

UNIVERSIDADE DE LISBOA
FACULDADE DE CIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA E BIOQUÍMICA



**Desenvolvimento de Metodologias Analíticas Inovadoras para
Análise Vestigial de Pesticidas Piretróides em Matrizes
Aquosas**

Renata Martinho Brochado Miguéis

Mestrado em Química
Especialização em Química Analítica

Dissertação orientada por:
Professor Doutor José Manuel Florêncio Nogueira

Don't limit your challenges, challenge your limits.

Agradecimentos

Em primeiro lugar, gostaria de expressar o meu mais profundo agradecimento ao Professor Doutor José Manuel Nogueira. Foi com enorme privilégio que integrei o seu grupo de investigação, onde pude desenvolver este trabalho com a autonomia que tanto valorizei, apoiada pelo seu rigor científico, paciência e dedicação incansável. A sua orientação atenta, os seus conselhos sábios e a constante disponibilidade foram fundamentais não só para o sucesso desta tese, mas para o meu crescimento académico e pessoal. Agradeço-lhe por acreditar no meu potencial, mesmo nos momentos em que eu mesma duvidava, e por me desafiar a ir além dos meus limites.

Às minhas colegas de curso, e em especial à Mariana, devo o meu sincero reconhecimento pela amizade genuína e pelo apoio constante. Foram muitos os momentos em que as nossas conversas, partilhas e risos me deram forças para continuar. A todas os membros do laboratório 8.2.48 – Maria, Marisa, Bruno e ao Prof. Nuno Neng – deixo a minha gratidão pela colaboração, pelo ambiente estimulante e pela amizade que ultrapassou as paredes da investigação.

À minha cidade, Aveiro, o lugar que sempre senti como meu lar, e aos meus amigos mais próximos que aqui me acompanharam, deixo um agradecimento caloroso. Às minhas colegas de casa na nossa humilde Casa do Povo — Fabi, Pipa e Maria — agradeço profundamente por todo o carinho, companheirismo e suporte emocional. Vocês estiveram comigo nos dias bons e maus, ajudando-me a encontrar equilíbrio e serenidade quando mais precisava. Ao Nuno, que é hoje o meu melhor amigo e uma presença constante de apoio, deixo um obrigado sentido. A tua amizade, confiança e incentivo foram luz nos momentos de maior desafio e cansaço.

À minha equipa de basquetebol, onde recentemente tive oportunidade de integrar. Foram vocês que, com o espírito de equipa, a disciplina e a paixão pelo jogo, me mostraram o poder da resiliência e da união. Durante a fase final deste trabalho, o vosso apoio e motivação foram uma fonte inestimável de energia, ajudando-me a manter o foco. Obrigada pela amizade e motivação.

Por fim, mas sem qualquer dúvida o mais importante, o meu agradecimento mais sentido vai para o meu pai. Sem o teu amor incondicional, sacrifício silencioso e apoio inabalável, nada disto teria sido possível. És o alicerce da minha vida, o exemplo constante de força e coragem que me inspira todos os dias. À minha família, ao meu irmão e aos meus avós, deixo o meu mais profundo amor e gratidão. Vocês são a base sólida sobre a qual construí os meus sonhos, e o vosso carinho e presença fizeram toda a diferença nesta caminhada. A cada um de vocês, o meu obrigado sincero por estarem sempre ao meu lado, nos momentos de conquista e nas dificuldades, mostrando-me o verdadeiro significado de amor e apoio.

A todos vocês um enorme agradecimento. Esta fase está concluída,
A vossa Renata é mestre.

Comunicações

Comunicações em painel:

R. Miguéis*, J.M.F. Nogueira, “Application of the innovative hollow fiber microextraction (HF μ E) to monitor trace levels of pyrethroids in aqueous matrices”. Apresentado no 13^o Encontro Nacional de Cromatografia, Lisboa, Portugal. 17 a 19 de dezembro de 2023.

R. Miguéis*, J.M.F. Nogueira, “Determination of trace levels of pyrethroids in water samples by hollow fiber microextraction (HF μ E)”. Apresentado no 6th CQE Days, Lisboa, Portugal. 18 e 19 de junho de 2024.

R. Miguéis*, J.M.F. Nogueira, “Hollow fiber microextraction (HF μ E) for the determination of trace levels of pyrethroids in water samples”. Apresentado 4th Chem & Biochem Student’s Meeting, Lisboa, Portugal. 27 de junho de 2024.

R. Miguéis*, J.M.F. Nogueira, “Sustainable Analytical Approaches for Trace Determination of Pyrethroids in Environmental Water Matrices”. Apresentado no 7th CQE Days, Lisboa, Portugal. 12 e 13 de maio de 2025.

Comunicações orais:

M. Matos*, N. Nunes, R. Miguéis, M.S. Santos, A.P. Carvalho, J. Coelho, A. Martins, “Mechanochemistry: an effective method to produce metal loaded HY catalysts for HDO reaction”. Apresentado 16^o Encontro Nacional de Química Física + V Simpósio de Química Computacional, Lisboa, Portugal. 17 a 19 de julho de 2024.

Resumo

A utilização excessiva de produtos fitofarmacêuticos na agricultura nas últimas décadas tem resultado na contaminação de recursos hídricos, impactando negativamente diversos ecossistemas. Os piretróides são compostos químicos pertencentes à classe dos inseticidas, amplamente utilizados atualmente para o controle de pragas de insetos. Apesar da baixa toxicidade que esta classe de fitofarmacêuticos apresenta, a utilização em larga escala promove a contaminação pela acumulação progressiva nos solos agrícolas e, conseqüentemente, a sua infiltração nas águas circundantes. Tendo em conta esta preocupação e em conformidade com as diretivas nacional e europeia, é imprescindível estabelecer metodologias analíticas eficazes e sensíveis para reduzir o consumo de alimentos e água contaminados por pesticidas que excedam os limites permitidos pela legislação vigente, minimizando assim os impactos negativos na saúde pública e ambiental.

O presente trabalho consistiu no desenvolvimento, por meio da otimização, validação e aplicação a matrizes reais, de uma abordagem analítica inovadora baseada nos princípios da química verde, alternativa aos métodos convencionais, para a determinação de sete piretróides (Aletrina, Tetrametrina, Bifentrina, Fenpropatrina, Lambda-Cialotrina, Cipermetrina e Fenvalerato). Para esse efeito, recorreu-se a microextração em fibra oca seguida de microdessorção líquida e cromatografia em fase gasosa acoplada a espectrometria de massa (HF μ E- μ LD/GC-MS(SIM)).

Neste sentido, foram estudados diversos parâmetros, tendo obtido as melhores condições experimentais otimizadas (microextração: *n*-C₇, 3 h (1600 rpm), pH 5,5, 5% MeOH; retroextração: *n*-C₇, 2 min sob agitação realizada por vortéx) foram alcançadas recuperações médias compreendidas entre 65,2 e 102,0 % com RSD < 8,8 %. A metodologia revelou, por meio de validação, excelente linearidade ($r^2 > 0,9956$) nas gamas lineares de concentração entre 0,02 e 10,00 $\mu\text{g L}^{-1}$. Foi alcançado limites de deteção e quantificação compreendidos entre 5,0 e 50,0 $\mu\text{g L}^{-1}$ e 15,0 e 150,0 $\mu\text{g L}^{-1}$, respetivamente. Recorrendo ao método de adição padrão, a metodologia otimizada e validada, foi aplicada a matrizes aquosas reais que evidenciaram excelentes linearidades ($r^2 > 0,9957$), não tendo sido detetado níveis vestigiais dos analitos nas matrizes (< LOD). Além disso, verificou-se a viabilidade da reutilização das fibras, sustentada por estudos de degradação dos compostos alvo e pela aplicação de um protocolo de lavagem otimizado, que garantiu tanto a preservação do desempenho analítico quanto a prevenção de contaminação cruzada entre os ciclos de uso.

A metodologia proposta evidenciou ser uma técnica alternativa para a análise vestigial de piretróides em amostras aquosas ambientais. Como principais vantagens destacam-se as pequenas quantidades de amostras utilizada, volumes negligenciáveis de solventes orgânicos, rápida cinética imposta, baixa relação custo-benefício, fácil manipulação e bom desempenho analítico para a monitorização de pesticidas piretróides em matrizes aquosas ambientais.

Palavras-Chave

Piretróides

Microextração em fibra oca (HF μ E)

Análise vestigial

GC-MS(SIM)

Matrizes aquosas ambientais

Abstract

The excessive use of plant protection products in agriculture over the past decades has led to the contamination of water resources, negatively impacting various ecosystems. Pyrethroids are chemical compounds belonging to the class of insecticides and are widely used for pest control. Despite their relatively low toxicity compared to other pesticides, large-scale application promotes contamination due to their progressive accumulation in agricultural soils, ultimately leading to their infiltration into surrounding water bodies. Given this concern and in compliance with national and European directives, it is essential to establish effective and sensitive analytical methodologies to minimize the consumption of food and water contaminated with pesticides exceeding the legal limits, thereby reducing the negative impacts on public and environmental health.

This study focused on the development, optimization, validation, and application of a novel analytical approach based on green chemistry principles as an alternative to conventional methods for the determination of seven pyrethroids (Allethrin, Tetramethrin, Biphentrin, Fenprothrin, Lambda-Cyhalothrin, Cypermethrin, and Fenvalerate). For such purpose, hollow fiber microextraction followed by liquid microdesorption and gas chromatography coupled with mass spectrometry (HF μ E- μ LD/GC-MS(SIM)) was employed.

Various parameters were tested to optimize the experimental conditions. The best optimized conditions obtained were as follows: microextraction in *n*-heptane (*n*-C₇), 3 h at 1600 rpm, pH 5.5, 5% MeOH; back-extraction – *n*-C₇, 2 min under vortex agitation. Under these conditions, average recoveries ranged from 65.2 to 102.0%, with RSD < 8.8%. The validated methodology demonstrated excellent linearity ($r^2 > 0.9956$) over concentration ranges of 0.02 to 10.00 $\mu\text{g L}^{-1}$. The limits of detection and quantification were determined to be 5.0 – 50.0 $\mu\text{g L}^{-1}$ and 15.0 – 150.0 $\mu\text{g L}^{-1}$, respectively. The optimized and validated method was applied to real water matrices using the standard addition method, yielding good linearities ($r^2 > 0.9957$), with no residual levels of the analytes detected in the matrices (< LOD). Furthermore, the feasibility of fiber reuse was demonstrated, supported by degradation studies of the target compounds and the application of an optimized washing protocol, which ensured both the preservation of analytical performance and the prevention of cross-contamination across multiple usage cycles.

The proposed methodology proved to be a viable alternative for trace analysis of pyrethroids in environmental water samples. The main advantages include the use of small sample volumes, negligible amounts of organic solvents, rapid kinetics, low cost, ease of handling, and excellent analytical performance, making it a promising approach for pesticide monitoring in environmental water analysis.

Keywords

Pyrethroids

Hollow fiber microextraction (HF μ E)

Trace analysis

GC-MS(SIM)

Environmental water matrices

Índice geral

1. INTRODUÇÃO TEÓRICA	1
1.1. Evolução temporal da utilização dos fitofarmacêuticos	3
1.2. Impacto dos fitofarmacêuticos no ambiente e na saúde	3
1.3. Legislação nacional e europeia em vigor	4
1.4. Definição e classificação dos produtos fitofarmacêuticos	5
1.5. Inseticidas: Piretróides	5
1.5.1. Propriedades físico-químicas	6
1.5.2. Contaminação ambiental e bioacumulação	9
1.5.3. Toxicidade humana e ecotoxicidade	10
1.6. Metodologias analíticas para a determinação de piretróides	11
1.6.1. Técnicas de microextração baseada em sólidos	12
1.6.1.1. Microextração em fase sólida (SPME)	12
1.6.1.2. Extração sortiva em barra de agitação (SBSE)	15
1.6.1.3. Microextração adsortiva em barra (BA μ E)	17
1.6.2. Técnicas de microextração baseada em líquidos	18
1.6.2.1. Microextração em gota única (SDME)	18
1.6.2.2. Microextração líquido-líquido dispersiva (DLLME)	19
1.6.2.3. Microextração em fase líquida com auxílio de fibras ocas (HF-LPME)	20
1.6.2.4. Microextração em fibra oca (HF μ E)	22
1.6.3. Técnicas Cromatográficas	23
1.6.3.1. Cromatografia em fase gasosa acoplada a espectrometria de massa (GC-MS)	25
1.7. Objetivos	29
2. PARTE EXPERIMENTAL	31
2.1. Reagentes, materiais e amostras	33
2.2. Instrumentação	33
2.3. Procedimento experimental	34
2.3.1. Preparação das soluções padrão	34
2.3.2. Condições instrumentais de análise	34
2.3.3. Calibração Instrumental	35
2.3.4. Preparação dos dispositivos de HF μ E	36

2.3.5. HF μ E/GC-MS	36
3. DISCUSSÃO DE RESULTADOS	39
3.1. Otimização das condições instrumentais de análise	41
3.1.1. Calibração instrumental	42
3.2. Otimização da metodologia HF μ E- μ LD	43
3.2.1. Seleção do solvente de extração e retroextração	43
3.2.2. Efeito do tempo de retroextração	44
3.2.3. Efeito da velocidade de agitação	46
3.2.4. Efeito do tempo de equilíbrio	47
3.2.5. Efeito do modificador orgânico	48
3.2.6. Efeito da força iônica	49
3.2.7. Dual-HF μ E	50
3.3. Reutilização dos dispositivos por HF μ E	51
3.4. Validação do método HF μ E(n-C ₇)- μ LD/GC-MS(SIM)	53
3.4.1. Limiares analíticos e linearidade	53
3.4.2. Precisão intra-dia e inter-dia	56
3.5. Aplicação a matrizes reais	57
3.5.1. Amostras de água subterrânea	57
3.5.2. Amostras de água para consumo humano	58
3.5.3. Amostras de água superficial	59
3.5.4. Amostras de água residual de ETAR	60
3.6. Aplicação na metodologia LVI-GC-MS(SIM)	62
3.7. Comparação com estudos anteriores	64
4. CONCLUSÃO E PERSPETIVAS FUTURAS	67
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	71
6. ANEXOS	81
Anexo I: Restrições nacionais e europeias para os piretróides em estudo	83
Anexo II: Equações	84
Anexo III: Espetros de massa dos piretróides em estudo obtidos por GC-MS	85
Anexo IV: Curvas de calibração instrumental (GC-MS)	88
Anexo V: Traçado de corrente iônica total para observação do isômero da ALL	91
Anexo VI: Traçado de corrente iônica total da extração por HF μ E(n-C ₉)	92

Anexo VII: Curvas de calibração da validação da metodologia HF μ E(n-C ₇)- μ LD/GC-MS(SIM) _____	93
Anexo VIII: Gráfico de dispersão residual das calibrações _____	96
Anexo IX: Traçados de corrente iónica total de ensaios sem fortificação das matrizes reais _____	99
Anexo X: Gráficos de comparação das diversas matrizes reais testadas _____	101
Anexo XI: Comparação de metodologias para análise vestigial de piretróide por técnicas de microextração _____	104

Índice de Figuras

Figura 1.1. Estrutura molecular genérica dos dois tipos de piretróides. A estrutura molecular (A) corresponde ao tipo I e a (B) corresponde ao tipo II [19].	7
Figura 1.2. Esquema simplificado do comportamento dos pesticidas no ambiente, em particular no ar, água e solo [25,26].	9
Figura 1.3. Esquema do dispositivo de SPME.	12
Figura 1.4. Esquema dos modos de extração da SPME. Na figura a) encontra-se o modo HS e na figura b) o modo DI. A ilustração foi criada com recurso ao endereço eletrónico https://biorender.com/ .	13
Figura 1.5. Representação do procedimento experimental da SPME por HS e posterior análise em GC. A ilustração foi criada com recurso ao endereço eletrónico https://biorender.com/ .	14
Figura 1.6. Esquema detalhado da composição do dispositivo de SBSE(PDMS).	15
Figura 1.7. Representação esquemática dos modos de operação relativos à extração [a) DI-SBSE; b) HS-SBSE] e retro-extração ou deserção [c) LD; d) TD] usados pela técnica SBSE. 1 - Vortéx formando pela agitação; 2 - Barra de agitação do SBSE; 3 - Amostra; 4 – Barra agitação de Teflon; 5 - HS; 6 - Frasco de amostragem; 7 - Vial de injeção (GC ou HPLC); 8 - Solvente para LD; 9 - Tubo de vidro para TD. A ilustração foi criada com recurso ao endereço eletrónico https://biorender.com/ .	16
Figura 1.8. Esquemática do dispositivo analítico utilização na BA μ E à esquerda e o modo de operação do processo extrativo por BA μ E à direita. 1- amostra; 2- dispositivo analítico BA μ E; 3 - barra de agitação magnética de Teflon; 4 - fraco de amostragem. A ilustração foi criada com recurso ao endereço eletrónico https://biorender.com/ .	17
Figura 1.9. Esquema da extração por SDME. Na figura a) encontra-se o modo DI e na figura b) o modo HS (artigo 1,3). A ilustração foi criada com recurso ao endereço eletrónico https://biorender.com/ .	19
Figura 1.10. Esquema do procedimento tradicional de microextração líquido-líquido dispersiva (DLLME); 1 - Seringa com solvente extrator e dispersos; 2 - Amostra aquosa; 3 - dispersão da mistura de solventes na amostra após a injeção rápida; 4 - colheita da fase orgânica [65,67]. A ilustração foi criada com recurso ao endereço eletrónico https://biorender.com/ .	20
Figura 1.11. Esquema dos modos de extração utilizados em HF-LPME [70]. A ilustração foi criada com recurso ao endereço eletrónico https://biorender.com/ .	21
Figura 1.12. Esquemática da malha do tudo do dispositivo analítico da HF μ E à esquerda e a análise do processo extrativo por HF μ E à direita. 1 - amostra; 2 - fraco de amostragem; 3 - dispositivo analítico HF μ E; 4 – barra magnética de Teflon. A ilustração foi criada com recurso ao endereço eletrónico https://biorender.com/ .	22

Figura 1.13. Representação esquemática de um cromatograma na separação dos compostos 1 e 2.	24
Figura 1.14. Esquematização da classificação de métodos de separação tendo por base três critérios: a natureza física da fase móvel, o suporte da fase estacionária e a natureza do mecanismo de separação.	25
Figura 1.15. Esquema detalhado do sistema GC-MS [80].	26
Figura 1.16. Comparação entre os injetores de vaporização isotérmica (sendo S e SL) e os com temperatura controlada (PTV) em cromatografia em fase gasosa.	26
Figura 1.17. Representação esquemática do sistema MS, desde a entrada dos analitos a partir da coluna capilar até à sua deteção.	28
Figura 2.1. Representação esquemática do procedimento experimental utilizado para a otimização da metodologia por HF μ E- μ LD/GC-MS. A ilustração foi criada com recurso ao endereço eletrónico https://biorender.com/ .	37
Figura 3.1. Traçado de corrente iónica obtido através da análise por GC-MS(SIM) da mistura de piretróides (2,5 mg L ⁻¹), nas condições instrumentais otimizadas. (1- ALL; 2- TET; 3 – BIF; 4- FEN; 5- CYH; 6-CYP; 7-FEV).	41
Figura 3.2. Efeito dos diferentes solventes extratantes na recuperação dos piretróides em estudo, obtidos por HF μ E- μ LD/GC-MS(SIM). Condições do ensaio: 25 mL de água desionizada fortificada com 10,0 μ g L ⁻¹ ; extração: 1 h (1000 rpm), pH 5,5; retro-extração: 5 min sob tratamento ultrassónico).	44
Figura 3.3. Efeito do tempo de retroextração na recuperação dos piretróides em estudo, obtidos por HF μ E(n-C ₉)- μ LD/GC-MS(SIM). Condições do ensaio: 25 mL de água desionizada fortificada com 10,0 μ g L ⁻¹ ; extração: 1 h (1000 rpm), pH 5,5; retro-extração: n-C ₉).	45
Figura 3.4. Efeito do tempo de retroextração na recuperação dos piretróides em estudo, obtidos por HF μ E(n-C ₇)- μ LD/GC-MS(SIM). Condições do ensaio: 25 mL de água desionizada fortificada com 10,0 μ g L ⁻¹ ; extração: 1 h (1000 rpm), pH 5,5; retro-extração: n-C ₇).	45
Figura 3.5. Efeito da velocidade de agitação na recuperação dos piretróides em estudo, obtidos por HF μ E(n-C ₉)- μ LD/GC-MS(SIM). Condições do ensaio: 25 mL de água desionizada fortificada com 10,0 μ g L ⁻¹ ; extração: 1 h, pH 5,5; retro-extração: n-C ₉ ; 2 min sob agitação por vortéx.	46
Figura 3.6. Efeito da velocidade de agitação na recuperação dos piretróides em estudo, obtidos por HF μ E(n-C ₇)- μ LD/GC-MS(SIM). Condições do ensaio: 25 mL de água desionizada fortificada com 10,0 μ g L ⁻¹ ; extração: 1 h, pH 5,5; retro-extração: n-C ₇ ; 2 min sob agitação por vortéx.	46
Figura 3.7. Efeito do tempo de equilíbrio na recuperação dos piretróides em estudo, obtidos por HF μ E(n-C ₉)- μ LD/GC-MS(SIM). Condições do ensaio: 25 mL de água desionizada fortificada com 10,0 μ g L ⁻¹ ; extração: 1600 rpm, pH 5,5; retro-extração: n-C ₉ ; 2 min sob agitação.	47

Figura 3.8. Efeito do tempo de equilíbrio na recuperação dos piretróides em estudo, obtidos por HF μ E(n-C ₇)- μ LD/GC-MS(SIM). Condições do ensaio: 25 mL de água desionizada fortificada com 10,0 μ g L ⁻¹ ; extração: 1600 rpm, pH 5,5; retro-extração: n-C ₇ ; 2 min sob agitação por vortéx.	47
Figura 3.9. Efeito do modificador orgânico (MeOH) na recuperação dos piretróides em estudo, obtidos por HF μ E(n-C ₇)- μ LD/GC-MS(SIM). Condições do ensaio: 25 mL de água desionizada fortificada com 10,0 μ g L ⁻¹ ; extração: 3h, 1600 rpm, pH 5,5; retro-extração: n-C ₇ ; 2 min sob agitação por vortéx.	48
Figura 3.10. Efeito da força iônica (NaCl) na recuperação dos piretróides em estudo, obtidos por HF μ E(n-C ₇)- μ LD/GC-MS(SIM). Condições do ensaio: 25 mL de água desionizada fortificada com 10,0 μ g L ⁻¹ ; extração: 3h, 1600 rpm, pH 5,5, 5% de MeOH; retro-extração: n-C ₇ ; 2 min sob agitação por vortéx.	49
Figura 3.11. Efeito da utilização de duas HFs (n-C ₇) e tempo de equilíbrio de 2 horas para os analitos em estudo, sob as restantes condições otimizadas.	50
Figura 3.12. Resultados obtidos da utilização de duas e três fibras, de diâmetro 200 μ m, comparativamente às otimizadas. Estes ensaios foram realizados a partir da metodologia HF μ E(n-C ₇)- μ LD/GC-MS(SIM), sob as condições anteriormente otimizadas.	51
Figura 3.13. Resultados obtidos da utilização das fibras reutilizadas, de diâmetro 600 μ m. Estes ensaios foram realizados a partir da metodologia HF μ E(n-C ₇)- μ LD/GC-MS(SIM), sob as condições anteriormente otimizadas.	52
Figura 3.14. Estudo do efeito dos processos de lavagem das fibras reutilizadas sob as condições otimizadas da metodologia HF μ E(n-C ₇)- μ LD/GC-MS(SIM).	53
Figura 3.15. Traçado de corrente iônica total relativo à amostra de água subterrânea fortificada a 0,2 μ g L ⁻¹ obtido por HF μ E(n-C ₇)- μ LD/GC-MS(SIM), nas condições experimentais otimizadas (1-ALL; 2-TET; 3-BIF; 4-FEN; 5-CYH; 6-CYP; 7-FEV).	58
Figura 3.16. Traçado de corrente iônica total relativo à amostra de água para consumo humano fortificada a 0,2 μ g L ⁻¹ obtido por HF μ E(n-C ₇)- μ LD/GC-MS(SIM), nas condições experimentais otimizadas (1-ALL; 2-TET; 3-BIF; 4-FEN; 5-CYH; 6-CYP; 7-FEV).	59
Figura 3.17. Traçado de corrente iônica total relativo à amostra de água superficial fortificada a 0,2 μ g L ⁻¹ obtido por HF μ E(n-C ₇)- μ LD/GC-MS(SIM), nas condições experimentais otimizadas (1-ALL; 2-TET; 3-BIF; 4-FEN; 5-CYH; 6-CYP; 7-FEV).	60
Figura 3.18. Traçado de corrente iônica total relativo à amostra de água residual (ETAR) fortificada a 0,2 μ g L ⁻¹ obtido por HF μ E(n-C ₇)- μ LD/GC-MS(SIM), nas condições experimentais otimizadas (1-ALL; 2-TET; 3-BIF; 4-FEN; 5-CYH; 6-CYP; 7-FEV).	61
Figura 3.19. Gráfico de comparação das curvas de calibração do composto FEN analisado nas diferentes matrizes reais aquosas.	62

Figura 3.20. Comparação dos traçados de corrente iônica dos íons 164 m/z (A) e 181 m/z (B) a 0,05 mg L⁻¹ (EtOAc) obtidos por SL-GC-MS(SIM) e LVI-GC-MS(SIM). Os piretróides identificados são 2 – TET, 3 – BIF e 4- FEN. _____ 63

Anexos

Figura III.1. Espectro de fragmentos de massa iônica característico do composto ALL. _____	85
Figura III.2. Espectro de fragmentos de massa iônica característico do composto TET. _____	85
Figura III.3. Espectro de fragmentos de massa iônica característico do composto BIF. _____	85
Figura III.4. Espectro de fragmentos de massa iônica característico do composto FEN. _____	86
Figura III.5. Espectro de fragmentos de massa iônica característico do composto CYH. _____	86
Figura III.6. Espectro de fragmentos de massa iônica característico do composto CYP. _____	86
Figura III.7. Espectro de fragmentos de massa iônica característico do composto FEV. _____	87
Figura IV.1. Curva de calibração instrumental do composto ALL. _____	88
Figura IV.2. Curva de calibração instrumental do composto TET. _____	88
Figura IV.3. Curva de calibração instrumental do composto BIF. _____	88
Figura IV.4. Curva de calibração instrumental do composto FEN. _____	89
Figura IV.5. Curva de calibração instrumental do composto CYH. _____	89
Figura IV.6. Curva de calibração instrumental do composto CYP. _____	89
Figura IV.7. Curva de calibração instrumental do composto FEV. _____	90
Figura V.1. Traçado de corrente iônica total da mistura padrão a 2,5 mg L ⁻¹ com ampliação do composto ALL, para observação do isômero formado _____	91
Figura VI.1. Traçado de corrente iônica total da análise dos piretróides em estudo obtido pela metodologia HFμE(n-C ₉)-μLD/GC-MS(SIM). _____	92
Figura VII.1. Curva de calibração obtida para ALL. _____	93
Figura VII.2. Curva de calibração obtida para TET. _____	93
Figura VII.3. Curva de calibração obtida para BIF. _____	93
Figura VII.4. Curva de calibração obtida para FEN. _____	94
Figura VII.5. Curva de calibração obtida para CYH. _____	94
Figura VII.6. Curva de calibração obtida para CYP. _____	94
Figura VII.7. Curva de calibração obtida para FEV. _____	95
Figura VIII.1. Gráfico de dispersão de resíduos obtida para ALL. _____	96
Figura VIII.2. Gráfico de dispersão de resíduos obtida para TET. _____	96

Figura VIII.3. Gráfico de dispersão de resíduos obtida para BIF. _____	96
Figura VIII.4. Gráfico de dispersão de resíduos obtida para FEN. _____	97
Figura VIII.5. Gráfico de dispersão de resíduos obtida para CYH. _____	97
Figura VIII.6. Gráfico de dispersão de resíduos obtida para CYP. _____	97
Figura VIII.7. Gráfico de dispersão de resíduos obtida para FEV. _____	98
Figura IX.1. Traçado de corrente iônica total do ensaio sem fortificação na matriz de água subterrânea, nas condições otimizadas da metodologia HF μ E(n-C ₇)- μ LD/GC-MS(SIM). ____	99
Figura IX.2. Traçado de corrente iônica total do ensaio sem fortificação na matriz de água de consumo humano, nas condições otimizadas da metodologia HF μ E(n-C ₇)- μ LD/GC-MS(SIM). _____	99
Figura IX.3. Traçado de corrente iônica total do ensaio sem fortificação na matriz de água superficial, nas condições otimizadas da metodologia HF μ E(n-C ₇)- μ LD/GC-MS(SIM). ____	100
Figura IX.4. Traçado de corrente iônica total do ensaio sem fortificação na matriz de água residual de ETAR, nas condições otimizadas da metodologia HF μ E(n-C ₇)- μ LD/GC-MS(SIM). _____	100
Figura X.1. Gráfico de comparação das curvas de calibração do composto ALL analisado nas diferentes matrizes reais aquosas. _____	101
Figura X.2. Gráfico de comparação das curvas de calibração do composto TET analisado nas diferentes matrizes reais aquosas. _____	101
Figura X.3. Gráfico de comparação das curvas de calibração do composto BIF analisado nas diferentes matrizes reais aquosas. _____	102
Figura X.4. Gráfico de comparação das curvas de calibração do composto CYH analisado nas diferentes matrizes reais aquosas. _____	102
Figura X.5. Gráfico de comparação das curvas de calibração do composto CYP analisado nas diferentes matrizes reais aquosas. _____	102
Figura X.6. Gráfico de comparação das curvas de calibração do composto FEV analisado nas diferentes matrizes reais aquosas. _____	103

Índice de Tabelas

Tabela 1.1. Tipos de produtos fitofarmacêuticos classificados de acordo com o organismo alvo [11]. _____	5
Tabela 1.2. Estruturas químicas e outras propriedades físicas e químicas de alguns piretróides. O símbolo “-“ significa, composto de uso proibido, em Portugal. _____	8
Tabela 3.1. Tempo de retenção (t_R) e iões selecionados para quantificação dos analitos em modo SIM. Estes valores foram obtidos por análise GC-MS, nas condições instrumentais otimizadas. _____	42
Tabela 3.2. Gama linear, coeficiente de determinação (r^2), limite de quantificação (LOQ) e limite de deteção (LOD) dos sete piretróides, obtidos por GC-MS(SIM), nas condições instrumentais otimizadas. _____	43
Tabela 3.3. Condições otimizadas para o método desenvolvido por HF μ E(n-C ₇)- μ LD/GC-MS(SIM). _____	50
Tabela 3.4. Recuperações médias dos analitos nas condições otimizadas obtidas por HF μ E(n-C ₇)- μ LD/GC-MS(SIM) e os respetivos RSD (%), calculados a partir de seis replicados. _____	51
Tabela 3.5. Processos de lavagem para a reutilização dos dispositivos de microextração por HF μ E. _____	52
Tabela 3.6. LODs e LOQs para os compostos alvo, obtidos na validação da metodologia HF μ E(n-C ₇)- μ LD/GC-MS(SIM). _____	54
Tabela 3.7. Parâmetros matemáticos relativos às gamas de trabalho dos sete piretróides, obtidos através da validação da presente metodologia. _____	54
Tabela 3.8. Valores correspondentes ao F_{tab} e F_{exp} determinados para os sete piretróides em estudo. _____	55
Tabela 3.9. Valores de recuperação e precisão obtidos em condições de repetibilidade (intra-dia) e de precisão intermédia (inter-dia) para os piretróides estudados através da metodologia por HF μ E(n-C ₇)- μ LD/GC-MS(SIM). Os três níveis de fortificação selecionados foram de 5,0 μ g L ⁻¹ (Alto) 2,0 μ g L ⁻¹ (Médio) e 0,20 μ g L ⁻¹ (Baixo). _____	56
Tabela 3.10. Parâmetros relativos às curvas de calibração obtidas por SAM para a amostra de água subterrânea obtida por HF μ E(n-C ₇)- μ LD/GC-MS(SIM), sob condições experimentais otimizadas (a – declive; b – ordenada na origem). _____	57
Tabela 3.11. Parâmetros relativos às curvas de calibração obtidas por SAM para a amostra de água para consumo humano obtida por HF μ E(n-C ₇)- μ LD/GC-MS(SIM), sob condições experimentais otimizadas (a – declive; b – ordenada na origem). _____	58
Tabela 3.12. Parâmetros relativos às curvas de calibração obtidas por SAM para a amostra de água superficial obtida por HF μ E(n-C ₇)- μ LD/GC-MS(SIM), sob condições experimentais otimizadas (a – declive; b – ordenada na origem). _____	59

Tabela 3.13. Parâmetros relativos às curvas de calibração obtidas por SAM para a amostra de água residual de ETAR obtida por HF μ E(n-C ₇)- μ LD/GC-MS(SIM), sob condições experimentais otimizadas (a – declive; b – ordenada na origem). _____	60
Tabela 3.14. Recuperações médias dos sete piretróides estudados obtidas aplicando a metodologia desenvolvida a águas subterrânea, para consumo humano, superficial e residual (ETAR). ____	61
Tabela 3.15. Valores de limiares analíticos, LOD e LOQ, da calibração instrumental dos piretróides em estudo para a metodologia LVI-GC-MS(SIM) e SL-GC-MS(SIM). _____	63
Tabela 3.16. Valores de limiares analíticos, LOD e LOQ, dos piretróides em estudo sob condições otimizadas da metodologia HF μ E(n-C ₇)- μ LD e utilização de LVI-GC-MS(SIM) e GC-MS(SIM), respetivamente. _____	64
Tabela 3.17. Comparação das técnicas de microextração estática mais utilizadas na análise de piretróides em matrizes aquosas, utilizando como instrumentação de análise o sistema GC. __	65

Anexos

Tabela I.1. Restrições nacionais e europeias para os piretróides em estudo. Para cada analito encontra-se apresentado a regulamentação e a aprovação ou não da utilização em território europeu e nacional. _____	83
---	----

Tabela XI.1. Comparação da metodologia desenvolvida com outros estudos para análise vestigial de piretróides em amostras aquosas. _____	104
---	-----

Abreviaturas, siglas e símbolos

AC	Carvão ativado (do inglês <i>Activated carbon</i>)
ACe	Acetona
ACN	Acetonitrilo
ALL	Aletrina
BA μ E	Microextração adsortiva em barra (do inglês <i>Bar adsortive microextraction</i>)
BIF	Bifentrina
CE	Eletroforese Capilar (do inglês <i>Capillary electrophoresis</i>)
CYH	Lambda-Cialotrina
CYP	Cipermetrina
DCM	Diclorometano
DDT	Dicloro-difenil-tricloroetano
DGAV	Direção Geral de Alimentação e Veterinário
DI	Imersão Direta (do inglês <i>Direct immersion</i>)
DLLME	Microextração líquido-líquido dispersiva (do inglês <i>Dispersive liquid-liquid microextraction</i>)
EEA	Agência Ambiental Europeia (do inglês <i>European Environment Agency</i>)
EI	Eletro-ionização
EPA	Agência de Proteção Ambiental (do inglês <i>Environmental Protection Agency</i>)
ETAR	Estação de tratamento de águas residuais
EtOH	Etanol
EU	União Europeia (do inglês <i>European Union</i>)
FEN	Fenpropatrina
FEV	Fenvalerato
GC	Cromatografia em fase gasosa (do inglês <i>Gas chromatography</i>)
GC-MS	Cromatografia em fases gasosa acoplada a espectrometria de massa (do inglês <i>Gas chromatography – mass spectrometry</i>)
HF-LPME	Microextração em fase líquida com fibras ocas (do inglês <i>Hollow fiber-based liquid phase microextraction</i>)
HF μ E	Microextração em fibra oca (do inglês <i>Hollow fiber microextraction</i>)
HPLC	Cromatografia líquida de alta eficiência (do inglês <i>High performance liquid chromatography</i>)
HS	Espaço de cabeça (do inglês <i>headspace</i>)

LC	Cromatografia em fase líquida (do inglês <i>Liquid chromatography</i>)
LD	Dessorção líquida (do inglês <i>Liquid desorption</i>)
LLE	Extração líquido-líquido (do inglês <i>Liquid-liquid extraction</i>)
LLOQ	Limite de quantificação baixo (do inglês <i>lower limit of quantification</i>)
LOD	Limite de detecção (do inglês <i>limit of detection</i>)
LOQ	Limite de quantificação (do inglês <i>limit of quantification</i>)
LVI	Injeção de grandes volumes (do inglês <i>Large volume injection</i>)
MeOH	Metanol
MS	Espetrometria de massa (do inglês <i>Mass spectrometry</i>)
NaCl	Cloreto de sódio
<i>n</i> -C ₆	Hexano
<i>n</i> -C ₇	Heptano
<i>n</i> -C ₈	Octano
<i>n</i> -C ₉	Nonano
OCP	Organoclorados
OPP	Organofosforados
OVAT	Otimização univariada (do inglês <i>One-factor-at-a-time method</i>)
PDMS	Polidimetilsiloxano
PE	Poliétileno
PP	Polipropileno
PTFE	Politetrafluoretileno
PTV	Vaporização por temperatura programada (do inglês <i>Programmable Temperature Vaporizing</i>)
RSD	Desvio padrão relativo (do inglês <i>Relative standard deviation</i>)
S	Split
S/N	Razão sinal/ruído
SAM	Método de adição padrão (do inglês <i>Standard addition method</i>)
SBSE	Extração sortiva em barra de agitação (do inglês <i>Stir bar sorptive extraction</i>)
SDME	Microextração em gota única (do inglês <i>Single-Drop Microextraction</i>)
SIM	Monitorização de iões seleccionados (do inglês <i>Selected ion monitoring</i>)
SL	Splitless
SPE	Extração em fase sólida (do inglês <i>Solid phase extraction</i>)
SPME	Microextração em fase sólida (do inglês <i>Solid phase microextraction</i>)
TD	Dessorção térmica (do inglês <i>Thermal desorption</i>)

TET	Tetrametrina
Tol	Tolueno
USA	Estados Unidos da América (do inglês <i>United States of America</i>)
VMA	Valor máximo admissível
a	Declive da reta
α	Seletividade
pH	Simétrico do logaritmo decimal da concentração de hidrogeniões
b	Interseção da reta no eixo das abcissas
F_{tab}	Valor F tabelado
F_{exp}	Valor F experimental
k'	Fator de capacidade
$K_{O/W}$	Coefficiente de partição octanol-água
MM	Massa molar
N	Número de pratos teóricos
R_s	Resolução
t'_R	Tempo de retenção ajustado
t_R	Tempo de retenção
t_M	Tempo morto
W	Largura da base de um pico num cromatograma
$K_{PDMS/W}$	Coefficiente de partição PDMS-água
V_{PDMS}	Volume em PDMS
V_W	Volume de amostra aquosa
%	Porcentagem
°C	Graus Celsius
μL	Microlitro
h	Hora
m/z	Razão massa/carga
min	Minuto
rpm	Rotações por minuto
eV	Elétrão-Volt
\emptyset	Diâmetro

1. Introdução teórica

1.1. Evolução temporal da utilização dos fitofarmacêuticos

Após o aparecimento dos produtos fitofarmacêuticos, a sua utilização tornou-se crucial para a agricultura, conferindo vantagens pelo controlo das ameaças biológicas que prejudicam o desenvolvimento dos produtos alimentares. Atualmente, o avanço tecnológico da ciência e aumento da população mundial, despoletou um crescimento exponencial da utilização destes compostos químicos principalmente em zonas agrícolas, contribuindo para o impacto negativo ambiental e na saúde pública [1-3].

Os primeiros produtos fitofarmacêuticos administrados eram de origem natural, pelo que na segunda metade do século XIX, foram descobertos os primeiros compostos inorgânicos à base de arsénio e cobre com efeitos inseticidas, designados por “Verde de Paris” [4]. De facto, a Segunda Guerra Mundial contribuiu para o avanço da química, marcado pela introdução de novos fitofarmacêuticos de origem sintética, dos quais fazem parte o DDT (dicloro-difenil-tricloroetano). O DDT, apesar de ter sido sintetizado por Othmar Zeidler em 1874, foi o químico Paul Müller que descobriu as propriedades inseticidas deste organoclorado (OCP) em 1939. Desde então, este composto passou a ser utilizado em larga escala na agricultura, mas também no controlo de transmissão vetorial da malária. Com o avanço da industrialização, os estudos sobre novos produtos fitofarmacêuticos evoluíram progressivamente, resultando na descoberta de uma variedade de compostos pertencentes a diferentes classes e com distintos modos de ação nos organismos-alvo, entre os quais se destacam os OCPs. Esses compostos foram amplamente disseminados globalmente devido às suas propriedades que favoreciam o aumento da produção agrícola. Contudo, a sua utilização indiscriminada levantou, posteriormente, diversos problemas ambientais [4,5].

No final da década de 60, surgiram os primeiros estudos sobre as propriedades dos organoclorados, que foram identificados como poluentes persistentes tanto no organismo quanto no ambiente, devido à elevada toxicidade e bioacumulação, especialmente nos ecossistemas aquáticos. Em 1970, organizações internacionais, incluindo a Agência de Proteção Ambiental (EPA, do inglês *Environmental Protection Agency*), implementaram as primeiras regulamentações que proibiram o uso de OCPs [4-6]. Desde então, novos compostos fitofarmacêuticos com menor toxicidade e persistência ambiental, como os organofosforados, carbamatos e, mais recentemente, os piretróides, foram introduzidos no mercado, especialmente na classe dos inseticidas [6-8]. Embora esses novos compostos apresentem vantagens em relação aos OCPs, atualmente também suscitam preocupações ambientais e têm sido alvo de algumas restrições legislativas (anexo I).

1.2. Impacto dos fitofarmacêuticos no ambiente e na saúde

Com o avanço da industrialização e o conseqüente aumento da produção agrícola, houve uma expansão significativa no uso de produtos fitofarmacêuticos. Estes componentes, assim como outros compostos químicos, oferecem benefícios esperados, neste caso, o aumento da produtividade agrícola por meio do combate a agentes indesejados. Estes novos fitofarmacêuticos, apesar de apresentarem menor toxicidade em comparação aos anteriormente utilizados (OCPs), a ampla utilização global, especialmente no setor agrícola, acarreta conseqüências ambientais e de saúde significativas. Quando aplicados em grandes quantidades, esses compostos podem alcançar elevadas concentrações nos diversos recursos ambientais,

resultando em bioacumulação e, por meio de diversos vetores, prejudicando organismos não-alvo e a saúde humana [7,8,1].

De acordo com a Agência Europeia de Ambiente (EEA, do inglês *Environmental European Agency*), em 2020, foram comercializadas 350.000 toneladas de produtos fitofarmacêuticos na EU [8]. A crescente preocupação mundial está centrada no impacto ambiental e humano desses compostos, uma vez que a poluição gerada pela utilização promove a perda de biodiversidade, destruindo microrganismos e nutrientes benéficos à fertilidade do solo [9]. Dessa forma, enquanto os fitofarmacêuticos procuram promover um efeito desejado no controlo de pragas, a utilização indiscriminada resulta em contaminação do meio envolvente. Como consequência, a exposição direta a alimentos, água potável ou regiões agrícolas contaminadas com esses produtos fitofarmacêuticos constitui uma fonte difusa de intoxicação da saúde pública e declínio de populações [3,5,9].

Embora os produtos fitofarmacêuticos tenham melhorado a eficiência agrícola, impõem desafios ambientais e toxicológicos substanciais. Assim, é imperativo o desenvolvimento de métodos analíticos para monitorizar a presença em diversas matrizes ambientais, com o objetivo de mitigar os impactos adversos e proporcionar uma resposta eficaz a esta problemática.

1.3. Legislação nacional e europeia em vigor

Em Portugal, cerca de 70% da água para consumo humano provém de águas subterrâneas e superficiais. Assim sendo, o arrastamento de resíduos de produtos de fitofarmacêuticos através do perfil do solo é a principal via de contaminação deste bem essencial. Focado o estudo em amostras das águas circundantes para o consumo humano e/ou utilização das mesmas na produção agrícola, este subcapítulo tende a apresentar as legislações nacional e europeia que decretam a regulamentação de controlo não só das águas para consumo humano, assim como, a qualidade mínima das águas subterrâneas e superficiais, utilizadas posteriormente como águas de rega, para produção agrícola e consumo humano.

De acordo com a Diretiva (EU) 2020/2184 do Parlamento e do Conselho Europeu, de 16 de dezembro, e o Decreto-Lei nº 306/2007, de 27 de agosto, destinada ao controlo da qualidade da água para consumo humano, visa proteger a saúde humana dos efeitos nocivos resultantes de qualquer contaminação. O quadro jurídico estabelecido admite como valores máximos admissíveis (VMA) para a deteção das substâncias ativas de produtos fitofarmacêuticos entre 0,1 $\mu\text{g L}^{-1}$ e 0,5 $\mu\text{g L}^{-1}$, na deteção de uma única substância ou na sua totalidade, respetivamente.

Relativamente às águas circundantes, o Decreto-Lei n.º 208/2008 de 28 de outubro, descreve que a água subterrânea: “é um recurso natural valioso que, enquanto tal, deve ser protegida da deterioração e da poluição química. Essa proteção é particularmente importante no que respeita aos ecossistemas dependentes da água subterrânea e à utilização desta para o abastecimento de água destinada ao consumo humano.”

Desta forma, o regime de proteção de águas subterrâneas contra a poluição e deterioração, transpondo a ordem jurídica interna da Diretiva 2006/118/CE do Parlamento e Conselho Europeu de 12 de dezembro, decreta VMA para substâncias ativas de pesticidas tal como descrito anteriormente. Por conseguinte, a qualidade mínima das águas superficiais é

regulamentada pelo Decreto-lei nº 236/98, de 1 agosto, que abrange as águas superficiais destinadas a consumo humano, águas superficiais destinadas ao suporte da vida aquícola e águas de rega. Este diploma estabelece normas, critérios e objetivos de qualidade com a finalidade de proteger o meio aquático e melhorar a qualidade das águas em função dos seus principais usos. Para as águas destinadas ao consumo humano, são aplicados os valores descritos anteriormente, embora, esta legislação defina os objetivos ambientais de qualidade mínima para as águas superficiais que não são destinadas ao consumo humano. Neste sentido, os VMA para a deteção de substâncias ativas de pesticidas é de $0,5 \mu\text{g L}^{-1}$ para uma única substância e de $2,5 \mu\text{g L}^{-1}$ para a soma total das substâncias detetadas.

1.4. Definição e classificação dos produtos fitofarmacêuticos

Segundo a Diretiva 91/414/CEE do Conselho Europeu, são intitulados de produtos fitofarmacêuticos:

“... as substâncias químicas ativas e as preparações contendo uma ou mais substâncias ativas que sejam apresentadas sob a forma em que são fornecidas ao utilizador e se destinem a proteger os vegetais ou os produtos vegetais de todos os organismos prejudiciais ou a impedir a sua ação, desde que essas substâncias ou preparações não estejam a seguir definidas de outro modo; (...)”.

Em termos simplificados, os produtos fitofarmacêuticos, amplamente referidos como pesticidas ou agroquímicos, consistem em compostos naturais ou sintéticos destinados ao controlo de pragas ou outras ameaças biológicas. A principal finalidade prende-se com proteção das culturas, garantindo a quantidade e a qualidade da produção agrícola. Relativamente à sua classificação, existem diversas formas de agrupar, sendo a classificação de acordo com o organismo alvo a mais comumente utilizada [11]. Deste modo, na tabela 1.1 encontram-se descritas as principais classes geralmente reportadas, entre outras.

Tabela 1.1. Tipos de produtos fitofarmacêuticos classificados de acordo com o organismo alvo [11].

Classe	Organismo Alvo
Fungicidas	Controlo de fungos
Inseticidas	Controlo de insetos
Acaricidas	Controlo de ácaros
Herbicidas	Controlo de ervas classificadas como infestantes
Rodenticidas	Controlo de roedores
Bactericidas	Controlo de bactérias

1.5. Inseticidas: Piretróides

A utilização de inseticidas é considerada indispensável para o aumento da produtividade no setor agrícola, dado que os insetos são responsáveis por perdas significativas durante a etapa de produção. Enquanto classe, os inseticidas devem exibir dois parâmetros cruciais: (i) especificidade para os insetos alvo; (ii) baixa toxicidade para os restantes seres vivos (baixo LD_{50}) [12,13].

Nesse contexto, uma das classificações amplamente discutidas na literatura baseia-se na estrutura química dos compostos, destacando-se quatro principais grupos: OCPs, organofosforados (OPPs), carbamatos e piretróides. Com o surgimento de organizações voltadas ao controle ambiental, a utilização de OCPs foi proibida devido à sua elevada persistência no ambiente. Como alternativa, as classes dos OPPs e carbamatos passaram a substituir os OCPs, embora atualmente alguns compostos também tenham sido banidos devido à elevada toxicidade que apresentam [12]. Nesse contexto, os piretróides emergiram como uma nova classe de fitofarmacêuticos, posicionando-se como uma alternativa aos inseticidas anteriormente utilizados. Inicialmente, após a Segunda Guerra Mundial, os piretróides foram utilizados como componentes ativos em repelentes. Contudo, a partir da década de 70, começaram a ser amplamente introduzidos na agricultura, devido às características favoráveis, nomeadamente baixa toxicidade e elevada biodegradabilidade [14,16].

De acordo com a Direção-Geral de Alimentação e Veterinária (DGAV), Portugal registou, em 2021, a venda de 9.608.978 kg de produtos fitofarmacêuticos, dos quais 3% correspondem a inseticidas, sendo os piretróides a classe mais comercializada dentro deste grupo [17]. Em escala global, o consumo dessas substâncias apresenta algumas variações: dos 4 milhões de toneladas de produtos fitofarmacêuticos consumidos anualmente, cerca de 30% são inseticidas [8].

Os piretróides têm sido amplamente utilizados como inseticidas no setor agrícola e continuam a ser utilizados em aplicações domésticas, como repelentes em ambientes internos, incluindo residências, armazéns e edifícios agrícolas e setores públicos [13]. Contudo, o uso indiscriminado desses compostos tem gerado crescente preocupação em relação à contaminação ambiental. Embora os piretróides apresentem baixa toxicidade aguda, seu uso frequente contribui para a bioacumulação nos ecossistemas, causando impactos prejudiciais aos seres vivos, conforme relatado na literatura [12-14].

Diante dessas questões, torna-se essencial adotar medidas de prevenção e controle no uso dos piretróides, bem como implementar métodos eficazes para monitorizar amostras ambientais contaminadas, visando minimizar os impactos adversos ao meio ambiente e à saúde humana [13].

1.5.1. Propriedades físico-químicas

Os piretróides são derivados sintéticos das piretrinas, toxinas naturais extraídas das flores *Tanacetum cinerariifolium*. A estrutura molecular é caracterizada por uma ligação éster, frequentemente acompanhada pela presença de um anel ciclopropano como substituinte da cadeia R1. Estes compostos podem ser classificados em dois grupos principais: tipo I e tipo II. A principal diferença entre estes reside na adição de um grupo ciano ($C \equiv N$) na posição α nos compostos do tipo II, conforme demonstrado na figura 1.1 [14,18,19].

Em 1949, a aletrina tornou-se o primeiro piretróide sintético a ser comercializado, pertencente ao tipo I (tabela 1.2). Embora os piretróides do tipo I tenham representado um avanço significativo, apresentavam limitações importantes, como alta fotossensibilidade, que restringia sua aplicação na agricultura. Porém, após atingirem o solo, demonstravam persistência no meio [15].

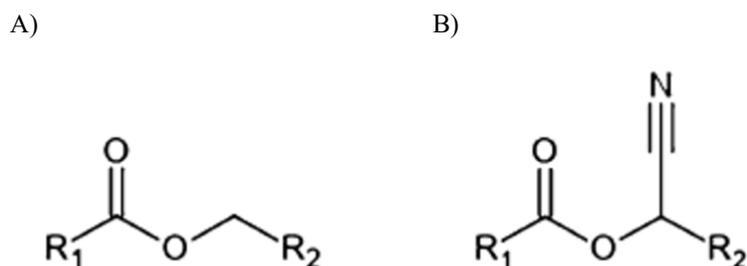


Figura 1.1. Estrutura molecular genérica dos dois tipos de piretróides. A estrutura molecular (A) corresponde ao tipo I e a (B) corresponde ao tipo II [19].

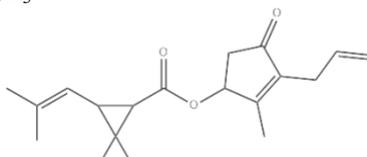
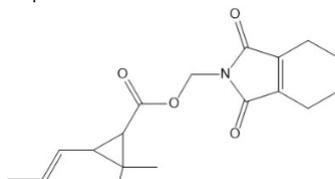
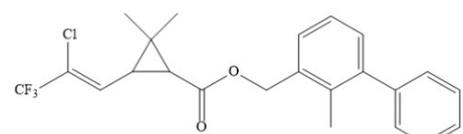
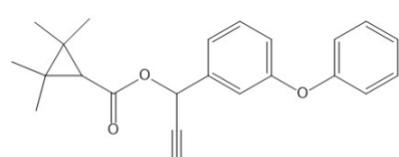
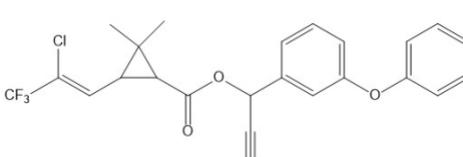
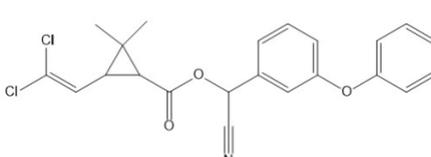
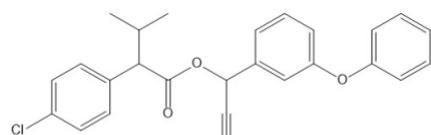
Para superar estas limitações, modificações moleculares foram introduzidas progressivamente, com o objetivo de aumentar a atividade inseticida e a fotoestabilidade. Neste contexto, a adição de um grupo ciano resultou num aumento significativo do potencial de ação inseticida destes compostos [14,18,19]. Devido à conjugação do anel ciclopropano e do grupo ciano, a maioria das estruturas moleculares dos piretróides contém dois a três átomos de carbono assimétricos, conferindo elevada quiralidade, promovendo a formação de isómeros, incluindo enantiómeros e diastereoisómeros, ampliando a complexidade das suas estruturas moleculares [19].

As propriedades químicas dos piretróides estão intimamente relacionadas à sua elevada hidrofobicidade, com valores de logaritmo do coeficiente de partição octanol-água ($\log K_{ow}$) entre 4 e 7, volatilidade intermédia e baixa solubilidade em água (na ordem de alguns $\mu\text{g L}^{-1}$). Essas características favorecem uma rápida cinética de adsorção a partículas sólidas, como sedimentos, o que contribui para sua persistência em águas subterrâneas e ecossistemas aquáticos [20].

Do ponto de vista físico-químico, os piretróides apresentam menor toxicidade em comparação com outros compostos, pois, apesar de termoestáveis, são fotossensíveis e degradam-se sob exposição solar. Estudos indicam que a sensibilidade à luz varia conforme a estrutura molecular, resultando em tempos de meia-vida em água que podem variar amplamente, de 0,67 a 600 dias [12,21]. No entanto, no interior de solos, plantas e ambientes aquáticos, diversos estudos demonstram a degradação de piretróides por microrganismos, como *Acremonium*, *Aspergillus*, *Microsphaeropsis*, *Westerdykella* e *Pseudomonas*. Apesar disso, os piretróides de formulação mais recente tendem a persistir no ambiente por vários meses antes de serem completamente degradados [20,22].

De acordo com as estruturas moleculares, são piretróides do tipo I a aletrina, bifentrina, bioresmetrina, resmetrina, teflutrina, tetrametrina, D-fenotrina e permetrina. Enquanto os produtos fitofarmacêuticos piretróides tipo II são a ciflutrina, cialotrina, cipermetrina, deltametrina, fenvalerato, fenpropatrina, flumetrina, fluvalinato e tralometrina [14]. Na tabela 1.2, encontra-se a informação estrutural e química de alguns compostos piretróides.

Tabela 1.2. Estruturas químicas e outras propriedades físicas e químicas de alguns piretróides. O símbolo “-” significa, composto de uso proibido, em Portugal.

Composto (Tipo)	Estrutura molecular	Log $K_{o/w}$ ⁽¹⁾	MM (g/mol)	Uso ⁽²⁾
Aletrina (I)	<chem>C19H26O3</chem> 	4,8	302,4	-
Tetrametrina (I)	<chem>C19H25NO4</chem> 	4,6	331,4	Doméstico
Bifentrina (I)	<chem>C23H22ClF3O2</chem> 	6,0	422,9	Agrícola
Fenpropatrina (II)	<chem>C22H23NO3</chem> 	5,7	349,4	-
Lambda-Cialotrina (II)	<chem>C23H19ClF3NO3</chem> 	6,1	449,8	Agrícola
Cipermetrina (II)	<chem>C22H19Cl2NO3</chem> 	6,0	416,3	Agrícola
Fenvalerato (II)	<chem>C25H22ClNO3</chem> 	6,2	419,9	-

⁽¹⁾ Log $K_{o/w}$ calculado pelo software computacional XlogP3 3.0; ⁽²⁾ Avaliação das restrições no anexo I;

1.5.2. Contaminação ambiental e bioacumulação

Conforme relatado anteriormente, os piretróides acumulam-se em diversos compartimentos ambientais, incluindo solo, água, sedimentos, biota e ar. Esta acumulação poderá levar a efeitos de toxicidade significativa. Concentrações elevadas nos ecossistemas não apenas intensificam a contaminação ambiental, mas também impactam negativamente o desenvolvimento vegetal, comprometendo o crescimento das plantas e, conseqüentemente, contribuem para o declínio da produção de alimentos [4,23-25].

Após a aplicação de piretróides por pulverização em setores agrícolas ou públicos (por exemplo, parques, jardins e áreas urbanas), a maior parte dos resíduos deposita-se no solo. Devido à elevada hidrofobicidade e baixa solubilidade em água, esses compostos apresentam forte afinidade por partículas coloidais presentes no solo, sendo rapidamente adsorvidos. No entanto, a movimentação natural de sedimentos facilita a difusão para sistemas aquáticos.

Conforme ilustrado pela figura 1.2, a poluição das águas superficiais ocorre predominantemente por mecanismos de escoamento superficial, arrastamento pelo vento ou contato com solos e sedimentos contaminados, sendo o escoamento a principal via de transporte para a conseqüente acumulação [4,19,25]. Além disso, devido à continuidade hidrogeológica entre águas subterrâneas e superficiais, os piretróides podem migrar entre esses sistemas por meio de processos de lixiviação [23-25]. Esse cenário ressalta a importância do controle da contaminação hídrica, especialmente considerando que, em Portugal, 53% da água potável é proveniente de águas subterrâneas. A presença de piretróides nesses recursos pode ter implicações significativas para a saúde pública [4].

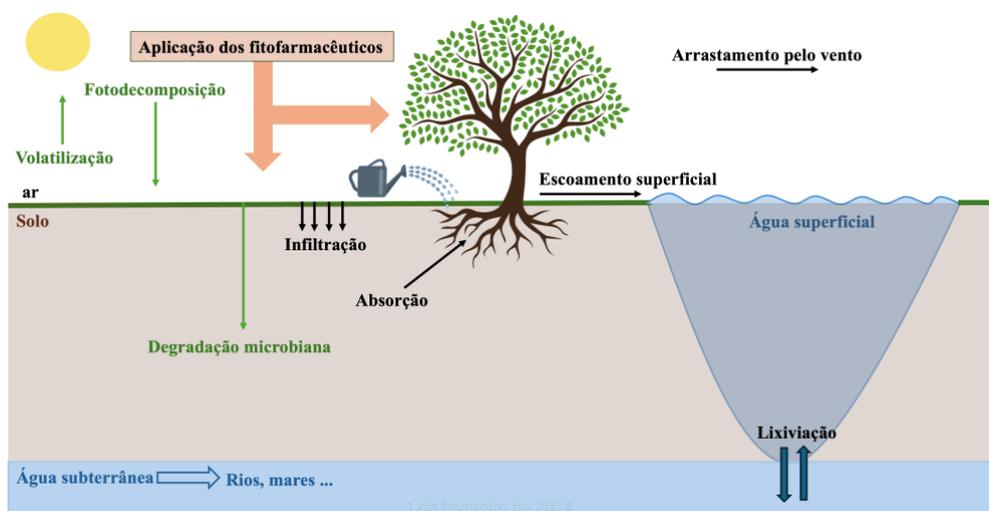


Figura 1.2. Esquema simplificado do comportamento dos pesticidas no ambiente, em particular no ar, água e solo [25,26].

De forma geral, os piretróides apresentam um tempo de semi-vida curto no ambiente, isto é, são facilmente degradados, por mecanismo de fotodecomposição, volatilização ou por degradação química ou microbiana (conforme descrito no ponto 1.5.1.), quando do contacto com o solo [24,25]. Apesar desta característica, a literatura destaca que a utilização em larga escala afeta diversas formas de vida, como plantas, peixes, insetos aquáticos, populações microbianas e insetos não alvo, resultando num desequilíbrio de nitrogénio, comprometendo fatores reguladores

e prejudicando a flora local, podendo suscitar preocupações quanto à biodiversidade e saúde pública [19].

1.5.3. Toxicidade humana e ecotoxicidade

Relativamente à toxicidade, os piretróides são geralmente considerados menos tóxicos para os seres humanos do que outros grupos de fitofarmacêuticos, tais como os OPPs ou os carbamatos. Contudo, a ampla aplicação, quer em contextos domésticos, do quais repelentes e inseticidas de uso interior, quer em ambientes agrícolas, tem gerado crescente preocupação quanto aos seus efeitos adversos na saúde humana e nos ecossistemas [22,27]. A exposição humana pode ocorrer por diferentes vias, nomeadamente por via oral, através da ingestão de alimentos ou água contaminados, por via inalatória, pela respiração de partículas em ambientes recém pulverizados, ou por via dérmica, particularmente no manuseamento ocupacional de produtos contendo estes compostos [13,28].

Conforme descrito no ponto 1.5.1., os piretróides podem ser classificados em dois grupos principais: tipo I, que não possuem o grupo ciano na sua estrutura química, e tipo II, que contém o grupo funcional (-CN). Esta distinção estrutural influencia diretamente o perfil toxicológico dos compostos [29]. Os piretróides do tipo I tendem a provocar efeitos agudos menos graves, como irritações cutâneas e oculares, sendo geralmente reversíveis. No entanto, a exposição prolongada, particularmente por ingestão, pode induzir alterações hepáticas, como a hipertrofia do fígado [30]. Já os piretróides do tipo II estão associados a efeitos mais severos, sobretudo de natureza neurotóxica. A presença do grupo ciano potencia a ação sobre o sistema nervoso, interferindo com os canais de sódio dependentes de voltagem, fundamentais para a propagação dos impulsos nervosos. Estes compostos prolongam a abertura desses canais, provocando um aumento da permeabilidade ao sódio e uma excitação neuronal contínua, o que pode resultar em sintomas como tremores, convulsões, hiperexcitabilidade muscular e, em casos extremos, paralisia ou morte [22].

A toxicidade aguda dos piretróides é frequentemente expressa através da dose letal média (LD₅₀). Embora os valores variem consoante o composto específico, a via de exposição e o modelo animal utilizado, os piretróides apresentam, de forma geral, uma LD₅₀ oral em ratos entre 200 e 5000 mg kg⁻¹, sendo o valor médio estimado de aproximadamente 1000 mg kg⁻¹. De acordo com a classificação da EPA, estes valores enquadram os piretróides como compostos de baixa a moderada toxicidade aguda para os humanos [13,14].

Apesar do seu perfil toxicológico relativamente favorável em mamíferos, os piretróides são altamente tóxicos para organismos aquáticos, o que levanta sérias preocupações do ponto de vista ecotoxicológico. A sua elevada hidrofobicidade favorece a bioacumulação e a persistência nos sedimentos aquáticos, prolongando os seus efeitos tóxicos no ambiente. Espécies como *Oncorhynchus mykiss* (truta arco-íris) e *Daphnia magna* apresentam valores de concentração letal média (CL₅₀) extremamente baixos quando expostas a piretróides, com a cipermetrina a apresentar, por exemplo, uma CL₅₀ de apenas 0,4 µg L⁻¹ para trutas. Este elevado grau de toxicidade em concentrações reduzidas pode comprometer significativamente a biodiversidade e o equilíbrio ecológico dos ecossistemas aquáticos, afetando organismos não-alvo e as cadeias tróficas associadas [27,29,31].

1.6. Metodologias analíticas para a determinação de piretróides

Os produtos fitofarmacêuticos são compostos que, predominantemente, têm sido encontrados nos diversos recursos hídricos. Desde as últimas décadas, as restrições e controles destes resíduos tem sido estabelecido especialmente na EU. A crescente utilização de fitofarmacêuticos da classe dos piretróides tem sido preocupante, na medida em que diversos estudos têm sido publicados sobre metodologias analíticas para a sua quantificação. De acordo com as ordens jurídicas descrita no capítulo 1.3., a metodologia de preferência para a deteção e quantificação destes analitos é a cromatografia em fase gasosa (GC, do inglês *Gas Chromatography*) (Decreto-lei nº 306/2007 e Diretiva UE 2020/2184). Portanto, o principal foco do desenvolvimento de metodologia analítica para a determinação de vestigial piretróides está na preparação da amostra, visando obter sensibilidade e seletividade na posterior análise instrumental [19].

Sabendo que, qualquer processo analítico tem início com a recolha da amostra através de um processo de amostragem adequado, sendo posteriormente seguido da etapa de preservação por forma a garantir a integridade dos compostos e das suas características físicas-químicas. Todavia, antes da análise instrumental, é necessário um passo crucial de preparação da amostra, que permite extrair e concentrar o analito das matrizes da amostra [32]. Como consequência, os analitos são isolados seletivamente da matriz, e enriquecidos por forma a reduzir os limiares analíticos e a tornar possível a identificação e quantificação, sendo crucial em análise vestigial [19,32].

Nas últimas décadas, este processo tem sido maioritariamente realizado com recurso às técnicas de extração bem consolidadas, extração em fase sólida (SPE, do inglês *Solid Phase Extraction*) e extração líquido-líquido (LLE, do inglês *Liquid-Liquid Extraction*) que exigem de elevados volumes de solventes orgânicos e recursos, fonte de impacto negativo sobre o ambiente [34]. Recentemente, emergiu um novo conceito de química sustentável, onde o investigador Paulo Anastas reconheceu o papel fundamental do desenvolvimento de métodos analíticos e atribuiu o ramo *Green Analytical Chemistry* como uma área emergente na sustentabilidade. Desde então, começaram a surgir as primeiras técnicas de microextração, desenvolvidas com objetivo de atender às necessidades analíticas e aos desafios colocados pelos princípios da Química Verde [33,34].

A classificação das técnicas de microextração pode ser influenciada por diversos fatores, destacando-se dois tipos principais, nomeadamente a microextração sortiva baseada em sólidos e em líquidos. Estes métodos empregam dispositivos configurados para realizar a extração dos analitos por meio de interações físico-químicas específicas com uma fase extratora, podendo esta ser constituída por sorventes sólidos ou líquidos [32].

Algumas destas técnicas têm vindo a ser propostas para a análise de piretróides, como é o caso da microextração em fase sólida (SPME, do inglês *Solid Phase Microextraction*) [35,36], microextração sortiva em barra de agitação (SBSE, do inglês *Stir Bar Sorptive Extraction*) [37] e microextração adsortiva em barra (BA μ E, do inglês *Bar Adsorptive Microextraction*) [38]. Relativamente a técnicas de microextração baseadas em líquidos, tem sido desenvolvido estudos em microextração em gota única (SDME, do inglês *Single-Drop Microextraction*) [39,40], microextração líquido-líquido dispersiva (DLLME, do inglês *Dispersive Liquid-Liquid Micoextraction*) [41,42] e microextração em fase líquida com auxílio de fibra oca (HF-LPME, do

inglês *Hollow Fiber Liquid Phase Microextraction*) [43]. Estas últimas, comparativamente às técnicas sortivas, foram desenvolvidas pois proporcionam uma cinética muito rápida da extração, uma vez utilizarem solventes como fase extratora, para além de reduzirem a manipulação analítica, proporcionam significativa sensibilidade na recuperação de analitos alvo, elevada reprodutibilidade e baixo custo. Assim sendo, para os compostos estudo que apresentam características de hidrofobicidade ($\log K_{O/W} \geq 3$), como tal o caso dos piretróides, torna-se vantajoso a utilização de líquidos para a sua extração da matriz aquosa, devido ao facto das interações dominantes serem rapidamente estabelecidas com a fase extratora, ao invés da matriz aquosa [34,39,41,43].

1.6.1. Técnicas de microextração baseada em sólidos

1.6.1.1. Microextração em fase sólida (SPME)

Em 1990, Pawliszyn *et al.* introduziram a técnica de SPME, com o propósito de simplificar a preparação de amostras, pelo que, ganhou destaque em análise ambiental por oferecer uma alternativa eficiente e ambientalmente sustentável, eliminando a necessidade de solventes orgânicos [44-47]. Esta tecnologia recorre a uma fibra polimérica retrátil de 1 a 2 cm de comprimento para a extração de analitos presentes numa matriz e posterior injeção na instrumentação analítica [44,45]. Na figura 1.3 encontra-se representado o dispositivo de SPME, sendo constituído por uma fibra reutilizável de sílica fundida revestida com uma fase estacionária polimérica, adequada aos analitos alvo, permitindo a respetiva extração e enriquecimento. Esta fibra revestida encontra-se incorporada numa seringa oca, na qual a protege de possíveis danos que podem ocorrer no processo extrativo, preservando a movimentação da mesma na perfuração dos septos dos frascos de amostragem e dos injetores cromatográficos [46,48].

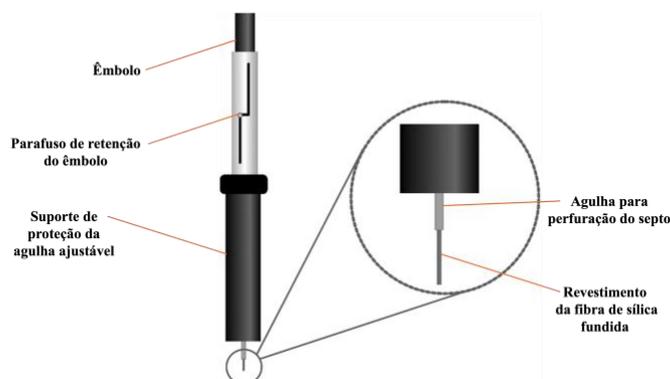


Figura 1.3. Esquema do dispositivo de SPME.

O processo de SPME envolve a execução de duas etapas básicas: (i) sorção dos analitos entre a fase estacionária e a matriz da amostra e (ii) dessorção dos extratos concentrados para um instrumento analítico. Nos últimos anos, esta técnica tem adquirido reconhecimento significativo nos diversos domínios de aplicação, com enfoque em laboratórios de rotina e aplicações industriais, devido à sua capacidade de integrar, num processo único, as etapas de amostragem, extração e enriquecimento dos analitos do seio da amostra [45]. Na técnica SPME, uma pequena quantidade da fase estacionária, associada a um suporte sólido, é colocada em contato com a matriz da amostra por um período pré-definido, pelo que, se a exposição for suficientemente longa, ocorre o estabelecimento de um equilíbrio entre as concentrações presentes na matriz da

amostra e na fase polimérica do dispositivo. Quando as condições de equilíbrio são alcançadas, uma exposição prolongada da fibra não resulta numa maior acumulação de analitos [46]. De facto, o objetivo primordial será alcançar uma extração completa o mais rapidamente possível, pois isso indica que o equilíbrio de extração foi atingido, conforme descrito na literatura [45,46,49].

Na primeira etapa realiza-se a extração e o enriquecimento dos analitos alvo através da exposição da fibra polimérica em contacto com a amostra durante um período de tempo previamente determinado, podendo haver dois modos distintos para a extração: por imersão direta (DI, do inglês *Direct Immersion*) na amostra, utilizada maioritariamente para compostos não voláteis ou semi-voláteis, ou por extração no espaço de cabeça (HS, do inglês *Headspace*), no caso de serem compostos voláteis, conforme apresentado na figura 1.4 b) e a), respetivamente. Já na segunda etapa procede-se á dessorção dos analitos da fase polimérica para posterior análise na instrumentação, podendo ser efetuada por duas vias: por dessorção térmica (TD, do inglês *Thermal Desorption*), para compostos mais voláteis e não termolábeis, onde ganha extrema sensibilidade na resposta instrumental exclusiva para sistemas de GC, conforme apresentado na figura 1.5. A outra via é por dessorção líquida (LD, do inglês *Liquid Desorption*), no caso de compostos não voláteis e termolábeis, onde os compostos são transferidos do seio do revestimento da fibra de SPME para uma solução orgânica passível de análise por sistemas de cromatografia líquida (LC, do inglês *Liquid Chromatography*) ou eletroforese capilar (CE, do inglês *Capillary Electrophoresis*), estes últimos através de uma interface adequada [44,47].

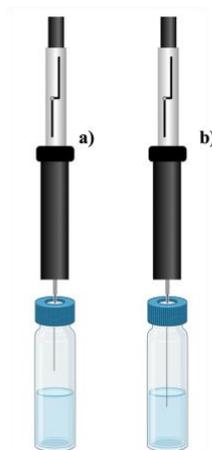


Figura 1.4. Esquema dos modos de extração da SPME. Na figura a) encontra-se o modo HS e na figura b) o modo DI. A ilustração foi criada com recurso ao endereço eletrónico <https://biorender.com/>.

De acordo com a literatura, a grande evolução da técnica SPME advém das suas vantagens, particularmente evidentes para compostos mais voláteis em matrizes complexas. Isso deve-se ao facto de que a extração em HS e injeção por TD confere à metodologia características de sustentabilidade e eficiência, ao eliminar o uso de solventes e simplificar o processo analítico numa única etapa. Deste modo, a SPME tem sido frequentemente utilizada em combinação com a GC e cromatografia em fase gasosa acoplada a espetrometria de massa (GC-MS, do inglês *Gas Chromatography – Mass Spectrometry*), demonstrando sucesso numa ampla gama de compostos, especialmente compostos orgânicos voláteis e semi-voláteis de matrizes complexas [44]. Conforme ilustrado na figura 1.5, os analitos alvo após serem extraídos e enriquecidos na fase polimérica que reveste a fibra de SPME, são posteriormente introduzidos na instrumentação analítica num único passo, ou seja, através de TD [46].

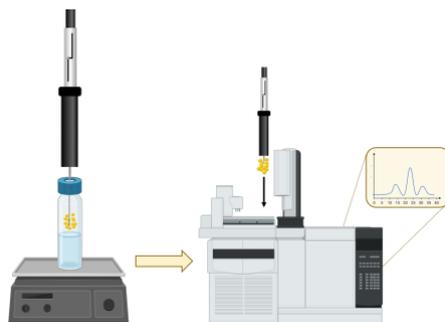


Figura 1.5. Representação do procedimento experimental da SPME por HS e posterior análise em GC. A ilustração foi criada com recurso ao endereço eletrónico <https://biorender.com/>.

De uma forma geral, esta técnica demonstra elevada compatibilidade numa ampla variedade de instrumentação analítica, tendo sido adotada em diversas áreas como ambiental, alimentar e farmacêutica. Pela conformidade com os princípios da "química verde", visto que dispensa a necessidade de solventes, de abordagem simplificada e eficiente para análise, torna-se “*user friendly*” e “*eco friendly*”. A técnica de SPME apresenta um processo rápido de uma única etapa e pela disponibilidade de dispositivos portáteis, o que viabiliza a aplicação direta em ambientes de campo. As suas vantagens incluem a compatibilidade com uma ampla variedade de matrizes, a exigência de quantidades reduzidas de amostra e a versatilidade em diversos setores de trabalho e na instrumentação analítica [50].

Contudo, é importante considerar as limitações associadas, como a disponibilidade restrita de fases poliméricas do revestimento da fibra, o custo elevado destas e dos respetivos aparelhos de automatização, a restrição da análise de compostos com volatilidade por GC, a sensibilidade a mudanças na matriz das amostras e a capacidade de extração limitada devido à quantidade reduzida de revestimento na fibra [50].

Fundamentos teóricos de SPME:

Teoricamente, quando a concentração do analito presente na matriz da amostra e no revestimento da fibra apresentarem estar em equilíbrio o processo de microextração SPME é dada por completa, sendo que posteriormente a atingir as condições de equilíbrio, não existe mais acumulação de analito na fase polimérica. Numa extração por DI, este equilíbrio é descrito por uma constante de distribuição entre a fibra e a amostra (K_{mf}), conforme apresentado na equação 1.1, calculado pelas concentrações de analito na fase polimérica da fibra (C_f) e a concentração de analito presente na matriz da amostra (C_m) [46,49].

$$A_{\text{matriz}} \leftrightarrow A_{\text{fibra}} \quad K_{mf} = \frac{C_f}{C_m} \quad (1.1)$$

A constante de distribuição é influenciada pelas condições da matriz, especialmente pelos parâmetros de agitação, tempo de equilíbrio e modo de extração. A quantidade de analito extraído para a fibra (n_f) em equilíbrio pode ser determinada pela equação 1.2, considerando a concentração inicial do analito na amostra (C_0), e o volume da fase sorvente na fibra (V_f).

$$n_f = C_0 \cdot V_f \cdot K_{fm} \quad (1.2)$$

Nesse contexto, a equação demonstra que a quantidade de analito extraído é independente do volume da amostra, refletindo diretamente a concentração do analito na matriz. Isto permite a quantificação de forma precisa por meio de técnicas de instrumentação analítica [49].

1.6.1.2. Extração sortiva em barra de agitação (SBSE)

Posteriormente à técnica de microextração SPME surgiu, em 1999, a SBSE de Baltussen *et al.* como técnica complementar e alternativa face às limitações vigentes da SPME [51]. Conforme ilustrado na figura 1.6, o dispositivo SBSE que consiste numa barra de agitação magnética incorporada dentro de um tubo de vidro selado e revestido externamente com 25-125 μL (0,3-1,0 mm de espessura) de fase polimérica, polidimetilsiloxano (PDMS). A encapsulação com vidro e a ausência de polímero nas extremidades evita a decomposição da fase polimérica [34,52].

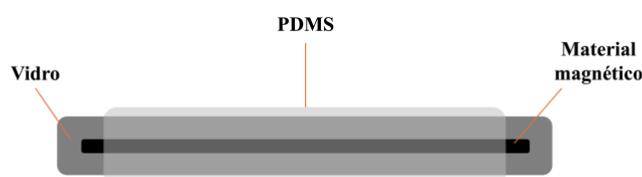


Figura 1.6. Esquema detalhado da composição do dispositivo de SBSE(PDMS).

O processo analítico da SBSE consiste em dois passos fundamentais, nomeadamente a extração e enriquecimento dos analitos do seio da amostra para o PDMS e, posteriormente, a retro-extração ou dessorção dos mesmos da fase polimérica para o sistema cromatográfico. Durante o processo de extração, as barras de agitação serem colocadas em contato com os solutos recorrendo aos modos de amostragem por DI ou por HS, conforme é exemplificado na figura 1.7, sendo a última mais indicada para a análise de compostos voláteis. No modo HS-SBSE, a amostragem é efetuada suspendendo a barra de agitação no topo do frasco, ficando o polímero em contato estático com a fase vapor proveniente da matriz líquida ou sólida. Esta abordagem apresenta a vantagem de preservar o polímero de PDMS de possíveis contaminações com interferentes não voláteis, aumentando igualmente o tempo de vida da barra de agitação. Já no modo DI-SBSE, a barra é colocada dentro da matriz aquosa da amostra, permitindo a extração dos analitos pela agitação provocada [51,53]. Uma das características mais interessantes da SBSE reside nas barras de agitação poderem ser usadas centenas de vezes sem mostrar degradação física do revestimento em PDMS, dependendo da complexidade das amostras e cuidado no manuseamento [51,52].

Na etapa de retro-extração por SBSE, é possível recorrer a dois modos de dessorção: a TD e a LD. A TD, embora seja a abordagem mais direta, está restrita a compostos voláteis e semi-voláteis, enquanto a LD torna-se abrangente, preferencialmente para analitos termolábeis, incluindo semi-voláteis e não voláteis. Já o modo TD exige um tubo de vidro apropriado e uma unidade de aquecimento dedicada, alcançando temperaturas de até 350 $^{\circ}\text{C}$, sendo compatível apenas com GC. Por outro lado, a LD pode ser combinada com sistemas de separação GC, LC, cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC, do inglês *High Performance Liquid Chromatography*) ou CE, utilizando condições instrumentais convenientes [34,51-53].

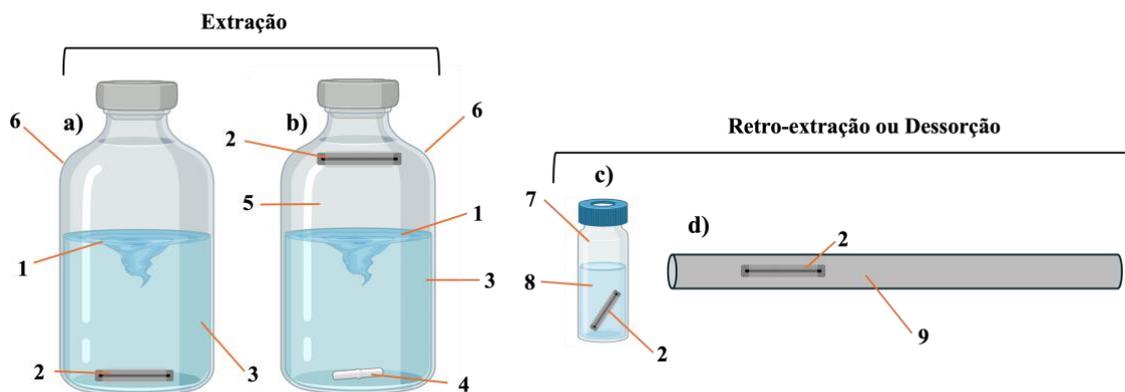


Figura 1.7. Representação esquemática dos modos de operação relativos à extração [a] DI-SBSE; b) HS-SBSE] e retro-extração ou desorção [c] LD; d) TD] usados pela técnica SBSE. 1 - Vórtex formando pela agitação; 2 - Barra de agitação do SBSE; 3 - Amostra; 4 - Barra agitação de Teflon; 5 - HS; 6 - Frasco de amostragem; 7 - Vial de injeção (GC ou HPLC); 8 - Solvente para LD; 9 - Tubo de vidro para TD. A ilustração foi criada com recurso ao endereço eletrônico <https://biorender.com/>.

Apesar dos recentes desenvolvimentos por SBSE(PDMS) terem provado características interessantes e inovadoras como técnica baseada em sorção, em muitos casos evidencia limitações na microextração de diversos tipos de solutos. Assim, se focarmos a nossa atenção no alargado grupo de compostos com características polares, p.e. $\log K_{O/W} < 3$, a técnica de SBSE(PDMS) tem demonstrado ineficácia devido às fracas interações hidrofóbicas que se estabelecem, sendo uma fase polimérica com maior capacidade de extração de compostos apolares ($\log K_{O/W} \geq 3$) [52-54]. Relativamente à limitação da pequena quantidade de material sortivo da técnica de SPME, o dispositivo de SBSE apresenta entre 50 e 250 vezes mais quantidade de fase polimérica, o que resulta numa maior sensibilidade especialmente para concentração baixa em análise vestigial [34].

No entanto, apesar da limitação que evidencia para compostos polares, a SBSE(PDMS) continua a ser das técnicas mais implementadas, uma vez apresentar grande reprodutibilidade, robustez e abrangência, comparativamente com outros métodos de microextração analítica. Recentemente, foi proposta uma nova técnica para solucionar a limitação da SBSE(PDMS) na análise de compostos com características mais polares, designada por BA μ E, que tem demonstrado grande potencial e complementaridade relativamente à primeira [52].

Fundamentos teóricos da SBSE(PDMS):

Na teoria SBSE(PDMS), os rendimentos de eficiência de um analito estão relacionados com a partição entre a fase PDMS da barra de agitação e a amostra aquosa (W), apresentando um comportamento semelhante à distribuição descrita pelos coeficientes de partição octanol-água ($K_{PDMS/w} \approx K_{o/w}$) durante o equilíbrio estático. Em geral, os analitos apolares têm valores de $\log K_{o/w}$ superiores ou iguais a 3, e os mais polares têm valores de $\log K_{o/w}$ inferiores a 3. Assim, $K_{o/w}$ e o rácio de fase ($\beta = V_w/V_{PDMS}$, em que V_w é o volume da amostra de água e V_{PDMS} é o volume de PDMS) são parâmetros importantes para prever a recuperação teórica utilizando a seguinte equação [53-55]:

$$\text{Recuperação (\%)} = (K_{o/w} / \beta) / (1 + K_{o/w} / \beta) \times 100 \quad (1.3)$$

A partir desta expressão, percebemos que quanto maior a hidrofobicidade dos compostos alvo ou o volume de PDMS (menor B), maiores são os rendimentos de extração esperados pela

SBSE, conforme demonstrado pela figura 1.8. A equação 1.3 permite prever a recuperação teórica, conhecendo apenas β e $K_{o/w}$, sendo que este último pode ser facilmente obtido a partir dos valores teóricos da literatura ou calculado através de software disponível noutro local [53,55].

1.6.1.3. Microextração adsortiva em barra (BA μ E)

Com a finalidade de superar as limitações impostas pela técnica de SBSE(PDMS) na análise de compostos com característica mais polares, é proposta em 2010, a BA μ E. Neste contexto, vários estudos têm sido propostos com esta metodologia analítica onde tem demonstrado ser promissora e abrangente na monitorização vestigial de diversas classes de compostos orgânicos, com características desde polares ($\log K_{o/w} < 3$) a apolares ($\log K_{o/w} > 3$) em diversas matrizes [38,34]. Os dispositivos analíticos apresentam uma geometria cilíndrica, consistindo num tubo oco de polipropileno (15 mm de comprimento, 2,0 mm de diâmetro e 0,5 de espessura) no qual são revestidos externamente com fases sorventes (cerca de 1 a 5 mg), apropriado a cada analito em questão, sendo fixadas com recurso a um adesivo, conforme ilustrado na figura 1.9.

As fases sorventes utilizadas para o revestimento destes dispositivos podem ser carvões ativados (ACs) provenientes da biomassa e/ou preparados no laboratório, sendo sólidos caracterizados por apresentarem estruturas de nanopartículas porosas compostas por poros com dimensões diferenciadas: desde estruturas de macroporos (> 50 nm) e mesoporos (2-50 nm) a microporos (< 2 nm). Estes ACs apresentam elevadas áreas superfícies de contacto e grande capacidade de retenção do analito. Alternativamente recorre-se a sorventes poliméricos, uma vez que estes são macromoléculas formadas a partir de fortes ligações covalentes com repetidas unidades básicas designadas de monómeros. Os mecanismos de interação para retenção do analito dependem de fatores como as características textuais, tamanho, área superficial, microporosidade e pH. Neste contexto, a análise de compostos mais polares foi conseguida, uma vez que os materiais sorventes usados, permitem a retenção de analitos de ampla gama de polaridades [56,57].

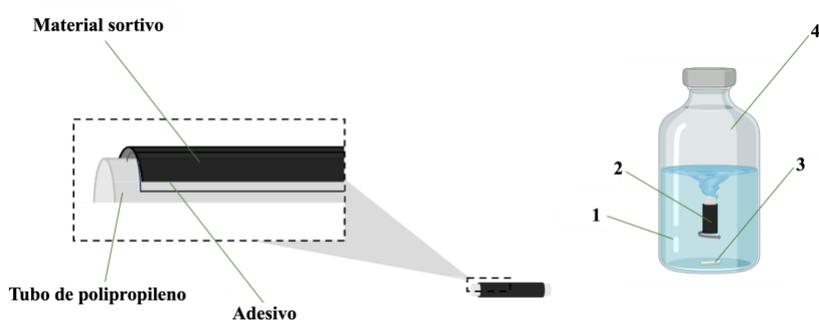


Figura 1.8. Esquematização do dispositivo analítico utilização na BA μ E à esquerda e o modo de operação do processo extrativo por BA μ E à direita. 1 - amostra; 2 - dispositivo analítico BA μ E; 3 - barra de agitação magnética de Teflon; 4 - fraco de amostragem. A ilustração foi criada com recurso ao endereço eletrónico <https://biorender.com/>.

Do ponto de vista prático, o ciclo analítico da BA μ E, á semelhança da SBSE e SPME, consiste em duas etapas fundamentais: a microextração dos analitos da matriz da amostra para o dispositivo analito, onde este é um passo que opera em condições de equilíbrio, seguido da retro-extração dos compostos da fase sorvente para um solvente passível de ser posteriormente analisado no sistema instrumental adequado [56]. Esta técnica opera por intermédio de uma

tecnologia inovadora de amostragem por flutuação, onde o dispositivo flutua na matriz da amostra. Desta forma, o enriquecimento é efetuado através da agitação com uma barra magnética á base de Teflon que vai promover a migração dos analitos do seio da matriz até á fase, por difusão, tal como demonstrado na figura 1.9. Ao usar-se esta abordagem, como os dispositivos flutuam no vortéx formado, evita-se a degradação física resultante pelo contacto direto com as paredes e com o fundo dos frascos de amostragem, favorecendo assim a preservação da fase e do próprio dispositivo. O passo de retro-extração, por sua vez, opera no modo LD, sendo os analitos dessorvidos para um solvente adequado á análise instrumental, com recurso a ultrassons [56,58].

Neste sentido, a grande vantagem desta metodologia alternativa face às bem estabelecidas reside no facto de demonstrar excelente desempenho para a microextração vestigial de uma vasta gama de compostos desde polares a apolares numa variedade de matrizes complexas. Esta técnica, além de apresentar ser amiga do ambiente, por utilizar recursos provenientes da biomassa e volumes de solventes orgânicos negligenciáveis, passível de ser incluído em trabalho de rotina e adaptado aos sistemas instrumentais convencionais, GC ou HPLC. Contudo, a maior vantagem desta metodologia alternativa advém da grande redução de custo-benefício, ser “*eco friendly*” e á grande eficácia e facilidade de manipulação [56,59].

1.6.2. Técnicas de microextração baseada em líquidos

1.6.2.1. Microextração em gota única (SDME)

De forma a resolver as diversas limitações das técnicas convencionais baseadas em líquidos que contrariam os princípios da química verde, Liu e Dasgupta, em 1990, desenvolveram o primeiro procedimento de microextração à base de solventes, designada por SDME, para extração de analitos de amostras aquosas e gasosas para uma gota de solvente orgânico [60-62].

Na figura 1.10 encontra-se ilustrado o dispositivo de SDME, composto por uma microsseringa convencional equipada com uma agulha, a qual suporta a gota de solvente orgânico. Durante o procedimento, a gota é exposta após a introdução da microsseringa no frasco de amostragem. Posteriormente, a gota é recolhida para o interior da microsseringa e injetada num instrumento analítico adequado, como cromatógrafos ou espectrofotómetros [39,61]. Os volumes típicos de solvente utilizados na SDME variam entre 1 e 3 μL , embora volumes maiores possam ser alcançados com o uso de adaptadores acoplados à extremidade da microsseringa [63].

A abordagem por SDME decorre em duas etapas, na qual na primeira se procede à extração e enriquecimento do analito, através da exposição da gota à amostra durante um intervalo de tempo previamente estabelecido. A extração pode ser efetuada por diferentes modos, agrupados por duas classes: pelo modo bifásico, constituído por duas fases, ou pelo modo trifásico, constituído por três fases distintas [60,61,63].

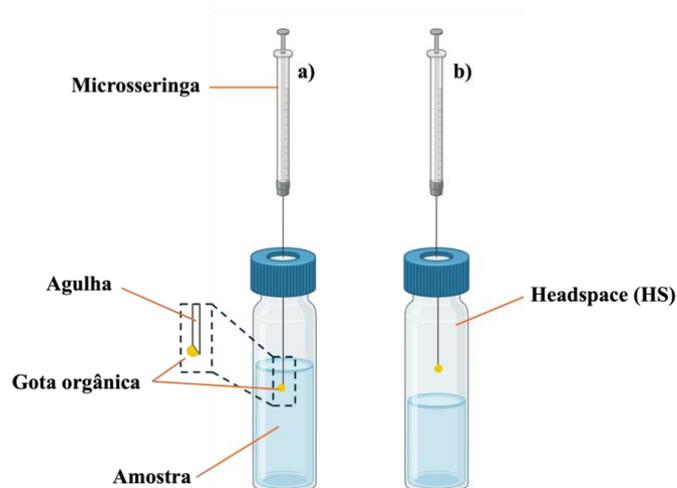


Figura 1.9. Esquema da extração por SDME. Na figura a) encontra-se o modo DI e na figura b) o modo HS (artigo 1,3). A ilustração foi criada com recurso ao endereço eletrónico <https://biorender.com/>.

Entre os diferentes modos destaca-se os modos por DI (figura 1.9, a)) e por HS (figura 1.9, b)), aos quais correspondem a cerca de 80% dos trabalhos desenvolvidos com SDME. No modo de extração por HS-SDME, um sistema de três fases, a gota fica suspensa na ponta da microseringa acima da amostra aquosa, no espaço denominado HS, ao invés do procedimento de extração por DI-SDME. Isso deve-se ao facto de que, os compostos extraídos volatilizam da fase aquosa para o HS passando, posteriormente, do HS para o solvente. Deste modo, a técnica HS-SDME é direcionada para a análise de analitos voláteis e semi-voláteis, sendo o modo DI-SDME complementar para analitos não voláteis, mas que contenham alguma hidrofobicidade [62,63].

Embora apresente a limitação relacionada com a estabilidade da gota, a SDME continua a ser amplamente utilizada, conforme descrito na literatura, devido às inúmeras vantagens que evidenciam grande simplicidade, “*eco friendly*”, cinética de extração rápida, baixo custo-benefício, ausência de necessidade de equipamentos adicionais e a sua aplicabilidade a uma ampla gama de compostos com diferentes volatilidades e polaridades [60,63].

1.6.2.2. Microextração líquido-líquido dispersiva (DLLME)

Em 2006, foi introduzida por Rezaee e colaboradores, a técnica DLLME, como técnica complementar às técnicas vigentes baseadas em líquidos [64,65]. A técnica de DLLME aborda uma extração líquido-líquido miniaturizada, onde os analitos são extraídos da matriz com auxílio de um solvente extrator e um solvente dispersor, sendo o solvente imiscível e miscível com a amostra aquosa, respetivamente [66].

Conforme ilustrado na figura 1.10, o processo analítico da DLLME ocorre em duas etapas principais. Na primeira etapa, uma mistura de solventes, composta por um solvente extrator e um solvente dispersor, é rapidamente injetada numa amostra aquosa, promovendo a formação de uma dispersão homogênea que facilita a partição dos analitos para a fase orgânica. Para assegurar a eficiência do processo, os solventes devem atender a requisitos específicos: o solvente extrator deve ser hidrofóbico e apresentar elevada densidade (como DCM, clorofórmio ou tetracloretileno), enquanto o solvente dispersor deve ser miscível tanto com o solvente extrator quanto com a amostra aquosa (como Ace, EtOH ou ACN) [64,65].

Durante a injeção, forma-se uma microemulsão composta por microgotículas de solvente extrator, cuja formação é auxiliada pelo solvente dispersor. Esta microemulsão gera uma maior área superficial entre a amostra aquosa e o solvente extrator, permitindo que o equilíbrio seja atingido rapidamente e tornando a eficiência da microextração praticamente independente do tempo, o que constitui a principal vantagem desta abordagem. Na segunda etapa, a separação das fases é obtida por centrifugação, sendo a fase orgânica recolhida com auxílio de uma seringa para posterior análise instrumental [65].

Do ponto de vista da eficiência do processo da DLLME, os parâmetros dos solventes provocam a maior influência no desempenho, pelo que, tanto o solvente extrator como o dispersor devem de ser cuidadosamente selecionados. É de considerar, a importância dos volumes utilizados para ambos os solventes, crucial para obtenção de uma boa formação da microemulsão [67,68].

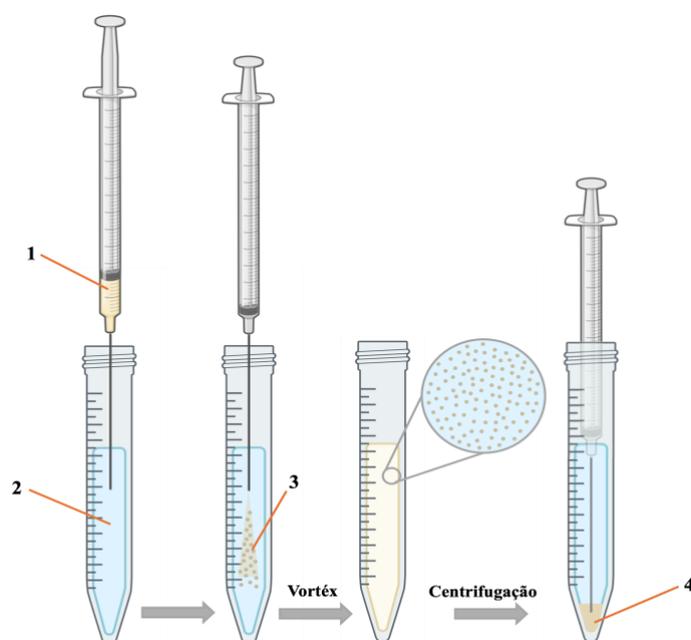


Figura 1.10. Esquema do procedimento tradicional de microextração líquido-líquido dispersiva (DLLME); 1 - Seringa com solvente extrator e dispersos; 2 - Amostra aquosa; 3 - dispersão da mistura de solventes na amostra após a injeção rápida; 4 - colheita da fase orgânica [65,67]. A ilustração foi criada com recurso ao endereço eletrónico <https://biorender.com/>.

Neste sentido, a DLLME é uma técnica simples e rápida, cujos benefícios são, a redução da utilização de solventes orgânicos, a grande área superficial entre as fases, que promove a rápida cinética de extração até obtenção do equilíbrio e elevado fator de concentração para uma diversa classe de compostos. Contudo, contrariamente aos princípios da química verde, alguns autores descrevem como principal desvantagem o uso de solventes orgânicos clorados [65].

1.6.2.3. Microextração em fase líquida com auxílio de fibras ocas (HF-LPME)

Outra abordagem desenvolvida foi a HF-LPME, que surgiu por forma a colmatar as grandes limitações da SDME [43,69,70]. A técnica HF-LPME envolve a utilização de um dispositivo analítico que consiste numa membrana microporosa de polipropileno (PP) contendo

a fase extrator. A fibra mais comumente utilizada para esta técnica apresenta 70% de porosidade e o seu comprimento varia entre 1,5 e 10,0 cm. A elevada porosidade permite a fácil imobilização de um solvente orgânico [70,71].

O procedimento analítico consiste numa fibra polimérica microporosa preenchida por um solvente orgânico, introduzido por intermédio de uma microseringa. O processo de extração envolve a submersão da fibra, ou de um sistema de fibras, na matriz da amostra, permitindo a extração dos analitos por difusão passiva da amostra para o interior da membrana, de forma semelhante ao mecanismo observado na LLE. Após a etapa de extração, o solvente orgânico é recuperado com o auxílio de uma microseringa e submetido à análise instrumental, que pode ser realizada por GC, HPLC ou CE [70].

A microextração em fase líquida pode apresentar duas ou três fases básicas para o desenvolver do processo. No sistema de duas fases, o analito é extraído de uma amostra aquosa com recurso a um solvente orgânico imiscível, que se encontra imobilizado nos poros e no interior da membrana oca. Este sistema é compatível com a análise instrumental por HPLC ou GC. Quando o sistema é composto por três fases, o analito é extraído de uma amostra aquosa, através de um solvente orgânico imobilizado nos poros da membrana, para uma nova fase aquosa presente no interior da membrana oca. Desta forma, este sistema é largamente utilizado para análise por HPLC ou CE. De acordo com a figura 1.11, encontra-se ilustrado os dois modos de extração por HF-LPME, onde espelham a principal diferença, sendo esta o tipo de fase recetora, orgânica ou aquosa [70,72].

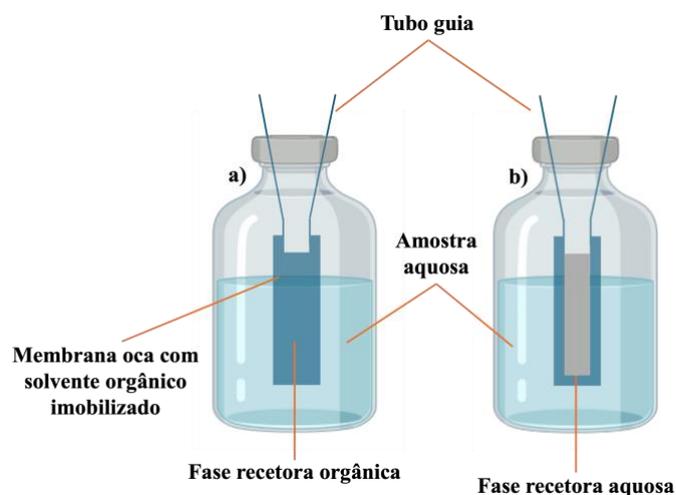


Figura 1.11. Esquema dos modos de extração utilizados em HF-LPME [70]. A ilustração foi criada com recurso ao endereço eletrónico <https://biorender.com/>.

Existem outras configurações empregando-se HF-LPME, tal como a adaptação da membrana oca em forma de U, na qual são utilizadas duas microseringas para a injeção e a retirada da solução recetora do interior da membrana; outra configuração possível é a utilização da membrana em forma de haste, com a parte inferior da membrana selada mediante aplicação de pressão, valendo-se nesse caso também do auxílio de uma microseringa para a colocação e retirada da solução recetora [43,70,71]. Deste modo, apesar da técnica de HF-LPME apresentar rápida cinética de extração, elevados fatores de enriquecimento e aplicação a uma larga gama de compostos, devido aos diferentes modos e configurações exigidas, torna-se de difícil manuseio, embora com desvantagem para a automatização, o que se torna uma técnica morosa e exaustiva para o analista, em contexto rotina [70].

1.6.2.4. Microextração em fibra oca (HF μ E)

Em 2018, surgiu uma técnica inovadora de microextração em fibra oca (HF μ E, do inglês *Hollow-Fiber Microextraction*), destinada à análise vestigial de compostos orgânicos voláteis e semi-voláteis em matrizes reais. Esta abordagem é considerada híbrida, pois combina as principais vantagens de técnicas anteriormente descritas, como a SDME, a HF-LPME e a BA μ E, visando superar diversas limitações das metodologias convencionais. Além disso, a HF μ E alinha-se aos princípios da química analítica verde, promovendo uma alternativa mais sustentável e eficiente para amostras complexas [41,73].

O dispositivo analítico da HF μ E, ilustrado na figura 1.12, é composto por uma membrana oca porosa de PP, um material de baixo custo amplamente utilizado na técnica HF-LPME. Esta membrana é embebida num solvente orgânico selecionado de acordo com os compostos-alvo, promovendo uma cinética rápida de enriquecimento dos analitos no dispositivo, característica partilhada com a técnica SDME. Além disso, o sistema opera sob o princípio de amostragem por flutuação, conferindo-lhe uma robustez comparável à observada na técnica BA μ E [43].

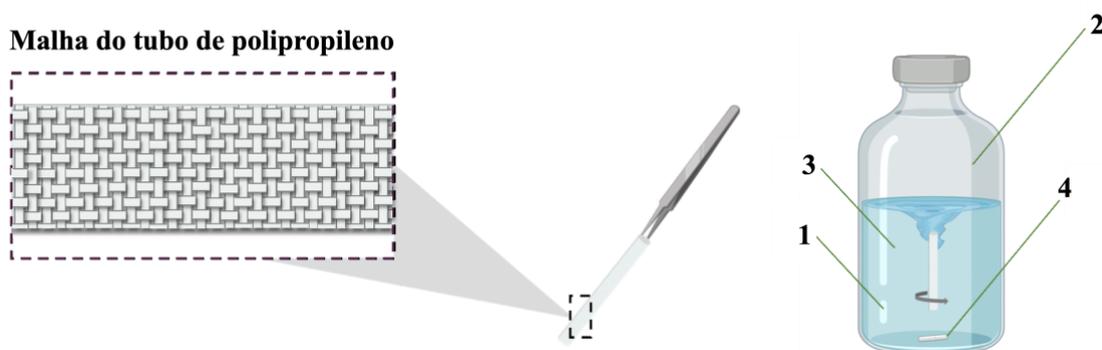


Figura 1.12. Esquematização da malha do tubo do dispositivo analítico da HF μ E à esquerda e a análise do processo extrativo por HF μ E à direita. 1 - amostra; 2 - frasco de amostragem; 3 - dispositivo analítico HF μ E; 4 - barra magnética de Teflon. A ilustração foi criada com recurso ao endereço eletrónico <https://biorender.com/>.

Semelhante à técnica BA μ E, o ciclo analítico da HF μ E opera em dois passos fundamentais: a microextração e a retroextração, etapas essenciais para a posterior análise instrumental. Conforme ilustrado na figura 1.12, o processo de extração segue os princípios descritos anteriormente. No entanto, diferentemente de outras técnicas de microextração em fibras ocas mencionadas na literatura (ex. HF-LPME), onde o uso de uma microsseringa é indispensável para administrar e recuperar o solvente orgânico da membrana de PP, a abordagem proposta simplifica significativamente este procedimento. Na HF μ E, a membrana é embebida por alguns segundos num solvente orgânico adequado aos analitos em estudo e, em seguida, colocada diretamente na amostra juntamente com uma barra magnética de Teflon para agitação. Este método oferece uma etapa preparativa mais rápida e de fácil execução. Na etapa de retroextração, o processo distingue-se por ser realizado num único passo: os dispositivos analíticos são removidos da amostra e transferidos para *vials* de vidro apropriados, contendo até 100 μ L do mesmo solvente orgânico utilizado previamente. Posteriormente, a amostra encontra-se pronta para análise em sistemas instrumentais apropriados, beneficiando da versatilidade das membranas de PP, que permitem a injeção automática no vial graças às suas dimensões compactas e elevada flexibilidade [73,74].

Neste sentido, as vantagens distintas desta metodologia alternativa em relação às abordagens convencionais residem na sua simplicidade de utilização e robustez, com os processos de extração e retroextração, uma vez que são realizados numa única etapa. Além disso, destaca-se pela sua ampla aplicabilidade a diversos analitos e matrizes, aliada à sua característica ecológica e de uso rotineiro, eficácia comprovada e excelente relação custo-benefício [41]. Estudos recentes que recorreram a esta técnica demonstram resultados notáveis na extração de uma ampla gama de compostos, em particular com características apolares, em diversas matrizes aquosas [73,74].

1.6.3. Técnicas Cromatográficas

O termo “cromatografia” foi introduzido e utilizado pela primeira vez no início do século XX pelo botânico russo Mikhail Tswett. Tswett aplicou esta técnica na separação de pigmentos vegetais, como clorofilas e xantofilas, através da passagem de soluções desses compostos por uma coluna, onde as espécies separadas formavam bandas coloridas. Este fenómeno inspirou a designação do método, derivada do grego "chroma" (cor) e "graphein" (escrita). Nas últimas cinco décadas, a área da cromatografia tem registado um crescimento exponencial, impulsionado tanto pelo desenvolvimento de novas técnicas como pela necessidade de métodos mais avançados para a caracterização de misturas complexas. Este progresso notável foi reconhecido pelo Prémio Nobel de Química de 1952, atribuído a A. J. P. Martin e R. L. M. Synge, em homenagem às suas descobertas pioneiras, que destacaram o papel fundamental da cromatografia de partição. Até aos dias de hoje, este campo continua a expandir-se e a desempenhar um papel crucial nas ciências analíticas [75,76].

A cromatografia compreende um conjunto diversificado e fundamental de métodos que permitem a separação de diferentes componentes presentes em misturas complexas. Em todos os processos cromatográficos, a amostra é transportada por uma fase móvel, que pode ser gasosa, líquida ou composta por um fluido supercrítico. Esta fase móvel é então conduzida através de uma fase estacionária imiscível, contida numa coluna ou em leito aberto [76].

A eficácia da separação depende de características moleculares, como a adsorção, a partição, as diferenças de polaridade e os pesos moleculares. Assim, alguns componentes permanecem mais tempo na fase estacionária, deslocando-se mais lentamente no sistema cromatográfico, enquanto outros atravessam a fase estacionária com maior rapidez [75,77]. Componentes fortemente retidos pela fase estacionária deslocam-se de forma lenta com o fluxo da fase móvel, ao passo que os menos retidos percorrem o sistema mais rapidamente. Como resultado dessas diferenças de mobilidade, os componentes da amostra separam-se em bandas discretas ou zonas, permitindo a realização de análises qualitativas e/ou quantitativas.

Em relação aos resultados alcançados por um sistema cromatográfico, existem conceitos teóricos pertinentes para a compreensão do cromatograma, o qual se encontra exemplificado na figura 1.13. Ao considerar uma mistura de dois componentes (1 e 2, figura 1.13), a separação numa coluna só se efetuará se estes forem diferencialmente retidos pela fase estacionária.

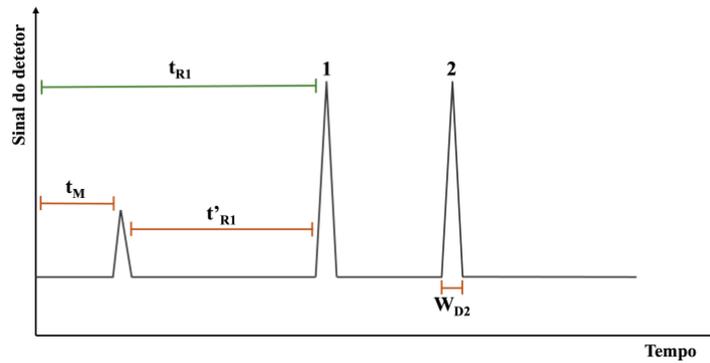


Figura 1.13. Representação esquemática de um cromatograma na separação dos compostos 1 e 2.

De forma a identificar os componentes da mistura por meio da separação cromatográfica, o tempo de retenção (t_R), isto é, o intervalo de tempo durante o qual um componente é introduzido na coluna até ser detetado, é determinado pela soma do tempo de retenção ajustado (t'_R) e do tempo morto (t_M), conforme expresso pela equação 1.4. Um composto não retido será eluído no t_M , enquanto um composto retido eluirá posteriormente, atravessando a coluna num t_R , sendo o t'_R o tempo que o composto depende na fase estacionária.

$$t_R = t'_R + t_M \quad (1.4)$$

O fator de capacidade (k') é uma medida que estuda o grau de retenção dos analitos nas colunas ou superfícies, podendo ser calculada com a equação 1.5, desde que a velocidade do fluxo se mantenha constante.

$$k' = \frac{t'_R}{t_M} \quad (1.5)$$

Considerando a separação de dois compostos adjacentes, esta pode exprimir-se através do fator de separação ou seletividade (α) e relaciona-se com a fase estacionária e com as condições de operação a partir da interação com a mesma. Este parâmetro traduz-se entre os fatores de capacidade de dois compostos adjacentes (1 e 2), de acordo com a equação 1.6. A seletividade aumenta quando existe um afastamento entre os picos adjacentes.

$$\alpha = \frac{k'_1}{k'_2} \quad (1.6)$$

Sendo a cromatografia um fenómeno de transferência de massa, a eficiência (N) de uma coluna cromatográfica pode ser expressa pela teoria dos pratos teóricos, modelo desenvolvido pela dupla Martin e Synge, grandeza que exprime o número de equilíbrios que ocorrem durante a separação, sendo tanto maior quanto maior for N , e que pode ser calculada pela equação 1.7, em que W é a largura da base de um pico simétrico (equação 15). Esta eficiência traduz na capacidade de eluição do analito com o mínimo de dispersão.

$$N = 16 \times \left(\frac{t_R}{W} \right)^2 \quad (1.7)$$

O objetivo das aplicações cromatográficas consiste em separar todos os componentes de uma dada mistura, sendo o gráfico de separação entre dois compostos designado por resolução (R_s). Desta forma, pode recorrer-se a uma expressão que exprime a R_s em termos dos três fatores fundamentais independentes, ou seja, α , k' e N , conforme ilustrado na equação 1.8. A medida de R_s permite afirmar se dois componentes adjacentes são ou não completamente separados por uma coluna cromatográfica, num tempo analítico aceitável. Qualquer pico com formato gaussiano ocorre separação completa ou resolução entre eventuais picos adjacentes sempre que R_s seja superior ou igual a 1,5 [75-78].

$$R_s = \frac{\sqrt{N}}{4} \times \frac{(\alpha-1)}{\alpha} \times \frac{k'_2}{(k'_2+1)} \quad (1.8)$$

De forma geral, as técnicas cromatográficas podem ser categorizadas com base na modalidade física pela qual as fases móvel e estacionária interagem. Esta distinção ocorre entre os formatos: planar, no qual a fase móvel é retida em leito aberto, permitindo que a fase estacionária seja atravessada pela capilaridade ou gravidade; coluna, onde a fase móvel é contida num tubo estreito através do qual é impulsionada sob gravidade ou pressão pela fase estacionária. Contudo, uma classificação adicional pode ser realizada considerando três critérios: a natureza física da fase móvel, o suporte da fase estacionária e a natureza do mecanismo de separação conforme demonstrado no diagrama da figura 1.14 [76].

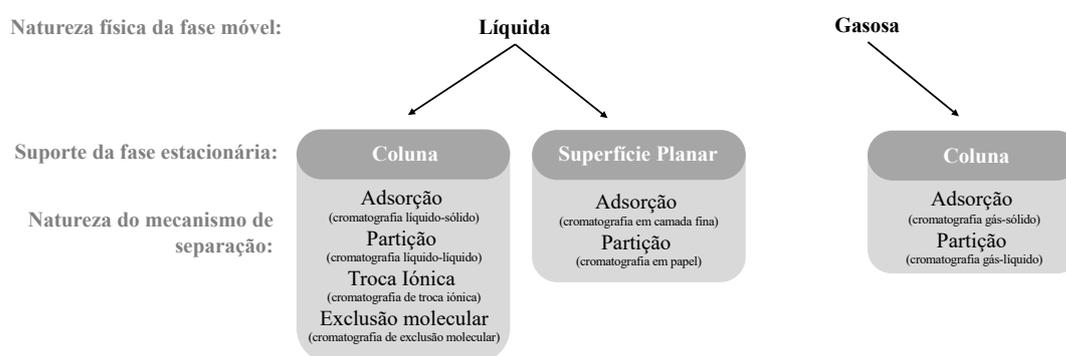


Figura 1.14. Esquemática da classificação de métodos de separação tendo por base três critérios: a natureza física da fase móvel, o suporte da fase estacionária e a natureza do mecanismo de separação.

1.6.3.1. Cromatografia em fase gasosa acoplada a espectrometria de massa (GC-MS)

Na hifenação GC-MS, a amostra é introduzida no injetor de uma cromatografia em fase gasosa, pelo que é um método de separação baseado em princípios onde os componentes de uma mistura são seletivamente distribuídos entre a fase móvel, neste caso, um gás inerte, normalmente He, H ou N_2 , e uma fase estacionária presente no revestimento da coluna [77]. Sendo um método de separação em fase gasosa, o GC requer que os analitos sejam volatilizados antes da sua separação.

Como tal, a aplicação é limitada a componentes com volatilidade e estabilidade térmica [75]. Este sistema cromatográfico é composto por um injetor, uma coluna a temperaturas elevadas localizada no interior de um forno, sendo posteriormente detetado com recurso a detetores convencionais, neste caso, o detetor espectro de massa (MS, do inglês *Mass Spectrometry*) conforme ilustrado na figura 1.15.

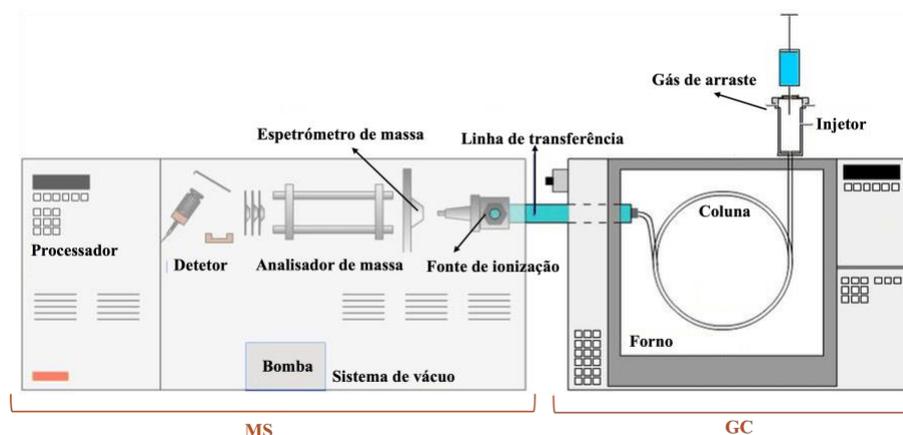


Figura 1.15. Esquema detalhado do sistema GC-MS [80].

No sistema GC são abordados diversos sistemas de injeção, sendo os mais comuns aqueles que operam por vaporização isotérmica com ou sem repartição de fluxo ("*split/splitless*"). Conforme demonstrado na 1.16, o injetor *split* (S) direciona uma fração da amostra para a coluna cromatográfica (tipicamente numa proporção entre 1:10 e 1:100), enquanto o restante é descartado, sendo preferencial em análises de amostras com concentrações substanciais. Por outro lado, o injetor *splitless* (SL) introduz a totalidade da amostra no sistema, suspendendo temporariamente o fluxo de gás inerte para possibilitar a completa vaporização e focagem da amostra, sendo mais apropriado para amostras de concentração vestigial. A seleção entre estes injetores é determinada pelas características intrínsecas dos analitos e pelos objetivos analíticos, otimizando a sensibilidade e a eficiência da análise cromatográfica exigida ao estudo [79,80].

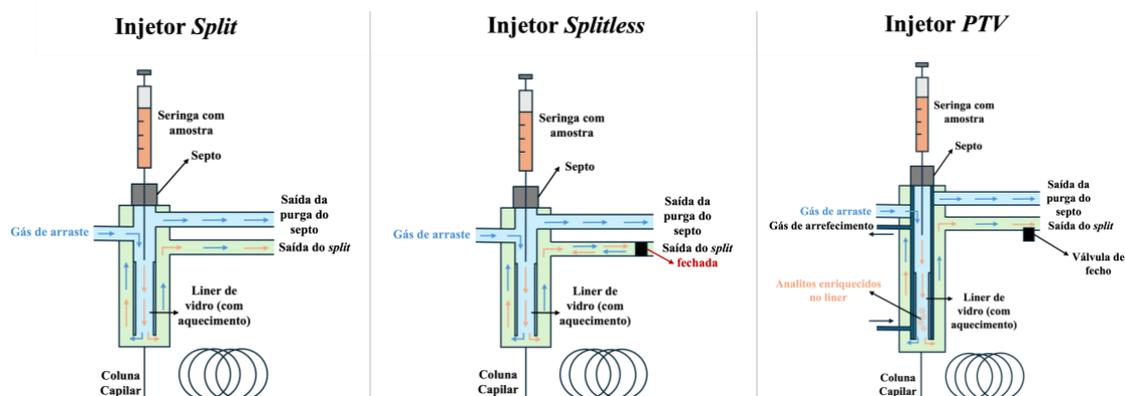


Figura 1.16. Comparação entre os injetores de vaporização isotérmica (sendo S e SL) e os com temperatura controlada (PTV) em cromatografia em fase gasosa.

Sob a perspetiva do estudo de análises vestigiais, os injetores, sobretudo o injetor *splitless*, apresenta limitações face ao volume de injeção, uma vez poder variar entre 1 e 3 μL , o que pode

comprometer a sensibilidade analítica. Porém, atualmente, a literatura menciona alternativas, tal como o injetor por vaporização com temperatura programada (PTV, do inglês *Programmed Temperature Vaporizer*). Este possibilita a injeção de grandes volumes (LVI, do inglês *Large Volume Injection*) até 200 μL ou múltiplas injeções, tornando-se não só uma técnica de injeção crucial para amostras com baixas concentrações (na ordem dos ppt), como também favorece um enriquecimento dos analitos presentes. Deste modo, aumenta da sensibilidade analítica na resposta instrumental [81]. Contudo existem outras diferenças, uma vez que, enquanto o injetor "split/splitless" opera a temperatura constante, o injetor PTV tem a capacidade de operar com recurso a uma rampa de temperatura previamente programada. O processo é iniciado pela introdução da amostra num "liner" frio (abaixo do ponto de ebulição do solvente), sendo o arrefecimento realizado pelo auxílio de ar comprimido ou nitrogénio líquido. Durante a injeção, o solvente é eliminado recorrendo a um aquecimento balístico e os analitos ficam retidos no "liner", sendo posteriormente introduzidos na coluna cromatográfica aquando se dá o restabelecimento da pressão à cabeça [78,80]. Face a esta particularidade, este injetor apresenta a limitação, pois apenas pode ser utilizada para compostos com pontos de ebulição mais elevados, nomeadamente, semi-voláteis. Posteriormente à injeção, os analitos são separados tendo por base os princípios de volatilidade e/ou polaridade. Sendo a fase estacionária da coluna escolhida com base nas características dos compostos alvo, tendo em conta as características moleculares e interações por afinidade [79].

Para a obtenção de resultados, a hifenização GC-MS oferece não apenas o tempo de retenção do analito, mas também os respetivos espectros de fragmentação iónica gerados no MS, o que a torna uma ferramenta analítica altamente poderosa e precisa para a identificação de compostos. Quando os analitos entram no MS, passam por uma câmara de ionização, onde são ionizados e fragmentados por um feixe de eletrões. Os iões formados são desviados e acelerados em direção ao analisador de massa, onde sofrem separação com base na razão massa/carga (m/z) [78,79].

Aprofundando em detalhe sobre o sistema MS, conforme ilustrado na figura 1.17, as fontes de ionização frequentemente utilizada é a ionização eletrónica (EI, do inglês *Electronic Ionization*), onde promove a ionização e fragmentação dos analitos alvo com recurso a um feixe de eletrões a uma energia de ionização 70 eV. Posteriormente estes fragmentos são transferidos para o analisador de massas, podendo ser de vários tipos dependendo da funcionalidade e do nível de resolução (alta ou baixa), pelo que, o mais comumente utilizado é o quadropólo, que opera em baixa resolução. Estes fragmentos iónicos são acelerados com recurso a quatro cilindros condutores de polaridades opostas, onde a separação em função de m/z é de acordo com a corrente continua e radiofrequências exercidas. Por fim, estes fragmentos chegam ao detetor, sendo o mais utilizado o multiplicador de eletrões, existe a produção de correntes amplificadas que permite a conversão de corrente iónica em eletrónica de forma a produzir uma resposta, neste caso os espectros de massa de cada composto [78,82].

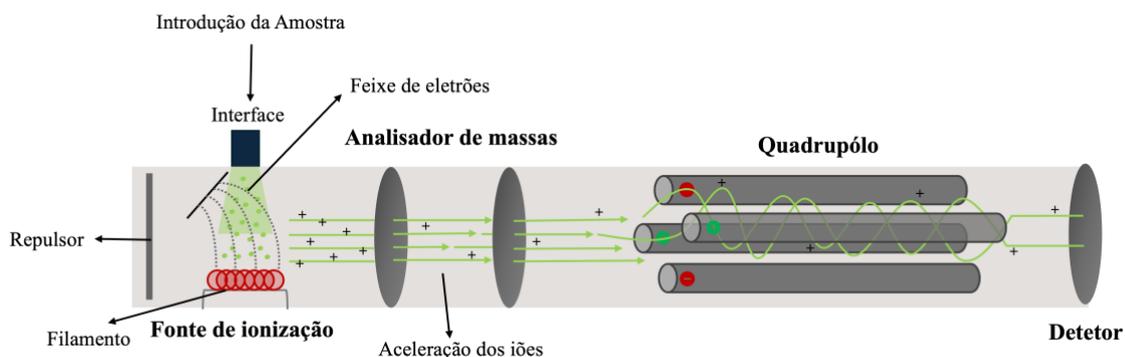


Figura 1.17. Representação esquemática do sistema MS, desde a entrada dos analitos a partir da coluna capilar até à sua detecção.

A principal vantagem do sistema MS reside na sua capacidade de detetar e identificar eficientemente todos os compostos orgânicos voláteis e semi-voláteis pela complementaridade do espectro de fragmentação iónica ao cromatograma convencional. Deste modo, este sistema pode operar em dois modos de aquisição de dados, que deverá ser adequado ao estudo em questão. No modo de varrimento contínuo ("*full-scan*"), possibilita a identificação de compostos em amostras desconhecidas utilizando bibliotecas espectrais de referência (70 eV), uma vez que monitoriza e identifica todos os fragmentos iónicos gerados onde são posteriormente comparados. Porém, quando o objetivo reside na quantificação de analitos em concentrações vestigiais, o modo de monitorização de iões seleccionados (SIM, do inglês *Selected Ion Monitoring*), permite obter elevada sensibilidade e seletividade, tornando-se num modo de aquisição poderoso analiticamente [78]. Neste modo, são previamente seleccionadas janelas de tempo com m/z específicos do analito alvo, pelo que, em cada ciclo, em vez de ocorrer a medição de todas as m/z presentes numa ampla gama, mede apenas os iões previamente seleccionados [78,80,81].

1.7. Objetivos

Embora existam diversas abordagens propostas para análise vestigial de piretróides em matrizes ambientais aquosas, considerou-se que seria relevante desenvolver uma metodologia inovadora de microextração, que proporcionasse melhores recuperações, limiares analíticos mais baixos e que permitisse uma cinética rápida e eficácia no processo extrativo.

Neste sentido, o presente projeto tem como objetivo o desenvolvimento de uma nova metodologia analítica, designada por HF μ E em combinação com GC-MS, para a determinação vestigial de piretróides em matrizes aquosas, tendo por base sete piretróides amplamente usados como inseticidas. Para tal, consideraram-se os seguintes objetivos:

- Calibrar e otimizar a instrumentação analítica GC-MS para os piretróides em estudo;
- Otimizar a metodologia HF μ E- μ LD/GC-MS para a identificação dos analitos alvo em matrizes aquosas;
- Validar a metodologia otimizada, nomeadamente a linearidade, precisão e limiares analíticos associados;
- Aplicar a metodologia otimizada e validada na quantificação dos sete piretróides em amostras reais aquosas (águas superficiais, subterrâneas, para consumo humano e residuais de ETAR), no sentido de avaliar o efeito matriz na metodologia;
- Averiguar se a metodologia proposta é reprodutível e robusta, e comparar com outras metodologias vigentes (i.e., SBSE, SDME, etc.).

2. Parte experimental

2.1. Reagentes, materiais e amostras

O acetato de etilo (EtOAc, C₄H₈O₂, 99,0%), o *n*-hexano (*n*-C₆, C₆H₁₄, 99%), o diclorometano (DCM, CH₂Cl₂, 99,9%) e a acetona (Ace, C₃H₆O, 99%), de qualidade para HPLC, foram obtidos da Carlos Erba (França). O metanol (MeOH, CH₃OH, 99,9%), de qualidade para HPLC, foi obtido pela PanReac (Espanha). O *n*-heptano (*n*-C₇, C₇H₁₆, 99%), de qualidade para HPLC, foram obtidos da Sigma-Aldrich (Alemanha). O *n*-octano (*n*-C₈, C₈H₁₈, 99%), de qualidade para HPLC, foram obtidos da Fluka AG (Suíça). O *n*-nonano (*n*-C₉, C₉H₂₀, 99%), de qualidade para HPLC, foi obtido da ThermoFisher (Alemanha). O tolueno (Tol, C₇H₈, 99%) foi obtido da Koch Light (Reino Unido). O cloreto de sódio (NaCl, ≥ 99,5%) foi obtido da Honeywell (Alemanha). A água ultrapura foi obtida do sistema de purificação de água Milli-Q (Millipore, EUA).

A solução padrão analítica da mistura de piretróides (1000 mg L⁻¹ em Ace) contendo aletrina (ALL, C₁₉H₂₆O₃, 99,2%), tetrametrina (TET, C₁₉H₂₅NO₄, 97%), bifentrina (BIF, C₂₃H₂₂ClF₃O₂, 98,9%), fenpropatrina (FEN, C₂₂H₂₃NO₃, 99,9%), lambda-cialotrina (CYH, C₂₃H₁₉ClF₃NO₃, 97,5%), cipermetrina (CYP, C₂₂H₁₉Cl₂NO₃, 97,3%), fenvalerato (FEV, C₂₅H₂₂ClNO₃, 98,7%) e deltametrina (DEL, C₂₅H₁₉Br₂NO₃, 98%), foi obtido da Dr. Ehrenstorfer (EUA).

Para a metodologia por HFμE, foram utilizadas membranas de fibra oca de PP (C₃H₆)_n (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).

As amostras de água, superficial e subterrânea, foram obtidas através da recolha de água superficial de um troço da Ria de Aveiro e de um poço na zona de Aveiro, respetivamente. As amostras de água para consumo humano e residual, foram recolhidas na zona de Lisboa, nomeadamente águas da rede e água do efluente de ETAR (Alcântara, Lisboa), respetivamente. Todas as amostras foram armazenadas no laboratório a 4°C até serem analisadas.

2.2. Instrumentação

Para além do material corrente de laboratório, utilizaram-se frascos de vidro de 25 mL (Macherey-Nagel, Alemanha) e respetivas tampas de polietileno (PE, (C₂H₄)_n) (diâmetro = 22 mm), barras de agitação de *teflon* 14 × 4 mm obtidos pela VWR International (EUA). Foram igualmente utilizados *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 Alwsci Technologies (China), um encapsulador manual (Agilent Technologies, EUA) seringas de uso único Injekt de 20 mL (Braun, Alemanha) e filtros de seringa de nylon 25 mm – 0,45 μm (Labor Spirit, Portugal). Relativamente às medições efetuadas, utilizou-se uma micropipeta de capacidade de 20 - 200 μL (Labok, Espanha), uma micropipeta 100 - 1000 μL (Labok, Espanha) e uma micropipeta 1000 - 5000 μL (VWR International, EUA).

Para efetuar pesagens recorreu-se a uma balança analítica (Mettler Toledo AG135, Suíça). Nos ensaios de microextração foram utilizadas duas placas de agitação magnética compostas por quinze posições (H+P Labortechnik AG Variomag, Alemanha; Cimarec i Poly, Alemanha), um banho ultrassons equipado com um termóstato de modelo 3510 E-DTH (Branson, EUA) e um

vortéx (Velp, Itália). O controlo de pH das diversas soluções foi medido recorrendo a um medidor de pH de modelo 744 pH Meter, composto por um eletrodo de vidro combinado (Metrohm, Suíça).

As análises por GC-MS foram efetuadas no equipamento Agilent Technologies (Alemanha), constituído por um cromatógrafo em fase gasosa (Agilent 6890 Series) equipado com amostrador automático (Agilent 7683), um injetor *split/splitless*, um injetor PTV, acoplados ao detetor seletivo de massa (Agilent 5973N). Para a separação dos compostos utilizou-se a coluna capilar InertCap 5MS (30 m de comprimento \times 0,25 mm de diâmetro interno \times 0,25 μ m 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 foi efetuado o respetivo controlo instrumental. Para a comparação espectral, utilizou-se a base de dados da biblioteca de espectros da Wiley (G1035B, Rev. D.02.00, Agilent Technologies, EUA).

2.3. Procedimento experimental

2.3.1. Preparação das soluções padrão

A solução mãe foi preparada em EtOAc obtendo-se uma concentração de 20 mg L⁻¹, recorrendo à solução padrão stock da mistura de piretróides em acetona (1000 mg L⁻¹). Todas as soluções padrão foram armazenadas a -20 °C (Jocel JCV-220L, Portugal) no decorrer do trabalho experimental, sendo necessário a renovação mensal da solução mãe. As soluções de trabalho para fins da calibração instrumental obtiveram-se por diluição da solução mãe em EtOAc. Já as soluções de trabalho utilizadas nos ensaios de otimização e validação do método obtiveram-se, também, a partir da diluição adequada da solução mãe (20 mg L⁻¹) em MeOH. As soluções de trabalho foram renovadas diariamente evitando a possibilidade de degradação dos compostos em estudo (artigo agroquímicos).

2.3.2. Condições instrumentais de análise

Para otimizar as condições instrumentais para a análise dos oito piretróides em estudo, realizaram-se injeções de uma mistura padrão 10 mg L⁻¹ em EtOAc, preparada por diluição da solução mãe a 20 mg L⁻¹. Foram avaliadas diferentes condições cromatográficas, incluindo o volume de injeção e a rampa de temperatura. Este processo possibilitou a identificação dos compostos com base nos tempos de retenção e nos espectros de massa característicos.

A configuração final das condições instrumentais para a análise por GC-MS foi estabelecida utilizando o padrão de referência, com os parâmetros otimizados no modo de aquisição “*full-scan*”. Posteriormente, essas condições foram ajustadas e aplicadas no modo SIM, visando a condução dos ensaios subsequentes. As condições detalhadas encontram-se descritas de seguida.

Condições instrumentais otimizadas no sistema GC:

O injetor *split/splitless* operou com uma temperatura de 270 °C, no modo SL (pressão: 10,4 psi; fluxo: 33,9 mL/min) e, por forma a melhorar a resposta cromatográfica, recorreu-se 2

μL de volume de injeção. O gás de arraste selecionado foi hélio, mantido sob pressão constante de 10,4 psi. A programação de temperatura do forno iniciou-se em 70 °C (2 min de isotérmica) seguido de um aumento a uma taxa de 25°C/min até 200 °C. Posteriormente, o forno foi aquecido a uma taxa de 8°C/min até 300 °C, terminando com um platô isotérmico de 3 minutos. Nestas condições, o sistema cromatográfico apresentou um tempo total de corrida de 23 minutos. Este método baseia-se no protocolo descrito na literatura [37], uma vez possuir condições adequadas à análise dos piretróides em estudo.

Condições instrumentais otimizadas no sistema LVI-GC:

O injetor PTV operou no modo *solvent vent*, utilizando um tempo de ventilação de 0,30 minutos (fluxo: 50 mL/min; pressão: 0,0 psi; fluxo de purga: 60,0 mL/min durante 2 minutos) e arrefecido por meio de ar comprimido. A temperatura do injetor foi programada para iniciar a 70 °C, mantida por 0,35 minutos, seguida de um aumento a uma taxa de 600 °C/min até 320 °C, onde ficou 3 minutos isotermicamente. Por fim, a temperatura foi reduzida para 200 °C, a uma taxa de 50 °C/min, sendo mantida até o término da análise. O volume e a velocidade de injeção foram de 20 μL e 100 $\mu\text{L}/\text{min}$, respectivamente. As condições do gás de arraste e a pressão foram mantidas conforme descrito anteriormente. A programação de temperatura do forno e o tempo de corrida foi mantida, salvo exceção do tempo total de corrida que foi de 22 min. Este método baseia-se no protocolo descrito na literatura [37], uma vez possuir condições adequadas à análise dos piretróides em estudo.

Condições instrumentais otimizadas no detetor MS:

As temperaturas da linha de transferência, fonte de ionização e o quadrupólo foram mantidos a 280, 230 e 150 °C, respectivamente, tendo sido utilizada o modo de EI com a energia de 70 eV. Foi também programado um *solvent delay* de 11 min.

No modo “*full-scan*” foi utilizado uma gama de massas compreendida entre 45 e 550 m/z , com corrente de ionização de 34,6 μA e um potencial multiplicador de 1200 V. No modo SIM vários grupos de iões alvo foram monitorizados numa janela de tempo definida pela retenção correspondente, mantendo um *dwell time* de 100 ms.

2.3.3. Calibração Instrumental

Posteriormente à otimização das condições instrumentais de análise em GC-MS em SL, recorreu-se ao modo de aquisição SIM, tendo por base a seleção de dois iões específicos da fragmentação iónica características de cada composto presente no estudo. Deste modo, a calibração instrumental, recorrendo a este sistema instrumental, realizou-se a partir de uma solução de 10 mg L⁻¹ em EtOAc, previamente diluída da solução mãe (20 mg L⁻¹). Sucessivas diluições desta solução (10 mg L⁻¹) com EtOAc possibilitaram obter padrões de calibração que foram injetados no sistema cromatográfico. A análise dos mesmos, realizadas em triplicado, permitiu estabelecer o limite de deteção (LOD, do inglês *Limit of Detection*) e o limite de quantificação (LOQ, do inglês *Limit of Quantification*) instrumentais, dos quais as razões sinal/ruído (S/N) correspondem a 3:1 e 10:1, respectivamente.

A fim de estudar a linearidade da resposta instrumental, prepararam-se dez soluções com diferentes níveis de concentração (2,50; 1,25; 0,50; 0,25; 0,125; 0,05; 0,025; 0,0125; 0,005;

0,0025 mg L⁻¹), obtidos a partir da solução mistura de 10 mg L⁻¹. As injeções realizaram-se em triplicado, por forma a permitir a construção de curvas de calibração individual para cada composto, constituídas com, pelos menos, seis pontos.

Uma solução de 0,25 mg L⁻¹ (em EtOAc), preparada a partir da solução mãe, foi injetada consecutivamente seis vezes no sistema cromatográfico. Deste modo, as análises permitiram estudar a precisão intra-dia ou repetibilidade desta metodologia.

2.3.4. Preparação dos dispositivos de HF μ E

A aplicação da técnica HF μ E requer a preparação prévia dos dispositivos de microextração em laboratório. Para tal efeito, são utilizadas pequenas membranas comerciais de PP, cuja dimensões se encontram descritas no ponto 2.1. Estas são recortadas manualmente por forma a obter dispositivos com um comprimento de 10 mm. Posteriormente, estes foram purificados com recurso Ace e água desionizada para a remoção de polímeros e outras impurezas. Diversos solventes orgânicos foram testados, sendo que este é aplicado pela imersão das membranas no mesmo, onde aproximadamente a porosidade interna deste material retém, cerca de 22 μ L [73].

2.3.5. HF μ E/GC-MS

2.3.5.1. Ensaio de otimização

No desenvolvimento dos ensaios de otimização da metodologia de microextração, dos respetivos parâmetros em teste, deve-se ter em conta o procedimento das etapas de microextração e retroextração por HF μ E. Para tal, o procedimento de microextração foi efetuado em 25 mL de água desionizada num frasco de vidro, contendo uma barra de agitação de Teflon. Estes frascos de amostragem foram fortificados com 100 μ L da solução padrão mistura de piretróides (2,5 mg L⁻¹ em MeOH), obtendo-se uma concentração de 10 μ g L⁻¹ no volume final. De seguida, foi introduzido os dispositivos de microextração contendo, no seu interior, o solvente orgânico selecionado. Posteriormente, a etapa de microextração foi promovida por meio de agitação à temperatura ambiente, recorrendo a um tempo de equilíbrio e velocidade estabelecidos. Após terminar o período de microextração, procedeu-se à etapa de retroextração dos analitos retidos no dispositivo de HF μ E. Para tal, a membrana foi retirada do seio da amostra e, colocada dentro do *insert*, seguindo-se a adição de 100 μ L de solvente orgânico. De seguida, o *vial* foi selado com recurso a um encapsulador e seguiu-se o procedimento de retroextração. Este foi efetuado por via de tratamento ultrassónico ou agitação vigorosa com recurso a vortéx, num determinado período. Por fim, posicionou-se os *vials* no amostrador automático para realizar a análise por GC-MS. No esquema da figura 2.1, encontra-se o procedimento experimental referido anteriormente.

Para o estudo da otimização da metodologia por HF μ E- μ LD/GC-MS foi aplicada a estratégia de otimização por método univariante (OVAT, do inglês *One-Variable-at-Time*), que permitiu a aplicação de todas as variáveis fixadas exceto uma, tendo sido estudado o comportamento do sistema relativamente a essa variável selecionada. Neste sentido, estudaram-se diversos parâmetros cinéticos, dos quais incluem, o solvente orgânico extrator (EtOAc, DCM, Tol, *n*-C₆, *n*-C₇, *n*-C₈ e *n*-C₉), o tempo de dessorção por ultrassons ou vortéx (15, 10, 5 e 2 min),

o tempo de equilíbrio (1, 2, 3 e 4 h) e a velocidade de agitação (800, 1000, 1200, 1400 e 1600 rpm). Os parâmetros termodinâmicos estudados foram a utilização do modificador orgânico (0%, 5%, 10% e 20% em MeOH, v/v) e a força iônica (0%, 5% e 10% em NaCl, m/v), deixando excluído o estudo da variação de pH, uma vez, as moléculas não serem ionizáveis.



Figura 2.1. Representação esquemática do procedimento experimental utilizado para a otimização da metodologia por HFµE-µLD/GC-MS. A ilustração foi criada com recurso ao endereço eletrônico <https://biorender.com/>.

Por fim, estudou-se o efeito da utilização da *Dual* HFµE, tendo sido inseridas, no mesmo frasco de amostragem, dois dispositivos analíticos (comprimento 10 mm cada). Todos os ensaios de otimização foram realizados em triplicado. O cálculo das recuperações foi obtido por comparação das áreas do pico obtidos experimentalmente nos ensaios com os padrões de controlo, conforme apresentado na equação II.1 (anexo II).

2.3.5.2. Ensaios de validação

Para os estudos de validação do método HFµE-µLD/GC-MS(SIM), efetuaram-se ensaios com diferentes níveis de fortificação, em triplicado, seguindo-se o procedimento descrito no ponto anterior em condições otimizadas. A análise cromatográfica dos ensaios realizados com níveis de concentração sucessivamente baixos, permitiram determinar os limiares analíticos, LOD e LOQ, da metodologia de microextração, com recurso à razão S/N 3:1 e 10:1, respetivamente.

Prepararam-se treze soluções a partir de sucessivas diluições do padrão de 20 mg L⁻¹ em MeOH (2,5; 1,25; 0,5; 0,25; 0,175; 0,125; 0,1; 0,05; 0,025; 0,0175; 0,0125; 0,005; 0,0025 mg L⁻¹), de forma a obter ensaios com a concentração adequada nos 25 mL de água desionizada (10,0; 5,0; 2,0; 1,0; 0,7; 0,5; 0,4; 0,2; 0,1; 0,07; 0,05; 0,02; 0,01 µg L⁻¹). Neste sentido, estudou-se a linearidade do método pela construção das curvas de calibração para cada piretróide em estudo, tendo por base a análise das soluções obtidas nas diferentes concentrações, em triplicado. Estas curvas apresentam entre oito e treze pontos, dependendo dos limiares analíticos determinados no ponto anterior. De forma a complementar, realizou-se o teste F e o gráfico de dispersão de resíduos para estudo da linearidade.

A fim de determinar a precisão, intra-dia (repetibilidade) e inter-dia (intermédia), efetuaram-se ensaios a três níveis distintos de fortificação, alto ($5,0 \mu\text{g L}^{-1}$), médio ($2,0 \mu\text{g L}^{-1}$) e baixo ($0,2 \mu\text{g L}^{-1}$). A precisão intra-dia foi avaliada por meio da análise de cinco injeções consecutivas de cada uma das três concentrações, realizadas no mesmo dia. Por sua vez, a precisão inter-dia foi determinada por ensaios em triplicado para as três concentrações, reproduzidos ao longo de três dias consecutivos. Os critérios de aceitação utilizados para a precisão foi os desvios padrão relativos (RSD, do inglês *relative standard deviation*) fossem $\leq 15 \%$ para todas as concentrações exceto no LLOQ, onde foram aceites valores com $\text{RSD} \leq 20 \%$. Os valores de RSD foram determinados pela equação II.2, conforme apresentado no anexo II.

2.3.5.1. Ensaios de aplicação a amostras reais

Por forma a demonstrar a capacidade analítica da metodologia otimizada e validada, realizaram-se diversos ensaios em matrizes reais. Neste sentido, amostras de água superficial, subterrânea, residual de ETAR e para consumo humano foram estudadas. Estas, após recolhidas, sofreram tratamento por meio de filtração, com recurso a filtros de nylon com $0,45 \mu\text{m}$, de modo a remover possíveis impurezas.

Deste modo, estudou-se o efeito matriz nestas amostras recorrendo ao método de adição padrão (SAM, do inglês *Standard Addition Method*) para quantificação dos piretróides em estudo (ALL, TET, BIF, FEN, CYH, CYP e FEV). Estes ensaios foram igualmente realizados com o procedimento otimizado e fortificados a $10,0$; $5,0$; $1,0$; $0,5$ e $0,2 \mu\text{g L}^{-1}$, obtendo curvas de calibração de cinco pontos para cada analito.

Note-se que se realizaram ensaios de controlo, sem fortificação, de forma a confirmar a ausência de sinal nos tempos de retenção associados a cada um dos piretróides estudados.

3. Discussão de Resultados

3.1. Otimização das condições instrumentais de análise

Como etapa inicial do presente estudo, foi realizada a otimização das condições instrumentais para a análise dos piretróides selecionados, nomeadamente: ALL, TET, BIF, FEN, CYH, CYP e FEV. No contexto da aplicação de GC-MS, a identificação de compostos é baseada em parâmetros fundamentais, como o tempo de retenção (t_R) e os espectros de fragmentação de massa obtidas por EI (70eV). Com o intuito de estabelecer as condições instrumentais adequadas à análise, foi realizada a injeção de uma solução padrão contendo a mistura dos analitos (2,5 mg L⁻¹), utilizando o modo *full-scan*.

Após a otimização das condições cromatográficas, os perfis espectrais dos fragmentos de massa de cada composto presentes no traçado de corrente iônica total foram analisados, o que permitiu identificar os analitos por comparação com a biblioteca de referência da Wiley e a base de dados da NIST (anexo III). Com base em estudos prévios disponíveis na literatura e os espectros de massa obtidos, selecionaram-se o íon alvo (pico base) e um fragmento principal adicional para cada composto, com o objetivo de maximizar a seletividade e a sensibilidade das análises subsequentes realizadas no modo SIM.

Um exemplo de traçado de corrente iônica total encontra-se ilustrado na figura 3.1, exibindo a respetiva ordem de eluição dos analitos, cujos tempos de retenção (t_R) e íões selecionados se encontram descritos na tabela 3.1.

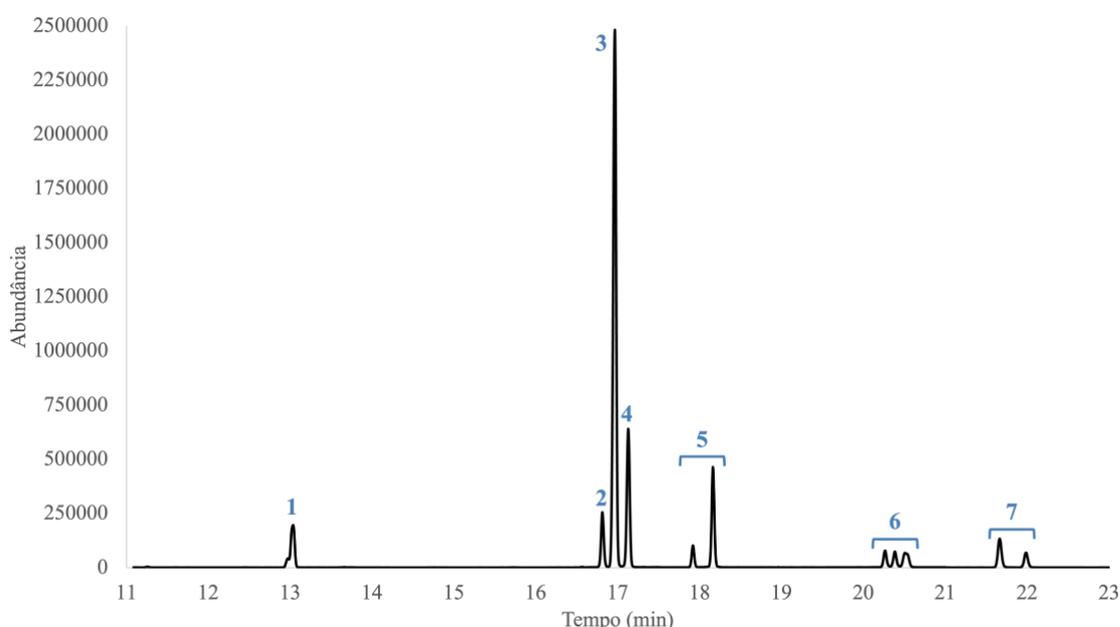


Figura 3.1. Traçado de corrente iônica obtido através da análise por GC-MS(SIM) da mistura de piretróides (2,5 mg L⁻¹), nas condições instrumentais otimizadas. (1- ALL; 2- TET; 3 – BIF; 4- FEN; 5- CYH; 6-CYP; 7-FEV).

Tanto na figura 3.1 quanto na tabela 3.1, é possível identificar a presença de isómeros em quatro compostos distintos. Essa constatação baseou-se na análise dos perfis espectrais, nos quais os picos apresentaram espectros coincidentes, com características típicas de isomeria. Entre os compostos analisados, a CYH, a CYP e o FEV evidenciaram isómeros com elevada resolução cromatográfica. Contudo, para o composto ALL, a separação cromatográfica nas condições

utilizadas revelou-se ineficiente. Ainda assim, a presença do isómero pode ser observada por meio de ampliação, conforme ilustrado no anexo V.

Tabela 3.1. Tempo de retenção (t_R) e iões selecionados para quantificação dos analitos em modo SIM. Estes valores foram obtidos por análise GC-MS, nas condições instrumentais otimizadas.

Piretróides	t_R (min)	Iões SIM (m/z)*
ALL	12,97 / 13,04	107, <u>123</u>
TET	16,81	123, <u>164</u>
BIF	16,97	164, <u>181</u>
FEN	17,13	<u>97</u> , 181
CYH	17,92 / 18,15	181, <u>197</u>
CYP	20,27 / 20,38 / 20,51	<u>163</u> , 181
FEV	21,66 / 21,99	<u>167</u> , 419

*Ião sublinhado utilizado para quantificação

Conforme mencionado anteriormente, as estruturas moleculares dos piretróides possuem elevada quiralidade, o que possibilita a formação de diversos isómeros, dependendo da presença de carbonos quaternários. Considerando os objetivos deste estudo, voltado para a análise de amostras ambientais, e reconhecendo que, na natureza, as misturas isoméricas são comuns, optou-se por tratar e investigar os isómeros de forma conjunta para a continuidade dos ensaios.

3.1.1. Calibração instrumental

Conforme descrito no ponto 2.3.3., os LOD e LOQ instrumentais foram estabelecidos a partir de diluições sucessivas do padrão de mistura ($0,5 \text{ mg L}^{-1}$) inicial até se obter uma razão sinal/ruído de 3:1 e 10:1, respetivamente. Obtiveram-se valores compreendidos entre $0,5 \leq \text{LOD} \leq 12,5 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$ e $1,5 \leq \text{LOQ} \leq 37,5 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$.

A linearidade da gama dinâmica de trabalho a nível instrumental determinou-se através do método dos mínimos quadrados, utilizando entre 6 e 10 níveis de concentração, compreendidos entre $0,0025$ e $2,5 \text{ mg L}^{-1}$. Como tal, os resultados obtidos demonstram excelente gama de linearidade, obtendo coeficientes de determinação (r^2) superiores a $0,995$, conforme descrito na tabela 3.2. As curvas de calibração encontram-se no anexo IV.

Por fim, a precisão intra-dia ou repetibilidade instrumental foi igualmente determinada por intermédio de seis injeções sucessivas do padrão mistura ($0,5 \text{ mg L}^{-1}$), dizendo respeito ao RSD das áreas dos picos obtidos. Obtiveram-se valores, a partir da equação II.2 (anexo II), de $1,30 \leq \text{RSD} \leq 7,65 \%$, inferior a $\pm 15 \%$ para todos os compostos, o que demonstrou elevada reprodutibilidade das injeções no sistema GC-MS(SIM).

Tabela 3.2. Gama linear, coeficiente de determinação (r^2), limite de quantificação (LOQ) e limite de detecção (LOD) dos sete piretróides, obtidos por GC-MS(SIM), nas condições instrumentais otimizadas.

Piretróides	Gama linear (mg L ⁻¹)	r^2	LOQ (µg L ⁻¹)	LOD (µg L ⁻¹)
ALL	2,5 - 0,025	0,9985	15,0	5,0
TET	2,5 - 0,025	0,9975	15,0	5,0
BIF	2,5 - 0,0025	0,9995	1,5	0,5
FEN	2,5 - 0,0125	0,9994	7,5	2,5
CYH	2,5 - 0,05	0,9985	37,5	12,5
CYP	2,5 - 0,05	0,9983	37,5	12,5
FEV	2,5 - 0,05	0,9981	37,5	12,5

3.2. Otimização da metodologia HFµE-µLD

Concluída a otimização das condições instrumentais, seguiu-se a otimização da metodologia proposta por HFµE-µLD dos sete analitos em estudo. O processo de otimização engloba a avaliação da influência de diversos parâmetros experimentais nas etapas de microextração e retroextração. Conforme descrito no ponto 2.3.5.1., os parâmetros em estudo incluem o solvente de extração e retroextração, o tempo de retroextração e de equilíbrio, a velocidade de agitação, o modificador orgânico e a força iônica da matriz. Durante o processo de otimização, o estudo foi conduzido seguindo uma abordagem univariável. Nesse contexto, todos os parâmetros foram avaliados em triplicado, sob condições experimentais padronizadas: 25 mL de água desionizada fortificada com 100 µL da solução mistura de piretróides (2,5 mg L⁻¹), tempo de equilíbrio de 1 h (1000 rpm) e retroextração com 100 µL de solvente orgânico, 5 min sob tratamento ultrassônico.

3.2.1. Seleção do solvente de extração e retroextração

Inicialmente, foram avaliados diferentes solventes orgânicos com o objetivo de selecionar o mais adequado para a extração e retroextração dos analitos. Nesse sentido, considerando a metodologia proposta, o solvente orgânico utilizado para recobrir as paredes das fibras ocas, desempenha um papel fundamental, pois determina a afinidade dos analitos presentes no seio da amostra com a fase extratora. Assim, a escolha do solvente deve levar em consideração duas propriedades físico-químicas cruciais: a volatilidade e a solubilidade em água. Após a impregnação das fibras ocas com o solvente, estas são expostas brevemente ao ar antes de serem inseridas no frasco de amostragem. Conseqüentemente, o solvente selecionado deve apresentar um ponto de ebulição suficientemente elevado para minimizar perdas por evaporação durante este procedimento. Além disso, a solubilidade do solvente em água é um fator determinante, uma vez que solventes altamente miscíveis podem ser parcialmente dissolvidos na matriz aquosa durante o processo de microextração, comprometendo a eficiência do método.

Com base nesses critérios, foram avaliados sete solventes (*n*-C₆, *n*-C₇, *n*-C₈, *n*-C₉, DCM, Tol e EtOAc) para maximizar a seletividade e a eficácia do método proposto. Os resultados obtidos encontram-se apresentados na figura 3.2.

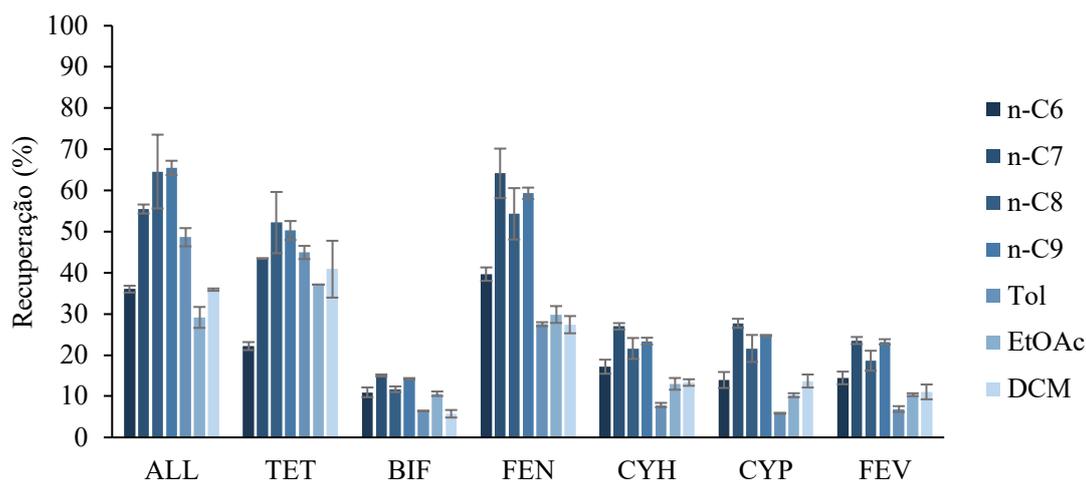


Figura 3.2. Efeito dos diferentes solventes extratantes na recuperação dos piretróides em estudo, obtidos por HF μ E- μ LD/GC-MS(SIM). Condições do ensaio: 25 mL de água desionizada fortificada com 10,0 μ g L⁻¹; extração: 1 h (1000 rpm), pH 5,5; retro-extração: 5 min sob tratamento ultrassônico).

Conforme apresentado no gráfico da figura 3.2, as taxas de recuperação alcançaram valores máximos de 65,0%, enquanto analitos com maior peso molecular, dos quais BIF, CYH, CYP e FEV, apresentaram, de forma geral, recuperações inferiores a 30%. Esta tendência poderá prender-se com o facto da velocidade de agitação utilizada (1000 rpm) ser insuficiente para a emergir dos dispositivos de HF μ E abaixo do vortéx durante o processo microextrativo. Esta limitação compromete a área superficial entre a fase extratora e a matriz aquosa, resultando em taxas de extração reduzidas conforme os valores observados.

Além disso, a análise do gráfico evidencia que os hidrocarbonetos apresentaram maior afinidade pelos compostos alvo. A afinidade pode ser atribuída à elevada hidrofobicidade, conforme indicado pelos valores de log K_{OW} superiores a 3 (tabela 1.2), sugerindo a predominância de interações hidrofóbicas entre os analitos e os solventes, favorecendo a eficiência da extração.

Face aos resultados obtidos, optou-se por continuar a otimização da extração recorrendo com aos solventes orgânicos *n*-C₇ e *n*-C₉, uma vez ter promovido recuperações mais elevadas, compreendidas entre 15,0 e 64,1 % e 14,2 e 65,0 %, respetivamente. Obtiveram-se valores de RSD compreendidos entre 0,1 e 9,4 % e 0,6 e 4,6 %, respetivamente.

3.2.2. Efeito do tempo de retroextração

A retroextração foi realizada com base no método de LD. Esta etapa consiste na transferência quantitativa dos analitos da fase extrativa para um solvente orgânico, sendo fundamental assegurar um tempo de contato adequado para garantir a completa remoção dos analitos, evitando eventuais efeitos de memória. O tratamento por ultrassons ou a aplicação de uma agitação vigorosa permite facilitar o processo de LD, pelo que é necessário otimizar o seu tempo, por forma a maximizar as recuperações e tornar o processo o mais célere possível. Para este efeito, foram estudados os períodos de 5, 10 e 15 minutos sob tratamento ultrassônico, bem como, 2 minutos sob agitação por vortéx, com base em procedimentos descritos na literatura [75]. Os ensaios foram conduzidos utilizando os solventes *n*-C₉ e *n*-C₇, previamente selecionados

conforme descrito no ponto 4.2.1. Os resultados obtidos constam no gráfico da figura 3.3 e 3.4, respectivamente.

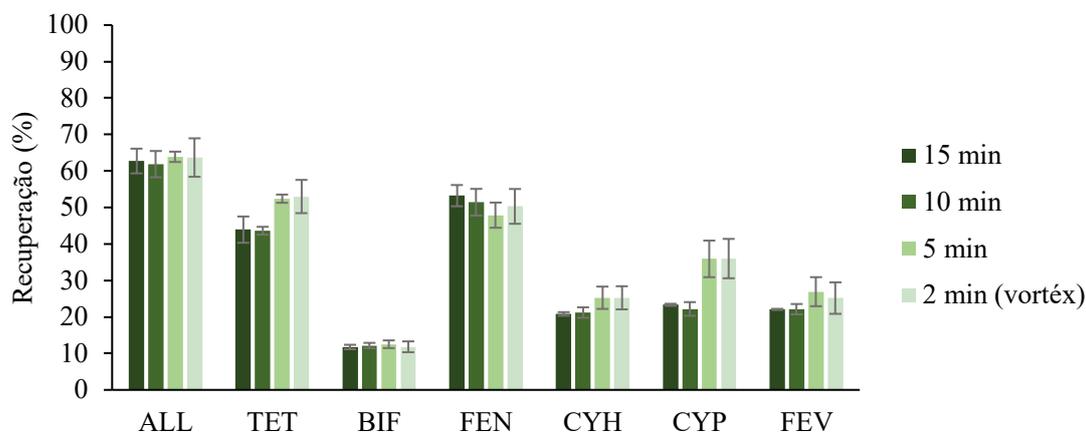


Figura 3.3. Efeito do tempo de retroextração na recuperação dos piretróides em estudo, obtidos por HF μ E(*n*-C₉)- μ LD/GC-MS(SIM). Condições do ensaio: 25 mL de água desionizada fortificada com 10,0 μ g L⁻¹; extração: 1 h (1000 rpm), pH 5,5; retro-extração: *n*-C₉).

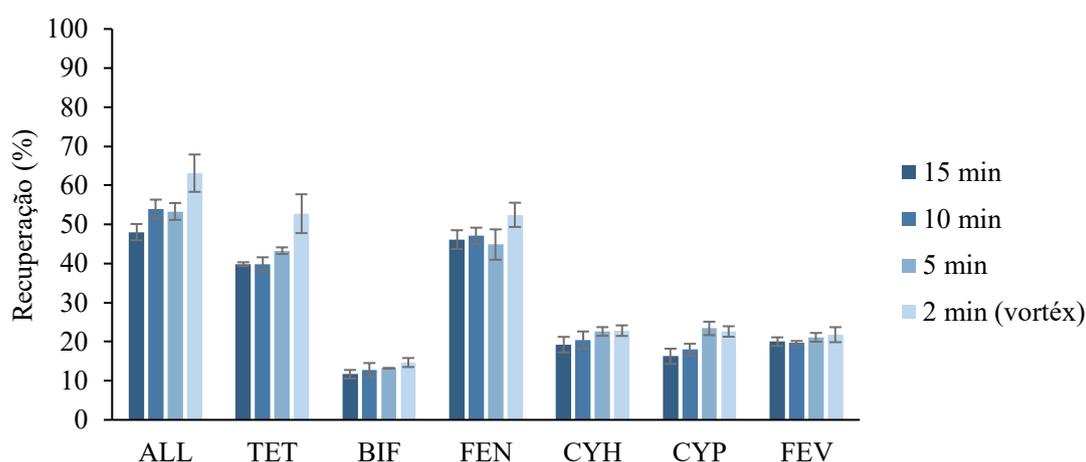


Figura 3.4. Efeito do tempo de retroextração na recuperação dos piretróides em estudo, obtidos por HF μ E(*n*-C₇)- μ LD/GC-MS(SIM). Condições do ensaio: 25 mL de água desionizada fortificada com 10,0 μ g L⁻¹; extração: 1 h (1000 rpm), pH 5,5; retro-extração: *n*-C₇).

Observando ambos os gráficos (figura 3.3 e 3.4), verificou-se uma proximidade entre as recuperações das quatro variações de tempo, pelo que períodos mais curtos favorecem a LD. Verificou-se que 2 minutos de tratamento por vortéx seriam o tempo e o tratamento necessário para a transferência dos analitos do dispositivo de HF μ E para o solvente orgânico. A utilização de agitação por vortéx, em substituição ao tratamento ultrassónico, pode ser justificada pela maior intensidade da agitação promovida entre o solvente e a fibra presente no *insert*, resultando numa cinética superior.

Assim, optou-se por prosseguir o trabalho com 2 minutos de tempo de retroextração, recorrendo ao vortéx. Para os testes subsequentes, foram mantidos os solventes extratores *n*-C₉ e *n*-C₇, considerando que não foi observada diferença significativa nas taxas de recuperação.

3.2.3. Efeito da velocidade de agitação

Relativamente à etapa de microextração, a HF μ E opera sob a tecnologia de amostragem por flutuação, onde os parâmetros cinéticos podem afetar a difusão dos analitos entre a fase extratora e o seio da amostra. Neste sentido, estudou-se a velocidade de agitação, sabendo que uma velocidade excessivamente elevada poderá promover a perda do solvente orgânico do dispositivo, enquanto uma velocidade abaixo não permite atingir o pico da maior área superficial de contacto para o processo de microextração. Deste modo, a velocidade deve de ser ajustada por forma a minimizar possíveis perdas de rendimento durante a etapa de preparação da amostra.

Assim, testaram-se velocidades de agitação compreendidas entre 800 e 1600 rpm, para ambos os solventes extratores, *n*-C₉ e *n*-C₇. Os resultados obtidos constam nos gráficos das figuras 3.5 e 3.6, respetivamente.

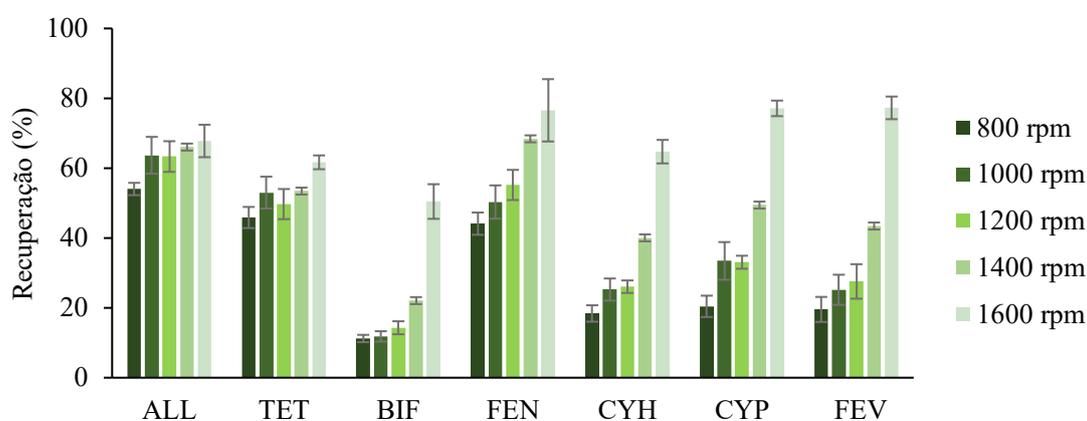


Figura 3.5. Efeito da velocidade de agitação na recuperação dos piretróides em estudo, obtidos por HF μ E(*n*-C₉)- μ LD/GC-MS(SIM). Condições do ensaio: 25 mL de água desionizada fortificada com 10,0 μ g L⁻¹; extração: 1 h, pH 5,5; retro-extração: *n*-C₉; 2 min sob agitação por vortéx.

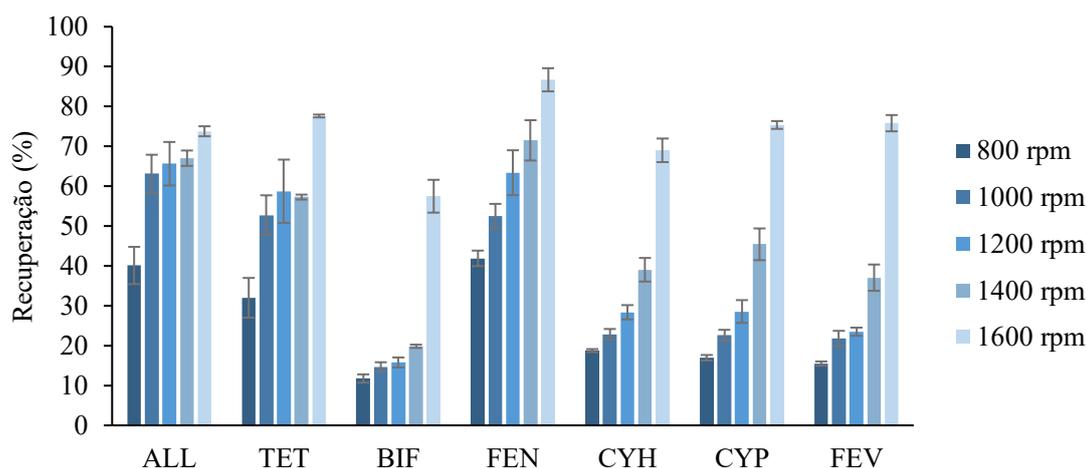


Figura 3.6. Efeito da velocidade de agitação na recuperação dos piretróides em estudo, obtidos por HF μ E(*n*-C₇)- μ LD/GC-MS(SIM). Condições do ensaio: 25 mL de água desionizada fortificada com 10,0 μ g L⁻¹; extração: 1 h, pH 5,5; retro-extração: *n*-C₇; 2 min sob agitação por vortéx.

Por análise das figuras 3.5 e 3.6, verificou-se que, para ambos os solventes utilizados, o aumento da velocidade de agitação resultou numa elevação da taxa de recuperação dos sete analitos em estudo. Este efeito foi particularmente evidente nos compostos de maior peso

molecular, dos quais, a BIF, a CYH, a CYP e o FEV, pois apresentam o dobro da recuperação quando submetidos a uma velocidade de agitação de 1600 rpm. Os registos levam a concluir que na velocidade de agitação de 1600 rpm, foi a condição mais eficiente estudada, destacando-se por alcançar recuperações superiores a 60%, sem comprometer a eficiência do processo.

3.2.4. Efeito do tempo de equilíbrio

O tempo de equilíbrio no processo de microextração é um parâmetro crucial na cinética do processo. O estudo deste fator é essencial na otimização da metodologia, uma vez o objetivo principal ser maximizar a recuperação dos analitos no menor tempo possível. Deste modo, foram realizados ensaios considerando tempos de microextração de 1, 2, 3 e 4 h. Os resultados obtidos encontram-se descritos nos gráficos da figura 3.7 e 3.8.

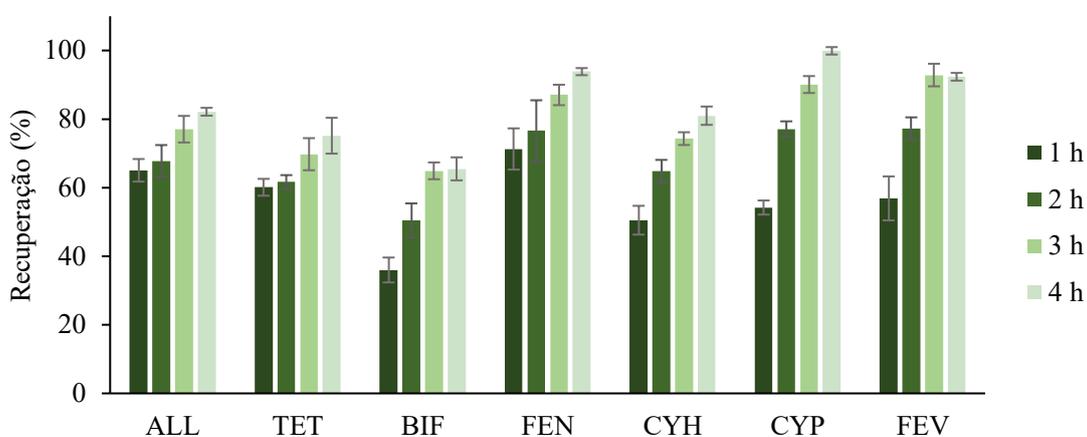


Figura 3.7. Efeito do tempo de equilíbrio na recuperação dos piretróides em estudo, obtidos por HF μ E(*n*-C₉)- μ LD/GC-MS(SIM). Condições do ensaio: 25 mL de água desionizada fortificada com 10,0 μ g L⁻¹; extração: 1600 rpm, pH 5,5; retro-extração: *n*-C₉; 2 min sob agitação.

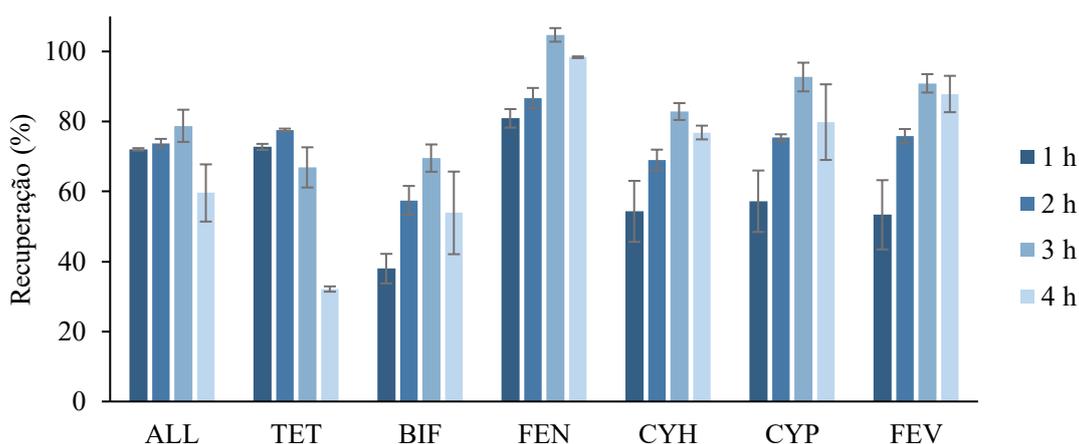


Figura 3.8. Efeito do tempo de equilíbrio na recuperação dos piretróides em estudo, obtidos por HF μ E(*n*-C₇)- μ LD/GC-MS(SIM). Condições do ensaio: 25 mL de água desionizada fortificada com 10,0 μ g L⁻¹; extração: 1600 rpm, pH 5,5; retro-extração: *n*-C₇; 2 min sob agitação por vortéx.

Na figura 3.8, verifica-se que as taxas de recuperação utilizando *n*-C₇ atingem um patamar máximo ao final de 3 h, enquanto na figura 3.7 se observa que, ao utilizar *n*-C₉, as taxas de

recuperação continuam a aumentar até às 4 h. Considerando que o uso do *n*-C₉ exigiria um tempo de equilíbrio superior em 1 h para alcançar resultados comparáveis, foi realizada uma análise comparativa entre os resultados obtidos pelos dois solventes.

O *n*-C₇ foi selecionado para dar continuidade ao estudo, com o tempo de equilíbrio fixado em 3 horas. Esta escolha fundamenta-se no facto deste solvente oferecer taxas de recuperação equivalentes às do *n*-C₉ nas mesmas condições experimentais, mas sem os inconvenientes observados no *n*-C₉, como o arrastamento de picos no cromatograma (conforme ilustrado no anexo VI). Além disso, o *n*-C₇ demonstrou maior precisão analítica, evidenciada por taxas de erro associadas significativamente mais baixas, garantindo maior estabilidade e reprodutibilidade no processo.

3.2.5. Efeito do modificador orgânico

As propriedades da matriz desempenham um papel fundamental na termodinâmica do processo de microextração. Neste sentido, estudou-se o efeito da adição de MeOH como modificador orgânico. Durante a microextração, pode ocorrer adsorção dos compostos mais hidrofóbicos às superfícies de vidro do *vial*, fenómeno conhecido como *wall-effect*, comprometendo a recuperação dos analitos. A adição de MeOH ao seio da amostra promove a redução desse efeito e com aumento da solubilidade do analito na amostra.

Deste modo, foram realizados ensaios com a incorporação de 0, 5, 10 e 20% (v/v) de MeOH à amostra aquosa. Os resultados obtidos encontram-se no gráfico da figura 3.9.

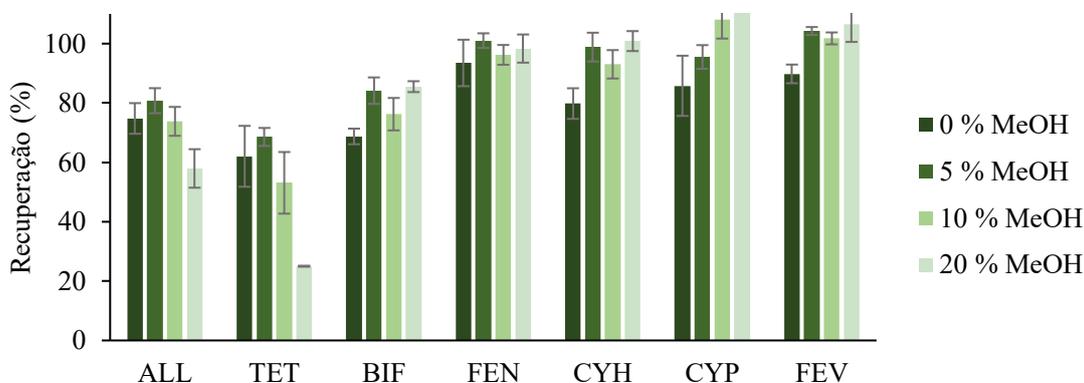


Figura 3.9. Efeito do modificador orgânico (MeOH) na recuperação dos piretróides em estudo, obtidos por HF μ E(*n*-C₇)- μ LD/GC-MS(SIM). Condições do ensaio: 25 mL de água desionizada fortificada com 10,0 μ g L⁻¹; extração: 3h, 1600 rpm, pH 5,5; retro-extração: *n*-C₇; 2 min sob agitação por vortéx.

Os resultados evidenciaram que, para os compostos ALL e TET, a concentração ótima de MeOH é de 5%, uma vez que concentrações superiores provocaram uma diminuição nas taxas de recuperação. Estes dados podem ser atribuídos à menor hidrofobicidade desses compostos, que, em concentrações mais elevadas de MeOH, apresentam maior solubilidade na solução, competindo de forma mais efetiva com o dispositivo de microextração pela partição dos analitos. Para os demais compostos em estudo, a adição de 5% de MeOH resultou em taxas de recuperação semelhantes às obtidas com 20% de MeOH.

Assim, para alcançar uniformidade nas taxas de recuperação dos piretróides em estudo, garantindo valores superiores a 65,2%, foi estabelecido que a concentração de 5% de MeOH é a mais apropriada para a otimização do método analítico.

3.2.6. Efeito da força iônica

A adição de eletrólitos fortes, como é o caso de NaCl, foi utilizada para alterar a força iônica da matriz, induzindo o efeito de *salting-out*. Este fenômeno ocorre devido à presença de íons na solução, que estabelecem interações fortes com as moléculas de água, diminuindo a solubilidade dos analitos no seio da amostra, facilitando a sua migração para o dispositivo de microextração. Este efeito é particularmente benéfico para a extração de compostos mais hidrofílicos, uma vez reduzir as suas interações com o meio, aumentando a eficiência do processo de extração.

Para avaliar o impacto da força iônica na recuperação dos piretróides, foi estudada a adição de diferentes concentrações de NaCl (0, 5 e 10% m/v) à matriz aquosa. Os resultados obtidos, apresentados na figura 3.10, demonstram a influência direta da força iônica no desempenho do método.

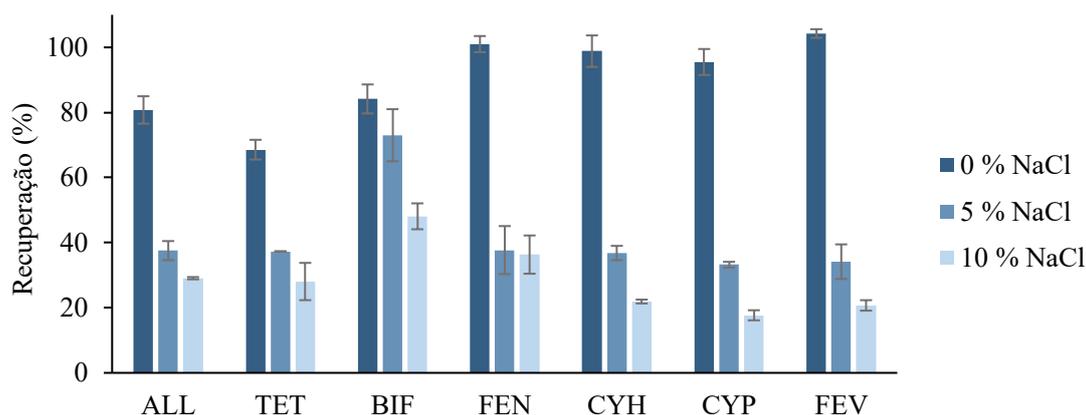


Figura 3.10. Efeito da força iônica (NaCl) na recuperação dos piretróides em estudo, obtidos por HF μ E(n-C7)- μ LD/GC-MS(SIM). Condições do ensaio: 25 mL de água desionizada fortificada com 10,0 μ g L⁻¹; extração: 3h, 1600 rpm, pH 5,5, 5% de MeOH; retro-extração: n-C7; 2 min sob agitação por vortéx.

A diminuição das recuperações com a adição de NaCl pode ser explicada pela natureza hidrofóbica dos analitos em estudo ($4,6 < \log K_{ow} < 6,2$). Dado que estes compostos já apresentam baixa solubilidade na fase aquosa, o efeito de *salting-out* tem impacto limitado. Além disso, concentrações elevadas de NaCl podem aumentar a viscosidade da solução ou alterar o equilíbrio de extração, dificultando a difusão dos analitos para o dispositivo de microextração, o que justifica a redução observada nas taxas de recuperação.

Assim, concluiu-se que a adição de NaCl influencia negativamente a eficiência de extração, razão pela qual foi descartada do estudo.

3.2.7. Dual-HF μ E

Finalizou-se a otimização do processo de microextração com a avaliação de modificações ao dispositivo de HF μ E. Com o intuito de reduzir o tempo de equilíbrio na etapa de microextração, estudou-se a utilização simultânea de duas fibras por amostra, uma abordagem designada por Dual-HF μ E. Este método consiste no uso de duas fibras para aumentar a área superficial de contacto com a amostra e a quantidade de fase extratora disponível, o que potencialmente acelera a cinética do processo ao reduzir o tempo necessário para atingir o equilíbrio.

Os ensaios foram realizados sob condições previamente otimizadas, sendo ambas as fibras preenchidas com o solvente *n*-C₇. Os resultados obtidos constam no gráfico da figura 3.11.

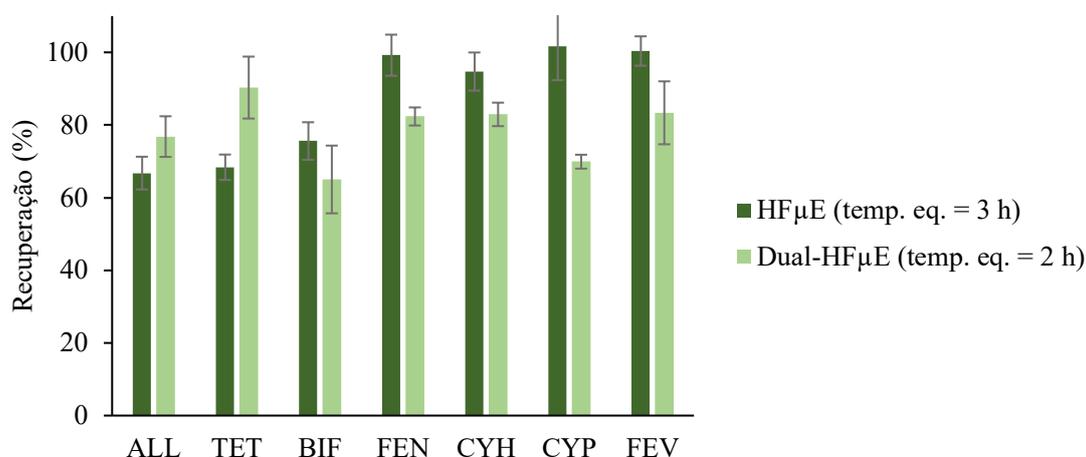


Figura 3.11. Efeito da utilização de duas HF μ E (*n*-C₇) e tempo de equilíbrio de 2 horas para os analitos em estudo, sob as restantes condições otimizadas.

Pelos dados obtidos, constatou-se que a estratégia Dual-HF μ E foi ineficaz para reduzir o tempo de equilíbrio de 3 para 2 h, uma vez que os compostos de maior massa molecular não alcançaram os mesmos níveis de recuperação previamente observados. Isto deve-se ao facto de que, embora o volume da fase extratora tenha sido duplicado, o tempo de 2 horas revelou-se insuficiente para a extração completa desses compostos. Consequentemente, optou-se por dar continuidade ao estudo utilizando apenas uma fibra, mantendo o tempo de equilíbrio em 3 horas.

Após a conclusão da otimização da metodologia por HF μ E- μ LD/GC-MS(SIM), as condições otimizadas encontram-se detalhadas na tabela 3.3.

Tabela 3.3. Condições otimizadas para o método desenvolvido por HF μ E(*n*-C₇)- μ LD/GC-MS(SIM).

Parâmetros	Condição Otimizada
Solvente de extração e dessorção	<i>n</i> -C ₇
Tempo de microextração (h)	3
% MeOH	5
% NaCl	0
Velocidade de agitação (rpm)	1600
Tempo de dessorção em vortéx (min)	2

Sob estas condições experimentais, foram alcançadas taxas de recuperação médias para os sete piretróides em estudo, variando entre 65,2% e 102,0% (tabela 3.4). Os baixos erros associados demonstram a elevada precisão e reprodutibilidade do método nas condições extrativas estabelecidas.

Tabela 3.4. Recuperações médias dos analitos nas condições otimizadas obtidas por HF μ E(n-C₇)- μ LD/GC-MS(SIM) e os respetivos RSD (%), calculados a partir de seis replicados.

Composto	Recuperação (%) \pm RSD (%) (n = 6)
ALL	70,8 \pm 4,2
TET	74,7 \pm 6,7
BIF	65,2 \pm 8,8
FEN	99,4 \pm 5,8
CYH	90,8 \pm 4,1
CYP	92,3 \pm 5,6
FEN	102,0 \pm 3,7

3.3. Reutilização dos dispositivos por HF μ E

Por razões alheias ao estudo e devido à escassez, em laboratório, das fibras inicialmente utilizadas, foram investigadas diversas alternativas que permitissem a continuidade do estudo, com o objetivo de igualar, nas condições otimizadas, as recuperações obtidas (tabela 3.4). Assim, tendo em conta que a fibra utilizada, com 10 mm de comprimento e diâmetro (\varnothing) 600 μ m, apresentava uma capacidade aproximada de 22 μ L de fase extratora no seu interior [73], foi proposta a utilização de uma fibra mais fina, também com 10 mm de comprimento, mas com menor diâmetro (200 μ m). Estas fibras, devido à sua menor quantidade de solvente, foram testadas em combinações de duas e três unidades, de modo a aumentar o volume e a área superficial de contacto da fase extratora, com o intuito de igualar o desempenho da fibra anteriormente utilizada. Os resultados obtidos encontram-se representados no gráfico da figura 3.12.

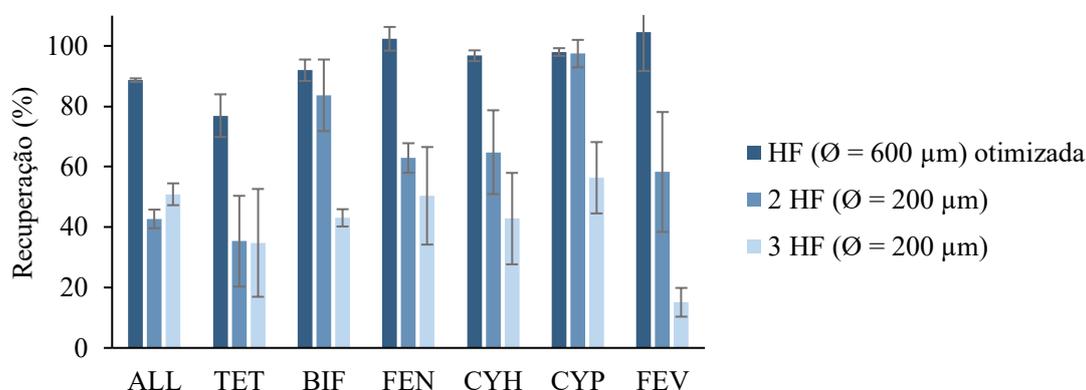


Figura 3.12. Resultados obtidos da utilização de duas e três fibras, de diâmetro 200 μ m, comparativamente às otimizadas. Estes ensaios foram realizados a partir da metodologia HF μ E(n-C₇)- μ LD/GC-MS(SIM), sob as condições anteriormente otimizadas.

Verificou-se que, para a maioria dos compostos analisados, a utilização das fibras mais finas foi insuficiente para alcançar recuperações semelhantes às obtidas com as fibras iniciais. Adicionalmente, a aplicação de três fibras finas tornou o processo extrativo mais difícil, o que pode estar associado à degradação dos dispositivos ou à perda de solvente no seu interior, provavelmente causada por uma maior interação entre as fibras devido ao vortéx formado durante o processo.

Perante os resultados obtidos e considerando inviáveis as opções testadas até então, foi analisada a possibilidade de reutilizar os dispositivos inicialmente utilizados. Para tal, o procedimento consistiu na remoção dos dispositivos do *vial* de análise, seguida de um processo de lavagem. Inicialmente, as lavagens foram realizadas com água e Ace, visando a remoção de impurezas e resíduos provenientes de extrações anteriores. É importante salientar que a reutilização das fibras foi testada após um período de repouso de pelo menos quatro meses entre a primeira e a segunda microextração. Os resultados foram comparados com os valores finais obtidos durante a otimização, conforme ilustrado no gráfico da figura 3.13.

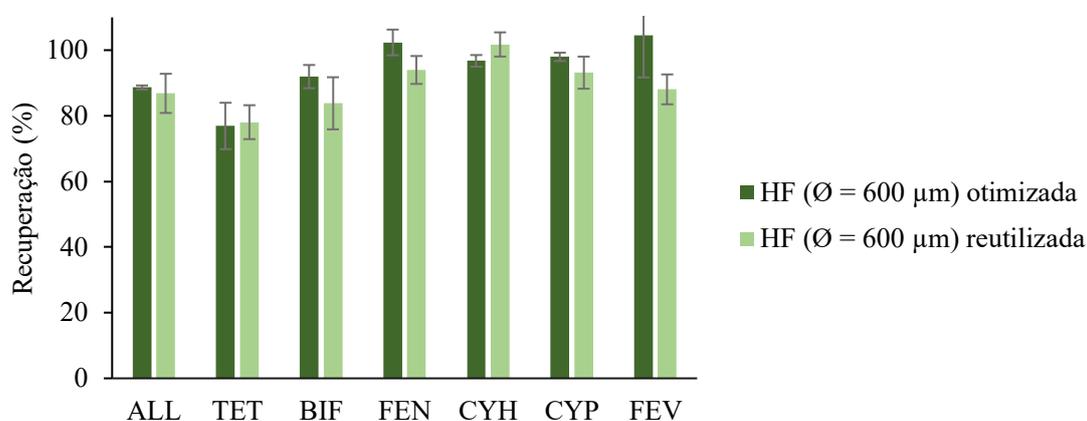


Figura 3.13. Resultados obtidos da utilização das fibras reutilizadas, de diâmetro 600 µm. Estes ensaios foram realizados a partir da metodologia HFµE(n-C₇)-µLD/GC-MS(SIM), sob as condições anteriormente otimizadas.

Por observação do gráfico da figura 3.13, observa-se uma elevada proximidade nas taxas de recuperação, indicando a viabilidade da reutilização das fibras. Contudo, a possibilidade de contaminação cruzada entre extrações revelou-se um ponto de preocupação. Para avaliar esta questão, foram realizados seis ensaios em amostras aquosas não fortificadas. Na maioria dos ensaios, não foram detetados compostos, sugerindo uma lavagem eficaz. No entanto, em dois casos, foram observadas concentrações residuais, o que motivou a otimização do processo de lavagem, variando o tempo e os métodos utilizados. Na tabela 3.5 encontram-se descritos os três processos de lavagem estudados: (i) imersão das fibras, conforme o procedimento anteriormente utilizado; (ii) tratamento com ultrassons, pela possibilidade de desintegração de resíduos no interior dos dispositivos.

Tabela 3.5. Processos de lavagem para a reutilização dos dispositivos de microextração por HFµE.

Processo de lavagem	Ace	Água	Repetições do ciclo
1	Imersão: 2 min		
2	Imersão: 5 min	2 min	3×
3	Ultrassons: 5 min		

Aplicando os diferentes processos referidos (tabela 3.5), os resultados obtidos constam no gráfico da figura 3.14.

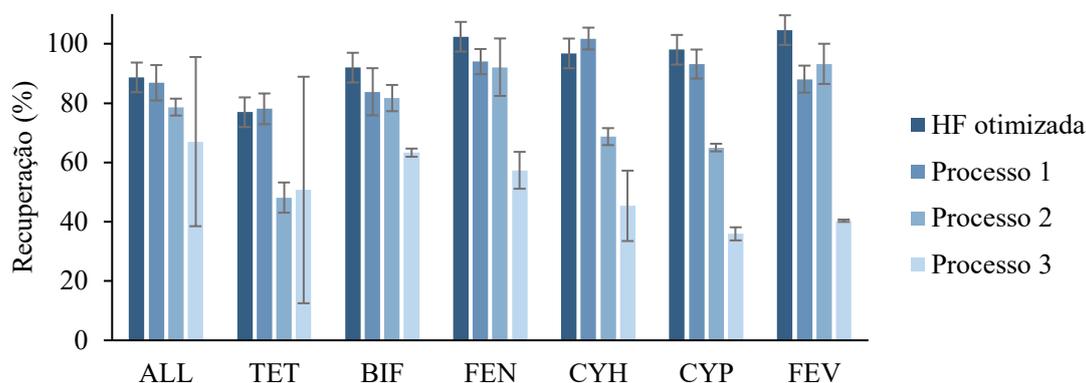


Figura 3.14. Estudo do efeito dos processos de lavagem das fibras reutilizadas sob as condições otimizadas da metodologia HF μ E(*n*-C₇)- μ LD/GC-MS(SIM).

Os resultados apresentados na figura 3.14 evidenciaram que o processo 1 foi o mais eficiente, alcançando taxas de recuperação semelhantes às obtidas com dispositivos de primeira utilização. Contudo, o prolongamento do tempo de imersão em Ace, assim como a aplicação de tratamento ultrassónico, resultaram em recuperações inferiores, possivelmente devido à degradação das fibras durante o processo. Adicionalmente, nas fibras reutilizadas, verificou-se um aumento na presença de interferentes no traçado da corrente iónica, em comparação com os dispositivos novos.

Como alternativa, investigou-se a possibilidade de degradação dos piretróides, fotossensíveis, por exposição solar. Os dispositivos foram submetidos a 30 dias de exposição à luz solar, em condições de temperatura ambiente laboratorial, e posteriormente testados em ensaios sem fortificação. Verificou-se que a combinação da exposição solar com o Processo 1 de lavagem resultou na redução de interferentes no processo extrativo, permitindo a continuidade dos estudos com esta abordagem.

3.4. Validação do método HF μ E(*n*-C₇)- μ LD/GC-MS(SIM)

Após a otimização das condições experimentais, procedeu-se à validação da metodologia, etapa fundamental para a quantificação dos analitos em amostras aquosas reais, pela necessidade do cumprimento dos limites estabelecidos pela legislação vigente descritos no ponto 1.3. Para tal, foram determinados os limiares analíticos, a gama linear de trabalho e a precisão, tanto intra-dia como inter-dia, associadas à metodologia proposta. Os ensaios foram realizados utilizando água desionizada como matriz, previamente fortificada com uma mistura padrão de piretróides em diferentes concentrações.

3.4.1. Limiares analíticos e linearidade

De forma a avaliar a sensibilidade da metodologia, foram determinados os LOD e LOQ, através das razões S/N de 3:1 e 10:1, respetivamente, pelo que os valores obtidos se encontram descritos na tabela 3.6.

Tabela 3.6. LODs e LOQs para os compostos alvo, obtidos na validação da metodologia HF μ E(*n*-C₇)- μ LD/GC-MS(SIM).

Piretróides	LOQ (ng L ⁻¹)	LOD (ng L ⁻¹)
ALL	150	50
TET	60	20
BIF	15	5
FEN	30	10
CYH	60	20
CYP	150	50
FEV	150	50

Conforme apresentado na tabela 3.6, verifica-se que a metodologia HF μ E(*n*-C₇)- μ LD/GC-MS(SIM) apresenta $5 < LOD < 50$ ng L⁻¹ e $15 < LOQ < 150$ ng L⁻¹. Comparando estes resultados com os limites estabelecidos pela legislação, descritos no ponto 1.3, observa-se que, para aplicação em águas superficiais, particularmente para utilização em rega, a metodologia proposta permite quantificar os sete piretróides em estudo no limite máximo exigido de 500 ng L⁻¹, uma vez que os LOQ apresentados se encontram abaixo deste valor.

Contudo, no caso da legislação relativa às águas destinadas ao consumo humano, nem todos os piretróides podem ser quantificados no limite máximo permitido, que é de 100 ng L⁻¹. Especificamente, os compostos ALL, CYP e FEV apresentam valores de LOQ superiores a este limite, indicando que a metodologia não permite a sua quantificação, sendo apenas possível identificar a sua presença, levando à necessidade de uma maior sensibilidade não alcançada neste estudo. No entanto, para os restantes piretróides, a metodologia demonstra-se eficaz e adequada para a quantificação no limite exigido a este tipo de matriz.

Posteriormente, para avaliar a linearidade da metodologia, procedeu-se à construção das curvas de calibração, recorrendo ao método dos mínimos quadrados para a obtenção de regressões lineares. Foram fortificados ensaios com concentrações compreendida entre 2,5 e 0,00125 mg L⁻¹, proporcionando concentrações na água compreendidas entre 10,0 e 0,05 μ g L⁻¹. Os parâmetros das regressões lineares, nomeadamente a gama dinâmica de trabalho, o declive (*a*) e a interceção no eixo das abcissas (*b*) e os valores de coeficiente de determinação (*r*²) encontram-se descritos na tabela 3.7. As curvas de calibração obtidas podem ser consultadas no anexo VII.

Tabela 3.7. Parâmetros matemáticos relativos às gamas de trabalho dos sete piretróides, obtidos através da validação da presente metodologia.

Piretróides	Gama linear (μ g L ⁻¹)	<i>a</i>	<i>b</i>	<i>r</i>²
ALL	10,0 - 0,2	477962	38021	0,9989
TET	10,0 - 0,1	257765	28388	0,9976
BIF	10,0 - 0,02	3519942	520468	0,9956
FEN	10,0 - 0,05	958285	82040	0,9979
CYH	10,0 - 0,1	621270	32631	0,9993
CYP	10,0 - 0,2	318585	24987	0,9979
FEV	10,0 - 0,2	548938	67963	0,9992

Para obter estes resultados recorreu-se a calibradores entre 8 e 12 níveis, dependendo da sensibilidade do analito em questão, registando-se assim gamas lineares dinâmicas de 0,2 a 10,0 $\mu\text{g L}^{-1}$ para ALL, CYP e FEV, de 0,1 a 10,0 $\mu\text{g L}^{-1}$ para TET e CYH, de 0,05 a 10,0 $\mu\text{g L}^{-1}$ para FEN, e de 0,02 a 10,0 $\mu\text{g L}^{-1}$ para BIF. Adicionalmente, observaram-se r^2 superiores a 0,9956, evidenciando uma elevada proximidade ao valor ideal de 1, o que reflete uma forte tendência para a ocorrência de linearidade nos dados analisados.

Contudo, é insuficiente averiguar a linearidade das regressões pela utilização deste único parâmetro, r^2 , visto que não permite avaliar a homocedasticidade numa determinada gama linear de trabalho. Ao não avaliar este parâmetro, podemos estar a introduzir erros sistemáticos, pela diminuição da precisão, que influenciará as concentrações residuais. Neste sentido, recorreu-se ao teste *lack-of-fit*, também descrito na literatura como teste F, e ao estudo da dispersão residual. Enquanto no gráfico de resíduos se observa visualmente a dispersão dos valores, o teste F possibilita estudar a uniformidade na distribuição dos dados experimentais, comparando o valor F tabelado (F_{tab}) com o valor F experimental (F_{exp}), para cada piretróide em estudo.

Por forma a verificar a uniformidade de cada analito, calcularam-se os valores de F_{tab} , determinado com base na tabela da distribuição F, considerando, neste caso, o nível de confiança de 95% e os graus de liberdade específicos do composto em análise. A aceitação é estabelecida pela condição $F_{\text{tab}} > F_{\text{exp}}$, indicando homocedasticidade da gama linear [83]. Na tabela 3.8 encontram-se apresentados os valores de F_{tab} e F_{exp} referentes aos analitos em estudo.

Tabela 3.8. Valores correspondentes ao F_{tab} e F_{exp} determinados para os sete piretróides em estudo.

Piretróides	F_{exp}	F_{tab}
ALL	0,0014	2,74
TET	0,17	2,58
BIF	0,000013	2,25
FEN	0,0000031	2,34
CYH	0,0081	2,58
CYP	0,0012	2,74
FEV	0,00029	2,74

Por avaliação tabela 3.8, os resultados obtidos indicam que os todas as gamas dinâmicas dos diferentes analitos, exibem homocedasticidade, devido ao facto de que os valores de F_{tab} excedem consistentemente os valores de F_{exp} . Simultaneamente, estudou-se a dispersão residual, definida pela diferença entre os valores experimentais e os valores previstos pelo modelo de regressão, com o objetivo de avaliar o comportamento dos dados na gama dinâmica considerada. Com base na análise dos gráficos apresentados no anexo VIII, que relacionam os resíduos relativos às concentrações, verificou-se uma distribuição aleatória, sem indícios de tendências, o que confirma a homocedasticidade dos dados. Assim, concluiu-se que todas as regressões lineares descritas na tabela 3.7 são adequadas pois apresentam uma linearidade satisfatória.

3.4.2. Precisão intra-dia e inter-dia

Conforme descrito no ponto 2.3.5.2. da parte experimental, a avaliação da precisão da metodologia foi estudada recorrendo á realização de ensaios intra dia (n = 6) e inter-dia (n = 3, por 3 dias consecutivos). Os níveis de fortificação avaliados corresponderam a 5,0 µg L⁻¹ (alto), 2,0 µg L⁻¹ (médio) e 0,20 µg L⁻¹ (baixo). Os valores de precisão obtidos, expressos em RSD, encontram-se detalhados na tabela 3.9 juntamente com as respetivas recuperações obtidas.

Tabela 3.9. Valores de recuperação e precisão obtidos em condições de repetibilidade (intra-dia) e de precisão intermédia (inter-dia) para os piretróides estudados através da metodologia por HFµE(n-C7)-µLD/GC-MS(SIM). Os três níveis de fortificação selecionados foram de 5,0 µg L⁻¹ (Alto) 2,0 µg L⁻¹ (Médio) e 0,20 µg L⁻¹ (Baixo).

Piretróides	Nível de fortificação (µg L ⁻¹)	Intra-dia (n=6)		Inter-dia (n=9)	
		Recuperação (%)	Precisão (RSD, %)	Recuperação (%)	Precisão (RSD, %)
ALL	5,0	77,5	2,6	70,3	4,3
	2,0	79,3	3,2	70,0	2,2
	0,2	70,2	4,0	72,4	8,6
TET	5,0	75,0	3,9	73,2	7,2
	2,0	71,1	8,3	70,6	11,1
	0,2	74,7	6,5	75,8	7,4
BIF	5,0	68,7	4,9	66,6	8,2
	2,0	68,9	6,3	60,1	8,7
	0,2	63,2	5,1	64,6	9,0
FEN	5,0	95,9	1,6	97,2	7,1
	2,0	94,1	4,8	98,7	4,6
	0,2	94,6	3,7	99,2	5,3
CYH	5,0	95,3	5,6	98,8	9,9
	2,0	95,2	5,1	97,6	10,4
	0,2	95,8	6,9	98,3	9,0
CYP	5,0	100,6	4,7	98,4	8,5
	2,0	101,1	3,9	99,6	8,0
	0,2	97,2	6,6	99,1	9,2
FEV	5,0	101,7	5,0	101,5	5,2
	2,0	99,1	6,5	100,5	6,4
	0,2	101,8	3,5	99,3	4,2

Com base nos resultados de precisão apresentados na tabela 3.9, os valores de RSD foram inferiores a 11,1%. De acordo com os requisitos estabelecidos pela Diretiva 98/83/EC para a análise vestigial de compostos orgânicos, a metodologia proposta é considerada aceitável, uma vez que a precisão obtida se encontra abaixo do limite máximo permitido de 25%.

Posteriormente, foram calculadas as respetivas recuperações com o objetivo de avaliar possíveis oscilações da metodologia proposta. Os valores de recuperação variaram entre 60,1% e 101,8%. Para os compostos CYP e FEV, obtiveram-se valores próximos de 100%, seguidos pela CYH (95,2% – 98,8%), FEN (94,1% – 99,2%), ALL (70,0% – 79,3%), TET (70,6% – 75,8%) e BIF (60,1% – 68,9%). Estes resultados refletem uma boa recuperação para a maioria dos analitos, com variações aceitáveis e adequadas para o propósito da metodologia por HFµE.

3.5. Aplicação a matrizes reais

No contexto da monitorização de piretróides em matrizes reais aquosas, a avaliação do efeito matriz é um fator determinante para a obtenção de resultados analíticos precisos e reprodutíveis. Com este objetivo, a metodologia de HF μ E, após otimização e validação, foi aplicada a diversas amostras de água, conforme descrito na parte experimental. A seleção das quatro matrizes fundamentou-se no reconhecimento como águas em meios ambientais com elevado potencial de contaminação pelos fitofarmacêuticos alvo.

Avaliou-se o efeito matriz utilizando o SAM, por meio da fortificação das amostras aquosas com o padrão de trabalho em diferentes concentrações (0,2 – 10,0 $\mu\text{g L}^{-1}$). Paralelamente, foram realizados ensaios em branco, isto é, sem o passo de fortificação, com o objetivo de garantir o máximo rigor e controlo de efeitos de memória na metodologia analítica desenvolvida.

3.5.1. Amostras de água subterrânea

A partir dos resultados obtidos nas análises da matriz de água subterrânea, construíram-se curvas de calibração com cinco níveis de concentração, que resultaram nos coeficientes de determinação apresentados na tabela 3.10, correspondentes a cada analito. Conforme ilustrado na tabela 3.10 e no anexo X, os dados indicam uma boa linearidade, com valores de r^2 superiores a 0,9957 (FEN).

Na tabela 3.10, encontram-se apresentados os parâmetros de linearização determinados pelo método dos mínimos quadrados. Os resultados obtidos nos ensaios em branco confirmaram a ausência de sinais dos analitos na matriz, indicando que as concentrações se encontram abaixo dos LODs estabelecidos na validação (anexo IX).

Tabela 3.10. Parâmetros relativos às curvas de calibração obtidas por SAM para a amostra de água subterrânea obtida por HF μ E(n -C7)- μ LD/GC-MS(SIM), sob condições experimentais otimizadas (a – declive; b – ordenada na origem).

Amostra (local)	Piretróides	a	b	r^2	Concentração ($\mu\text{g L}^{-1}$)
Água subterrânea (poço)	ALL	387180	25649	0,9992	< LOD
	TET	221766	10895	0,9963	< LOD
	BIF	2927723,4	524206	0,9982	< LOD
	FEN	479227	153609	0,9957	< LOD
	CYH	418970	65210	0,9972	< LOD
	CYP	239539	61974	0,9987	< LOD
	FEV	402144	50733	0,9994	< LOD

A figura 3.15 exemplifica um traçado de corrente iónica total correspondente ao ensaio obtido pela metodologia à amostra de água subterrânea fortificada com 0,2 $\mu\text{g L}^{-1}$ sob condições experimentais otimizadas. Observa-se uma excelente seletividade e sensibilidade da metodologia proposta, evidenciada pela ausência de interferentes na co-eluição dos analitos.

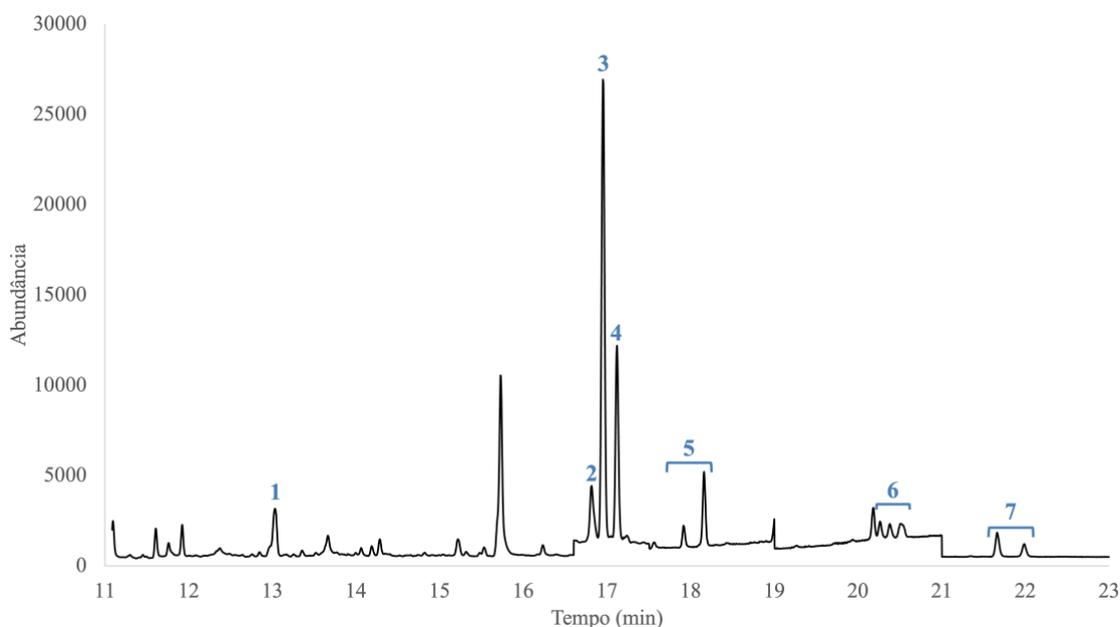


Figura 3.15. Traçado de corrente iônica total relativo à amostra de água subterrânea fortificada a $0,2 \mu\text{g L}^{-1}$ obtido por HF $\mu\text{E}(n\text{-C}_7)$ - $\mu\text{LD}/\text{GC-MS}(\text{SIM})$, nas condições experimentais otimizadas (1-ALL; 2-TET; 3-BIF; 4-FEN; 5-CYH; 6-CYP; 7-FEV).

3.5.2. Amostras de água para consumo humano

Relativamente à água para consumo humano, foram realizadas análises que resultaram nas curvas de calibração ilustradas no anexo X. Os valores obtidos pelo método dos mínimos quadrados, bem como as concentrações determinadas na amostra em branco (anexo IX), estão apresentados na tabela 3.11. Observou-se uma resposta linear, com r^2 superiores a 0,9958 (CYP).

Tabela 3.11. Parâmetros relativos às curvas de calibração obtidas por SAM para a amostra de água para consumo humano obtida por HF $\mu\text{E}(n\text{-C}_7)$ - $\mu\text{LD}/\text{GC-MS}(\text{SIM})$, sob condições experimentais otimizadas (a – declive; b – ordenada na origem).

Amostra (local)	Piretróides	a	b	r^2	Concentração ($\mu\text{g/L}$)
Água para consumo humano	ALL	489969	-71250	0,9996	< LOD
	TET	252599	29242	0,9964	< LOD
	BIF	2615293	-156301	0,9977	< LOD
	FEN	695544	- 49132	0,9993	< LOD
	CYH	551657	93293	0,9965	< LOD
	CYP	291732	72221,3	0,9958	< LOD
	FEV	477916	68200	0,9982	< LOD

A figura 3.16 apresenta um traçado de corrente iônica total correspondente à amostra de água para consumo humano fortificada com $0,2 \mu\text{g L}^{-1}$, no qual foi possível identificar os analitos determinados por aplicação do SAM com significativa qualidade analítica.

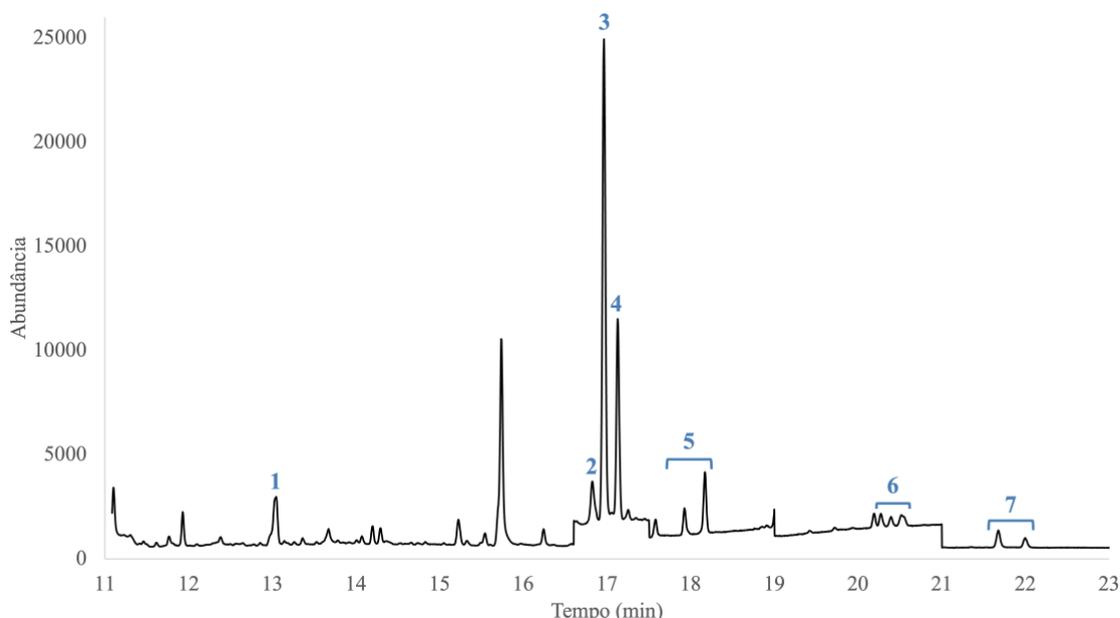


Figura 3.16. Traçado de corrente iônica total relativo à amostra de água para consumo humano fortificada a $0,2 \mu\text{g L}^{-1}$ obtido por HF $\mu\text{E}(n\text{-C}_7)$ - $\mu\text{LD}/\text{GC-MS}(\text{SIM})$, nas condições experimentais otimizadas (1-ALL; 2-TET; 3-BIF; 4-FEN; 5-CYH; 6-CYP; 7-FEV).

3.5.3. Amostras de água superficial

Na análise da amostra de água superficial proveniente da Ria de Aveiro, foram obtidas curvas de calibração a partir de cinco níveis de fortificação, apresentadas no anexo X. Os valores determinados pelo método dos mínimos quadrados estão listados na tabela 3.12, evidenciando uma boa linearidade, com r^2 superiores a 0,9973 (ALL). Além disso, os ensaios em branco confirmaram a ausência de concentrações dos piretróides em estudo acima dos LODs na amostra superficial (anexo IX).

Tabela 3.12. Parâmetros relativos às curvas de calibração obtidas por SAM para a amostra de água superficial obtida por HF $\mu\text{E}(n\text{-C}_7)$ - $\mu\text{LD}/\text{GC-MS}(\text{SIM})$, sob condições experimentais otimizadas (a – declive; b – ordenada na origem).

Amostra (local)	Piretróides	a	b	r^2	Concentração ($\mu\text{g/L}$)
Água superficial (Ria de Aveiro)	ALL	357495	44312	0,9973	< LOD
	TET	239776	10501	0,9983	< LOD
	BIF	2563067,3	- 410696	0,9998	< LOD
	FEN	576978	-25227	0,9976	< LOD
	CYH	434019	-82717	0,9997	< LOD
	CYP	282169	21759	0,9997	< LOD
	FEV	448320	15711	0,9995	< LOD

A figura 3.17 ilustra o perfil do traçado de corrente iônica total de uma amostra de água superficial fortificada com $0,2 \mu\text{g L}^{-1}$ dos piretróides em estudo, evidenciando a detecção dos analitos alvo com elevada precisão analítica pelo SAM.

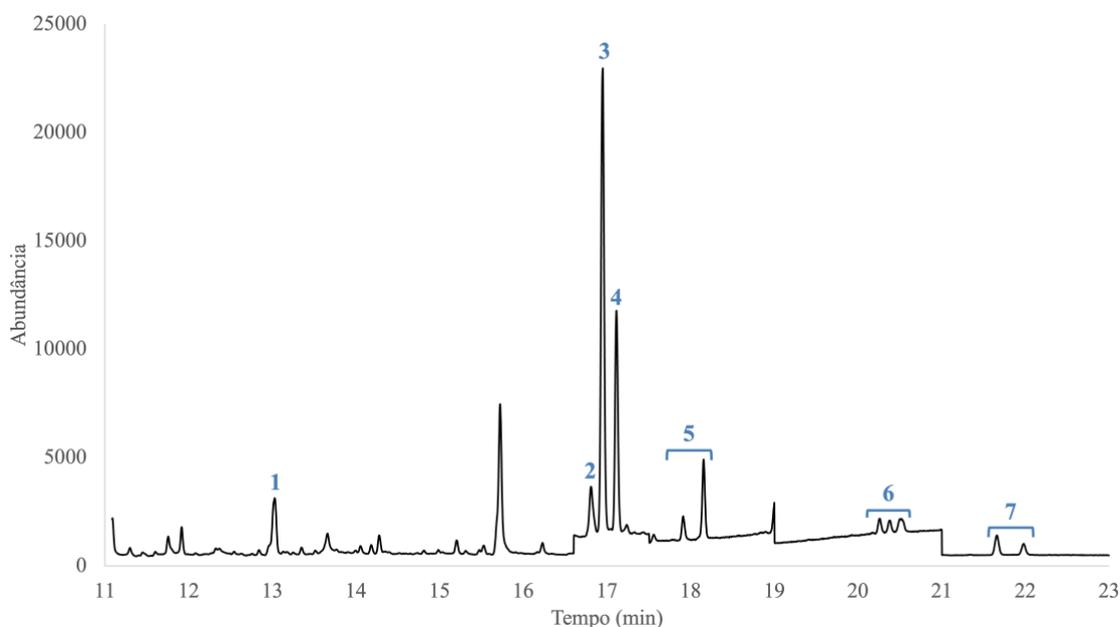


Figura 3.17. Traçado de corrente iônica total relativo à amostra de água superficial fortificada a $0,2 \mu\text{g L}^{-1}$ obtido por HF $\mu\text{E}(n\text{-C}_7)$ - $\mu\text{LD/GC-MS(SIM)$, nas condições experimentais otimizadas (1-ALL; 2-TET; 3-BIF; 4-FEN; 5-CYH; 6-CYP; 7-FEV).

3.5.4. Amostras de água residual de ETAR

Por fim, aplicou-se a metodologia também a amostras de água residual (ETAR). Deste modo construíram-se curvas de calibração para os diversos analitos do presente estudo, pelo que os parâmetros obtidos constam na tabela 3.13. Por observação à tabela, assim como ao anexo X, é possível determinar boa linearidade dentro da gama estudada, uma vez que os valores de r^2 encontram-se superiores a 0,9969 (BIF). Os ensaios em branco apresentaram ausência dos analitos em concentrações acima dos LODs obtidos na validação do método (anexo IX).

Tabela 3.13. Parâmetros relativos às curvas de calibração obtidas por SAM para a amostra de água residual (ETAR) obtida por HF $\mu\text{E}(n\text{-C}_7)$ - $\mu\text{LD/GC-MS(SIM)$, sob condições experimentais otimizadas (a – declive; b – ordenada na origem).

Amostra (local)	Piretróides	a	b	r^2	Concentração ($\mu\text{g/L}$)
	ALL	405587	-6127,3	0,9998	< LOD
	TET	198389	6100,0	0,9996	< LOD
Água residual (ETAR - Alcântara)	BIF	2324464,7	-625946	0,9969	< LOD
	FEN	677281	-61242	0,9997	< LOD
	CYH	484685	30339	0,9993	< LOD
	CYP	255235	14362	0,9988	< LOD
	FEV	393742	43227	0,9997	< LOD

Na figura 3.18 encontram-se exemplificado um traçado de corrente iônica total relativo a um ensaio da matriz de água residual (ETAR), fortificada com $0,2 \mu\text{g L}^{-1}$ de piretróides.

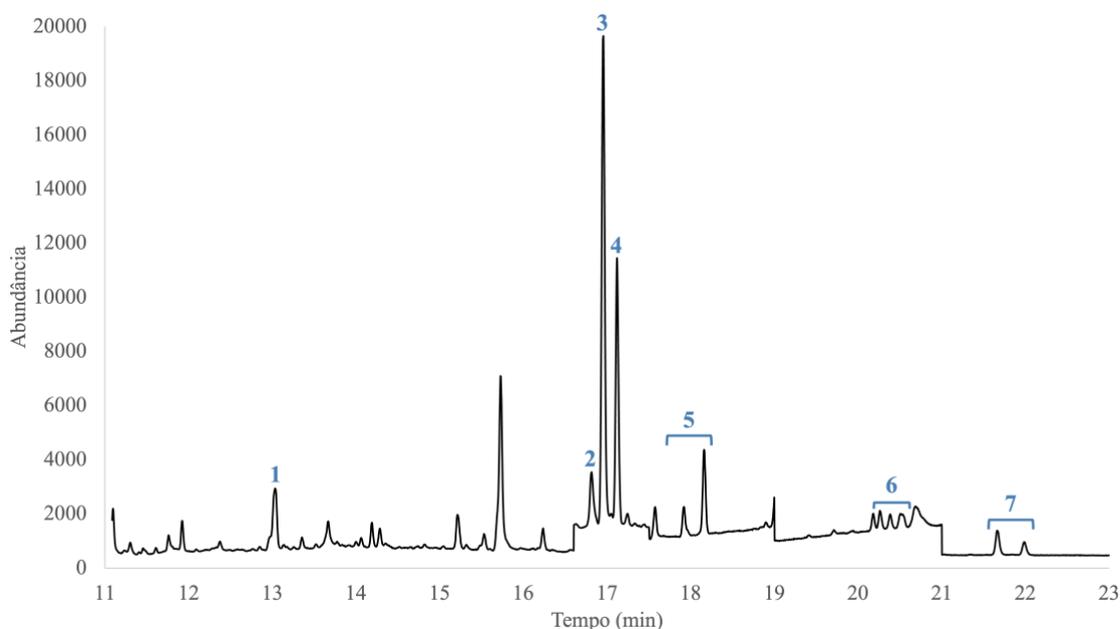


Figura 3.18. Traçado de corrente iônica total relativo à amostra de água residual (ETAR) fortificada a $0,2 \mu\text{g L}^{-1}$ obtido por HF $\mu\text{E}(n\text{-C}_7)$ - $\mu\text{LD}/\text{GC-MS}(\text{SIM})$, nas condições experimentais otimizadas (1-ALL; 2-TET; 3-BIF; 4-FEN; 5-CYH; 6-CYP; 7-FEV).

De forma geral, este estudo teve como objetivo avaliar o efeito matriz em quatro matrizes aquosas reais sobre os compostos-alvo, sob a utilização da metodologia proposta. Conforme apresentado na tabela 3.4, que reporta os valores de recuperação obtidos sob condições experimentais otimizadas e em ensaios com água ultrapura, a tabela 3.14 consta as taxas de recuperação de cada piretróide em matrizes reais fortificadas a $10 \mu\text{g L}^{-1}$. Os valores de RSD permaneceram abaixo de 11,9%, demonstrando a precisão da metodologia, em conformidade com os critérios de aceitação estabelecidos ($< 15\%$).

Tabela 3.14. Recuperações médias dos sete piretróides estudados obtidas aplicando a metodologia desenvolvida a águas subterrânea, para consumo humano, superficial e residual (ETAR).

Piretróides	Recuperação (%) \pm RSD (%) (n=3)			
	Água subterrânea	Água para consumo humano	Água superficial	Água residual (ETAR)
ALL	$60,4 \pm 11,7$	$69,7 \pm 9,5$	$60,1 \pm 5,4$	$65,0 \pm 2,7$
TET	$68,2 \pm 11,9$	$74,4 \pm 7,7$	$78,7 \pm 9,7$	$60,0 \pm 3,1$
BIF	$65,1 \pm 3,9$	$58,5 \pm 1,0$	$57,5 \pm 4,1$	$52,5 \pm 4,9$
FEN	$87,9 \pm 5,6$	$98,0 \pm 0,9$	$93,4 \pm 4,2$	$84,6 \pm 2,9$
CYH	$77,1 \pm 4,3$	$92,8 \pm 2,9$	$78,8 \pm 0,5$	$90,6 \pm 2,7$
CYP	$71,0 \pm 5,1$	$87,4 \pm 2,8$	$82,8 \pm 0,7$	$74,2 \pm 5,5$
FEV	$78,1 \pm 2,4$	$89,2 \pm 6,5$	$86,2 \pm 0,5$	$76,1 \pm 6,6$

Deste modo alcançaram-se recuperações entre 60,4% e 87,9% ($\text{RSD} \leq 11,9\%$) para água subterrânea, entre 58,5% e 92,8% ($\text{RSD} \leq 9,5\%$) para água para consumo humano, entre 57,5% e 93,4% ($\text{RSD} \leq 9,7\%$) para água superficial, e entre 52,5% e 90,6% ($\text{RSD} \leq 6,6\%$) para água residual de ETAR.

Com o objetivo de avaliar o desempenho da metodologia quando aplicada a matrizes aquosas reais, foram obtidas respostas lineares na gama de trabalho entre 0,2 e 10 $\mu\text{g L}^{-1}$, conforme demonstrado nos pontos anteriores. Para fins comparativos, foram elaborados gráficos de compilação para cada composto, sendo apresentado, a título exemplificativo, o gráfico da figura 3.19 da FEN, uma vez que seu comportamento é representativo da maioria dos compostos analisados.

Os resultados obtidos indicam a presença de efeitos de matriz de baixa intensidade na aplicação da metodologia desenvolvida a amostras aquosas reais. Com base na interpretação desses dados e nos valores de recuperação descritos na tabela 3.14, verificou-se que as matrizes de água residual de ETAR e água subterrânea apresentam o maior efeito matriz. Essa tendência foi observada para os compostos TET, BIF, FEN, CYP e FEV. No entanto, para os compostos ALL e CYH, o maior efeito matriz não foi causado pela água residual de ETAR, mas sim pelas matrizes de água superficial e subterrânea. Conforme esperado, a matriz com menor interferência foi a água de consumo humano, na qual os valores de recuperação se mantiveram mais próximos dos obtidos em condições ideais, evidenciando uma menor influência de efeitos de matriz.

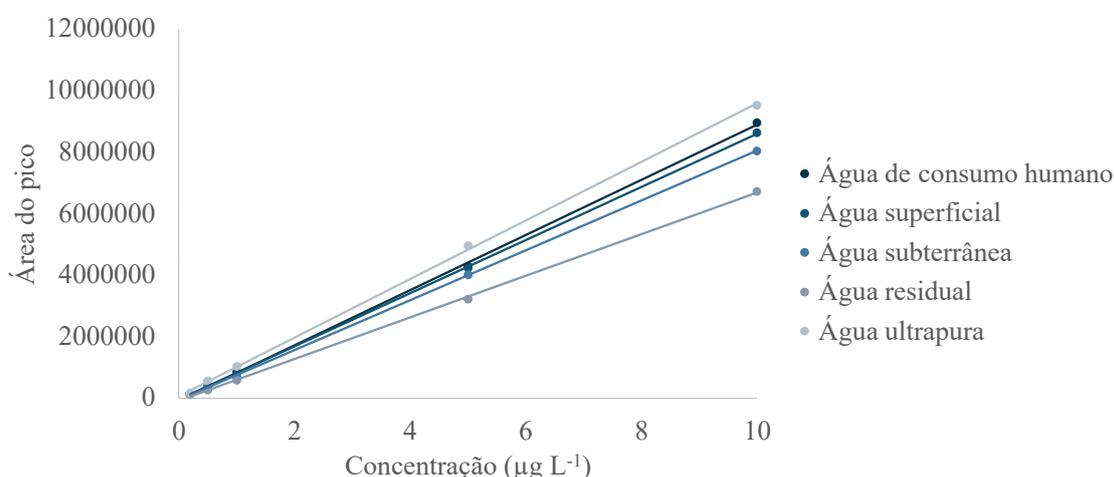


Figura 3.19. Gráfico de comparação das curvas de calibração do composto FEN analisado nas diferentes matrizes reais aquosas.

3.6. Aplicação na metodologia LVI-GC-MS(SIM)

Com base nos valores obtidos pela metodologia estudada, foi proposta a utilização de uma instrumentação de maior sensibilidade, com o objetivo de reduzir os limites analíticos e garantir que estes se encontrem dentro dos limites estabelecidos pela legislação, conforme os valores apresentados no ponto 1.3. A otimização das condições de injeção visa melhorar a eficiência na detecção dos piretróides analisados, aumentando a sensibilidade e a reprodutibilidade dos resultados.

Dessa forma, a injeção de 2 μL em modo SL foi substituída por uma injeção de 20 μL utilizando um injetor PTV no modo *solvent vent*. Essa abordagem permite a introdução de volumes maiores de amostra, com a eliminação controlada do solvente antes da transferência dos analitos para a coluna cromatográfica, minimizando a sobrecarga do sistema e reduzindo os efeitos de discriminação de compostos com diferentes volatilidades. Como resultado, há um aumento significativo na relação sinal-ruído e, conseqüentemente, na sensibilidade do método.

A comparação entre as metodologias foi realizada por meio da análise dos traçados de corrente iónica total. Como exemplo, a figura 3.20 apresenta os traçados correspondentes aos iões 164 (A) e 181 (B), obtidos para os piretróides TET, BIF e FEN. A utilização destes iões permite uma melhor comparação espectral entre os diferentes modos de injeção, evidenciando a superioridade da abordagem otimizada em termos de resposta analítica.

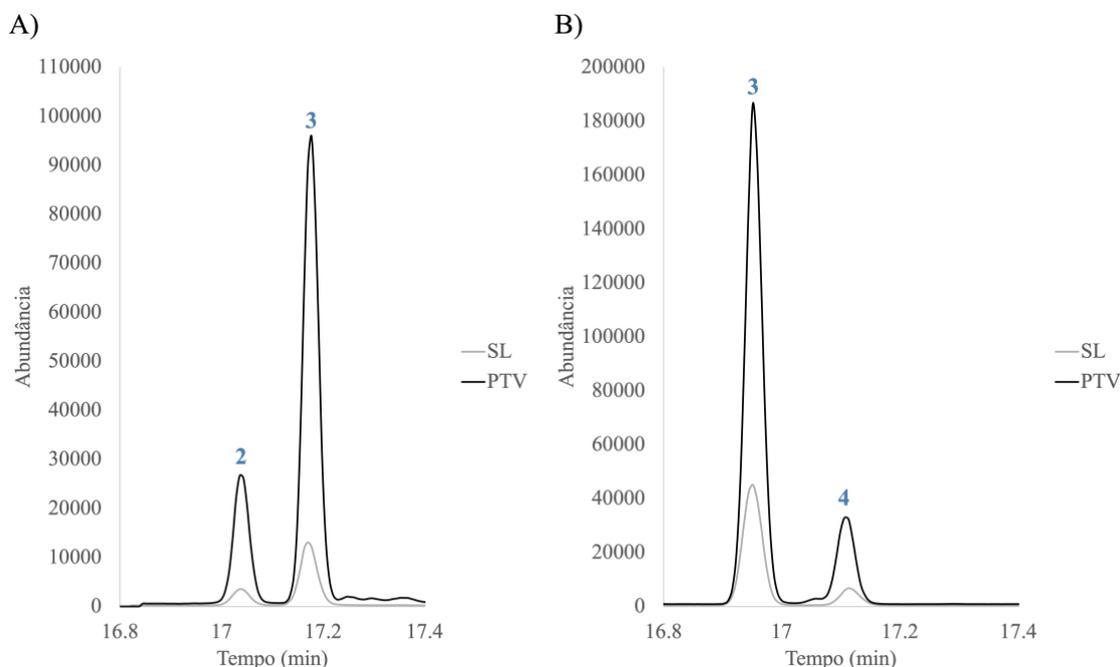


Figura 3.20. Comparação dos traçados de corrente iónica dos iões 164 m/z (A) e 181 m/z (B) a 0,05 $mg L^{-1}$ (EtOAc) obtidos por SL-GC-MS(SIM) e LVI-GC-MS(SIM). Os piretróides identificados são 2 – TET, 3 – BIF e 4- FEN.

Os resultados demonstram que a utilização do injetor PTV no modo *solvent vent* proporciona um aumento significativo na sensibilidade analítica, permitindo a deteção dos analitos em concentrações compatíveis com os limites regulamentares. Nesse contexto, a tabela 3.15 apresenta os valores obtidos por calibração instrumental do padrão de piretróides sob as condições operacionais dos injetores PTV e SL. A comparação entre os injetores demonstra que os limiares analíticos obtidos com o injetor SL é aproximadamente 4 a 5 vezes inferior à alcançada com o injetor PTV, evidenciando a eficiência deste *inlet*.

Tabela 3.15. Valores de limiares analíticos, LOD e LOQ, da calibração instrumental dos piretróides em estudo para a metodologia LVI-GC-MS(SIM) e SL-GC-MS(SIM).

Piretróides	PTV		SL	
	LOQ ($\mu g L^{-1}$)	LOD ($\mu g L^{-1}$)	LOQ ($\mu g L^{-1}$)	LOD ($\mu g L^{-1}$)
ALL	3,75	1,25	15,0	5,0
TET	3,75	1,25	15,0	5,0
BIF	0,375	0,125	1,5	0,5
FEN	1,5	0,5	7,5	2,5
CYH	7,5	2,5	37,5	12,5
CYP	7,5	2,5	37,5	12,5
FEV	7,5	2,5	37,5	12,5

Posteriormente, foram realizadas análises em triplicado como teste, aplicando a metodologia HF μ E(*n*-C₇)- μ LD sob as condições experimentais otimizadas, para posterior injeção no sistema LVI-GC-MS(SIM). A tabela 3.16 apresenta os valores dos limiares analíticos, LOD e LOQ, obtidos do sistema LVI-GC-MS(SIM) e do processo de validação do sistema GC-MS(SIM) apresentado anteriormente. A comparação entre os métodos demonstra a manutenção da sensibilidade previamente alcançada, uma vez que esses limiares permanecem de 4 a 5 vezes inferiores.

Considerando que o limite máximo permitido para a presença de um piretróide em alguns tipos de água ser de 0,1 $\mu\text{g L}^{-1}$, é fundamental que a metodologia desenvolvida alcance esse limiar no seu LOQ. O método otimizado e validado HF μ E(*n*-C₇)- μ LD-GC-MS(SIM) apresentou valores superiores ao limite estabelecido para os compostos ALL, CYP e FEV. Contudo, a comparação com a abordagem utilizando o injetor PTV demonstrou que a metodologia HF μ E(*n*-C₇)- μ LD-PTV-GC-MS(SIM) é capaz de alcançar o objetivo proposto, tornando-se adequada para a análise desses piretróides em aplicações reais ($< 100 \text{ ng L}^{-1}$).

Tabela 3.16. Valores de limiares analíticos, LOD e LOQ, dos piretróides em estudo sob condições otimizadas da metodologia HF μ E(*n*-C₇)- μ LD e utilização de LVI-GC-MS(SIM) e GC-MS(SIM), respectivamente.

Piretróides	PTV		SL	
	LOQ (ng L^{-1})	LOD (ng L^{-1})	LOQ (ng L^{-1})	LOD (ng L^{-1})
ALL	30,0	15,0	150,0	50,0
TET	15,0	5,0	60,0	20,0
BIF	3,0	1,0	15,0	5,0
FEN	7,5	2,5	30,0	10,0
CYH	15,0	5,0	60,0	20,0
CYP	60,0	20,0	150,0	50,0
FEV	60,0	20,0	150,0	50,0

3.7. Comparação com estudos anteriores

A comparação do método desenvolvido com trabalhos anteriormente propostos para estes compostos é crucial a qualquer estudo analítico. Relativamente à técnica de microextração otimizada e validada, a metodologia foi comparada com as técnicas convencionais de preparação de amostra vigentes na literatura, encontrando-se ilustrada na tabela 3.17.

A análise comparativa de diferentes metodologias de extração de piretróides em matrizes aquosas revela importantes distinções em termos de eficiência, sustentabilidade, aplicabilidade e custo-benefício. Entre as técnicas avaliadas, a HF μ E destaca-se como uma das mais promissoras, especialmente no contexto de monitorização ambiental e trabalho de rotina.

Tabela 3.17. Comparação das técnicas de microextração estática mais utilizadas na análise de piretróides em matrizes aquosas, utilizando como instrumentação de análise o sistema GC.

Método analítico	SPME	SBSE	BA μ E	SDME	DLLME	HF-LPME	HF μ E
<i>Tempo (h)</i>	1	1,5	4,5	1	1	6	3
<i>Userfriendly^a</i>	-/+	+	+	-	-	-	+
<i>Ecofriendly^a</i>	+	+	+	+	+	+	+
<i>Custo-benefício^b</i>	Elevado	Elevado	Baixo	Baixo	Baixo	Baixo	Baixo
<i>Abrangência^a</i>	-	-	+	+	-	+	+
<i>Trabalho de rotina^a</i>	-	+	+	-	-	-/+	+
<i>Ref.</i>	[35,36]	[37]	[38]	[39,40]	[41]	[42]	Presente trabalho

^a Um sinal de mais significa que o método possui a característica ou é adequado, e um sinal de menos significa que o método não possui a característica ou é inadequado; ^b Dados estimados entre uma graduação elevado – moderado – baixo.

A técnica HF μ E apresenta um tempo de extração moderado (cerca de 3 horas), sendo mais rápida do que a HF-LPME (6 horas) e apenas ligeiramente mais lenta do que técnicas como DLLME (1 hora). Contudo, o seu diferencial reside não apenas no tempo de análise, mas principalmente na combinação de outros fatores favoráveis. A HF μ E é considerada uma técnica *user-friendly*, o que a torna facilmente aplicável em laboratórios que buscam métodos simples, reprodutíveis e de baixa complexidade operacional. Ao contrário das restantes técnicas de microextração baseadas em líquidos, que exigem maior cuidado na manipulação e maior experiência, a HF μ E permite uma aplicação mais direta e segura, mesmo em contextos com recursos limitados. Do ponto de vista ambiental, a HF μ E é considerada *eco-friendly*, uma característica cada vez mais valorizada na química analítica sustentável. A utilização de quantidades mínimas de solventes orgânicos, a possibilidade de reutilização das fibras ocas e a redução geral de resíduos contribuem para um perfil ecológico altamente favorável, alinhado com os princípios da química verde.

Outro ponto relevante é o custo-benefício. A HF μ E requer materiais simples e de baixo custo, como fibras poliméricas e volumes reduzidos de solventes, o que a torna uma opção economicamente viável. Isto é especialmente importante em estudos de larga escala ou em instituições com orçamento restrito. Em contraste, técnicas como SPME e SBSE, embora amplamente utilizadas, apresentam custos significativamente mais elevados, tanto no investimento inicial (fibras e dispositivos específicos) quanto na manutenção. No que diz respeito à abrangência e versatilidade, a HF μ E apresenta um desempenho notável, sendo eficaz na extração de uma ampla gama de analitos, incluindo compostos hidrofóbicos como os piretróides. A sua capacidade de adaptação a diferentes tipos de matrizes aquosas torna-a particularmente útil em contextos de avaliação da qualidade da água e monitorização ambiental.

Relativamente aos analitos e aos resultados obtidos no presente estudo, estes foram comparados com dados disponíveis na literatura, conforme ilustrado no Anexo XI. Entre as moléculas-alvo, a CYP destaca-se como a mais estudada na última década, sendo uma das formulações mais recentes e ainda autorizada para uso em diversos países, o que justifica o seu elevado interesse científico e regulamentar. Por outro lado, compostos como ALL e TET são significativamente menos abordados na literatura recente, o que confere ao presente trabalho um contributo relevante e inovador no contexto da análise desses piretróides.

As recuperações obtidas no presente estudo mostram-se globalmente comparáveis às reportadas em estudos anteriores. Contudo, para determinados compostos, observaram-se recuperações significativamente elevadas, variando entre 95% e 100%, valores ligeiramente superiores aos documentados na literatura, o que atesta a eficiência do método desenvolvido. No que respeita à precisão, os valores de RSD obtidos foram todos inferiores a 8,8%, demonstrando elevada reprodutibilidade. Este desempenho é particularmente relevante quando comparado com outros estudos, cujos valores de RSD frequentemente ultrapassam a dezena, refletindo menor consistência analítica. Quanto aos limiares analíticos, os valores determinados situam-se na mesma ordem de grandeza dos indicados noutros trabalhos. Destaca-se, contudo, a superior sensibilidade do sistema analítico utilizado no presente estudo (LVI-GC-MS), o qual permitiu alcançar limites de deteção muito baixos. Estes valores são não apenas adequados, mas também relevantes do ponto de vista regulamentar, cumprindo os critérios estabelecidos pela legislação nacional e europeia para águas destinadas ao consumo humano e monitorização ambiental.

Entre as principais vantagens da metodologia proposta, salientam-se as elevadas taxas de recuperação, a ampla gama linear, os baixos limites de deteção e quantificação, a utilização negligenciável de solventes, o baixo custo operacional e a possibilidade de realizar até 15 análises em simultâneo. Estas características tornam o método uma alternativa credível, económica e ambientalmente sustentável para a determinação vestigial de piretróides em amostras aquosas.

4. Conclusão e Perspetivas Futuras

O presente estudo propõe uma metodologia alternativa e inovadora (HF μ E(*n*-C₇)- μ LD/GC-MS(SIM)) para a determinação vestigial de oito piretróides, nomeadamente ALL, TET, BIF, FEN, CYH, CYP e FEV. Esta abordagem demonstrou ser robusta, simples e adequada para a aplicação em matrizes reais aquosas, em contexto de monitorização do controlo da qualidade dos recursos hídricos.

Numa fase inicial, foram identificados os analitos alvo e selecionados os iões correspondentes para a análise no modo SIM do sistema GC-MS, uma vez ter sido verificado que ser o sistema instrumental mais indicado para o estudo proposto. A otimização dos parâmetros instrumentais (GC-MS(SIM)) permitiu uma separação eficiente em menos de 23 minutos, tendo-se obtido LOD > 0,5 μ g L⁻¹ e LOQ > 1,5 μ g L⁻¹. Verificou-se ainda boa precisão (RSD > 7,65%), bem como curvas de calibração com boa linearidade ($r^2 > 0,9975$) compreendidas entre 0,0025 e 2,5 mg L⁻¹.

O procedimento de preparação das amostras envolveu a otimização da técnica de microextração proposta, que possibilita a utilização de diversos solventes orgânicos para a extração, onde o solvente *n*-C₇ revelou os resultados mais adequados na microextração de piretróides.

Posteriormente, otimizaram-se diversos parâmetros da metodologia que poderiam afetar no processo de microextração e retroextração. As condições otimizadas para extrair os sete piretróides consistiram em 3 h de tempo de equilíbrio (1600 rpm), pH da matriz de 5,5 com adição de 5% em MeOH, e retroextração com *n*-C₇ e 2 minutos sob agitação por vortéx. Sob estas condições verificaram-se recuperações médias compreendidas entre 65,2 e 102,0 % (RSD < 8,8%). Por fim, avaliou-se a possibilidade de reutilização das fibras no processo, a qual se mostrou viável com base nos parâmetros de degradação dos compostos alvo, atendendo ao tempo de meia-vida e a suscetibilidade de processos de fotodegradação. A eficácia da reutilização foi ainda sustentada pela aplicação de um protocolo de lavagem otimizado, o qual garantiu a preservação do desempenho analítico da fibra e a limpeza destes compostos, retirando a possibilidade de contaminação cruzada ao longo de múltiplos ciclos de uso.

Após otimização do método, procedeu-se à respetiva validação. Nesta etapa foram obtidos LODs e LOQs compreendidos entre 5 - 50 μ g L⁻¹ e 15 - 150 μ g L⁻¹, respetivamente. As gamas lineares de trabalho obtidas foram de 0,2 - 10,0 μ g L⁻¹ para ALL, CYP e FEV, 0,1 - 10,0 μ g L⁻¹ para CYH e TET, 0,05 - 10,0 μ g L⁻¹ para FEN e 0,02 - 10,0 μ g L⁻¹ para BIF. Associada às curvas de calibração foi ainda registada uma boa linearidade, tanto considerando os valores de $r^2 \geq 0,9956$, como também por meio do estudo da homocedasticidade dos dados com recurso a teste F e dispersão de resíduos. No estudo da precisão intra-dia e inter-dia, obtiveram-se valores de RSD inferiores a 6,6% e 10,4%, respetivamente.

Validado o método HF μ E(*n*-C₇)- μ LD/GC-MS(SIM), estudou-se o efeito matriz a partir da aplicação a matrizes reais, nomeadamente amostras de água subterrânea e superficial provenientes de poço e Ria de Aveiro, respetivamente. Foi ainda testado água para consumo humano e água residual da ETAR de Alcântara (Lisboa). Com recurso ao SAM, as matrizes reais foram fortificadas onde se obtiveram excelentes linearidades, com valores de $r^2 > 0,9957$. A análise destas matrizes sem fortificação permitiu excluir a contaminação (< LOD) dos sete piretróides em causa. Obtiveram-se recuperações similares às obtidas nas análises de otimização para as diversas matrizes, com valores compreendidos de 60,1 - 69,7% para ALL, 60,0 - 78,7% para TET, 52,5 - 65,1% para BIF, 84,6 - 98,0% para FEN, 77,1 - 92,6% para CYH, 71,0 - 87,4%

para CYP e 76,1 - 89,2% para FEV. Contudo, a comparação entre as diferentes matrizes revelou que, para a maioria dos compostos-alvo, as amostras de água subterrânea e residual apresentam algum efeito de matriz, evidenciado pela redução nas taxas de recuperação. No entanto, essa diminuição não foi considerada estatisticamente significativa ao proposto.

Importa referir que, para alguns dos piretróides (ALL, CYP e FEV), o LOQ obtido (150 ng L⁻¹) não cumpre os requisitos legislativos em vigor, que estabelecem um limite de 100 ng L⁻¹. Esta limitação na sensibilidade do sistema analítico constituiu um entrave à plena conformidade com os objetivos do estudo. Assim, testou-se a utilização de um injetor com maior sensibilidade no sistema GC. A substituição do injetor SL por PTV, permitiu melhorar substancialmente os limites analíticos, alcançando-se LODs compreendidos entre 1,0 - 20,0 ng L⁻¹ e LOQs entre 3,0 - 60,0 ng L⁻¹. Desta forma, a metodologia proposta revelou-se plenamente aplicável a contextos reais de acordo com as exigências legais nacionais e europeias vigentes.

Por fim, os resultados obtidos no presente projeto foram comparados com os de outras técnicas de microextração convencionais descritas na literatura. Verificou-se que as taxas de recuperação se apresentam globalmente similares, embora, para alguns compostos, tenham sido obtidas recuperações superiores, na ordem dos 95 a 100%, bem como valores de RSD inferiores aos indicados em algumas metodologias já bem estabelecidas na literatura. Os limiares analíticos situaram-se na mesma ordem de grandeza dos alcançados com sistemas analíticos de elevada sensibilidade, como o LVI-GC-MS, o que demonstra a adequação do método desenvolvido. Conclui-se, assim, que a metodologia proposta configura uma alternativa eficaz às abordagens já existentes, apresentando vantagens em termos de eficiência, simplicidade, custo-benefício e aplicabilidade a contextos reais.

Em suma, os objetivos previamente delineados foram plenamente alcançados, tendo-se desenvolvido uma metodologia analítica inovadora, robusta e sensível para a determinação vestigial de piretróides, com potencial de aplicação em matrizes reais no âmbito da avaliação da qualidade de recursos hídricos.

Para trabalhos futuros, perspetiva-se a expansão da gama de piretróides analisados simultaneamente, bem como a aplicação da metodologia a outras matrizes, como águas fluviais ou matrizes alimentares (ex. vinho). Sugere-se também a utilização de instrumentação com maior sensibilidade, como GC-MS/MS, com vista à obtenção de limites de deteção ainda mais baixos (na ordem de alguns ng L⁻¹), particularmente relevantes em análises vestigiais destes compostos em amostras ambientais.

5. Referências bibliográficas

- [1] M. Tudi, H.D. Ruan, L. Wang, J. Lyu, R. Sadler, D. Connell, C. Chu, D.T. Phung, Agriculture development, pesticide application and its impact on the environment, *Int. J. Environ. Res. Public Health*. 18 (2021) 1112. doi:10.3390/ijerph18031112.
- [2] A. Sharma, V. Kumar, B. Shahzad, M. Tanveer, G.P.S. Sidhu, N. Handa, S.K. Kohli, P. Yadav, A.S. Bali, R.D. Parihar, O.I. Dar, K. Singh, S. Jasrotia, P. Bakshi, M. Ramakrishnan, S. Kumar, R. Bhardwaj, A.K. Thukral, Worldwide pesticide usage and its impacts on ecosystem, *SN Appl. Sci.* 1 (2019) 1446. doi:10.1007/s42452-019-1485-1.
- [3] K. Schneider, J. Barreiro-Hurle, E. Rodriguez-Cerezo, Pesticide reduction amidst food and feed security concerns in Europe, *Nat. Food* 4 (2023) 746–750. doi:10.1038/s43016-023-00834-6.
- [4] J. R. Bertomeu-Sánchez, Introduction. Pesticides: Past and Present, *HoST*. 13 (2019) 1–27. doi:10.2478/host-2019-0001.
- [5] J. E. Casida, G. B. Quistad, “Golden Age of Insecticide Research: Past, Present, or Future?”, *Annu. Rev. Entomol.* 43 (1998) 1–16. doi:10.1146/annurev.ento.43.1.1.
- [6] C. J. Martyniuk, A. C. Mehinto, N. D. Denslow, Organochlorine pesticides: Agrochemicals with potent endocrine-disrupting properties in fish, *Mol. Cell. Endocrinol.* 503 (2020) 110764. doi:10.1016/j.mce.2020.110764.
- [7] D. M. R. Pimentel, *A History of Pesticides*, Cambridge University Press, Cambridge, UK, 1995.
- [8] P. Hartmer, J. Hoppner, J. Lanfranco, *Pesticide Atlas: Facts and figures about toxic chemicals in agriculture*, Heinrich Boll Stiftung, Berlin, Germany, 2022. Acesso em 20 nov. 2024. <https://eu.boell.org/PesticideAtlas>
- [9] W. Aktar, D. Sengupta, A. Chowdhury, Impact of pesticides use in agriculture: their benefits and hazards, *Interdiscip. Toxicol.* 2 (2009) 1–12. doi:10.2478/v10102-009-0001-7.
- [10] V. M. Pathak, *et al.*, Current status of pesticide effects on environment, human health and its eco-friendly management as bioremediation: A comprehensive review, *Front. Microbiol.* 13 (2022) 962619. doi:10.3389/fmicb.2022.962619.
- [11] J. Simões, *Utilização de Produtos Fitofarmacêuticos na Agricultura*, Instituto Nacional de Investigação Agrária e Veterinária, Lisboa, Portugal, 2005.
- [12] M. A. T. dos Santos, M. Arcanjo Areas, F. G. Reyes Reyes, Piretróides - Uma Visão Geral, *Alim. Nutr.* 18 (2007) 339–349.
- [13] M. K. Ross, R. L. Carr, Pyrethroid insecticides: An update, *Encyclopedia Environ. Health*, Elsevier (2019) 429–435. doi:10.1016/B978-0-12-409548-9.11819-6.
- [14] A. Ahamad e J. Kumar, Pyrethroid pesticides: An overview on classification, toxicological assessment and monitoring, *J. Hazard. Mater. Adv.* 8 (2023) 100284. doi:10.1016/j.hazadv.2023.100284.
- [15] B. P. S. Khambay, Pyrethroid insecticides, *Pest. Outlook* 13 (2002) 49–54. doi:10.1039/b202996k.

- [16] N. Matsuo, Discovery and development of pyrethroid insecticides, *Proc. Jpn. Acad. Ser. B Phys. Biol. Sci.* 95 (2019) 378-400. doi:10.2183/pjab.95.027.
- [17] Direção-Geral de Alimentação e Veterinária, Relatório de Vendas de Produtos Fitofarmacêuticos, DGAV, Lisboa, Portugal, 2023. Acesso em 21 nov. 2024. <https://www.dgav.pt/destaques/noticias/relatorio-de-vendas-de-produtosfitofarmacêuticos-2021/>
- [18] A. Gajendiran, J. Abraham, An overview of pyrethroid insecticides, *Front. Biol.* 13 (2018) 79–90. <https://doi.org/10.1007/s11515-018-1489-z>
- [19] M. N. Rao, *Pyrethroid Insecticides*, Springer, Cham, Switzerland, 2020.
- [20] M. L. Feo, E. Eljarrat, D. Barceló, Determination of pyrethroid insecticides in environmental samples, *TrAC Trends Anal. Chem.* 29 (2010) 692–705. doi:10.1016/j.trac.2010.03.011.
- [21] J. Smith, *Physical and Chemical Properties of Pyrethroids*, CRC Press, Boca Raton, FL, 2002.
- [22] S. Singh *et al.*, Advances and future prospects of pyrethroids: Toxicity and microbial degradation, *Sci. Total Environ.* 829 (2022) 154561. doi:10.1016/j.scitotenv.2022.154561.
- [23] K. Palmquist, J. Salatas, A. Fairbrother, Pyrethroid insecticides: Use, environmental fate, and ecotoxicology, in: *Insecticides - Advances in Integrated Pest Management*, InTech, 2012, pp. 251-278. doi:10.5772/29495.
- [24] W. Tang *et al.*, Pyrethroid pesticide residues in the global environment: An overview, *Chemosphere* 190 (2018) 33–41. doi:10.1016/j.chemosphere.2017.10.115.
- [25] P. Gonçalves, Contributo para a tomada de decisão no uso sustentável de pesticidas em vinha: avaliação do perigo de pesticidas em recursos hídricos do Alentejo Central [Dissertação de mestrado]. Universidade de Lisboa, Lisboa, 2008.
- [26] C. DeMars, R. Wang, M. L. Grieneisen, J. Steggall, M. Zhang, Assessment of pyrethroid contamination and potential mitigation strategies in California Central Coast surface waters, *J. Environ. Manag.* 278 (2021) 111507. doi: 10.1016/j.jenvman.2020.111507
- [27] H. R. Andersen *et al.*, Pyrethroids and developmental neurotoxicity - A critical review of epidemiological studies and supporting mechanistic evidence, *Environ. Res.* 214 (2022) 113935. doi:10.1016/j.envres.2022.113935.
- [28] A. M. Saillenfait, D. Ndiaye, J. P. Sabaté, Pyrethroids: Exposure and health effects - An update, *Int. J. Hyg. Environ. Health* 218 (2015) 281–295. doi:10.1016/j.ijheh.2015.01.002.
- [29] A. J. Thatheyus, A. D. Gnana Selvam, Synthetic Pyrethroids: Toxicity and Biodegradation, *Appl. Ecol. Environ. Sci.* 1 (2013) 33–36. doi:10.12691/aees-1-3-2.
- [30] A. M. Ramchandra, B. Chacko, P. J. Victor, Pyrethroid poisoning, *Indian J. Crit. Care Med.* 23 (2019) 267–271. doi:10.5005/jp-journals-10071-23304.
- [31] M. Galadima, *et al.*, Toxicity, microbial degradation and analytical detection of pyrethroids: A review, *Environ. Adv.* 5 (2021) 100105. doi:10.1016/j.envadv.2021.100105.

- [32] S. Mitra, *Sample Preparation Techniques in Analytical Chemistry*, John Wiley & Sons, Hoboken, NJ, 2003.
- [33] Á. I. López-Lorente, F. Pena-Pereira, S. Pedersen-Bjergaard, V. G. Zuin, S. A. Ozkan, E. Psillakis, The ten principles of green sample preparation, *TrAC Trends Anal. Chem.* 151 (2022) 116530. doi:10.1016/j.trac.2022.116530.
- [34] M. Eugênia e C. Queiroz, *Extração sortiva em barra de agitação (SBSE): Fundamentos teóricos e fases seletivas*, Scientia Chromatographica, Brasil, 2009. Acesso em 3 dez. 2024. <http://www.scientiachromatographica.com>
- [35] V. Casas, M. Llompart, C. García-Jares, R. Cela, T. Dagnac, Multivariate optimization of the factors influencing the solid-phase microextraction of pyrethroid pesticides in water, *J. Chromatogr. A* 1124 (2006) 148–156. doi:10.1016/j.chroma.2006.06.034.
- [36] A. M. Filho, F. N. dos Santos, P. A. de P. Pereira, Development, validation and application of a method based on DI-SPME and GC-MS for determination of pesticides of different chemical groups in surface and groundwater samples, *Microchem. J.* 96 (2010) 139–145. doi:10.1016/j.microc.2010.02.018.
- [37] P. Serôdio, J. M. F. Nogueira, 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 (2005) 1141–1151. doi:10.1007/s00216-005-3210-8.
- [38] J. R. Bernarda, S. M. Ahmad, C. Almeida, N. R. Neng, J. M. F. Nogueira, Application of bar adsorptive microextraction-large-volume injection-gas chromatography-mass spectrometric method for the determination of trace levels of agrochemicals in real matrices, *J. Braz. Chem. Soc.* 26 (2015) 2150–2158. doi:10.5935/0103-5053.20150202.
- [39] A. de S. Pinheiro, G. O. da Rocha, J. B. De Andrade, A SDME/GC-MS methodology for determination of organophosphate and pyrethroid pesticides in water, *Microchem. J.* 99 (2011) 303–308. doi:10.1016/j.microc.2011.05.019.
- [40] E. A. Carlos, R. D. Alves, M. E. L. R. De Queiroz, A. A. Neves, Simultaneous determination of the organochlorine and pyrethroid pesticides in drinking water by single drop microextraction and gas chromatography, *J. Braz. Chem. Soc.* 24 (2013) 1217–1227. doi:10.5935/0103-5053.20130155.
- [41] M. Rezaee, Y. Assadi, M. R. Milani Hosseini, E. Aghaee, F. Ahmadi, S. Berijani, Determination of organic compounds in water using dispersive liquid-liquid microextraction, *J. Chromatogr. A* 1116 (2006) 1–9. doi:10.1016/j.chroma.2006.03.007.
- [42] A. S. Da Silva, E. F. G. C. Dores, R. D. Villa, A multiclass analytical method for pesticides determination in water using DLLME and GC-MS, *Rev. Virtual Quim.* 9 (2017) 550–562. doi:10.21577/1984-6835.20170032.
- [43] I. San Román, M. L. Alonso, L. Bartolomé, R. M. Alonso, Hollow fibre-based liquid-phase microextraction technique combined with gas chromatography-mass spectrometry for the

- determination of pyrethroid insecticides in water samples, *Talanta* 100 (2012) 246–253. doi:10.1016/j.talanta.2012.04.039.
- [44] S. Risticvic, V. H. Niri, D. Vuckovic, J. Pawliszyn, Recent developments in solid-phase microextraction, *Anal. Bioanal. Chem.* 393 (2009) 781–795. doi:10.1007/s00216-008-2375-3.
- [45] S. Merkle, K. Kleeberg, J. Fritsche, Recent developments and applications of solid phase microextraction (SPME) in food and environmental analysis—A review, *Chromatography 2* (2015) 293–381. doi:10.3390/chromatography2030293.
- [46] E. Carasek, L. Morés, J. Merib, Basic principles, recent trends and future directions of microextraction techniques for the analysis of aqueous environmental samples, *TrAC Trends Anal. Chem.* 107 (2018) 222–232. doi:10.1016/j.teac.2018.e00060.
- [47] V. Jalili, A. Barkhordari, A. Ghiasvand, A comprehensive look at solid-phase microextraction technique: A review of reviews, *Microchem. J.* 154 (2020) 104319. doi:10.1016/j.microc.2019.104319.
- [48] F. Pragst, Application of solid-phase microextraction in analytical toxicology, *Anal. Bioanal. Chem.* 389 (2007) 757–774. doi:10.1007/s00216-007-1289-9.
- [49] J. Pawliszyn, Theory of Solid-Phase Microextraction, *Handbook of Solid Phase Microextraction*, Elsevier Inc., Waltham, USA, 2012: pp. 13-59.
- [50] D. Chormey, S. Bakirdere, N. B. Turan, G. Engin, Fundamentals of quorum sensing, analytical methods and applications in membrane bioreactors. in: Á. R. Martínez, (Ed.), *Comprehensive Analytical Chemistry*, Elsevier, Amsterdam, 2018: pp. 322.
- [51] H. Jabari, U. Telgheder, N. Bader, N. Alshelmani, Stir bar sorptive extraction as a sample preparation technique for chromatographic analysis: An overview, *Asian J. nanosci. mater.* 1 (2018) 54-60.
- [52] J. M. F. Nogueira, Extração Sortiva em Barra de Agitação (SBSE): Uma metodologia inovadora para microextração estática, *Scientia Chromatographica* 4 (2012) 259–269. doi:10.4322/sc.2012.019.
- [53] J. M. F. Nogueira, Stir-bar sorptive extraction: 15 years making sample preparation more environment-friendly, *TrAC Trends Anal. Chem.* 71 (2015) 214–223. doi:10.1016/j.trac.2015.05.002.
- [54] E. Baltussen, P. Sandra, F. David, C. Cramers, Stir bar sorptive extraction (SBSE), a novel extraction technique for aqueous samples: Theory and principles, *J. of Microcolumn Sep.* 11 (1999) 737–747. doi: 10.1002/(SICI)1520-667X(1999)11:10<737::AID-MCS7>3.0.CO;2-4.
- [55] F. David, N. Ochiai, P. Sandra, Two decades of stir bar sorptive extraction: A retrospective and future outlook, *TrAC Trends Anal. Chem.* 113 (2019) 335-347. doi: 10.1016/j.trac.2018.12.006.
- [56] J. M. F. Nogueira, Microextração adsortiva em barra (BA μ E): Um conceito analítico inovador para microextração estática, *Scientia Chromatographica* 5 (2013) 275–283. doi: 10.4322/sc.2014.010.

- [57] C. Almeida, R. Strzelczyk, J. M. F. Nogueira, Improvements on bar adsorptive microextraction (BA μ E) technique-Application for the determination of insecticide repellents in environmental water matrices, *Talanta* 120 (2014) 126–134. doi: 10.1016/j.talanta.2013.11.031.
- [58] A. H. Ide, J. M. F. Nogueira, New-generation bar adsorptive microextraction (BA μ 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 (2018) 126–134. doi: 10.1016/j.jpba.2018.02.001.
- [59] N. R. Neng, A. R. M. Silva, J. M. F. Nogueira, Adsorptive micro-extraction techniques-Novel analytical tools for trace levels of polar solutes in aqueous media, *J Chromatogr A* 1217 (2010) 7303–7310. doi: 10.1016/j.chroma.2010.09.048.
- [60] S. Tang *et al.*, Single-drop microextraction, *TrAC Trends in Anal. Chem.* 108 (2018) 306-313. doi: 10.1016/j.trac.2018.09.016.
- [61] S. K. Kailasa, J. R. Koduru, T. J. Park, R. K. Singhal, H. F. Wu, Applications of single-drop microextraction in analytical chemistry: A review, *TrEAC* 29 (2021) 00113. doi: 10.1016/j.teac.2020.e00113.
- [62] M. A. Jeannot, A. Przyjazny, J. M. Kokosa, Single drop microextraction-Development, applications and future trends, *J. Chromatogr. A* 1217 (2010) 2326-2336. doi: 10.1016/j.chroma.2009.10.089.
- [63] I. P. de Pinto, M. P. Pedroso, Microextração em gota única (SDME): fundamentos e aplicações», *Scientia Chromatographica* 7 (2015) 183–198. doi: 10.4322/sc.2016.003.
- [64] A. Zgoła-Grześkowiak, T. Grześkowiak, Dispersive liquid-liquid microextraction, *TrAC* 30 (2011) 1382-1399. doi: 10.1016/j.trac.2011.04.014.
- [65] J. Grau, C. Azorín, J. L. Benedé, A. Chisvert, A. Salvador, Use of green alternative solvents in dispersive liquid-liquid microextraction: A review, *J. Sep. Sci.* 45 (2022) 210-222. doi: 10.1002/jssc.202100609.
- [66] A. Silva, B. Pereira, Application of DLLME in Environmental Water Analysis, in: *Dispersive Liquid-Liquid Microextraction*, J. F. Földényi (Ed.) Amsterdão, Países Baixos 16, 2020, pp. 345–368.
- [67] M. Saraji, M. K. Boroujeni, Recent developments in dispersive liquid-liquid microextraction Microextraction Techniques, *Anal. Bioanal. Chem.* 406 (2014) 2027-2066. doi: 10.1007/s00216-013-7467-z.
- [68] L. Kocúrová, I. S. Balogh, J. Šandrejová, V. Andruch, Recent advances in dispersive liquid-liquid microextraction using organic solvents lighter than water. A review, *Microchem. J.* 102 (2011) 11-17. doi: 10.1016/j.microc.2011.12.002.
- [69] M. Á. Bello-López, M. Ramos-Payán, J. A. Ocaña-González, R. Fernández-Torres, M. Callejón-Mochón, Analytical Applications of Hollow Fiber Liquid Phase Microextraction (HF-LPME): A Review, *Anal. Lett.* 45 (2012) 804-830. doi: 10.1080/00032719.2012.655676.

- [70] J. Merib, E. Carasek, Microextração em fase líquida suportada com fibra oca (HF-LPME): Fundamentos e aplicações recentes, *Scientia Chromatographica* 5 (2013) 249-262. doi: 10.4322/sc.2014.008.
- [71] M. Ghambarian, Y. Yamini, A. Esrafil, Developments in hollow fiber based liquid-phase microextraction: Principles and applications, *Microchimica Acta* 177 (2012) 271-294. doi: 10.1007/s00604-012-0773-x.
- [72] A. Esrafil, M. Baharfar, M. Tajik, Y. Yamini, M. Ghambarian, Two-phase hollow fiber liquid-phase microextraction, *TrAC Trend in Anal. Chem.* 108 (2018) 314-322. doi: 10.1016/j.trac.2018.09.015.
- [73] A. H. Ide, J. M. F. Nogueira, Hollow fiber microextraction: a new hybrid microextraction technique for trace analysis, *Anal. Bioanal. Chem.* 410 (2018) 2911-2920. doi: 10.1007/s00216-018-0971-4.
- [74] A. H. Ide e J. M. F. Nogueira, Dual-hollow fiber microextraction (dual-HF μ E) - application for monitoring trace levels of organochlorine pesticides in real matrices, *Int J Environ Anal Chem.* 100 (2020) 1402-1414. doi: 10.1080/03067319.2019.1655006.
- [75] W. M. A. Niessen, *Current Practice of Gas Chromatography–Mass Spectrometry*. J Am Soc Mass Spectrom 12 (2001) 1348-1351.
- [76] B. Gruber, F. David, P. Sandra, Capillary gas chromatography-mass spectrometry: Current trends and perspectives, *TrAC Trends in Anal. Chem.* 124 (2020) 115475. doi: 10.1016/j.trac.2019.04.007
- [77] O. Coskun, Separation Techniques: Chromatography, *North Clin Istanb* 3 (2016) 156-160, doi: 10.14744/nci.2016.32757.
- [78] M. A. Sayed, A review of Chromatography: principles, Classification, Applications, Helwan University, Cairo, Egito, 2021.
- [79] H. Hübschmann, *Handbook of GC/MS : fundamentals and applications*. Wiley-VCH, Weinheim, Alemanha, 2015.
- [80] D. A. Skoog, F. J. Holler, and S. R. Crouch, *Principles of Instrumental Analysis*, 6th ed. Belmont, CA: Thomson Brooks/Cole, 2007.
- [80] D. A. Skoog, F. J. Holler, and S. R. Crouch, *Principles of Instrumental Analysis*, 6th ed. Belmont, CA: Thomson Brooks/Cole, 2007.
- [81] K. Grob, *Split and Splitless Injection for Quantitative Gas Chromatography: Concepts, Processes, Practical Guidelines, Sources of Error*. Wiley-VCH, Weinheim, Alemanha, 2001.
- [82] B. Thomas, R. Daw, M. Grabenauer, General Principles of Mass Spectrometry: GC-MS, LC-MS, and LC-MS/MS, in: A. V. Lyubimov (Ed.), *Encyclopedia of Drug Metabolism and Interactions*, John Wiley & Sons, Inc., Nova Iorque, EUA, 2011.

- [83] C. P. Da Silva, E. S. Emídio, M. R. R. De Marchi, Method validation using weighted linear regression models for quantification of UV filters in water samples, *Talanta* 131 (2015) 221–227. doi: 10.1016/j.talanta.2014.07.041.
- [84] Direção-Geral da Saúde, Relatório das autorizações de venda de biocidas para uso profissional emitidas pela Direção-Geral da Saúde, DGS, Lisboa, Portugal, 2023. Acesso em 27 dez. 2023. <https://www.dgs.pt>

Legislação:

Ministério do Ambiente e da Ação Climática, Decreto-Lei n.º 69/2023, Diário da República, Lisboa, Portugal, 16 mar. 2023. Acesso em 27 dez. 2024. <https://dre.pt/web/guest/home/-/dre/161919848/details/maximized>

Ministério da Agricultura, do Desenvolvimento Rural e das Pescas, Decreto-Lei n.º 208/2008, Diário da República, Lisboa, Portugal, 3 nov. 2008. Acesso em 27 dez. 2024. <https://dre.pt/web/guest/home/-/dre/1735519/details/maximized>

Ministério da Agricultura, do Desenvolvimento Rural e das Pescas, Decreto-Lei n.º 236/98, Diário da República, Lisboa, Portugal, 4 set. 1998. Acesso em 27 dez. 2024. <https://dre.pt/web/guest/home/-/dre/145455/details/maximized>

Ministério da Saúde, Decreto-Lei n.º 306/2007, Diário da República, Lisboa, Portugal, 7 ago. 2007. Acesso em 27 dez. 2024. <https://dre.pt/web/guest/home/-/dre/1294919/details/maximized>

Comissão Europeia, Diretiva 2006/118/CE do Parlamento Europeu e do Conselho de 12 de dezembro de 2006 relativa à proteção das águas subterrâneas contra a poluição e o deterioramento, *Jornal Oficial da União Europeia*, Bruxelas, Bélgica, 12 dez. 2006. Acesso em 27 dez. 2024. <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/PT/TXT/?uri=CELEX%3A32006L0118>

Comissão Europeia, Diretiva 98/83/CE do Conselho de 3 de novembro de 1998 relativa à qualidade da água potável, *Jornal Oficial da União Europeia*, Bruxelas, Bélgica, 3 nov. 1998. Acesso em 27 dez. 2024. <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/PT/TXT/?uri=CELEX%3A31998L0083>

Comissão Europeia, Diretiva (UE) 2020/2184 do Parlamento Europeu e do Conselho de 16 de dezembro de 2020 relativa à qualidade da água destinada ao consumo humano, *Jornal Oficial da União Europeia*, Bruxelas, Bélgica, 16 dez. 2020. Acesso em 27 dez. 2024. <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/PT/TXT/?uri=CELEX%3A32020L2184>

União Europeia, Regulamento n.º 2076/2002 (EU), *Jornal Oficial da União Europeia*, Bruxelas, Bélgica, 20 nov. 2002. Acesso em 10 mai. 2024. <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/PT/TXT/?uri=CELEX%3A32002R2076>

Comissão Europeia, Decisão de Execução (EU) 2023/470 da Comissão, que decreta a não aprovação do uso do inseticida aletrina, *Jornal Oficial da União Europeia*, Bruxelas, Bélgica, 2

mar. 2023. Acesso em 10 mai. 2024. <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/PT/TXT/?uri=CELEX%3A32023D0470>

Comissão Europeia, Regulamento de Execução n° 2018/291 (EU), Jornal Oficial da União Europeia, Bruxelas, Bélgica, 26 fev. 2018. Acesso em 10 mai. 2024. <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/PT/TXT/?uri=CELEX%3A32018R0291>

Comissão Europeia, Regulamento Delegado (EU) 2022/643 da Comissão, relativo à proibição do composto para exportação, Jornal Oficial da União Europeia, Bruxelas, Bélgica, 10 fev. 2022. Acesso em 10 mai. 2024. <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/PT/TXT/?uri=CELEX%3A32022R0643>

Comissão Europeia, Regulamento (EU) 2021/2049 da Comissão sobre a autorização de produtos fitofarmacêuticos, Jornal Oficial da União Europeia, Bruxelas, Bélgica, 23 nov. 2021. Acesso em 10 mai. 2024. <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/PT/TXT/?uri=CELEX%3A32021R2049>

6. *Anexos*

Anexo I: Restrições nacionais e europeias para os piretróides em estudo

De acordo com o Decreto-lei nº94/98 de 15 de abril, a comercialização de pesticidas em Portugal só é permitida após autorização da venda pela DGADR, de acordo com as normas em vigor à data [84].

Tabela I.1. Restrições nacionais e europeias para os piretróides em estudo. Para cada analito encontra-se apresentado a regulamentação e a aprovação ou não da utilização em território europeu e nacional.

PIRETRÓIDE	UTILIZAÇÃO	REGULAMENTAÇÃO
ALL [C ₁₉ H ₂₆ O ₃]	Proibida	Regulamento (UE) n.º 2076/2002, de 20 de novembro, e Anexo I da Diretiva 91/414/EEC. Decisão de Execução (UE) 2023/470 da Comissão, de 2 de março de 2023, que determina a não aprovação da substância ativa aletrina como inseticida.
TET [C ₁₉ H ₂₅ NO ₄]	Proibida (restrita a uso doméstico)	Regulamento (UE) n.º 2076/2002, de 20 de novembro, e Anexo I da Diretiva 91/414/EEC. De acordo com o relatório da Direção-Geral da Saúde (2023), o composto permanece autorizado até 31/12/2024 exclusivamente para uso doméstico .
BIF [C ₂₃ H ₂₂ ClF ₃ O ₂]	Proibida	Regulamento de Execução (UE) 2018/291, de 26 de fevereiro. O composto encontra-se sujeito a restrição severa nos termos do Ofício Circular DGAV n.º 8/2018, alargado pelo Regulamento Delegado (UE) 2022/643, de 10 de fevereiro de 2022, proibindo a exportação .
FEN [C ₂₂ H ₂₃ NO ₃]	Proibida	Regulamento (UE) n.º 2076/2002, de 20 de novembro, e Anexo I da Diretiva 91/414/EEC. Regulamento Delegado (UE) 2022/643 da Comissão, de 10 de fevereiro de 2022, determina a proibição para exportação . A listagem da DGAV (17/05/2024) classifica todos os produtos contendo este pesticida como proibidos em Portugal.
CYH [C ₂₃ H ₁₉ ClF ₃ NO ₃]	Aprovada	Aprovado até 2026 , nos termos do Regulamento de Execução (UE) 2024/324, de 19 de janeiro de 2024.
CYP [C ₂₂ H ₁₉ Cl ₂ NO ₃]	Aprovada	Aprovado até 2029 , de acordo com o Regulamento (UE) n.º 540/2011 e o Regulamento (UE) n.º 2049/2021.
FEV [C ₂₅ H ₂₂ ClNO ₃]	Proibida	Decisão de não aprovação emitida pela Comissão Europeia no n.º 98/270/EC, de 7 de abril de 1998.

Anexo II: Equações

A recuperação (R) avalia a eficiência do método na quantificação de analitos em amostras fortificadas. A sua determinação baseia-se na relação entre a área medida numa amostra (A_{amostra}) e área obtida pelo padrão ($A_{\text{padrão}}$), expressa pela equação:

$$R (\%) = \frac{A_{\text{amostra}}}{A_{\text{padrão}}} \times 100 \quad (\text{II.1})$$

A equação do desvio padrão relativo (RSD) é usada para avaliar a precisão de um conjunto de dados analíticos. O cálculo do parâmetro baseia-se na seguinte equação:

$$\text{RSD} (\%) = \frac{\text{Desvio padrão}}{\text{Média}} \times 100 \quad (\text{II.2})$$

Anexo III: Espectros de massa dos piretróides em estudo obtidos por GC-MS

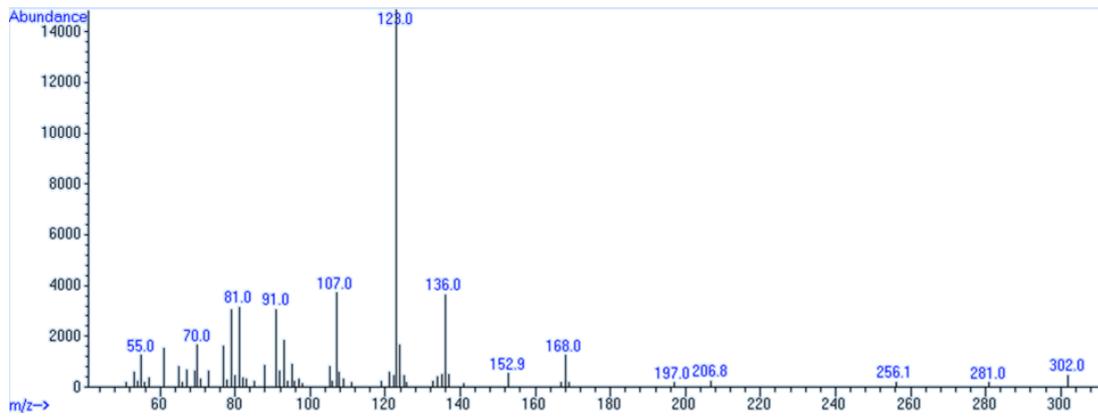


Figura III.1. Espectro de fragmentos de massa iônica característico do composto ALL.

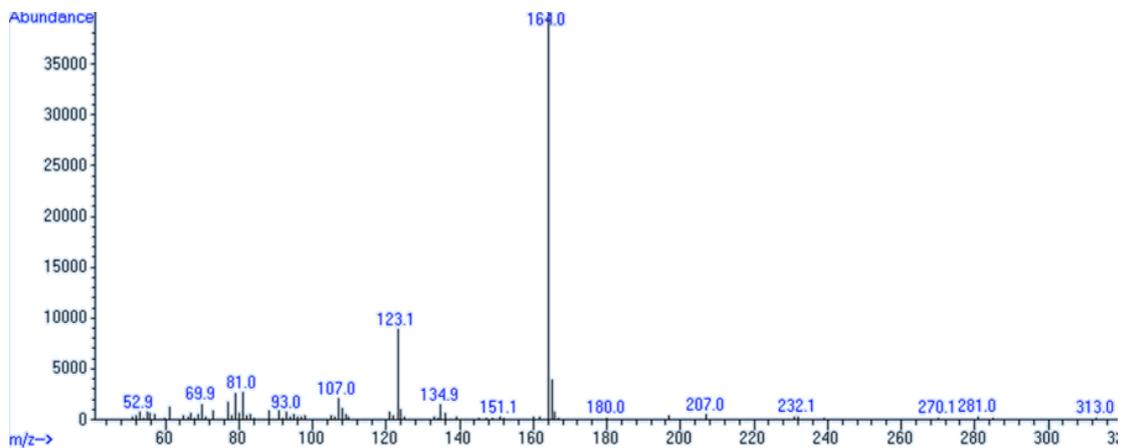


Figura III.2. Espectro de fragmentos de massa iônica característico do composto TET.

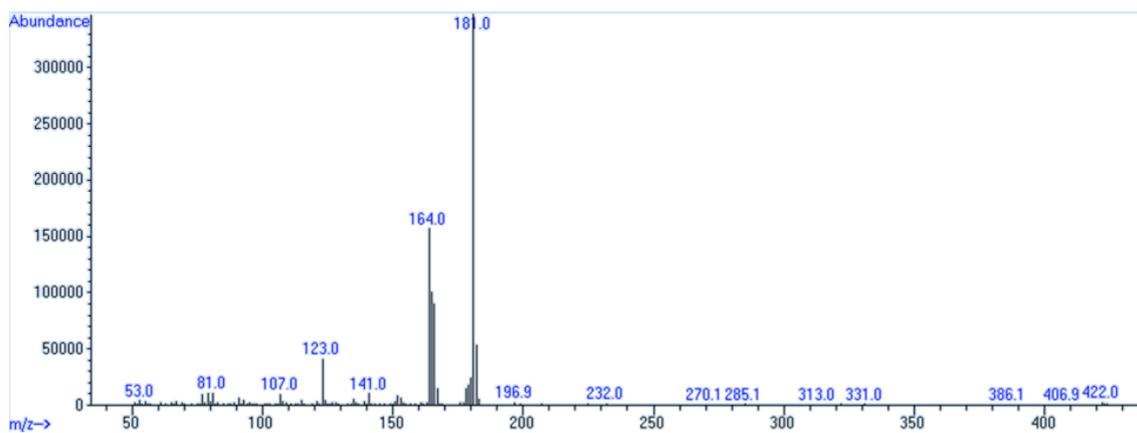


Figura III.3. Espectro de fragmentos de massa iônica característico do composto BIF.

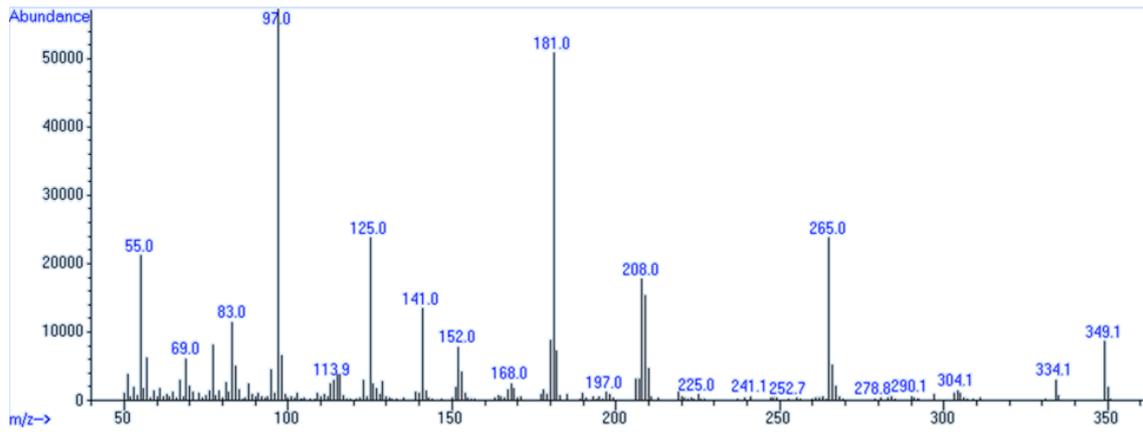


Figura III.4. Espectro de fragmentos de massa iônica característico do composto FEN.

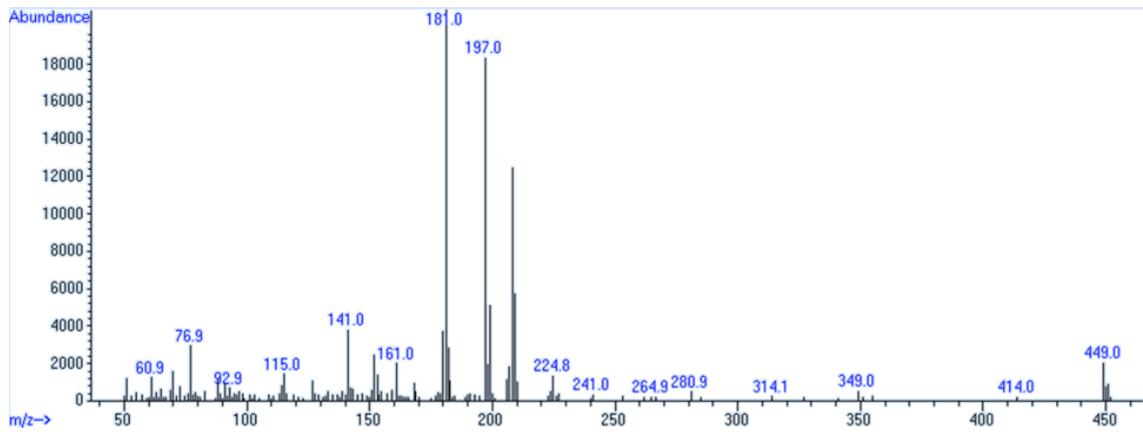


Figura III.5. Espectro de fragmentos de massa iônica característico do composto CYH.

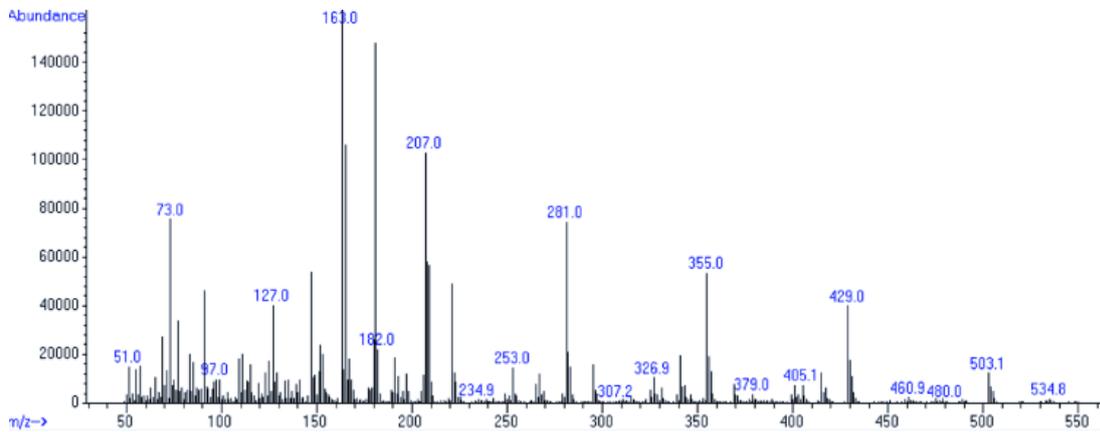


Figura III.6. Espectro de fragmentos de massa iônica característico do composto CYP.

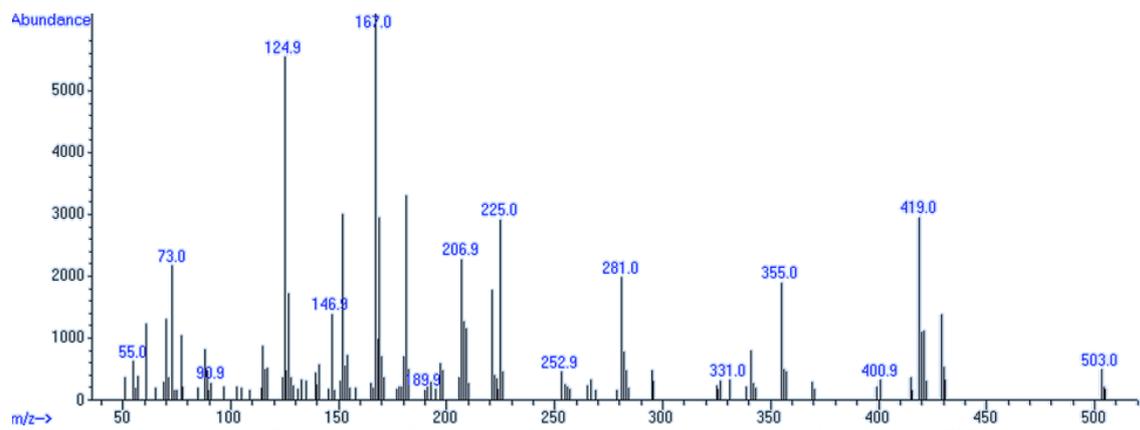


Figura III.7. Espectro de fragmentos de massa iônica característico do composto FEV.

Anexo IV: Curvas de calibração instrumental (GC-MS)

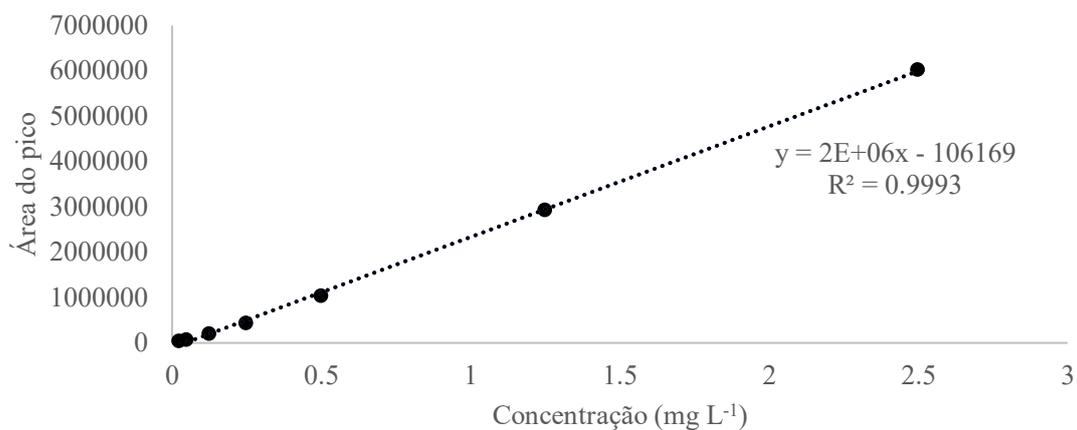


Figura IV.1. Curva de calibração instrumental do composto ALL.

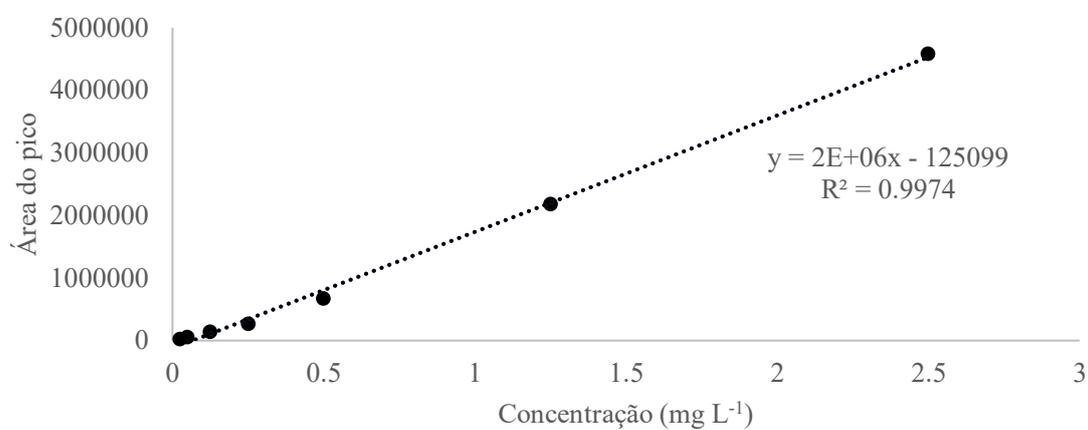


Figura IV.2. Curva de calibração instrumental do composto TET.

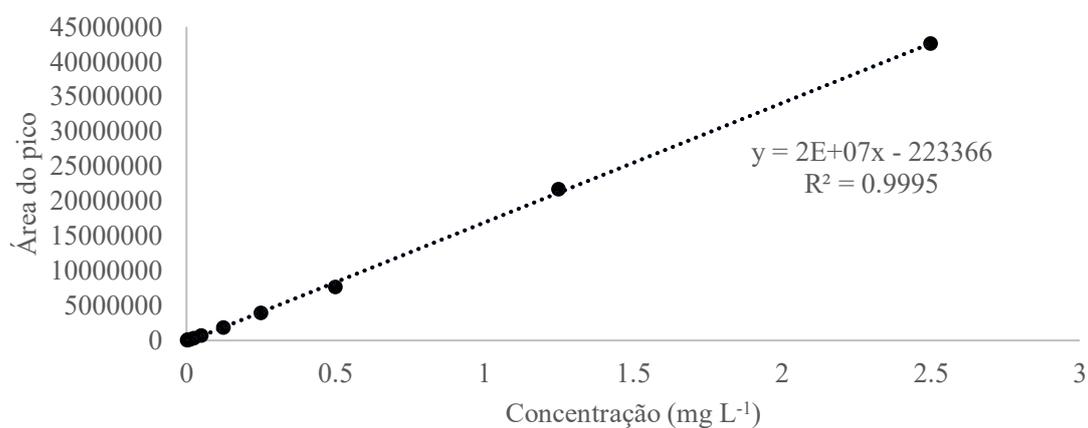


Figura IV.3. Curva de calibração instrumental do composto BIF.

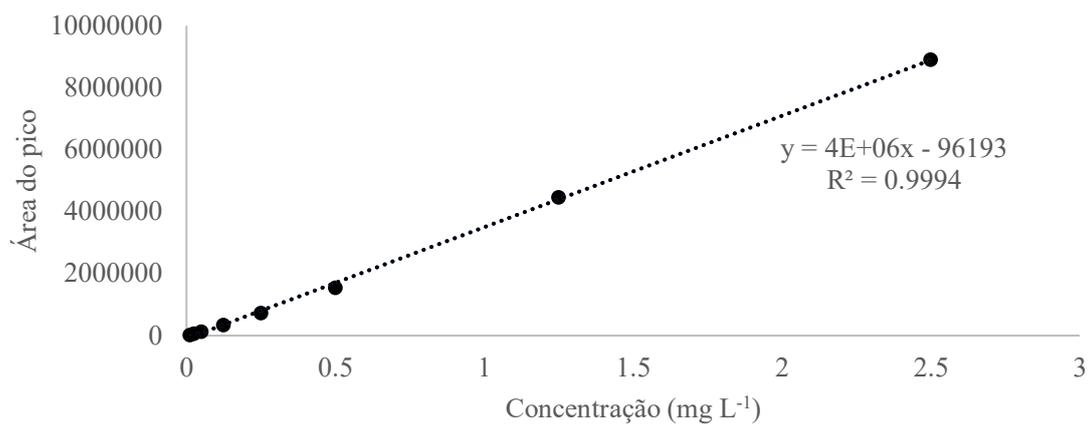


Figura IV.4. Curva de calibração instrumental do composto FEN.

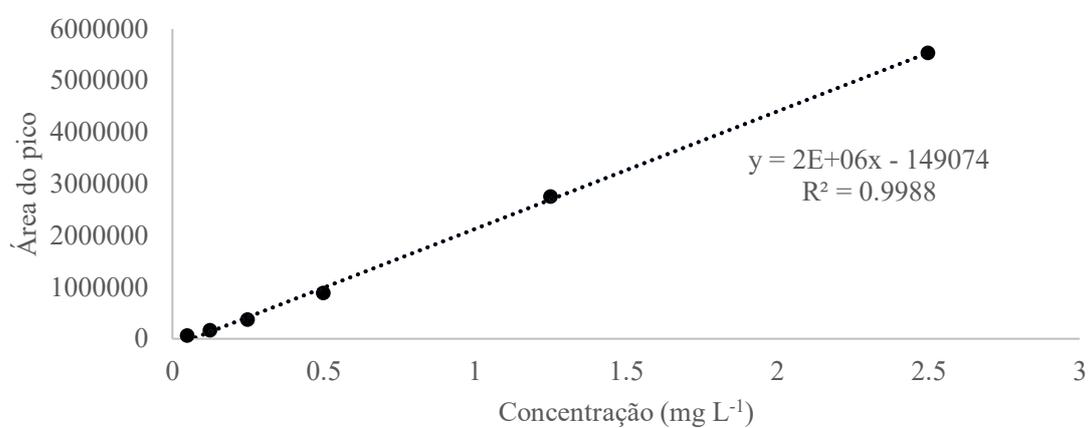


Figura IV.5. Curva de calibração instrumental do composto CYH.

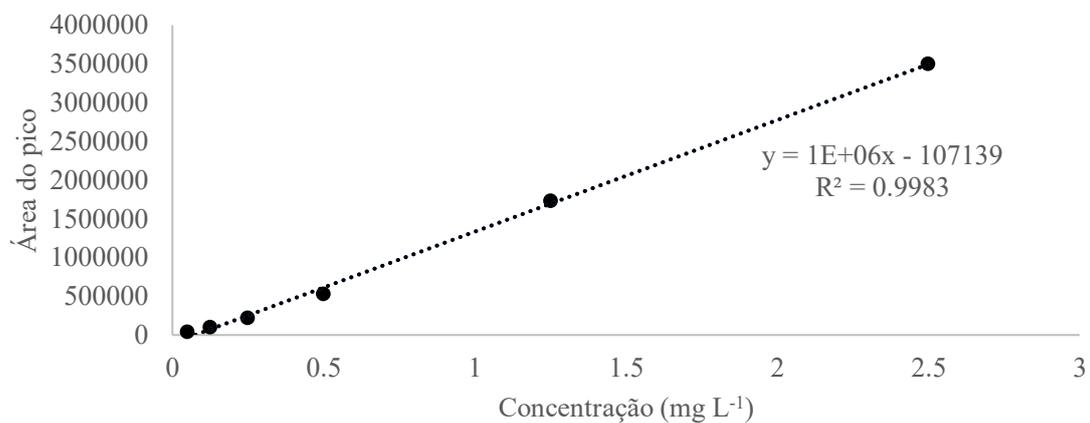


Figura IV.6. Curva de calibração instrumental do composto CYP.

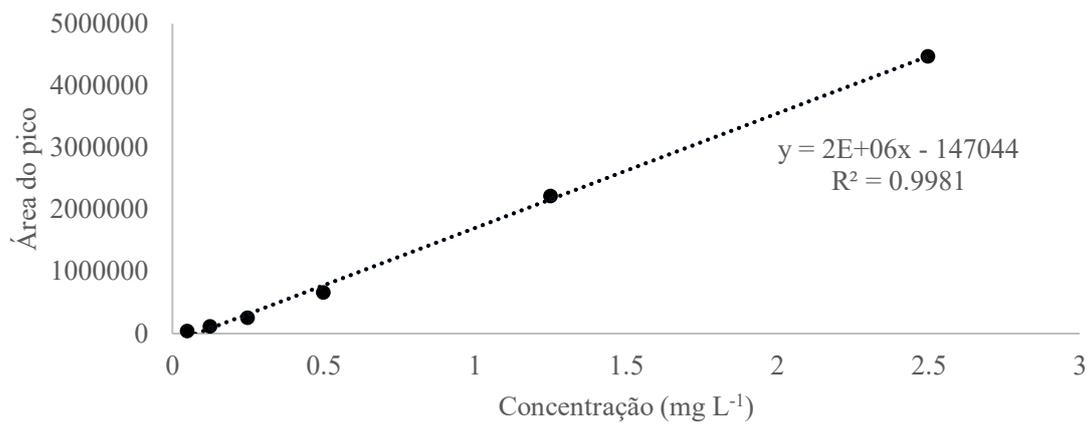


Figura IV.7. Curva de calibração instrumental do composto FEV.

Anexo V: Traçado de corrente iônica total para observação do isômero da ALL

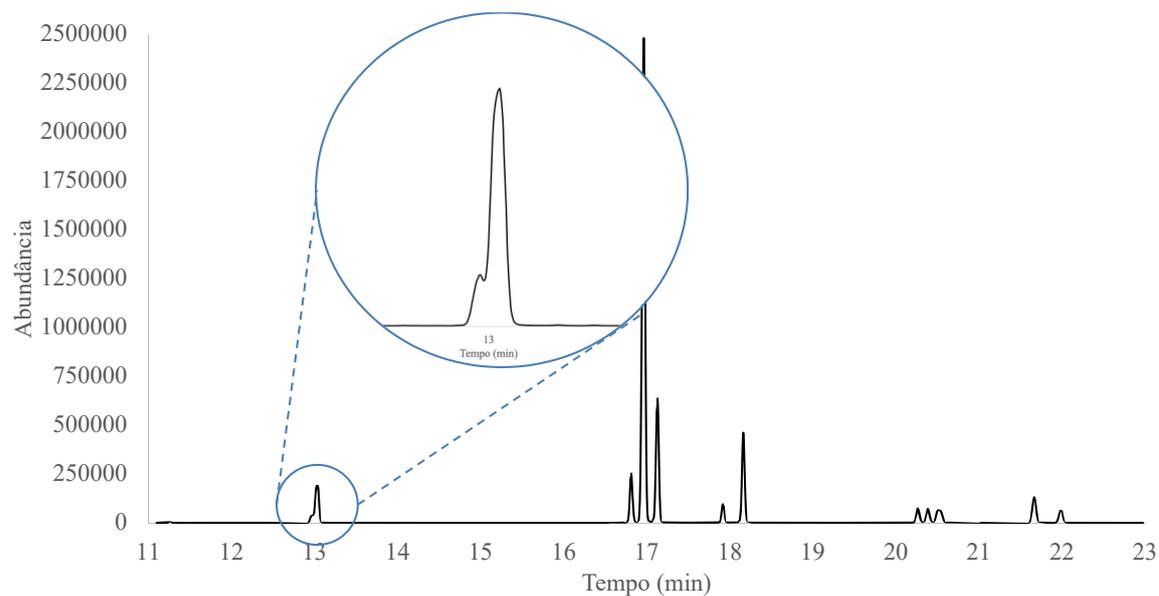


Figura V.1. Traçado de corrente iônica total da mistura padrão a 2,5 mg L⁻¹ com ampliação do composto ALL, para observação do isômero formado

Anexo VI: Traçado de corrente iônica total da extração por HF μ E(n-C₉)

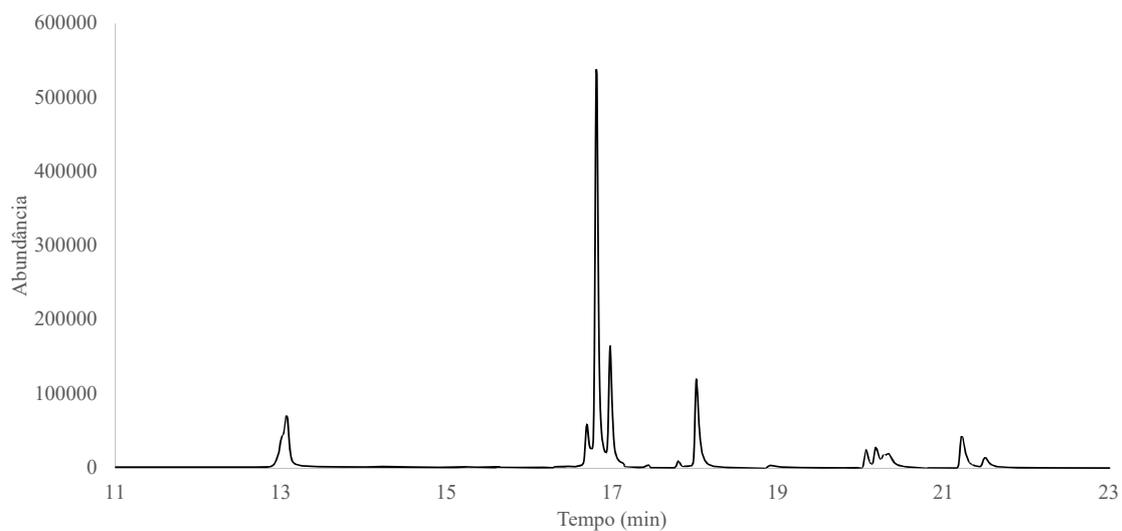


Figura VI.1. Traçado de corrente iônica total da análise dos piretróides em estudo obtido pela metodologia HF μ E(n-C₉)- μ LD/GC-MS(SIM).

Anexo VII: Curvas de calibração da validação da metodologia HF μ E(n-C₇)- μ LD/GC-MS(SIM)

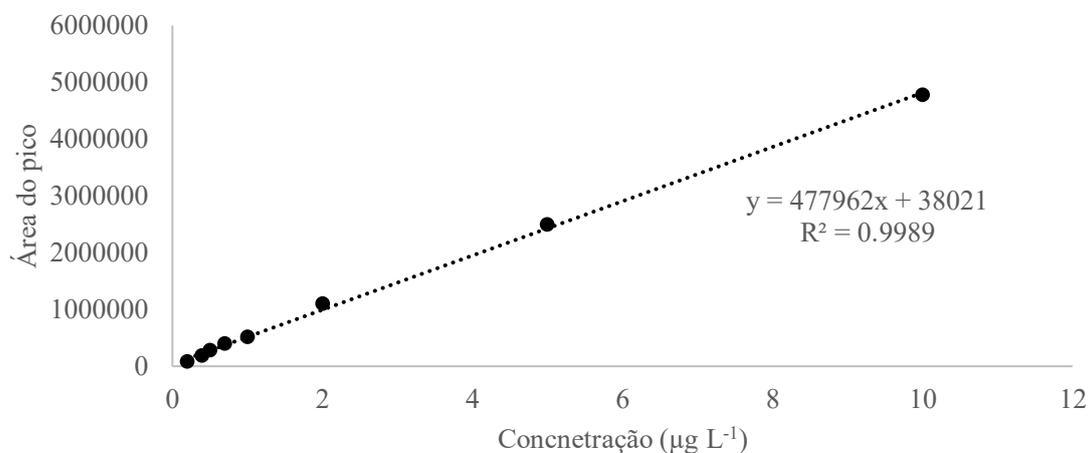


Figura VII.1. Curva de calibração obtida para ALL.

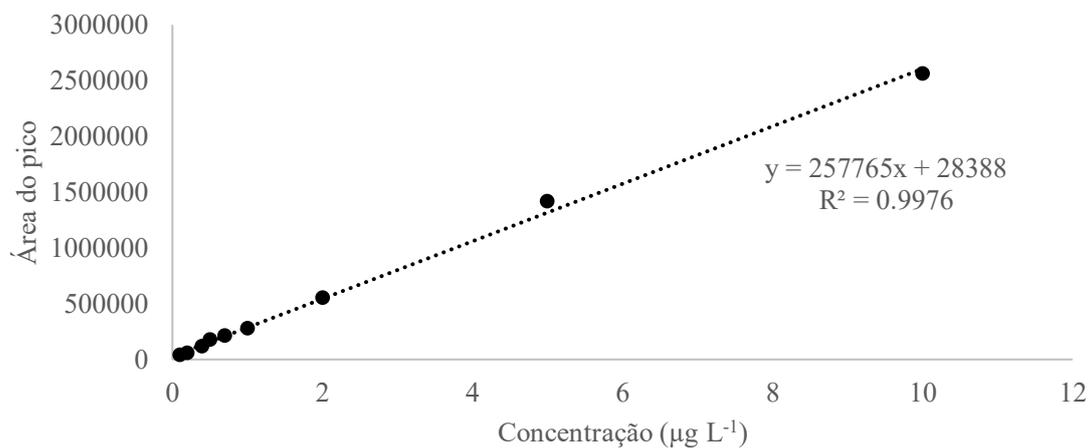


Figura VII.2. Curva de calibração obtida para TET.

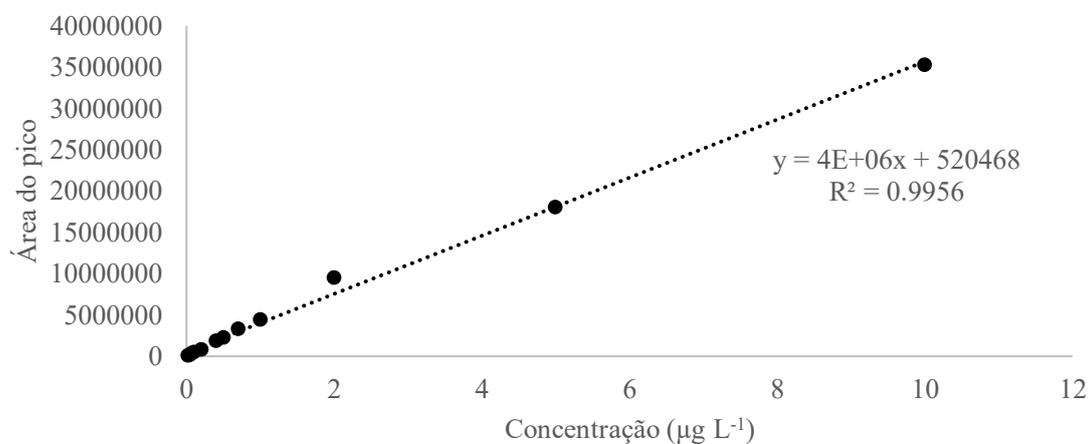


Figura VII.3. Curva de calibração obtida para BIF.

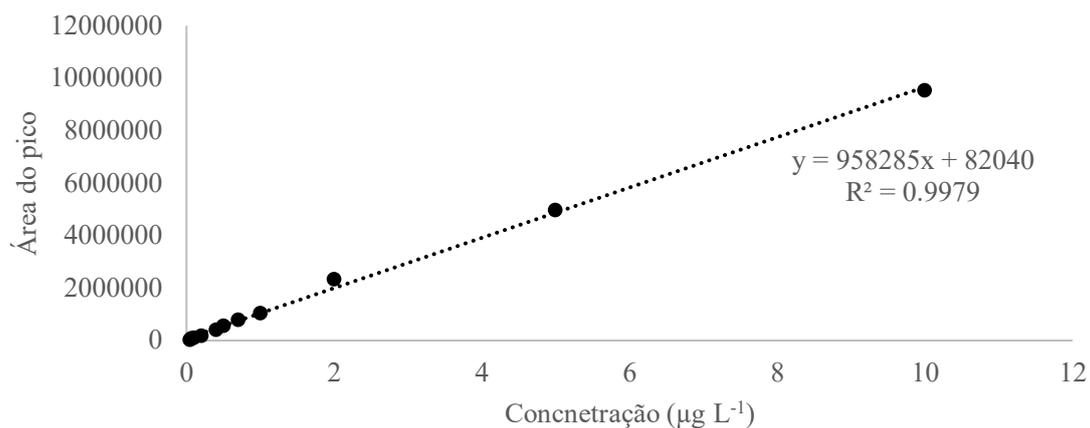


Figura VII.4. Curva de calibração obtida para FEN.

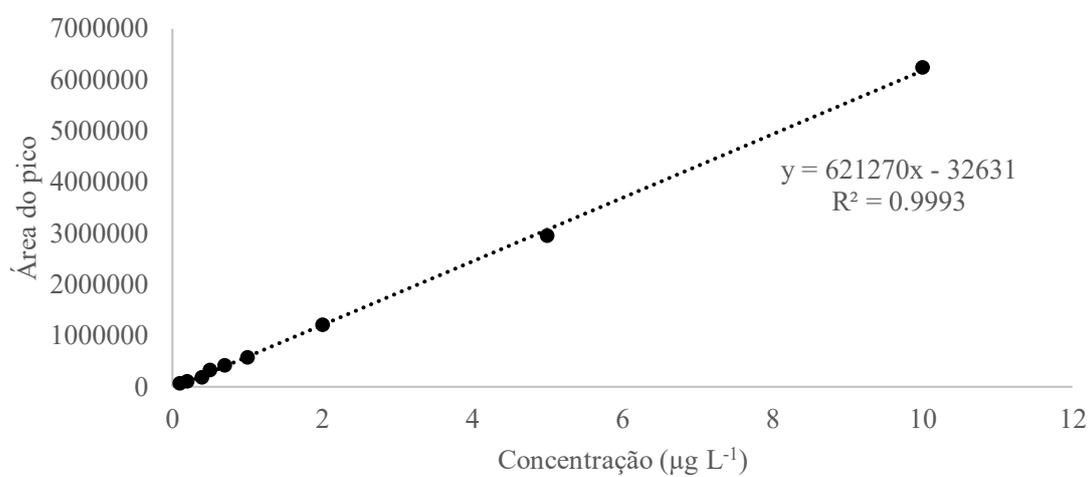


Figura VII.5. Curva de calibração obtida para CYH.

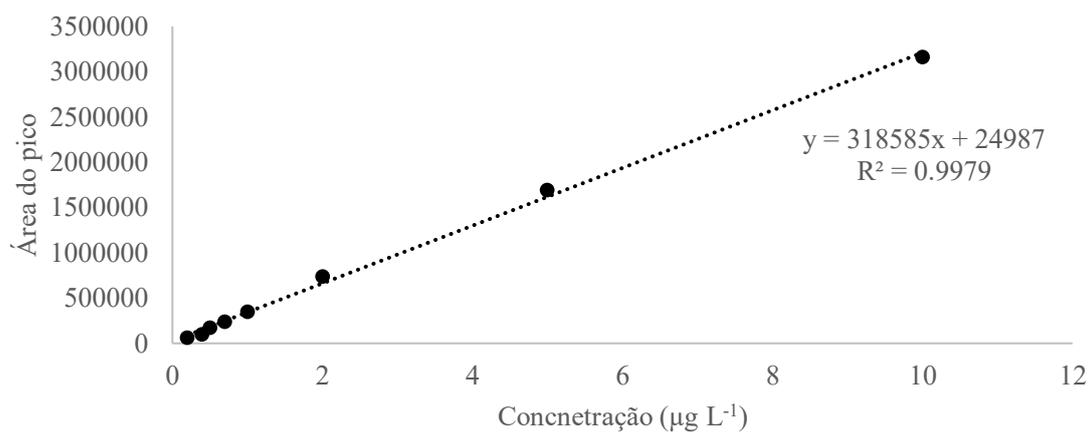


Figura VII.6. Curva de calibração obtida para CYP.

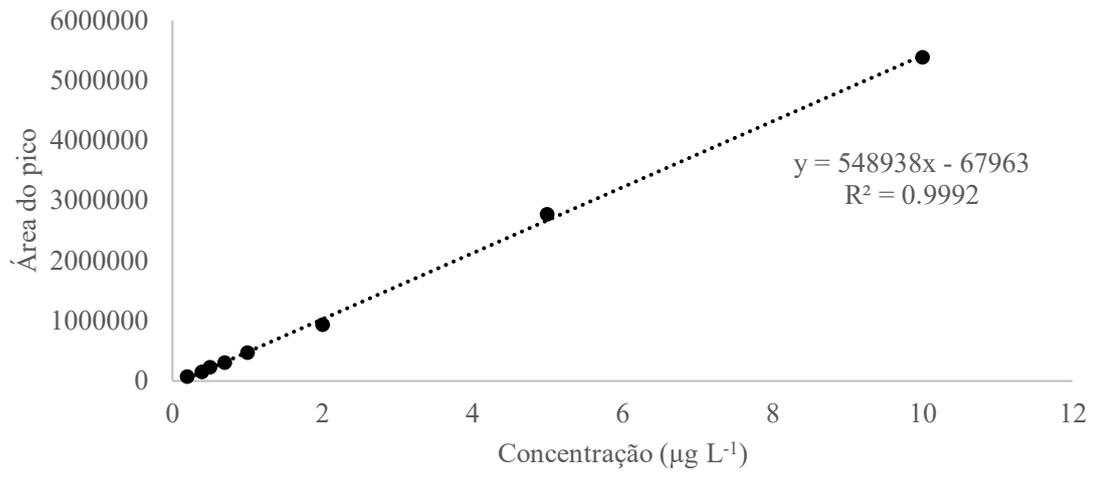


Figura VII.7. Curva de calibração obtida para FEV.

Anexo VIII: Gráfico de dispersão residual das calibrações

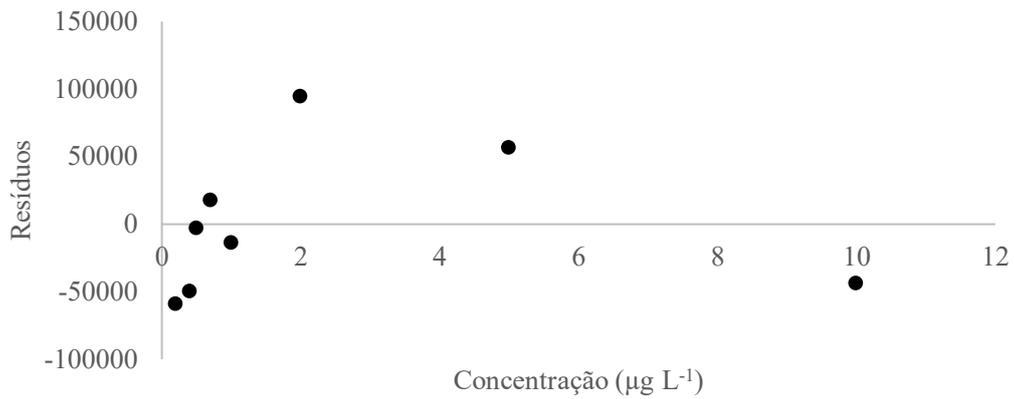


Figura VIII.1. Gráfico de dispersão de resíduos obtida para ALL.

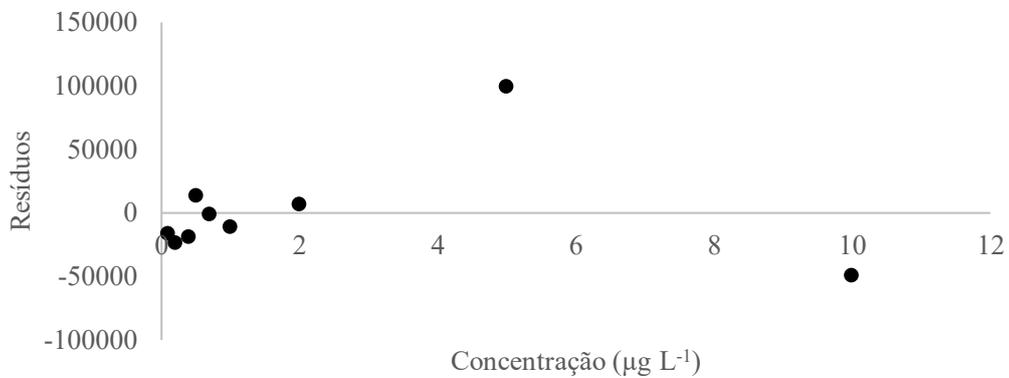


Figura VIII.2. Gráfico de dispersão de resíduos obtida para TET.

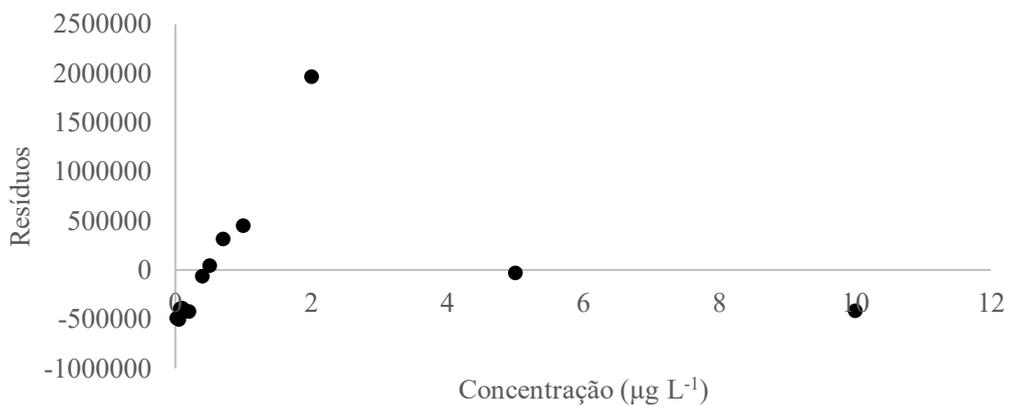


Figura VIII.3. Gráfico de dispersão de resíduos obtida para BIF.

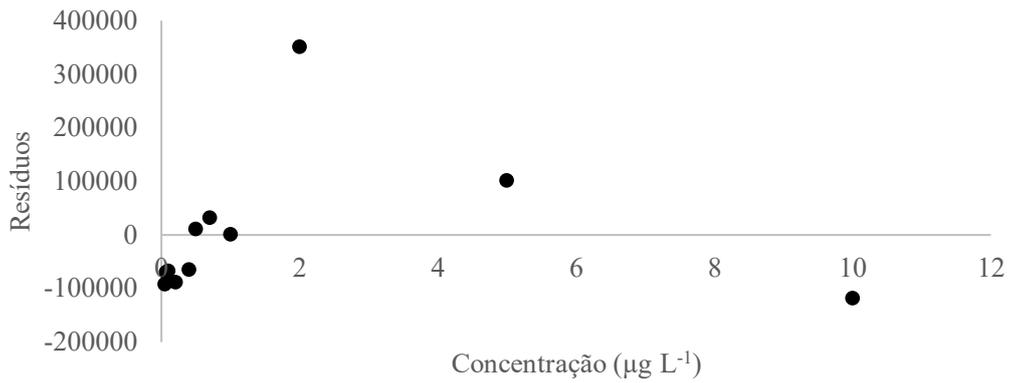


Figura VIII.4. Gráfico de dispersão de resíduos obtida para FEN.

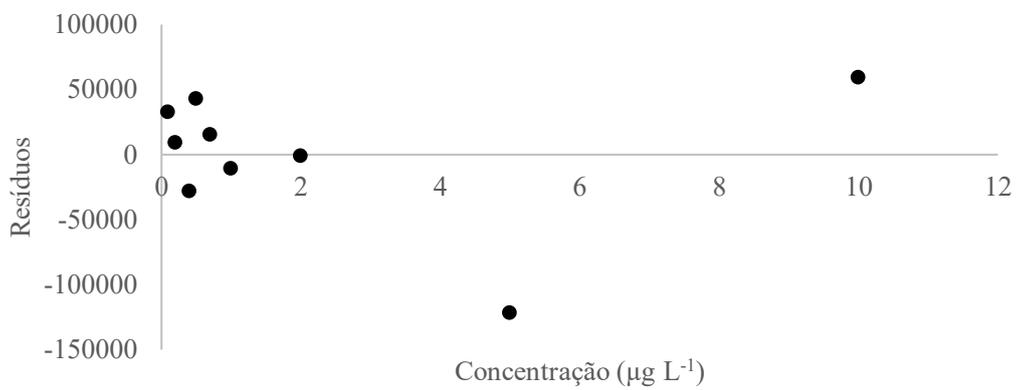


Figura VIII.5. Gráfico de dispersão de resíduos obtida para CYH.

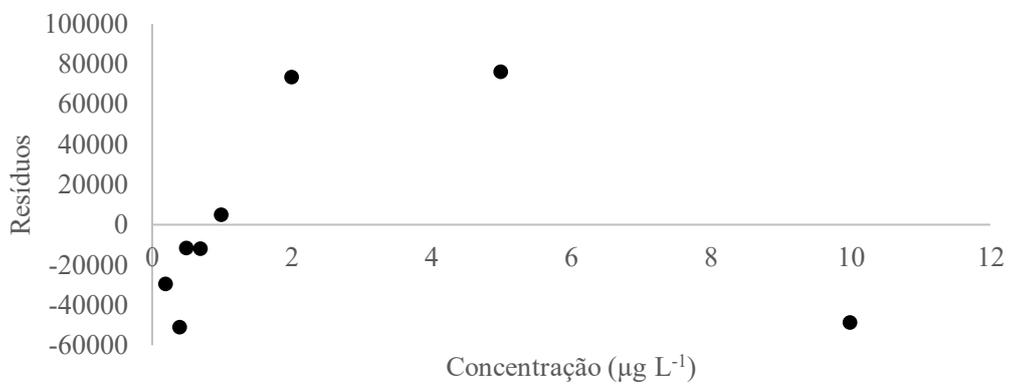


Figura VIII.6. Gráfico de dispersão de resíduos obtida para CYP.

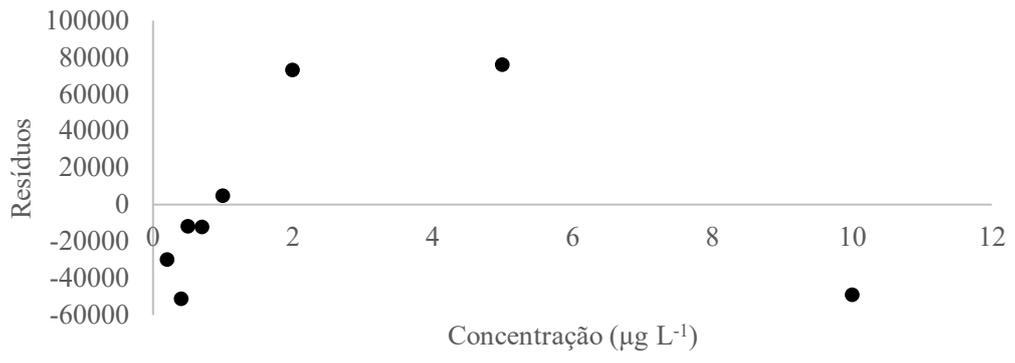


Figura VIII.7. Gráfico de dispersão de resíduos obtida para FEV.

Anexo IX: Traçados de corrente iônica total de ensaios sem fortificação das matrizes reais

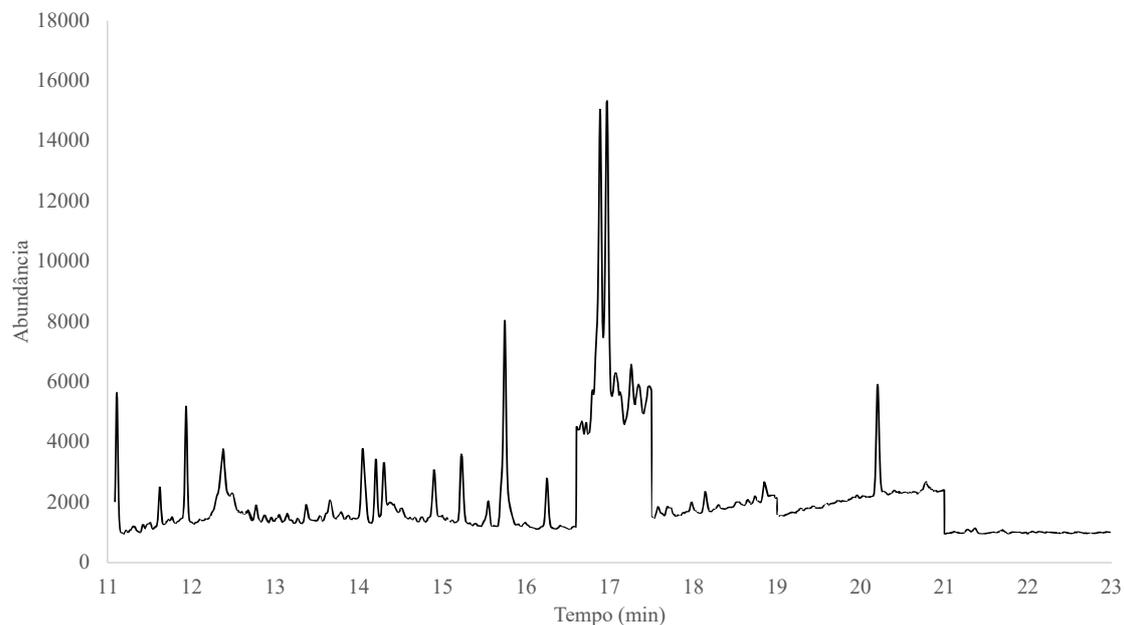


Figura IX.1. Traçado de corrente iônica total do ensaio sem fortificação na matriz de água subterrânea, nas condições otimizadas da metodologia HF μ E(*n*-C₇)- μ LD/GC-MS(SIM).

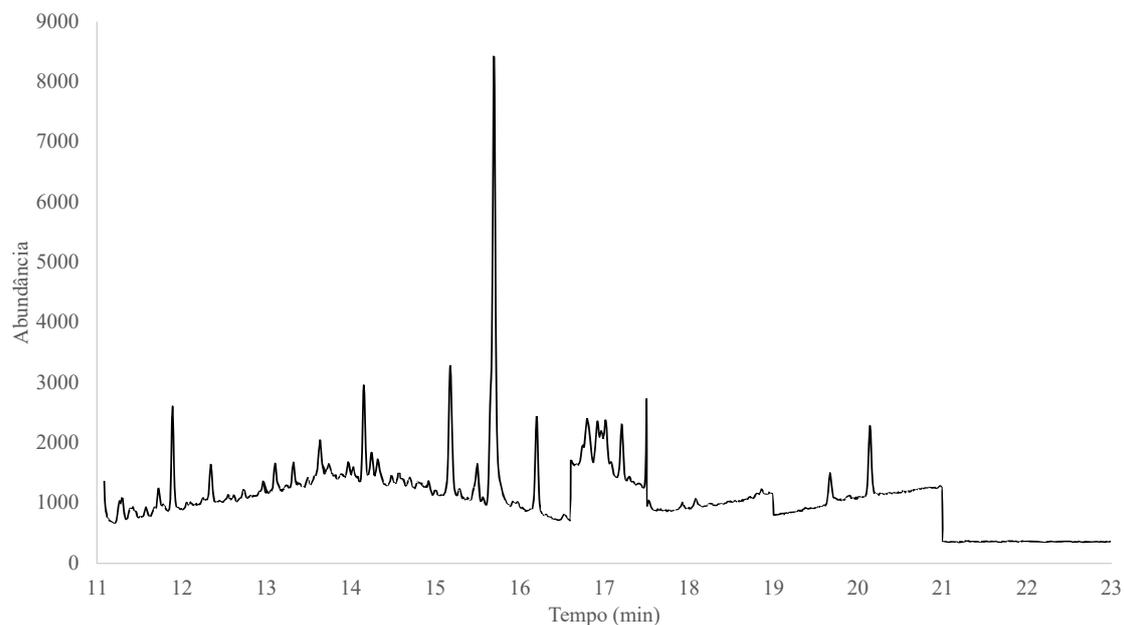


Figura IX.2. Traçado de corrente iônica total do ensaio sem fortificação na matriz de água para consumo humano, nas condições otimizadas da metodologia HF μ E(*n*-C₇)- μ LD/GC-MS(SIM).

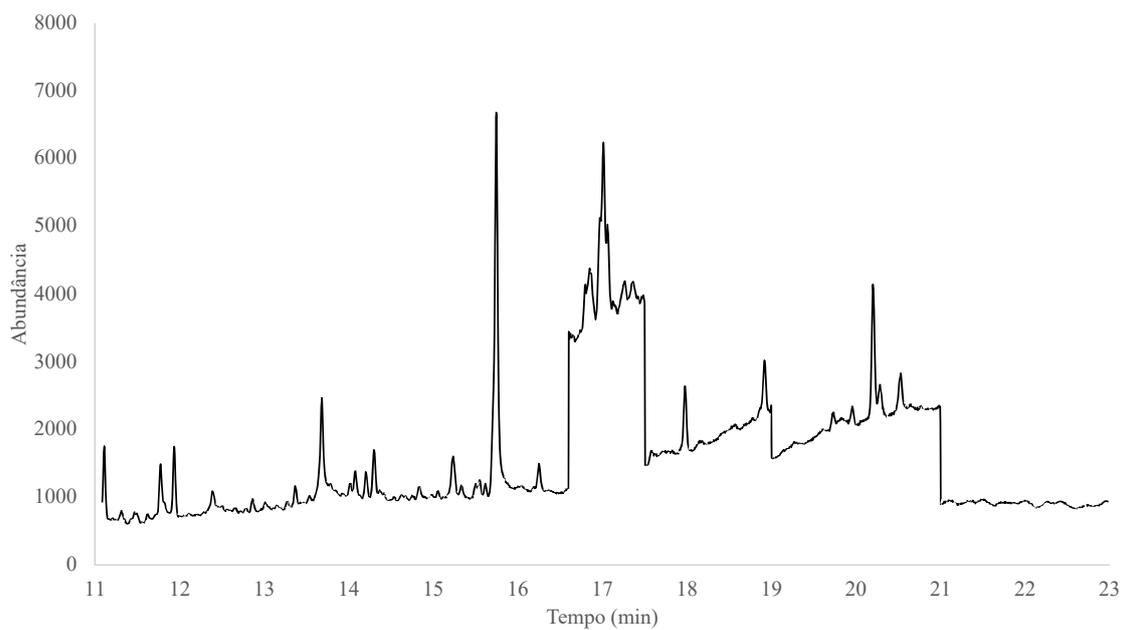


Figura IX.3. Traçado de corrente iônica total do ensaio sem fortificação na matriz de água superficial, nas condições otimizadas da metodologia HF μ E(*n*-C₇)- μ LD/GC-MS(SIM).

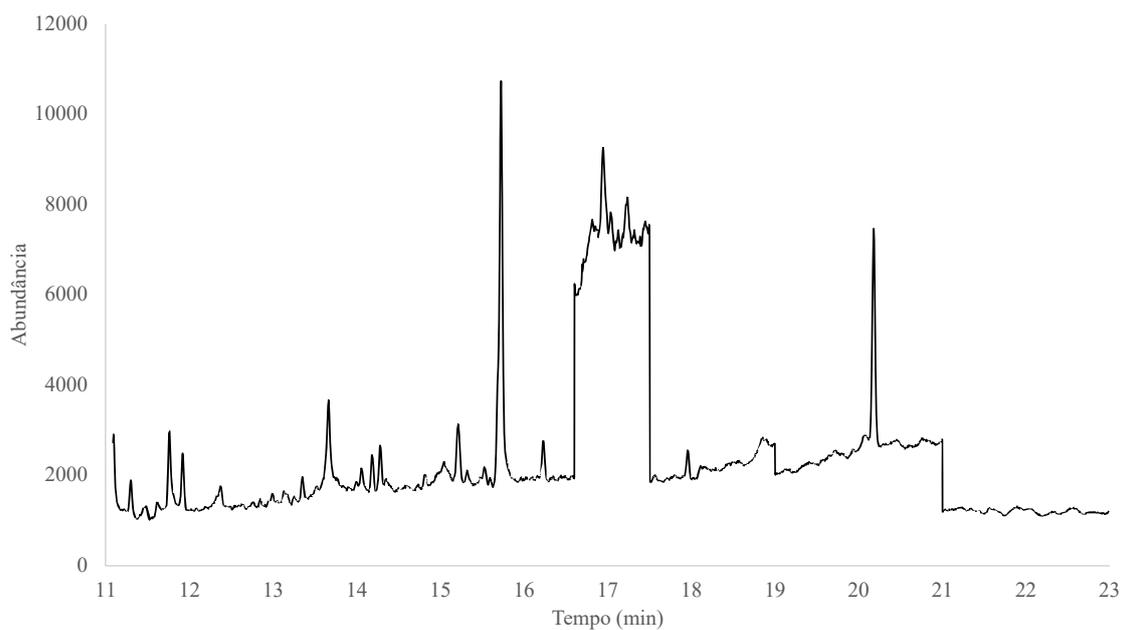


Figura IX.4. Traçado de corrente iônica total do ensaio sem fortificação na matriz de água residual de ETAR, nas condições otimizadas da metodologia HF μ E(*n*-C₇)- μ LD/GC-MS(SIM).

Anexo X: Gráficos de comparação das diversas matrizes reais testadas

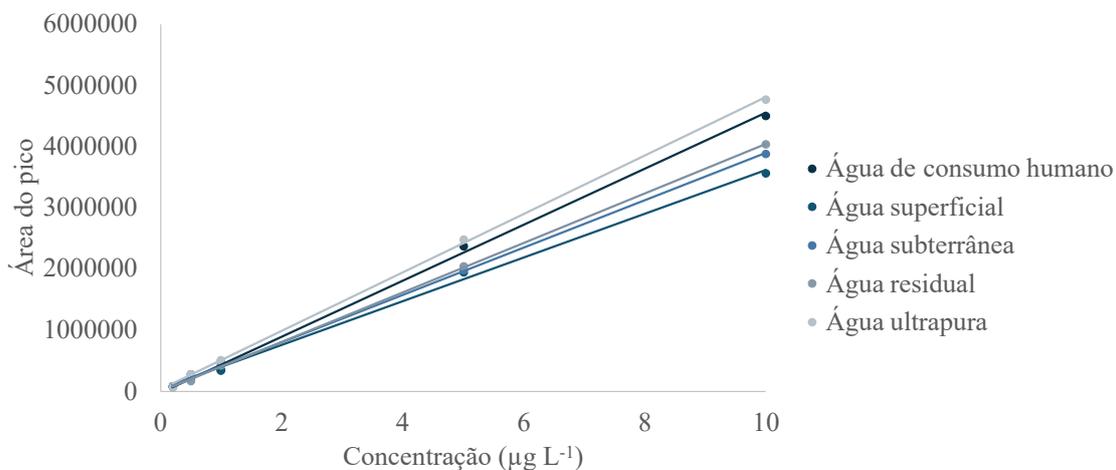


Figura X.1. Gráfico de comparação das curvas de calibração do composto ALL analisado nas diferentes matrizes reais aquosas.

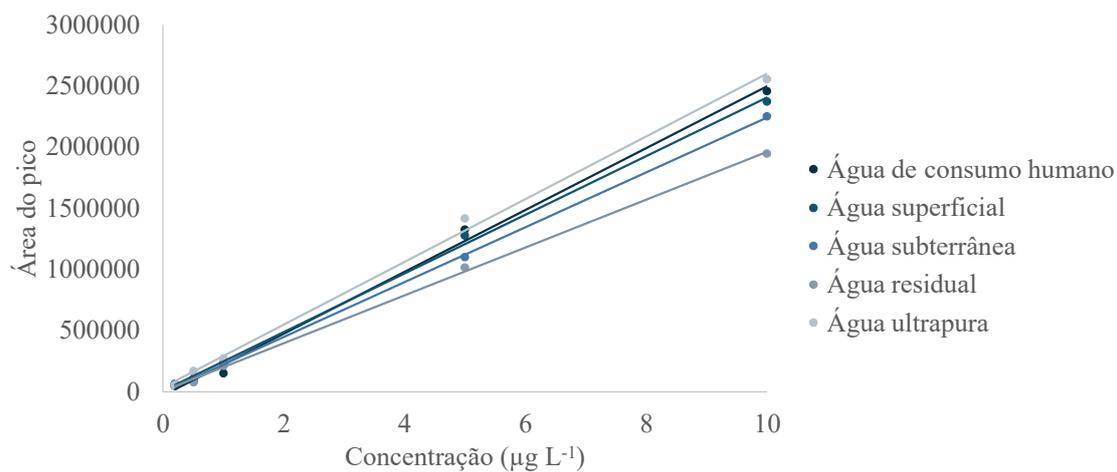


Figura X.2. Gráfico de comparação das curvas de calibração do composto TET analisado nas diferentes matrizes reais aquosas.

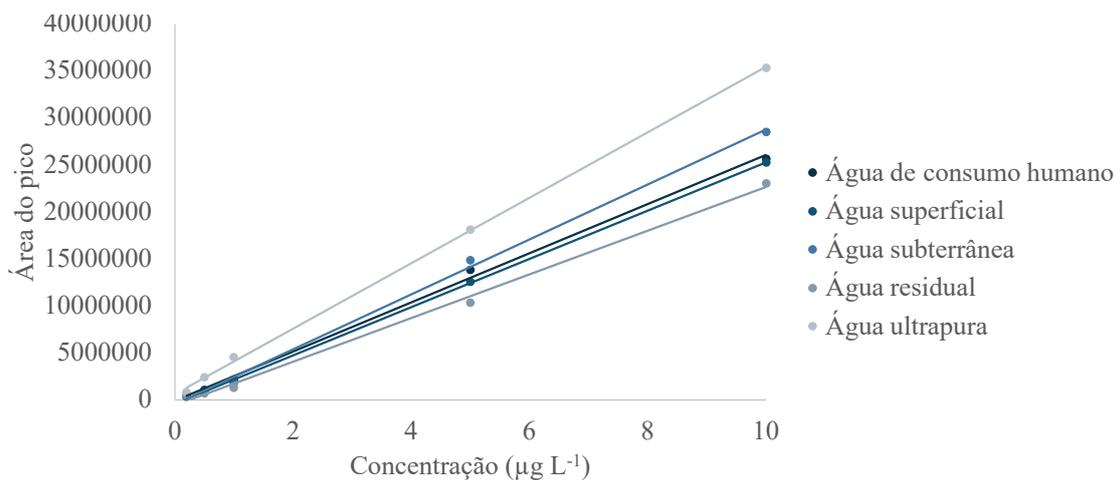


Figura X.3. Gráfico de comparação das curvas de calibração do composto BIF analisado nas diferentes matrizes reais aquosas.

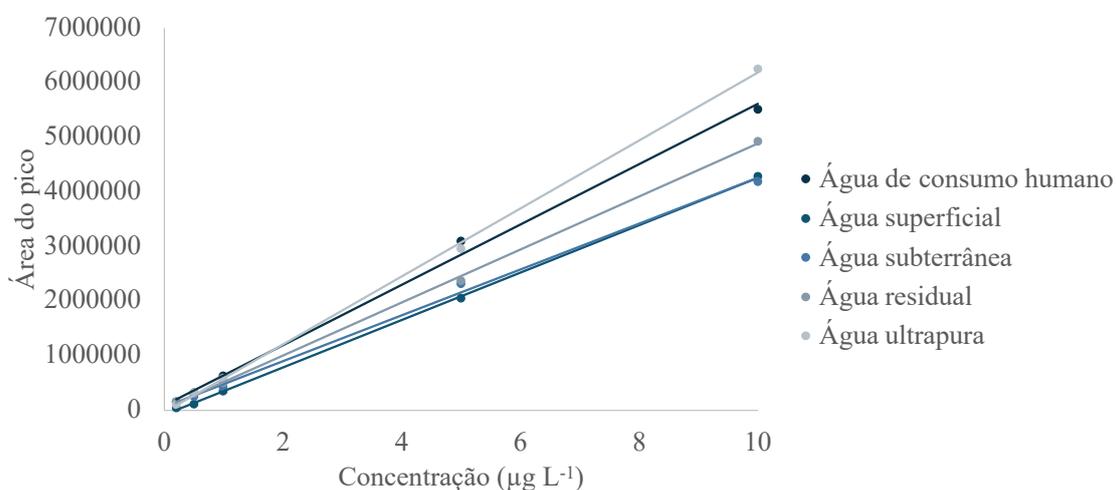


Figura X.4. Gráfico de comparação das curvas de calibração do composto CYH analisado nas diferentes matrizes reais aquosas.

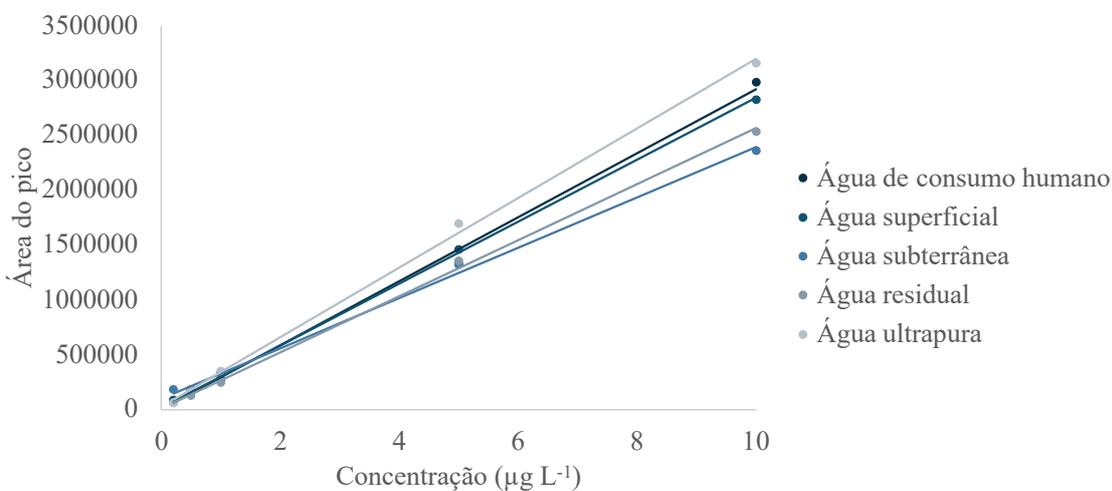


Figura X.5. Gráfico de comparação das curvas de calibração do composto CYP analisado nas diferentes matrizes reais aquosas.

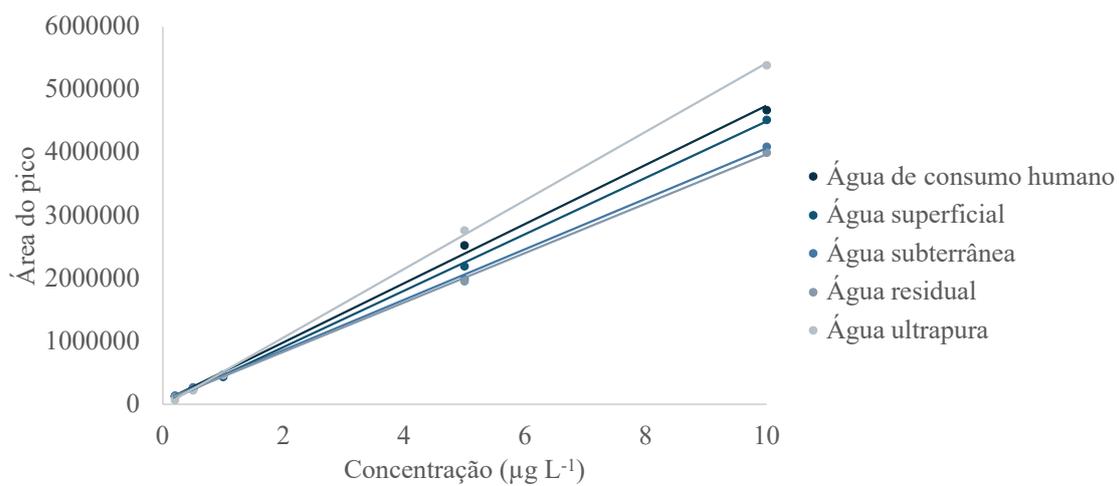


Figura X.6. Gráfico de comparação das curvas de calibração do composto FEV analisado nas diferentes matrizes reais aquosas.

Anexo XI: Comparação de metodologias para análise vestigial de piretróide por técnicas de microextração

Tabela XI.1. Comparação da metodologia desenvolvida com outros estudos para análise vestigial de piretróides em amostras aquosas.

Método analítico	Recuperação ± RSD (%)	Gama de trabalho (ng L⁻¹)	LOD (ng L⁻¹)	LOQ (ng L⁻¹)	Ref.
SPME/GC-ECD	40,5 - 135,0 ± (6,0 - 16,3) <u>ALL</u> : 76,6 - 116,0 ± 9,8 <u>TET</u> : 32,9 - 134,0 ± 15,2 <u>CYH</u> : 74,7 - 110,0 ± 9,7 <u>CYP</u> : 64,6 - 90,3 ± 15,7	20 - 10000	0,05 - 2,18 <u>ALL</u> : 0,43 <u>TET</u> : 0,32 <u>CYH</u> : 0,33 <u>CYP</u> : 1,07	0,16 - 7,27 <u>ALL</u> : 1,44 <u>TET</u> : 1,08 <u>CYH</u> : 1,11 <u>CYP</u> : 3,58	[35]
SPME/GC-MS	77,5 - 104,6 ± (5,0 - 11,4) <u>BIF</u> : 77,5 ± 10,8 <u>CYP</u> : 84,2 ± 8,4	50 - 250000	20 - 300 <u>BIF</u> : 30 <u>CYP</u> : 30	50 - 1000 BIF: 100 CYP: 100	[36]
SBSE/LVI-GC-MS	50,0 - 105,0 ± (4,4 - 11,1) <u>FEN</u> : 105,0 ± 4,4 <u>CYP</u> : 83,6 ± 6,9 <u>FEV</u> : 89,4 ± 11,1	25 - 400	1,0 - 2,5 <u>FEN</u> : 2,5 <u>CYP</u> : 2,5 <u>FEV</u> : 2,5	3,0 - 7,5 <u>FEN</u> : 7,5 <u>CYP</u> : 7,5 <u>FEV</u> : 7,5	[37]
BA _μ E/LVI-GC-MS	54,6 - 102,7 ± (4,6 - 7,0) <u>FEN</u> : 80,8 ± 5,9	30 - 400	8,0 - 32,0 <u>FEN</u> : 8,0	26,8 - 105,6 <u>FEN</u> : 26,4	[38]
SDME/GC-MS	78,6 - 106,8 ± (7,4 - 14,3) <u>CYP</u> : 99,4 ± 14,3	150 - 60000	50,0 - 375,0 <u>CYP</u> : 375,0	150,0 - 1125,0 <u>CYP</u> : 1125,0	[39]
SDME/GC-ECD	71,0 - 107,0 ± (9,0 - 21,0) <u>CYH</u> : 102,0 ± 19,0 <u>CYP</u> : 107,0 ± 17,9	300 - 16000	90 - 300 <u>CYH</u> : 90 <u>CYP</u> : 300	300 - 2000 <u>CYP</u> : 300 <u>CYP</u> : 1000	[40]
DLLME/GC-MS	47,0 - 116,0 ± (2,0 - 16,0) <u>CYH</u> : 47,0 - 101,0 ± (6,0 - 12,0)	200 - 4×10 ⁴	7 - 170 <u>CYH</u> : 25	2000 <u>CYH</u> : 2000	[41]
HL-LPME/GC-MS	69,4 - 122,7 ± (4,2 - 18,4) <u>BIF</u> : 69,4 - 122,7 <u>CYP</u> : 42,7 - 57,7	10000 - 4×10 ⁵	200 - 1200	300 - 2600	[42]