

UNIVERSIDADE DE LISBOA  
FACULDADE DE CIÊNCIAS  
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA ANIMAL

Dissertação



**Determinação de Resíduos de Pesticidas em  
Produtos de Origem Vegetal por GC-ECD**

Sara Cristina de Bessa Barbosa

Mestrado em Biologia Humana e Ambiente

2012

UNIVERSIDADE DE LISBOA  
FACULDADE DE CIÊNCIAS  
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA ANIMAL

Dissertação



# **Determinação de Resíduos de Pesticidas em Produtos de Origem Vegetal por GC-ECD**

Sara Cristina de Bessa Barbosa

Mestrado em Biologia Humana e Ambiente

*Dissertação orientada por:*

**Doutora Fernanda Vilarinho**

Departamento de Alimentação e Nutrição,  
Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge, Lisboa

**Professora Doutora Maria Teresa Rebelo**

Departamento de Biologia Animal,  
Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa

2012

*“No meio de qualquer dificuldade encontra-se a oportunidade”*

Albert Einstein

# SUMÁRIO

A utilização de pesticidas iniciou-se em meados da década de 30 do século XX com o desenvolvimento de novos compostos químicos para o aumento da produção agrícola, tendo como finalidade a satisfação das necessidades alimentares da população mundial. Porém, a sua fraca degradabilidade e o modo de dispersão fizeram dos pesticidas um grande problema de saúde pública e ambiental. Estes são responsáveis pela poluição do solo e da água e provocam efeitos nefastos na saúde humana. Tendo em linha de conta estes efeitos e visto ser inevitável a presença de resíduos de pesticidas nos alimentos, foram definidos limites máximos de resíduos (LMRs), abaixo dos quais o risco para a saúde dos consumidores não é significativo.

Os métodos cromatográficos são os mais utilizados na análise de resíduos de pesticidas, sendo a cromatografia gasosa (GC) a técnica mais aplicada na análise de produtos de origem vegetal. O presente trabalho teve como objectivo a validação do método de cromatografia gasosa com detector de captura de electrões (GC-ECD), para a determinação de resíduos de pesticidas em produtos de origem vegetal, nos laboratórios do Departamento de Alimentação e Nutrição (DAN) do Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge (INSA). A metodologia seguida envolveu o estudo da selectividade, linearidade, precisão, limite de detecção (LD) e de quantificação (LQ), e exactidão do método.

Os resultados obtidos no presente trabalho, demonstraram que o GC-ECD obedece a todos os parâmetros analíticos necessários à validação do método. Deste modo, conclui-se que a cromatografia gasosa com detector de captura de electrões é uma metodologia válida para a determinação de resíduos de pesticidas em produtos de origem vegetal.

**Palavras-Chave:** Produtos de Origem Vegetal, Resíduos de Pesticidas, Cromatografia de fase Gasosa (ECD), Validação de métodos

## ABSTRACT

The use of pesticides began in the mid-30's with the development of new chemical compounds to increase agricultural production, with the purpose to meet the world's population food needs. However, its poor degradation and propagation made them a major problem for public health and the environment. These are responsible for soil and water pollution and cause adverse effects on human health. They present a high risk especially for children, since the enzyme activity and its metabolic systems are not fully active. Taking into account these effects and since it is inevitable the presence of pesticides residues in food, were set maximum residue limits (MRLs), below which the risk to consumers health is not significant.

The chromatographic methods are the most used in the analysis of pesticide residues, and gas chromatography (GC) to more technical analysis applied in products of plant origin. This study aimed to validate the method of gas chromatography with electron capture detector (GC-ECD) for the determination of pesticide residues in products of plant origin, in the laboratories of the Department of Food and Nutrition (DAN) at the Institute Health Dr. Ricardo Jorge (INSA). The methodology involved the study of selectivity, linearity, precision, detection limit (LOD) and quantification (LOQ), and accuracy of the method.

The results obtained in this study showed that the GC-ECD obeys all parameters necessary for analytical method validation. Thus, it is concluded gas chromatography with electron capture detector is a valid methodology for the determination of pesticide residues in plant products.

**Keywords:** Vegetable Origin Products, Pesticide Residues, Gas Chromatography (ECD), Validation of methods.

## **AGRADECIMENTOS**

Antes de mais gostaria de salientar que a execução deste trabalho não teria sido possível sem a intervenção, apoio e simpatia de diversas pessoas. Por este motivo, quero demonstrar o meu profundo agradecimento, estima e reconhecimento mesmo correndo o risco de não conseguir expressar por palavras a minha imensa gratidão.

O meu enorme agradecimento é especialmente dirigido:

À Dra. Fernanda Vilarinho, minha orientadora científica, pela oportunidade que me proporcionou ao possibilitar a realização deste trabalho experimental, por todo o apoio, motivação, disponibilidade, confiança, simpatia e amizade, e ainda, por todos os comentários e observações enriquecedores que fez ao presente trabalho.

À Prof.<sup>a</sup> Dra. Teresa Rebelo, minha orientadora interna, por todo o apoio prestado, pelos comentários dirigidos ao trabalho sempre oportunos e construtivos, e também pela preocupação, simpatia e disponibilidade sempre demonstradas.

À Dra. Paula Alvito, coorientadora deste trabalho, pelo todo apoio, simpatia e disponibilidade.

À Dra. Maria João por todo o apoio prestado, disponibilidade, preocupação e simpatia.

À Dra. Antónia Calhau pela sua prestabilidade, preocupação e simpatia. A toda a equipa do Departamento de Alimentação e Nutrição, nomeadamente à Ana Cláudia, Carla Martins e Susana Santiago por toda hospitalidade e simpatia com que me receberam, e ainda, pelo apoio, disponibilidade e amizade.

À Prof.<sup>a</sup> Dra. Deodália Dias, coordenadora do mestrado de Biologia Humana e Ambiente, pelos esclarecimentos, disponibilidade, simpatia e preocupação demonstradas.

Às minhas amigas Tânia Santos, Eduarda Silva, Dora Mourão, Ana Vicente, Vera Gonçalves, Marcela Barroso, Alberta Domingues e Habiba Nasciri por toda a força que me deram, apoio, preocupação e confiança que depositaram em mim.

Aos meus pais por serem o meu apoio nos bons e maus momentos, por todo o carinho, compreensão, incentivo incansável e apoio incondicional ao longo da realização deste trabalho, bem como ao longo de toda a minha formação superior.

A todas as pessoas que não tive a oportunidade de referir aqui o nome, e que de uma forma ou outra contribuíram, mesmo que passivamente, para a realização deste trabalho o meu Muito Obrigada!

# ÍNDICE

SUMÁRIO .....	ii
ABSTRACT .....	iii
AGRADECIMENTOS .....	iv
ÍNDICE DE TABELAS .....	vii
ÍNDICE DE FIGURAS .....	viii
ÍNDICE DE EQUAÇÕES .....	ix
LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS .....	x
ABREVIATURAS .....	x
SÍMBOLOS .....	xii
1. INTRODUÇÃO .....	1
1.1 Pesticidas .....	1
1.1.1 Marcos Históricos .....	1
1.1.2 Definição, Classificação e Impacto .....	2
1.1.3 Efeito dos pesticidas na saúde humana .....	5
1.1.4 Legislação referente aos pesticidas .....	7
1.2. Determinação de resíduos de pesticidas .....	9
1.2.1 Métodos cromatográficos – Princípios teóricos .....	10
1.2.1.1 Cromatografia Gasosa com Detector de Captura de Electrões (GC-ECD) .....	11
1.3 Validação de Metodologias Analíticas .....	12
1.3.1 Definição dos parâmetros de validação .....	13
1.3.1.1 Selectividade/Especificidade .....	13
1.3.1.2 Linearidade .....	14
1.3.1.3 Precisão .....	15
1.3.1.4 Exactidão .....	15
1.3.1.5 Limiares Analíticos .....	16
1.4 Método de Extracção em Fase Sólida (SPE) .....	17
1.5 Efeito de Matriz na Determinação de Pesticidas com GC-ECD .....	21
1.5.1 Factores que Influenciam o Efeito de Matriz .....	22
1.5.1.1 Injetor .....	23
1.5.1.2 Coluna Cromatográfica e Detector .....	23
1.5.1.3 Propriedades da Matriz .....	24
1.5.1.4 Propriedades dos Pesticidas .....	24
1.5.1.5 Concentração dos Pesticidas .....	24

1.5.2 Formas de Minimizar o Efeito de Matriz .....	25
2. OBJECTIVOS DO TRABALHO.....	28
3. PARTE EXPERIMENTAL .....	28
3.1 Reagentes, Soluções e Padrões.....	29
3.2 Material e Equipamento .....	30
3.3 Preparação das Soluções Padrão dos Pesticidas.....	32
3.4 Validação da Técnica de Cromatografia Gasosa com Detector de Captura de Electrões (GC-ECD) .....	33
3.4.1 Validação de Métodos Analíticos.....	33
3.4.1.1 Teste de <i>Fisher-Snedecor</i> (F).....	34
3.4.1.2 Teste <i>t-Student</i> .....	36
3.4.1.3 Processo de Extração em Fase Sólida com colunas de sílica .....	36
3.5 Extração em Fase Sólida com coluna C <sub>18</sub> .....	38
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	39
4.1 Validação da Técnica de Cromatografia Gasosa com Detector de Captura de Electrões (GC-ECD) .....	39
4.1.1 Validação do Método Analítico .....	39
4.1.1.1 Estudo da Selectividade .....	39
4.1.1.2 Estudo da Linearidade .....	41
4.1.1.3 Estudo da Precisão .....	42
4.1.1.4 Estudo dos Limiares Analíticos: Limite de Detecção e Limite de Quantificação.....	43
4.1.1.5 Estudo da Exactidão .....	45
4.2 Comparação do Método de Extração em Fase Sólida com cartuchos de sílica e com cartuchos C <sub>18</sub> .....	47
5. CONCLUSÃO E CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	49
6. BIBLIOGRAFIA .....	51



## ÍNDICE DE TABELAS

<b>Tabela I.</b> Pesticidas estudados, bem como os grupos químicos e a respectiva classe a que pertencem.	9
<b>Tabela II.</b> Valores dos tempos de retenção dos 13 pesticidas em estudo.	40
<b>Tabela III.</b> Gamas estipuladas para cada pesticida bem como os respectivos coeficientes de correlação obtidos no estudo da linearidade.	42
<b>Tabela IV.</b> Valores dos Desvios Padrão e dos Coeficientes de Variação (%) dos 13 compostos.	43
<b>Tabela V.</b> Valores dos Limites de Detecção e dos Limites de Quantificação dos 13 compostos estudados.	44
<b>Tabela VI.</b> Recuperações obtidas a partir da fortificação da polpa da maçã fresca com 0.125 µg/ml.	46
<b>Tabela VII.</b> Recuperações obtidas a partir da SPE com colunas de sílica e colunas C <sub>18</sub>	48

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Classificação toxicológica dos pesticidas	3
<b>Figura 2.</b> Processo SPE constituído pelo sistema <i>manifold</i>	18
<b>Figura 3.</b> Etapas do procedimento de SPE: acondicionamento da coluna, retenção do analito, lavagem da coluna e eluição	20
<b>Figura 4.</b> Imagem dos <i>vials</i> para GC, capsulador e respectivas cápsulas metálicas	31
<b>Figura 5.</b> Cromatógrafo de fase gasosa com detector de de captura electrónica Hewlett Packard HP 6890.	32
<b>Figura 6.</b> Cromatograma de uma das réplicas das soluções padrão, com concentração de 1µg/ml: A) $\alpha$ -BHC, B) Lindano, C) $\sigma$ -BHC, D) Heptacloro, E) Aldrina, F) Heptacloro (Isómero A) e G) Nitrofenol	40

## ÍNDICE DE EQUAÇÕES

<b>Equação 1.</b>	Limite de Detecção	$LD = 3 \times S_{x_0}$	16
<b>Equação 2.</b>	Limite de Quantificação	$LQ = 10 \times S_{x_0}$	17
<b>Equação 3.</b>	Valor do Teste PG	$PG = \frac{DS^2}{Sy_2^2}$	33
<b>Equação 4.</b>	Teste de <i>Fisher</i>	$F = \frac{S_1^2}{S_2^2}$	34
<b>Equação 5.</b>	Limite de Detecção	$L.D. \cong X_0 + 3,3.\sigma_0$	35
<b>Equação 6.</b>	Limite de Quantificação	$L.Q. \cong X_0 + 10.\sigma_0$	35
<b>Equação 7.</b>	Teste <i>t-Student</i>	$t = \frac{\bar{x} - \mu_0}{\frac{s}{\sqrt{n}}}$	36

# LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

## ABREVIATURAS

Acetato De Etilo –  $\text{CH}_3\text{COOC}_2\text{H}_5$

Acetona –  $\text{CH}_3(\text{CO})\text{CH}_3$

ADI – Dose Diária Aceitável

AOEL – Nível Máximo Aceitável para o Operador

ARfD - Dose Aguda de Referência

BHC - Hexaclorobenzeno

CE – Comunidade Europeia

CEE – Comunidade Económica Europeia

DAR – Dose Aguda de Referência

DDT – 1.2-dicloro-2.2-di [4-clorofenil] – etano

Dióxido De Silício (Areia) –  $\text{SiO}_2$

DMFS – Dispersão da matriz em Fase Sólida

ECD /  $\mu\text{ECD}$  – Detector de Captura de Electrões

EPA – *Environmental Protection Agency*

Etanol –  $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$

FAO – Organização das Nações Unidas Para a Alimentação e Agricultura

FID – Detector de Ionização de Chama

GC – Cromatografia Gasosa

GC – ECD – Cromatografia Gasosa com Detector de Captura de Electrões

GC/MS – Espectrómetro de massa Acoplado ao Cromatógrafo Gasoso

GLC – Cromatografia Líquida Gasosa

GPC – Cromatografia de Permeação de Gel

GSC – Cromatografia Sólida Gasosa

Hexano – C<sub>6</sub>H<sub>14</sub>

Hidrogenocarbonato de Sódio – NaHCO<sub>3</sub>

HPLC – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

IEC – Cromatografia de Permuta Iônica

INSA – Instituto Nacional De Saúde Dr. Ricardo Jorge

LC – Cromatografia de Fase Líquida

LD – Limite de Detecção

LQ – Limite de Quantificação

LC/MS – Espectrómetro de Massa Acoplado ao Cromatógrafo Líquido

LC/MS-MS – Cromatografia Líquida com Espectrometria de Massa

LC/UV- Cromatografia Líquida com Espectrometria de Absorção Ultravioleta

LMR – Limites Máximos de Resíduos

Metanol - MeOH

MS-MS – Espectrometria de Massa

NOAEL – Dose Sem Efeito Adverso Observável

NPD – Detector de Fósforo-Azoto

OCDE – Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Económico

OMS – Organização Mundial de Saúde

OCPs – Pesticidas Organoclorados

ONPs – Pesticidas Organonitrogenados

OPPs – Pesticidas Organofosforados

UE – União Europeia

USDA – *United States Department Of Agriculture*

SEC – Cromatografia de Exclusão Molecular

SFC – Cromatografia Supercrítica

SPE – Extração em Fase Sólida

Sulfato de Sódio Anidro – Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>

TLC – Cromatografia de Camada Fina

TPV – Temperatura Programada de Vaporização

$t_r$  - Tempos de Retenção

## SÍMBOLOS

$r$  - Coeficiente de correlação

$x$  – Concentração do analito, variável independente

$P_1$  – Concentração do padrão mais baixo

$^{\circ}\text{C}$  – Graus *Celsius*

$s$  – Desvio-padrão

$\sigma_0$  – Desvio padrão referente às 10 réplicas

$S_{y_2}$  – Desvio padrão residual do ajuste polinomial

$DS^2$  – Diferença das variâncias

$g$  – Grama

$a$  – Inclinação da curva de calibração (coeficiente angular)

$b$  – Intersecção com o eixo  $y$  (coeficiente linear)

$M$  – Média das recuperações

$\bar{x}$  - Média das réplicas

$\mu\text{g}$  – Micrograma

$\mu\text{L}$  – Microlitro

$\mu\text{m}$  - Micrometro

$\text{mg}$  – Miligrama

$\text{mL}$  – Mililitro

$\text{mm}$  - Milímetro

$\text{kg}$  – Quilograma

$y$  – Altura ou área do pico, variável dependente

rpm – Rotações por minuto

$X_0$  – Tempo inicial

$\mu_0$  – Valor fixo utilizado para comparar com a média das réplicas

# 1. INTRODUÇÃO

## 1.1 Pesticidas

### 1.1.1 Marcos Históricos

As plantas, uma das principais fontes de alimento no mundo, podem ser afectadas por numerosas pragas, por doenças e pela competição de infestantes <sup>1</sup>.

Os pesticidas são, conseqüentemente, essenciais na agricultura para assegurar a necessidade crescente de alimentos. A sua aplicação conduz, de uma maneira geral, a um aumento da produtividade das colheitas, e também à melhoria das características qualitativas dos alimentos <sup>2,3</sup>.

A utilização de pesticidas é quase tão antiga como a agricultura <sup>4</sup>. O primeiro grande marco na história dos pesticidas sintéticos foi a descoberta no século XIX, do Kerosene e do “Verde de Paris” para combater o escaravelho-da-batateira. No início da Segunda Guerra Mundial a selecção de insecticidas limitava-se a diversos compostos como o arsénico, a produtos de origem natural como a rotenona, as piretrinas e a nicotina, o enxofre e pouco mais <sup>5</sup>. De facto a Segunda Grande Guerra contribuiu para a introdução do conceito de controlo químico de pragas, com o reconhecimento das propriedades insecticidas dos hidrocarbonetos, dos quais fazem parte o DDT (1,2-dicloro- 2,2- di [4-clorofenil] - etano). O DDT foi sintetizado pela primeira vez em 1874 pelo químico alemão *Zeidler*, contudo foi em 1939, que *Paul Muller* descobriu as suas propriedades insecticidas <sup>4,5</sup>. Desde então inúmeros pesticidas têm sido desenvolvidos e utilizados em todo o mundo, entre os quais os organoclorados, os organofosforados e os carbamatos. Nos países industrializados, aquando da “Revolução Verde”, em 1960, assistiu-se ao processo de modernização da agricultura devido ao aparecimento de novas tecnologias, muitas delas baseadas na utilização intensiva de pesticidas <sup>6</sup>.

Foi com a introdução maciça dos pesticidas no mercado que começaram a surgir os primeiros sinais de alarme quanto à sua toxicidade. No final do século passado começaram a centrar-se esforços no desenvolvimento de novos tipos de pesticidas, menos agressivos para o Homem e para o ambiente. Actualmente, estão a ser exploradas intensivamente novas áreas que incluem o controlo biológico, genético ou a própria produção de plantas geneticamente modificadas <sup>5</sup>.



### 1.1.2 Definição, Classificação e Impacto

Os pesticidas são definidos genericamente como um vasto grupo de compostos químicos sintéticos ou naturais utilizados para eliminar pragas e outras ameaças biológicas que atacam culturas agrícolas <sup>2,3</sup>.

Segundo a definição internacionalmente aceite pela Organização das Nações Unidas para a Alimentação e Agricultura/Organização Mundial de Saúde (FAO/OMS), um pesticida é qualquer substância ou mistura de substâncias utilizada na prevenção, controlo ou destruição de pragas (incluindo vectores de doenças), infestantes ou animais indesejáveis que interfiram com a produção, armazenamento, transporte, distribuição e transformação de géneros alimentícios, produtos agrícolas, madeira ou alimentos para animais. Sob esta definição, agrupam-se as substâncias administradas aos animais para o controlo de ectoparasitas, substâncias usadas como reguladores de crescimento, desfolhantes e dessecantes. A definição exclui fertilizantes, aditivos ou drogas veterinárias <sup>7</sup>.

Os pesticidas englobam uma série de substâncias de natureza química diversa, com diferentes funções e acções biológicas e que, por isso, podem ser classificados segundo diferentes critérios <sup>2</sup>. O sistema de classificação mais comum é o modo de acção. Esta classificação é feita de acordo com o tipo de organismo a combater, sendo portanto divididos em insecticidas, fungicidas, herbicidas, rodenticidas, acaricidas entre outros <sup>8</sup>. Outra forma de classificação é quanto à estrutura química, sendo, os produtos fitofarmacêuticos (pesticidas) divididos em inorgânicos e orgânicos. Os primeiros são constituídos por arsénio, bário, cádmio, chumbo, cobre, ferro, fósforo, mercúrio, nitrogénio, selénio, tálio e zinco, entre outros. Os segundos são constituídos pelos orgânicos de síntese (os organoclorados (OCPs), organoclorofosforados, organofosforados (OPPs), organonitrogenados (ONPs) e carbamatos) e pelos orgânicos de origem vegetal (como a nicotina e a piretrina) <sup>2,8</sup>. Do ponto de vista toxicológico podem ser divididos em quatro grandes classes de acordo com o seu grau de toxicidade. A classe toxicológica I é representada por um rótulo de cor vermelha e corresponde a um produto no qual se encontram substâncias ou compostos químicos considerados “extremamente tóxicos” para o ser humano. A classe toxicológica II é representada por um rótulo de cor amarela e indica que o produto é considerado “altamente tóxico” para o ser humano. A classe toxicológica III é caracterizada pela cor azul e representa um produto considerado “medianamente tóxico” para o ser humano. Finalmente a classe IV

é representada por um rótulo de cor verde e corresponde a um produto “pouco tóxico” para o Homem (Figura 1) <sup>9</sup>.



**Figura 1.** Classificação toxicológica dos pesticidas (Adaptado) <sup>9</sup>.

Recentemente tem havido um esforço em minimizar a utilização de pesticidas com utilização de novos meios de luta (culturais, biológicos, genéticos e biotecnológicos) para controlar as pragas, doenças e infestantes. Contudo, o uso de pesticidas continua a ser o meio de controlo mais comum <sup>10</sup>.

Estudos realizados no conjunto de 21 países da Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Económico (OCDE), entre 1990-2006, revelaram que apenas 8 países (38%) apresentaram um aumento do consumo dos pesticidas dentro dos quais se destaca Portugal com o maior aumento de consumo de pesticidas (103%). Esta posição ímpar de Portugal ocorreu também, entre 1990-92 e 2000-2002, no conjunto de 27 países da OCDE. O aumento do consumo de pesticidas em Portugal atingiu os 100% <sup>11</sup>.

Atendendo à sua larga utilização, não será de estranhar a presença de resíduos de pesticidas na cadeia alimentar. Segundo alguns autores, a percepção de risco, pelos consumidores, quanto ao perigo da presença de pesticidas nos alimentos é superior ao que verdadeiramente existe. Dados relativos a avaliação de resíduos de pesticidas em frutos, vegetais e cereais obtidos nos países da União Europeia, referentes a 2003, mostram que, das 47460 amostras analisadas, 58,3% não apresentavam resíduos, 36,6% apresentavam teores de resíduos inferiores aos Limites Máximos de Resíduos (LMR) estipulados e apenas 5,1% apresentavam teores de resíduos superiores aos LMR <sup>10</sup>. Os LMRs representam a máxima concentração de um resíduo de pesticidas (expresso em

mg/kg) legalmente permitida nos produtos alimentares e para alimentação animal. Estes são baseados em dados obtidos através de boas práticas agrícolas. Os alimentos que obedecem aos respectivos LMRs são toxicologicamente aceitáveis. Quando os LMRs são excedidos é realizada uma comparação da exposição com a dose diária aceitável (ADI) e/ou a dose aguda de referência (ARfD/DAR) de forma a conhecer se existem ou não possíveis danos crónicos ou agudos para a saúde <sup>12</sup>.

As diferenças existentes nos limites máximos legalmente estabelecidos devem-se ao facto das práticas agrícolas diferirem de país para país. Contudo, a maioria dos países mundiais segue os padrões internacionais da Comissão do *Codex Alimentarius* ou simplesmente designado como Codex da FAO/OMS. Os teores máximos de resíduo do Codex são análogos aos LMR (designados por níveis de tolerância) estabelecidos nos Estados Unidos da América pela *Environmental Protection Agency* (EPA). As diferenças que se observam entre eles são devidas essencialmente ao uso de um grupo de dados diferentes e/ou de métodos diferentes para o controlo das produções <sup>13</sup>. Em Portugal, os LMR existentes são estabelecidos por lei e publicados em Diário da República com base na legislação da UE <sup>10</sup>.

É de salientar ainda a existência de valores de resíduos de pesticidas especiais no que diz respeito aos alimentos infantis. Pois, alguns dos resíduos máximos permitidos na legislação poderão não ser os mais convenientes para utilizar em produtos infantis industrializados, uma vez que, as crianças são mais susceptíveis a efeitos tóxicos. Enquanto que pequenas quantidades de pesticidas não apresentam qualquer efeito nocivo nos adultos, nas crianças podem provocar intoxicação devido ao seu baixo peso corporal <sup>14</sup>.

Actualmente o LMR serve para regular o comércio internacional e, assim, minimizar a utilização errónea de pesticidas em culturas e produtos agrícolas. O agricultor não terá problemas nas exportações se cumprir escrupulosamente as instruções contidas nos rótulos dos pesticidas, uma vez que são indicadas claramente as doses, as concentrações, o número de aplicações e o intervalo de segurança do produto que garantem aqueles valores <sup>10</sup>.

A utilização negligente de pesticidas faz com que muitos destes sejam encontrados no ambiente, levando a alterações no ecossistema, acumulação em organismos não alvo e na água e provocando graves problemas para o Homem <sup>15,16</sup>. Por natureza, os pesticidas são compostos tóxicos. A avaliação do risco que estes constituem é determinada para diferentes espécies (roedores e não roedores), através da

exposição a diferentes vias (oral, cutânea, inalação), durante diferentes períodos de exposição (24 h -exposição aguda; 1 a 3 meses - exposição sub-aguda/sub-crónica; 2 anos - exposição crónica) e em vários níveis de dose (dose sem efeito observado (NOAEL), dose intermédia, dose com efeito adverso observado e dose máxima tolerada) <sup>10,17</sup>.

O resultado deste conjunto de estudos, principalmente o valor obtido para a dose sem efeito adverso observável (NOAEL) permite estabelecer dois parâmetros essenciais para a avaliação do risco: o limite máximo admissível de ingestão diária (ADI) para o consumidor e o nível máximo aceitável para o operador (AOEL) <sup>10</sup>. É de salientar que o valor de NOAEL, é posteriormente extrapolado para o Homem através do uso de factores de segurança, cujo objectivo é permitir que as incertezas no conhecimento a respeito do composto tóxico obtidas em testes de laboratório, não afectem o estabelecimento de doses seguras para a maior parte da população humana, tendo em atenção também a sua heterogeneidade, controlando assim os efeitos nocivos para os seres humanos <sup>18</sup>.

### **1.1.3 Efeito dos pesticidas na saúde humana**

A presença de pesticidas e outros resíduos de poluentes orgânicos nos alimentos continua a constituir um risco para a saúde, tornando-se uma das principais preocupações públicas. Os resíduos de pesticidas tendem a depositar-se na casca dos frutos passando, posteriormente, para a polpa e para o sumo <sup>19</sup>. Devido à sua alta resistência bioacumulam-se na cadeia alimentar, actuando sobre sistemas biológicos vitais como se verifica a nível do sistema nervoso, da inibição da acetilcolinesterase ou da respiração e na inibição do transporte de electrões nas mitocôndrias, tornando-se potencialmente tóxicos para os seres humanos <sup>19,10</sup>.

Embora não existam estatísticas rigorosas sobre a dimensão das intoxicações causadas por pesticidas, existem algumas informações relativas à toxicidade aguda proveniente de acidentes durante a formulação, transporte, armazenamento, preparação para aplicação e uso de pesticidas e ainda, relativas à toxicidade crónica decorrente de resíduos de pesticidas presentes nos produtos agrícolas alimentares e na água <sup>10</sup>.

Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS) o valor total anual é de 500 000 intoxicações, em 1975, e de três milhões em 1990, sendo neste caso de 220 000 o

número de mortes e admitindo-se a existência de muitos outros casos <sup>10</sup>. A Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Económico (OCDE) também afirma, numa das suas publicações de 1995 a existência de 25 milhões de agricultores e trabalhadores agrícolas de países em desenvolvimento, afectados anualmente, por intoxicações com pesticidas <sup>20</sup>. Outra estimativa realizada pela OMS sobre a intoxicação aguda por pesticidas verificou a existência de cerca de 3 milhões de casos anuais. Destes, 1 milhão resultam de exposição não intencional e são principalmente trabalhadores das explorações agrícolas e habitantes destas zonas. Os restantes 2 milhões resultam da contaminação indirecta, através da ingestão de água e alimentos contaminados <sup>21</sup>. Portanto é fundamental que os agricultores e técnicos tenham à sua disposição toda a informação e conhecimentos adequados e actualizados acerca dos pesticidas, bem como um rigoroso conhecimento da classe toxicológica dos mesmos de forma a minimizarem estes valores <sup>22</sup>.

Em Portugal, o número de mortes provocadas por intoxicações com pesticidas é considerável. As intoxicações provocadas por estes agentes tóxicos resultam da sua má utilização, da exposição accidental aos mesmos, e também da sua ingestão. Estudos realizados, entre 2000 e 2003 enfatizam o aumento de casos de intoxicações, particularmente relevante para os compostos organofosforados e herbicidas <sup>23</sup>.

Todos os valores referentes a intoxicações referidos anteriormente devem-se fundamentalmente ao modo de acção das diferentes classes de pesticidas.

Os organoclorados (OCPs) são compostos lipofílicos que se acumulam nos tecidos gordos dos seres vivos e passam através da cadeia alimentar <sup>24,25</sup>. O seu modo de actuação baseia-se na destruição do balanço entre os iões sódio e potássio nos neurónios, alterando a normal transmissão dos impulsos nervosos. Aparentemente, sob a sua acção os neurónios emitem impulsos espontaneamente, provocando a torção dos músculos, convulsões e eventualmente a morte <sup>25</sup>. Além disso provocam falhas ao nível do sistema reprodutor já que estes compostos se ligam aos receptores de estrogénio <sup>24, 25</sup>. Estes produtos químicos são de elevado risco principalmente para as crianças, uma vez que a actividade enzimática e os sistemas metabólicos não estão completamente activos. Relativamente à exposição a OCPs no início da gravidez, estudos revelam que pode ser um factor de risco culminando em malformações aquando do nascimento <sup>24</sup>.

Os organofosforados são uma das classes de pesticidas mais utilizada nas culturas agrícolas. Estudos realizados nos últimos anos têm provado que estes pesticidas podem ser mutagénicos, cancerígenos, citotóxicos, genotóxicos, teratogénicos e

imunotóxicos. Alguns pesticidas pertencentes a este grupo são também conhecidos por interferirem no sistema reprodutor, principalmente o masculino. De uma forma geral os organofosforados e os carbamatos actuam essencialmente no sistema nervoso, inibindo as enzimas colinesterases que estão envolvidas, de certa forma, no mecanismo de transmissão de impulsos nervosos. Portanto, uma vez presentes no organismo inibem o normal funcionamento do sistema nervoso, provocando paralisia e mesmo a morte <sup>26,27</sup>. Contudo os organofosforados actuam no sistema de enzimas intervenientes na degradação do neurotransmissor acetilcolina, designadas colinesterases. A acetilcolina é um transmissor de impulsos nervosos, sendo necessária em determinadas doses para a transmissão sináptica. Caso as acetilcolinesterases, as enzimas responsáveis pela sua hidrólise, sejam de algum modo bloqueadas, haverá uma acumulação de acetilcolina nas juntas nervosas, provocando interferência na coordenação da resposta muscular de órgãos vitais, podendo entre outros sintomas provocar a morte. Os carbamatos embora tenham uma forma de actuação semelhante aos organofosforados têm a vantagem de serem degradados mais rapidamente diminuindo assim a sua toxicidade para os seres humanos <sup>25</sup>.

É ainda de salientar o efeito dos pesticidas nas crianças uma vez que estas estão constantemente expostas a baixos níveis de pesticidas nos seus alimentos e no meio ambiente. Embora existam poucos estudos a longo prazo sobre estas exposições foram identificadas associações entre a exposição a pesticidas e o aparecimento de cancro na infância. O risco mais elevado de cancro dos rins foi associado ao contacto com os pais que estiveram expostos aos pesticidas aquando dos trabalhos agrícolas. Outros estudos demonstraram a associação entre o cancro cerebral e tumores hematológicos. Algumas crianças apresentam ainda maior risco de desenvolver leucemia aguda, se expostas durante a vida fetal ou infância precoce, a insecticidas e herbicidas utilizados nos jardins e árvores de fruto <sup>28</sup>.

#### **1.1.4 Legislação referente aos pesticidas**

Nos últimos anos tem havido uma preocupação crescente em relação à presença de resíduos de pesticidas nos alimentos devido aos seus possíveis efeitos adversos à saúde dos seres humanos <sup>29</sup>. Por isso, para proteger a saúde dos consumidores existe na

União Europeia (UE) uma série de actos na legislação que regulam a presença de resíduos de pesticidas nos alimentos <sup>15</sup>.

A legislação referente aos pesticidas colocados no mercado encontra-se descrita na Directiva 91/414/CEE, transposta pelo Decreto de Lei 98/94. Tem como objectivo assegurar a harmonização da homologação dos pesticidas utilizados na agricultura, regulamentar a reavaliação dos pesticidas existentes, e a autorização de novos pesticidas de modo a reduzir os riscos destes na UE <sup>22</sup>. A Directiva 91/414/CEE contribuiu muito, nos últimos 20 anos, na União Europeia, para o melhor conhecimento das características toxicológicas e ecotoxicológicas dos pesticidas agrícolas e para a retirada do mercado de pesticidas mais perigosos, com salutar influência na defesa da saúde humana e animal e do ambiente. Contudo, apesar de todos os esforços para a resolução desta problemática, a ausência de informação relativa à classificação toxicológica e às frases de risco e de segurança, ainda é bastante frequente <sup>30</sup>.

Em Portugal, a legislação relativa à alimentação especial mais relevante é descrita através de vários Decretos-Lei. O Decreto-Lei nº 220/99 de 16 de Junho, alterado pelos Decretos-Lei 286/2000 e 138/2004, que institui um regime jurídico aplicável às fórmulas para lactentes e às fórmulas de transição destinadas a lactentes saudáveis. O Decreto-Lei nº 226/99 de 22 de Junho, que estabelece o regime jurídico aplicável aos géneros alimentícios destinados a uma alimentação especial. O Decreto-Lei nº 227/99 de 22 de Junho, alterado pelos Decretos-Lei nº 285/2000 e nº 212/2000, que regulam o regime jurídico aplicável aos géneros alimentícios destinados a uma alimentação especial. O Decreto-Lei nº 233/99 de 24 de Junho, alterado pelos Decretos-Lei nº 284/2000 e nº 137/2004, que estabelece o regime jurídico aplicável aos géneros alimentícios para utilização nutricional especial, que satisfaçam os requisitos específicos relativos aos lactentes e a crianças jovens em suplemento das suas dietas e/ou adaptação progressiva à alimentação normal. E finalmente, o Decreto-Lei nº 137/2005, de 17 de Agosto, que altera Decreto-Lei nº 241/2002, de 5 de Novembro, transpondo para a ordem jurídica interna as Directivas nº 2004/5/CE e 2004/6/CE (substâncias que podem ser adicionadas, para fins nutricionais específicos, aos géneros alimentícios destinados a uma alimentação especial) <sup>14</sup>.

Em conformidade com o trabalho desenvolvido pelo Comité, a Directiva 99/50/CE estabelece que as fórmulas destinadas a lactentes e de transição não devem conter resíduos de pesticidas acima de 0,01 miligrama de resíduo de pesticida por quilograma de alimento <sup>14</sup>.

Adicionalmente, a Directiva 2003/14/CE, que altera a Directiva 91/321/CEE relativa às fórmulas para lactantes e de transição, proíbe a utilização de alguns pesticidas na produção dos produtos agrícolas destinados a fórmulas para alimentação de bebés, estabelecendo níveis ainda mais baixos no que respeita à presença de pesticidas ou dos seus metabolitos que sejam altamente tóxicos. Assim, o nível máximo de resíduo passa de  $0,01 \text{ mg/kg}^{-1}$ , para uma dose diária admissível inferior a  $0,0005 \text{ mg/kg}$  de peso corporal <sup>31</sup>.

## 1.2. Determinação de resíduos de pesticidas

A determinação de resíduos de pesticidas é realizada, geralmente, por análise cromatográfica, recorrendo-se tanto a métodos de cromatografia gasosa como de cromatografia líquida. A escolha dos detectores a usar, depende entre outros factores, das características estruturais dos pesticidas em questão e da sensibilidade e linearidade requeridas <sup>10</sup>.

Os pesticidas analisados no presente trabalho estão apresentados na Tabela I, indicando-se o grupo químico a que pertencem.

**Tabela I.** Pesticidas estudados, bem como os grupos químicos e a respectiva classe a que pertencem <sup>32, 33, 34, 35</sup> (Adaptado).

<i>Analito</i>	<i>Grupo Químico</i>	<i>Classe</i>
<i>α-BHC</i>	Organoclorado	Insecticida
Aldrina	Organoclorado	Insecticida
<i>β-BHC</i>	Organoclorado	Insecticida
<i>Dasanit</i>	Organofosforado	Insecticida e nematicida
<i>δ-BHC</i>	Organoclorado	Insecticida
Dieldrina	Organoclorado	Insecticida
<i>Disulfoton</i>	Organofosforado	Insecticida
Heptacloro	Organoclorado	Insecticida
Heptacloro (isómero A)	Organoclorado	Insecticida
Heptacloro (isómero B)	Organoclorado	Insecticida
Lindano	Organoclorado	Insecticida
Nitrofenol	Organoclorado	Herbicida
<i>Terbufos</i>	Organofosforado	Insecticida



### 1.2.1 Métodos cromatográficos – Princípios teóricos

A cromatografia é uma técnica analítica utilizada na separação, identificação e quantificação de componentes químicos presentes em misturas complexas <sup>36</sup>. Foi descoberta no início do século XX por *Michail Tswett*, e tem como base a diferença existente entre as velocidades de movimentação dos diferentes solutos, através de uma fase estacionária <sup>37</sup>. A classificação dos métodos cromatográficos varia consoante a natureza da fase móvel e da fase estacionária <sup>36,37</sup>. Assim sendo, a cromatografia pode ser classificada em cromatografia gasosa (GC) quando a fase móvel é um gás e a fase estacionária pode ser líquida (GLC) ou sólida (GSC); em cromatografia líquida (LC) quando a fase móvel é um líquido e a fase estacionária sólida; em cromatografia supercrítica (SFC) quando a fase móvel é um fluido, e, em cromatografia de camada fina (TLC) quando a fase móvel é um líquido de baixa viscosidade e a fase estacionária sólida. A cromatografia líquida pode ser dividida em cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), de permuta iónica (IEC), de permeação de gel (GPC) e exclusão molecular (SEC) dependendo do tipo de sólido que constitui a fase estacionária <sup>37</sup>.

Para a determinação de resíduos de pesticidas em alimentos e outros produtos agrícolas, são utilizados vários métodos cromatográficos, entre os quais a cromatografia gasosa combinada com uma série de detectores sensíveis como, o de captura de electrões (ECD ou  $\mu$ ECD), de fósforo-azoto (NPD) e o de ionização por chama (FID) <sup>38</sup>. A espectrometria de massa (MS-MS) também é utilizada com frequência, pois proporciona, para além da quantificação, uma maior e precisa identificação estrutural das substâncias. E ainda, o espectrómetro de massa acoplado ao cromatógrafo gasoso (GC/MS), a cromatografia líquida com espectrometria de absorção ultravioleta (LC/UV), a LC/MS e a LC/MS-MS que são trivialmente utilizados na determinação e quantificação de pesticidas muito polares e com altos pontos de ebulição <sup>19,39</sup>.

No presente trabalho vai recorrer-se ao método de GC-ECD para a determinação dos multi-resíduos de pesticidas supra citados, presentes em produtos de origem vegetal.

Este método é normalmente aplicado na análise de resíduos de pesticidas porque consiste numa poderosa ferramenta analítica cuja principal finalidade é a separação de compostos de misturas complexas, permitindo a identificação e quantificação de compostos puros e desconhecidos <sup>40</sup>. A sua resolução é excelente, permitindo assim a análise de diversas substâncias na mesma amostra. A sensibilidade da cromatografia é bastante elevada. Dependendo do tipo de substância analisada e do detector utilizado

pode-se obter resultados quantitativos em concentrações que podem variar de picogramas a miligramas <sup>41</sup>. Um dos detectores habitualmente utilizado para a pesquisa de pesticidas é o detector ECD. A sua elevada sensibilidade e selectividade para moléculas contendo grupos funcionais electronegativos, levou a que fosse adoptado para a análise de pesticidas clorados em vários métodos pela *Environmental Protection Agency*, por normas europeias e em metodologias descritas nas farmacopeias <sup>42</sup>.

### ***1.2.1.1 Cromatografia Gasosa com Detector de Captura de Electrões (GC-ECD)***

A cromatografia gasosa (GC) e a técnica de eleição para a determinação de resíduos de pesticidas. Esta técnica, ao permitir acoplar diferentes detectores, possibilita a análise de misturas complexas, com rapidez, elevada resolução e sensibilidade. Além disso, as colunas usadas em GC têm um elevado número de pratos teóricos o que permite uma elevada eficiência e selectividade <sup>10</sup>.

Na cromatografia gasosa as substâncias voláteis são transportadas por um gás na coluna, interagindo com a fase estacionária (sólida ou líquida) que está ligada a um material sólido <sup>43</sup>.

Ao injectar uma mistura de substâncias no cromatógrafo gasoso, cada substância pertencente à mistura, pode interagir e distribuir-se entre o gás transportador e o absorvente, de forma diferente e específica. Esta interacção, caso exista, permite que cada substância seja retida na coluna em diferentes tempos, possibilitando a separação e a distinção de cada substância na mistura <sup>43</sup>.

O detector ECD presente no GC-ECD é utilizado na detecção de componentes altamente electronegativos, sendo selectivo para grupos halogenados <sup>44</sup>. Possui um emissor, que emite um electrão causando a ionização do gás transportador e consequentemente, um aumento súbito de electrões. Estes electrões provocam uma corrente eléctrica constante entre os dois eléctrodos que constituem o detector, na ausência de substâncias ou espécies que possam capturá-los. Na presença de compostos com grupos funcionais electronegativos que capturam os electrões, como os pesticidas, a intensidade da corrente eléctrica diminui bruscamente, permitindo assim a identificação de tais substâncias <sup>43</sup>.

A resposta do detector surge num cromatograma em forma de picos ou bandas cujas intensidades dependem da concentração da substância e da sensibilidade do

detector. A junção desses detectores com a cromatografia gasosa confere ao sistema uma elevada sensibilidade e precisão na análise de substâncias voláteis com concentrações vestigiais<sup>43</sup>.

### 1.3 Validação de Metodologias Analíticas

A obtenção de resultados analíticos fiáveis é um aspecto fundamental para a validação de qualquer metodologia. Resultados não fiáveis podem colocar em causa a metodologia e conseqüentemente, neste caso em particular, a saúde do consumidor. Por esta razão, a importância da validação dificilmente poderá ser sobrestimada, facto ainda mais relevante se o laboratório estiver envolvido num contexto de gestão da qualidade e acreditação, aspectos que assumiram grande relevância nos últimos anos<sup>45</sup>.

A validação de um método analítico é um aspecto crucial para garantir a qualidade analítica desse método e implementar um sistema de controlo de qualidade em qualquer laboratório analítico<sup>45,46</sup>. Este conceito define-se como um processo segundo o qual se estabelece, através de ensaios laboratoriais, que o desempenho do método obedece aos requisitos da aplicação analítica. O principal objectivo do método de validação é demonstrar que a metodologia analítica satisfaz os critérios de aceitação por entidades reguladoras, permitindo assim uma correcta interpretação dos resultados analíticos, uma vez que conduz à identificação e quantificação de erros e incertezas inerentes ao procedimento analítico que não podem ser eliminados. Para que o trabalho laboratorial seja rigoroso tem de se obedecer a limites de controlo, limites esses que são estabelecidos no processo de validação<sup>45</sup>.

Nos últimos anos, tem sido objecto de discussão internacional a existência de um consenso acerca de quais os parâmetros de validação dos métodos analíticos a serem validados e com que profundidade, assim como quais os critérios de aceitação destes parâmetros<sup>45,47</sup>. Por outro lado, o processo de validação de um método não pode ser separado do seu desenvolvimento. O investigador não saberá se as condições analíticas são aceitáveis até que o estudo da validação esteja completo<sup>45</sup>.

Os requisitos mínimos para a validação de um método analítico incluem os seguintes parâmetros: selectividade, linearidade, precisão, exactidão e limiares analíticos dos quais fazem parte, o limite de quantificação (LQ) e o limite de detecção (LD)<sup>47</sup>. Todos estes critérios estão de acordo com a Norma NP/EN/ISO 17025<sup>46</sup>.

Os parâmetros supra citados são considerados os mais significativos para a realização da presente tese e serão descritos na secção seguinte.

### **1.3.1 Definição dos parâmetros de validação**

#### ***1.3.1.1 Selectividade/Especificidade***

A selectividade e/ou especificidade é um parâmetro de validação indirecta de um método e pode ser definido como a capacidade de um método analítico para determinar e discriminar inequivocamente o analito em estudo de outros compostos que possam estar presentes na amostra, como impurezas, produtos de degradação, excipientes, metabolitos, ou outros componentes da amostra (matriz) <sup>45,46,48</sup>. Para o desenvolvimento e validação de um método é fundamental a verificação da existência de compostos interferentes que possam comprometer a capacidade do método em identificar os analitos de interesse <sup>48</sup>.

A resposta que um determinado método analítico apresenta para as diversas substâncias presentes numa amostra é definida como selectividade enquanto, a especificidade baseia-se essencialmente, na habilidade que esse método apresenta para responder a uma única substância de interesse presente numa amostra heterogénea portanto, a selectividade é o termo que mais se adequa à validação de métodos cromatográficos <sup>48</sup>. A avaliação da selectividade é determinada pela aplicação de um método mas também, da técnica instrumental a ser utilizada. Nos métodos cromatográficos em particular, este parâmetro pode ser avaliado através da identificação dos compostos, pois tendo em conta os tempos de retenção ( $t_r$ ), é possível avaliar a resolução de dois picos cromatográficos com tempos de retenção muito próximos <sup>49</sup>.

Este é um dos primeiros passos no desenvolvimento e validação de um método, uma vez que se a especificidade/selectividade não for assegurada, a linearidade, a exactidão e a precisão poderão estar seriamente comprometidas <sup>48</sup>.

### 1.3.1.2 Linearidade

Este parâmetro define-se como o intervalo de concentrações onde os resultados do ensaio são directamente ou através de uma expressão matemática bem definida proporcionais à concentração do analito na amostra. Essa expressão matemática é expressa pela seguinte equação da recta <sup>50</sup>:

$$y = a x + b$$

Onde,

$y$  - é a resposta medida (altura ou área do pico), variável dependente;

$x$  - concentração do analito, variável independente;

$a$  - inclinação da curva de calibração (coeficiente angular);

$b$  - intersecção com o eixo  $y$  (coeficiente linear).

A linearidade estima-se avaliando a razão das áreas dos picos dos padrões e as concentrações dos padrões de calibração e é estabelecida em função da recta de calibração, a qual consiste numa representação gráfica de um determinado coeficiente de correlação ( $r$ ) que permite uma estimativa da qualidade da curva. A partir deste coeficiente, obtêm-se os desvios de cada ponto à recta traçada, e quanto mais próximo este valor estiver da unidade, menor é a dispersão do conjunto de pontos experimentais e menor a incerteza dos coeficientes de regressão estimados <sup>45</sup>. Para além dos coeficientes de correlação existem outros parâmetros para a avaliação da linearidade, nomeadamente o coeficiente de determinação, os quais não devem ser utilizados isoladamente pois, são bons indicadores de correlação, mas não necessariamente de linearidade. Portanto, para a obtenção de uma avaliação mais fiável podem ser utilizados o teste das áreas normalizadas, o teste de análise de resíduos e o teste de RIKILT. Esta avaliação deve ser realizada de acordo com o modelo estatístico definido na norma ISSO 8466-1 <sup>51</sup>.

Para que a linearidade seja considerada válida, o coeficiente de correlação terá de ser igual ou superior a 95% <sup>52</sup>. Por isso, se para uma determinada gama de concentrações a curva de calibração apresentar um coeficiente de correlação superior a 0,95 a linearidade está dentro dos parâmetros de acreditação.

### 1.3.1.3 Precisão

O parâmetro que é a medida dos erros aleatórios e avalia a proximidade dos erros obtidos a partir de medidas independentes de amostragens múltiplas de uma amostra homogénea é a precisão do processo analítico<sup>47,48</sup>. Este parâmetro reflecte a variação dos resultados quando as análises repetidas são feitas na mesma amostra, indicando a dispersão dos resultados obtidos em torno do valor real, numa série de medições<sup>45</sup>.

A precisão pode ser avaliada de duas formas: através da repetibilidade e da reprodutibilidade. Assim sendo, a repetibilidade expressa a precisão durante o processamento de uma sequência analítica num curto período de tempo, no mesmo laboratório, com a mesma instrumentação e condições de operação, e pelo mesmo analista. Por outro lado, a reprodutibilidade reflecte a precisão em dias diferentes, podendo implicar diferentes analistas, equipamentos e reagentes<sup>45</sup>.

Este parâmetro pode ser expresso como uma estimativa do desvio-padrão mas também, como variância ou coeficiente de variação (CV em %) de diversas medidas. Assim, a precisão de um procedimento analítico é habitualmente expressa através seguinte equação:

$$CV\% = \frac{s}{M} \times 100$$

Em que,  $s$  é o desvio-padrão das recuperações e  $M$  é a média das recuperações<sup>47</sup>.

Este é um importante parâmetro porque possibilita decidir se o método analítico é confiável ou não para o objectivo da análise<sup>48</sup>.

### 1.3.1.4 Exactidão

A exactidão é definida como a concordância entre o valor real do analito na amostra e o estimado pelo processo analítico<sup>46</sup>. Os processos normalmente utilizados na avaliação da exactidão de um método são, entre outros, a participação em ensaios interlaboratoriais e ensaios fortificados, o estudo de materiais de referência certificados e na comparação com métodos de referência<sup>46,48</sup>. Na análise de compostos orgânicos, a exactidão é estudada através de ensaios de recuperação, uma vez que, normalmente, não existem materiais de referência certificados.

A recuperação mede o rendimento da extracção, ou seja, a fracção de massa do analito contido na amostra que se encontra presente no extracto final. Reflecte ainda, a quantidade de determinado analito recuperado no processo de extracção, em relação à quantidade presente na amostra <sup>45</sup>. A recuperação dos analitos pode ser determinada pela análise de amostras fortificadas com quantidades conhecidas, contudo é um parâmetro geralmente dependente da concentração, por isso deve ser avaliado dentro da gama de concentrações esperadas para a amostra <sup>53</sup>.

Fontes internacionais que investigam resíduos de pesticidas em alimentos como é o caso do *United States Department of Agriculture* (USDA) e da *European Union* (EU) sugerem que a performance analítica só deve ser aceitável quando compreendida entre 50% a 150% e 40% a 160%, respectivamente <sup>50</sup>.

Tal como a precisão, a exactidão também é um parâmetro que permite julgar a fiabilidade de um método analítico, devendo ser estudado após a determinação da selectividade, linearidade e precisão do método analítico <sup>48</sup>.

### ***1.3.1.5 Limiares Analíticos***

Os limiares analíticos do método são constituídos pelo limite de detecção (LD) e pelo limite de quantificação (LQ) <sup>51</sup>. Estes são utilizados na análise de resíduos de pesticidas numa determinada matriz e, são essenciais para estabelecer a capacidade analítica na determinação qualitativa e quantitativa de substâncias químicas presentes na mesma <sup>54</sup>.

O Limite de Detecção é definido como o teor mínimo medido, a partir do qual é possível detectar a presença do analito com uma certeza estatística razoável. Este limiar analítico corresponde à mais pequena quantidade de substância a analisar que pode ser detectada numa amostra, mas não necessariamente quantificada como valor exacto <sup>51</sup>.

O Limite de Detecção pode ser calculado através da recta com ajuste linear, matematicamente definida pela seguinte expressão (Equação 1) ou através da concentração do padrão mais baixo (P1).

$$LD = 3 \times S_{x_0} \qquad \text{Equação 1}$$

Sendo,

$S_{xo}$  o desvio-padrão correspondente a várias leituras do branco (matriz não fortificada) ou da solução com a concentração mais baixa do intervalo de linearidade.

As várias determinações podem ser realizadas em condições de repetibilidade ou de reprodutibilidade. Quando as análises são realizadas ao longo de vários dias de trabalho, elas são mais representativas das situações de rotina <sup>51</sup>.

O Limite de Quantificação é definido como a menor concentração do analito que pode ser quantificada na amostra, com exactidão e precisão aceitáveis <sup>48</sup>. Podendo ser calculado, tal como o LD através da recta com ajuste linear, expressa pela seguinte equação (Equação 2) ou através da concentração do padrão mais baixo (P1).

$$LQ = 10 \times S_{xo} \quad \text{Equação 2}$$

Sendo,

$S_{xo}$  o desvio-padrão correspondente a várias leituras (geralmente entre 10 e 20) do branco ou da solução com a concentração mais baixa do intervalo de linearidade <sup>51</sup>.

O LQ é expresso como uma concentração, por isso é fundamental que a precisão e a exactidão das determinações sejam registadas. Esse critério é uma boa regra a seguir, todavia, a determinação do LQ representa um compromisso entre a concentração, a precisão e a exactidão exigidas, o que significa que quando o nível de concentração do LQ decresce, a medição torna-se menos precisa. Caso seja necessária uma maior precisão, deve ser adoptada uma concentração mais elevada para o LQ <sup>55</sup>.

De acordo com o procedimento estatístico utilizado para análise de resíduos de pesticidas, o LQ corresponde ao menor nível de concentração estudado <sup>47</sup>.

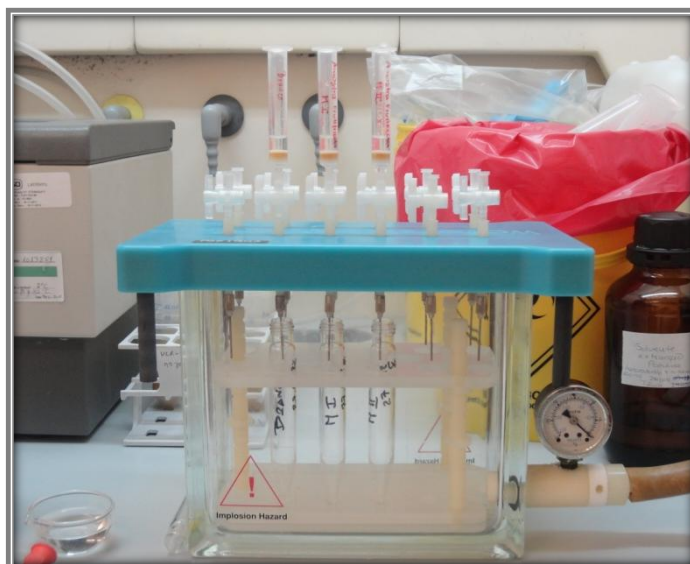
## 1.4 Método de Extração em Fase Sólida (SPE)

A extração é um processo determinante na análise de qualquer substância, nomeadamente pesticidas, em estudos toxicológicos. É, por norma, um processo complexo que requer técnicas analíticas de extração específicas para a remoção das substâncias.



A extracção em fase sólida (SPE – *Solid Phase Extration*) foi introduzida no início dos anos 70 e passou a ser comercializada em 1978, sob a forma de colunas/cartuchos descartáveis <sup>58</sup>. É um método flexível, rápido e simples que pode ser aplicado a vários procedimentos de extracção e consiste num processo de separação com o propósito de isolar um ou mais analitos presentes numa mistura líquida ou extracto duma mistura sólida, de acordo com as suas propriedades químicas e físicas <sup>45</sup>. Este tipo de metodologia é ainda, muito utilizada na purificação e pré-concentração de resíduos de pesticidas, sendo aplicada numa grande variedade de matrizes, incluindo tecidos animais e vegetais, urina, sangue, água, etc <sup>45</sup>.

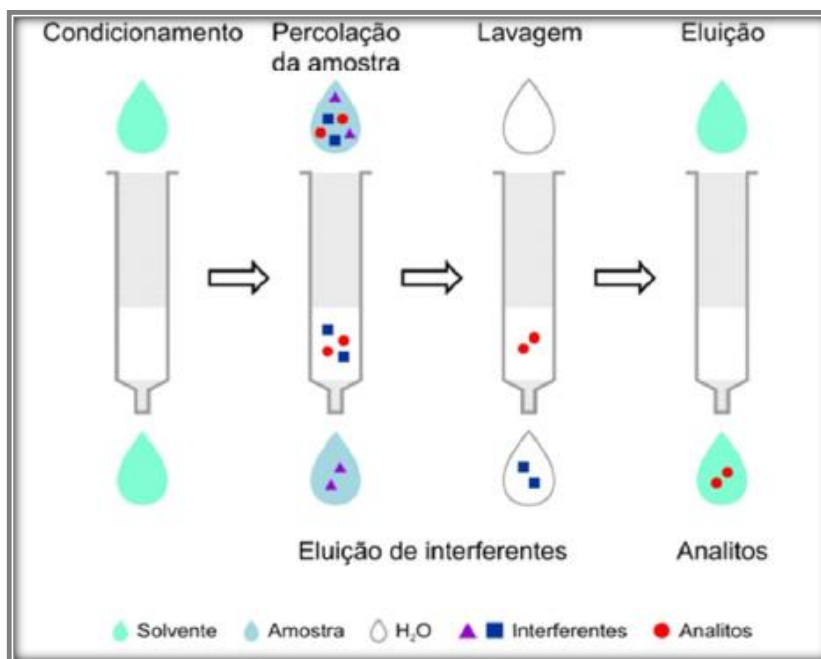
O fundamento deste método consiste na eluição de uma solução de amostra, com o auxílio de vácuo ou pressão, através de uma coluna/cartucho com um suporte sólido, constituído por estruturas de sílica ou por polímeros com diferentes grupos funcionais ou polaridades. Os analitos de interesse e os interferentes ficam retidos na superfície do suporte sólido, contudo os interferentes são removidos por lavagens selectivas, enquanto os analitos de interesse são posteriormente recuperados, por eluição num determinado volume de solvente para análise <sup>45,10</sup>. O sistema de extracção é composto pelas colunas que estão associadas a um recipiente de recolha designado *manifold* (Figura 2).



**Figura 2.** Processo Extracção em Fase Sólida constituído pelo sistema *manifold* <sup>57</sup>.

A SPE é um processo que se baseia fundamentalmente em quatro passos: o acondicionamento da coluna, a retenção do analito, a lavagem da coluna e a eluição (Figura 3) <sup>58</sup>.

O acondicionamento da coluna é o primeiro passo do método de extracção em fase sólida e consiste no acondicionamento do suporte sólido com solvente orgânico para solvatar os grupos funcionais. Os solventes utilizados dependem do tipo de procedimento de extracção realizado. Após a activação da coluna ocorre a fase de retenção do analito. Esta consiste na adição da amostra à coluna, de forma a reter os compostos de interesse, concentrando-os no suporte sólido. Existem diversos mecanismos de retenção, como é o caso das interacções de *Van Der Waals* (ligações hidrofóbicas, apolares, de partição ou de fase reversa), ligações por pontes de Hidrogénio, forças dipolo-dipolo e troca iónica, que dependem do tipo de coluna utilizada. A lavagem da coluna é a etapa seguinte e tem como objectivo a remoção selectiva dos interferentes da matriz que ficaram retidos no adsorvente no passo anterior sem que haja a remoção dos compostos de interesse. Para tal, faz-se passar um solvente adequado para as amostras analisadas, através dos espaços intersticiais do suporte sólido. Para finalizar o processo SPE, realiza-se um passo de eluição com um determinado volume de solvente, seleccionado especificamente para romper a interacção analito/adsorvente, de modo a recuperar os compostos de interesse. O eluente deverá ser capaz de remover a máxima quantidade possível de analito e simultaneamente, eluir o mínimo de interferentes que eventualmente poderão estar ainda, adsorvidas na fase sólida <sup>45</sup>.



**Figura 3.** Etapas do procedimento de SPE: acondicionamento da coluna, retenção do analito, lavagem da coluna e eluição (Adaptado)<sup>58</sup>.

Assim o método de SPE baseia-se na utilização de pequenas colunas de extração, descartáveis, preenchidas com uma variedade de enchimentos (adsorventes), permitindo uma separação eficaz dos componentes da matriz<sup>45</sup>.

Existem inúmeros tipos de colunas, especialmente concebidas para a SPE, facultando rapidez, economia, eficiência na preparação das amostras, podendo, deste modo, ser usadas em diferentes sistemas analíticos. Para além do tipo de coluna, o volume da amostra e de solvente para o acondicionamento da coluna e para a eluição dos analitos são alguns dos parâmetros que também devem ser ponderados<sup>58</sup>. Outro factor a ter em consideração consiste nas características de cada composto em estudo, pois quando conhecidas, permitem a determinação do tipo de coluna mais adequado à extração.

As colunas de sílica gel são muito utilizadas na purificação de extractos que contêm pesticidas organoclorados. Possuem características polares e uma superfície ligeiramente ácida, que permite a retenção de compostos básicos e a extração de compostos polares que possuem estruturas similares<sup>45, 10, 42</sup>.

Por outro lado, as colunas C<sub>18</sub> são extremamente utilizadas na extração de herbicidas, insecticidas organoclorados e na SPE de analitos com diferentes propriedades físico-químicas. Possuem características hidrofóbicas, não selectivas e

apolares que permitem a extracção em fase reversa de analitos hidrofóbicos em matrizes aquosas e biológicas<sup>58, 42</sup>.

As principais vantagens deste processo de extracção incluem tempos de preparação reduzidos, taxas de recuperação elevadas, extractos purificados, possibilidade de automação, compatibilidade com a análise cromatográfica, processamento de várias amostras, adaptável a diferentes volumes de amostra e com consumo reduzido de solventes orgânicos. Além disso, o processo de extracção torna-se específico utilizando esta técnica, uma vez que existem diversos mecanismos de interacção intermolecular possíveis entre as moléculas do analito e os grupos funcionais do adsorvente (interacções polares, hidrofóbicas e iónicas). A selectividade adicional proporcionada por esta técnica leva a uma diminuição da possibilidade de efeitos da matriz biológica, o que permite ao analista atingir menores tempos de corrida na técnica cromatográfica utilizada, além de obter uma elevada reprodutibilidade<sup>45</sup>. Contudo a extracção em fase sólida também apresenta inconvenientes, nomeadamente a possibilidade da existência de partículas sólidas nos extractos, podendo alterar o fluxo das eluições e consequentemente, provocar uma grande variabilidade nos valores de recuperação obtidos<sup>10</sup>.

Com o intuito de superar as debilidades referidas anteriormente foi desenvolvida, em 2003, uma metodologia analítica para a preparação das amostras designada QueChERS (*quick, easy, cheap, effective, rugged e safe*). Este é um método rápido, fácil, económico, eficiente, robusto e seguro que reúne numa só etapa o processo de extracção e purificação da amostra, apresentando vantagens em relação ao método de extracção em fase sólida<sup>58, 59</sup>. Contudo, no presente trabalho não se recorreu a esta metodologia.

## 1.5 Efeito de Matriz na Determinação de Pesticidas com GC-ECD

Um aspecto importante a ter em linha de conta na análise de resíduos de pesticidas em matrizes alimentares consiste no fenómeno designado efeito de matriz. O efeito de matriz é um estudo selectivo que tem como objectivo averiguar a existência de possíveis interferências causadas pelas substâncias que constituem a matriz da amostra, de modo a minimizar a potencial fonte de erros que este pode provocar nos parâmetros

analíticos <sup>60, 61</sup>. Este fenómeno, também conhecido por aumento da resposta cromatográfica induzida pela matriz permite ainda, explicar o número significativo de métodos com valores de recuperação acima de 100% quando usadas curvas de calibração em solvente, e a baixa precisão dos resultados <sup>10, 60</sup>.

O efeito de matriz, além de provocar percentagens de recuperação superiores a 100%, pode causar impacto em todas as etapas da análise cromatográfica e ainda, deteriorar a qualidade dos resultados obtidos devido ao facto de, i) mascarar a presença dos picos dos analitos de interesse, produzindo um resultado falso negativo, ii) errar na identificação do analito, identificando erradamente um interferente como analito de interesse e consequentemente, originando um resultado falso positivo e, iii) aumentar ou diminuir o sinal analítico do detector, o que leva à sobrestimação ou subestimação do resultado <sup>10</sup>.

Embora a influência do efeito da matriz na análise de pesticidas tenha sido estudada desde 1981, foi *Erney* e seus colaboradores que verificaram quais os factores que poderiam influenciar os resultados dos parâmetros analíticos. A partir deste estudo, realizaram-se outras pesquisas com o objectivo de por um lado, determinar quais os factores responsáveis pelo efeito de matriz e por outro, adoptar medidas que permitissem minimizar os problemas provocados por eles <sup>60</sup>.

### **1.5.1 Factores que Influenciam o Efeito de Matriz**

O efeito de matriz é mais acentuado em análises de amostras complexas como frutos, vegetais, mel, sumos, vinhos, azeite, tecidos animais, solos entre outros <sup>10, 60</sup>. Os problemas provocados pelos componentes endógenos da matriz nas respostas do detector não dependem só das características dos compostos, mas também das condições cromatográficas, nomeadamente do injector, da coluna cromatográfica e do detector do cromatógrafo gasoso. Portanto, é fundamental conhecer os componentes do aparelho e o seu funcionamento, de modo a adoptar medidas preventivas ou correctivas na tentativa de obter melhores resultados <sup>60</sup>.

### **1.5.1.1 Injector**

No que diz respeito ao efeito de matriz, a parte mais importante do sistema cromatográfico é provavelmente o injector. Durante a injeção clássica do *splitless* pode ocorrer a degradação e/ou adsorção de certas substâncias. Quando os extractos da amostra são injectados, as substâncias co-extraídas tendem a bloquear os sítios activos (tubos de vidro ou *liner*) do injector, diminuindo o efeito mencionado de degradação e/ou adsorção. Consequentemente, as substâncias são conduzidas em maior número para a coluna cromatográfica, contribuindo para o aumento do sinal analítico obtido na matriz, comparativamente com o sinal obtido por soluções padrão em solvente <sup>10, 60</sup>.

### **1.5.1.2 Coluna Cromatográfica e Detector**

De acordo com este factor, o efeito de matriz é promovido por conexões existentes entre a coluna cromatográfica e o detector.

Segundo alguns autores, o decréscimo da polaridade da coluna cromatográfica provoca a diminuição da temperatura de eluição de substâncias polares, comprovando deste modo o efeito de adsorção dos analitos. Para além disso, o diâmetro interno da coluna também possui influência na magnitude do efeito da matriz analisada pois, normalmente, colunas com um maior diâmetro interno apresentam maior dispersão de resultados do que as colunas com menores diâmetros <sup>60</sup>.

No que diz respeito ao detector, estudos revelaram que o efeito de matriz é mais perceptível em análises efectuadas pelo espectrómetro de massas (MS-MS), do que em análises em que o detector utilizado foi o de ionização por chama (FID). Isto é explicado pelo facto do espectrómetro de massas possuir uma superfície metálica e por não sofrer combustão. Por outro lado, o efeito de matriz associado ao detector fósforo-azoto é mais exacto que o efeito associado ao detector de captura de electrões (ECD), isto acontece devido ao detector NPF utilizar analitos com maiores concentrações, e consequentemente, tornar menos significativa a existência de possíveis interferentes <sup>60</sup>.

### ***1.5.1.3 Propriedades da Matriz***

A intensidade do efeito da matriz para determinado pesticida é influenciada pela natureza da amostra e pelo tipo de substâncias que a constituem, como é o caso do tamanho das moléculas, da polaridade, da estabilidade térmica, da volatilidade entre outros. Um dos grupos de pesticidas em que a influência da natureza da matriz é notória é o dos organofosforados, aquando da análise em modo de injeção sem divisor de fluxos. De uma forma geral, todos os compostos que possuam uma massa molecular elevada têm influência na matriz, pois por permanecerem solubilizados nos extractos após a purificação da amostra, promovem o efeito de matriz nas análises cromatográficas <sup>60</sup>.

### ***1.5.1.4 Propriedades dos Pesticidas***

As propriedades dos pesticidas também podem influenciar o efeito de matriz. Prova disso são os fitofarmacêuticos termicamente estáveis, que por apresentarem um potencial de adsorção do detector limitado em altas temperaturas, não são afectados pelo efeito de matriz. Outros compostos que não apresentam um efeito de matriz muito acentuado são os hidrofóbicos, como é o caso dos pesticidas organoclorados. Estes compostos, de uma forma geral, são menos susceptíveis à adsorção pelos sítios activos do injectador. Excepção disso é o DDT, pois pode ser degradado no injectador pela temperatura, após a acumulação de substâncias provenientes da amostra <sup>60</sup>.

Por outro lado, compostos como os organofosforados, carbamatos, com grupos hidroxilo (-OH) e derivados da uréia (-NH-CO-NH-), sendo mais polares são mais susceptíveis ao efeito de matriz <sup>60</sup>.

### ***1.5.1.5 Concentração dos Pesticidas***

Efectivamente, o efeito de matriz é mais significativo na análise de pesticidas quando estes se encontram em concentrações mais baixas ou então quando a proporção dos componentes da matriz/analito é muito alta <sup>60</sup>.

Quando é injectada, em baixa concentração, uma solução-padrão de pesticida preparada em solvente puro, uma quantidade significativa de analito fica retida na interface do injector, e conseqüentemente a quantidade de analito detectada é muito baixa. Por outro lado, quando se analisam os extractos, apenas uma quantidade ínfima de analito é adsorvido, pois a proporção de componentes da matriz/analito é muito alta e os interferentes são preferencialmente adsorvidos. Tal facto faz com que o efeito de matriz seja mais acentuado nos extractos, uma vez que neles o analito está presente em menores concentrações<sup>60</sup>.

Existem ainda, compostos que não apresentam efeito de matriz em altas concentrações, contudo quando analisados em menores concentrações podem apresentar o efeito de matriz bastante pronunciado<sup>60</sup>.

Conhecidos os principais factores que contribuem para o efeito de matriz em análises de pesticidas por cromatografia gasosa, é possível estudar métodos que permitam minimizar a fonte de erros provocada por este factor.

### **1.5.2 Formas de Minimizar o Efeito de Matriz**

A quantificação exacta de resíduos de pesticidas em amostras de origem alimentar é fulcral, por isso é necessário o desenvolvimento de métodos que permitam contornar o problema da obtenção de recuperações superiores a 100% em determinados pesticidas. Embora existam na literatura vários métodos, nenhum é capaz de eliminar totalmente o efeito da matriz observado na quantificação de pesticidas nas diversas matrizes. Dependendo do conjunto de pesticidas que se deseja analisar, do método analítico, das condições do equipamento, da disponibilidade temporal e de recursos é possível escolher o método mais adequado para minimizar esses erros<sup>60</sup>.

A curva analítica da matriz, as formas da injeção, os analitos protectores, a limpeza dos extractos, a função de correcção e o método de adição de padrão são as técnicas mais comuns utilizadas em trabalhos científicos e em laboratórios oficiais para a monitorização de resíduos de pesticidas em alimentos.

A curva analítica da matriz é uma técnica que permite contornar o problema provocado pela presença de sítios activos no injector, a fim de minimizar a diferença de resultados associada ao efeito matriz. Neste método, as soluções padrão são preparadas



em extractos da matriz, livres de resíduos de pesticidas (branco) e analisadas por CG. Desta forma, os próprios componentes da matriz ocupam os sítios activos durante a análise do padrão, assim como ocorre nas análises dos extractos <sup>60</sup>.

Embora existam vários factores que possam estar envolvidos no aumento da resposta induzida pela matriz, o principal responsável é o injector bem como, as suas formas de injeção. A acção do injector depende da temperatura de injeção, da vazão e da pressão do gás de arraste, do volume da injeção, do tipo solvente, do diâmetro da coluna e do tempo de retenção, pois todos estes factores influenciam a interacção do analito com a superfície <sup>60</sup>.

A técnica denominada temperatura programada de vaporização (TPV) consiste na injeção de um grande volume de amostra, à temperatura adequada à vaporização do solvente, de modo a formar depósitos de pesticidas e componentes de matriz no compartimento de injeção. Posteriormente, este compartimento é aquecido, de forma a vaporizar e transferir os compostos para a coluna cromatográfica <sup>60</sup>.

Em geral, as técnicas de injeção convencionais, como injeção a quente sem divisor de fluxo quando substituídas pela TPV diminuem o efeito de matriz, embora não o eliminem. Outra forma de minimizar o efeito de matriz é através controlo de pressão electrónica no injector. Nesta técnica, a amostra é vaporizada com uma elevada vazão de gás de arraste para a coluna onde é carregada rapidamente. Como o tempo de permanência da amostra no injector é menor, ocorre uma eficiente supressão da adsorção ou degradação do analito. Após a injeção, a vazão de gás para a coluna é ajustada automaticamente para o valor optimizado, de modo assegurar a separação dos componentes na coluna. É de salientar ainda, que as perdas de analitos no sistema de injeção podem ser evitadas através da injeção directa na coluna <sup>60</sup>.

Estudos envolvendo outros modos de inserção de amostra na coluna capilar são encontrados na literatura. Estes visam encontrar uma forma de injeção que minimize a interferência dos componentes da matriz nas análises <sup>60</sup>.

Por outro lado os analitos protectores têm como objectivo “mascarar” os locais activos do injector, minimizando assim a adsorção dos analitos de interesse. De acordo com esta técnica os compostos ou misturas utilizados “imitam” o comportamento dos componentes da matriz. Os analitos protectores devem ter uma volatilidade similar à

dos pesticidas, impedindo, deste modo, a adsorção destes durante a análise da solução padrão, assim como nos extractos. Uma substância é considerada um bom analito protector se apresentar grupos polares, se a sua eficiência for independente da natureza da matriz, se for solúvel no solvente da solução padrão, se não reagir com os pesticidas de interesse, se não se acumular no sistema cromatográfico e se não apresentar o mesmo tempo de retenção dos analitos <sup>60</sup>.

A principal limitação desta técnica é o facto dos melhores analitos protectores serem muito polares, o que leva obrigatoriamente à utilização de solventes, como o acetonitrilo ou a água, na preparação das soluções padrão, e conseqüentemente, limita a sua utilização na análise de pesticidas apolares por cromatografia gasosa <sup>60</sup>.

Após a extracção dos pesticidas da amostra pode ser realizada a limpeza dos extractos, de forma a separar convenientemente os analitos dos componentes remanescentes que constituem a matriz. Normalmente os procedimentos utilizados são a cromatografia de permeação em gel, a cromatografia por adsorção, as colunas de extracção em fase sólida (sílica gel, C<sub>18</sub>, carvão activado entre outros), a dispersão da matriz em fase sélica (DMFS), e mais recentemente a extracção com partição em baixa temperatura. Embora o processo de limpeza dos extractos possa provocar a perda de alguns compostos, diminuindo a percentagem de recuperação dos pesticidas analisados por cromatografia gasosa com detector de captura de electrões, pode ainda aumentar o tempo e o custo das análises, tornando-se a alternativa mais recomendada para reduzir o efeito de matriz, por causar menos danos no sistema cromatográfico <sup>60</sup>.

A função de correcção é outra técnica que permite a concentração do analito na amostra, obtida a partir da curva analítica preparada com um solvente puro, de modo a reflectir um valor equivalente ao utilizado numa curva de calibração preparada no extracto da matriz <sup>60</sup>.

Por último, o método de adição de padrão é utilizado para corrigir a influência dos componentes da matriz na quantificação de pesticidas numa amostra individual. De acordo com este método, a amostra com o pesticida (fortificada) é submetida a um processo de extracção, sendo o extracto obtido dividido em várias subamostras. As quantidades diferentes e conhecidas de padrões de pesticidas são adicionadas a cada sobre amostra e analisadas nas mesmas condições cromatográficas <sup>60</sup>.

As desvantagens deste método consistem na restrição da análise a um pequeno número de amostras, e no facto de conduzir a resultados erróneos, uma vez que considera que o efeito da matriz é independente da concentração do analito<sup>60</sup>.

Entre os diversos métodos propostos para minimizar o efeito de matriz, citados anteriormente, o mais comum é a utilização de soluções padrão preparadas no próprio extracto da matriz, contudo a utilização de analitos protectores tem demonstrado ser uma proposta muito permissora nesta área.

## **2. OBJECTIVOS DO TRABALHO**

O objectivo deste trabalho é validar o método de cromatografia gasosa com detector de captura de electrões, para a determinação de resíduos de pesticidas em produtos de origem vegetal nos laboratórios do Departamento de Alimentação e Nutrição do Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge (INSA).

## **3. PARTE EXPERIMENTAL**

Neste trabalho experimental o método que se pretende validar é um método multi-resíduos para a determinação de resíduos de pesticidas em produtos de origem vegetal. É um método de análise que foi efectuado de acordo com procedimento interno definido pelo Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge (INSA).

Para a execução deste trabalho foi necessária a realização de 456 ensaios no Cromatografo Gasoso com Detector de Captura de Electrões, e, aproximadamente 60g de amostra de origem vegetal.

### 3.1 Reagentes, Soluções e Padrões

Os padrões de pesticidas utilizados foram o *Dasanit*, *Disulfoton*, *Terbufos*,  $\beta$ -*BHC*,  $\alpha$ -*BHC*,  $\sigma$ -*BHC*, Lindano, Heptacloro, Heptacloro (Isómero A), Heptacloro (Isómero B), Dieldrina, Aldrina e o Nitrofenol. Cada padrão estava armazenado numa ampola de vidro de 1 mL, com a concentração de 100  $\mu\text{g/mL}$  in MeOH. Todos eles eram da empresa ISOSTANDARDS MATERIAL S.L. (Madrid).

Todas as soluções padrão preparadas foram armazenadas em material de vidro, ao abrigo da luz e a uma temperatura compreendida entre os 3 – 5 °C.

Os solventes orgânicos utilizados foram:

- Metanol (MeOH), aproximadamente 100% de pureza (Analar Norma Pur, BDH – Prolabo<sup>®</sup>);
- n – Hexano (C<sub>6</sub>H<sub>14</sub>), 99% de pureza (Pro analysi, MERCK).

Os reagentes utilizados foram:

- Acetona (CH<sub>3</sub>(CO)CH<sub>3</sub>), pureza > 99,5%, (Fluka Chemie GmbH – Riedel-de-Haen);
- Água ultrapura, com resistividade 18 M $\Omega$ cm;
- Acetato de etilo (CH<sub>3</sub>COOC<sub>2</sub>H<sub>5</sub>) para Cromatografia Líquida (LC);
- Areia do mar purificada com ácido e calcinada (SiO<sub>2</sub>), grão fino;
- Sulfato de sódio anidro (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>), p.a;
- Hidrogenocarbonato de sódio (NaHCO<sub>3</sub>), p.a;
- Etanol absoluto (CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>OH) para LC.

### 3.2 Material e Equipamento

Todo o material volumétrico utilizado era certificado e todos os equipamentos obedeciam ao plano de calibração do laboratório.

Para a execução do presente trabalho experimental foi utilizado o seguinte material:

- Balões volumétricos de 10 mL e de 20 mL;
- *Erlenmeyers*;
- Pipetas graduadas de escoamento total;
- Pipetas de plástico;
- Pompets;
- Micropipetas de 50  $\mu$ L, 100  $\mu$ L e 1000  $\mu$ L (GILSON);
- Cartuchos para extracção em fase sólida de sílica gel, Strata SI, 1.55 $\mu$ m, 70 Å, 500mg/3Ml (Phenomenex<sup>®</sup>);
- Cartuchos octadecilsilano (C<sub>18</sub>) Strata X, 33 $\mu$ m *Polymeric Reserved Phase*, 60mg/3mL (Phenomenex<sup>®</sup>);
- Filtros de seringa Acrodisc Lc, 13mm de diâmetro, poro 0.45 $\mu$ m;
- Microseringa de 100 $\mu$ m;
- Tubos de centrífuga com rosca 50 mL;
- Tubos de vidro 16 x 100 mm para evaporador de corrente azoto (Caliper<sup>®</sup>, Turbovap);
- Funil de bucal largo para pós;
- *Vials* para GC;
- *Inserts* de 0.2 mL Mikroeinsatz 31x6mm (Microclear glass, VWR<sup>™</sup> International);
- Cápsulas metálicas de *vials*;
- Capsulador e descapsulador HP (Hewlett Packard, USA) (Figura 4).

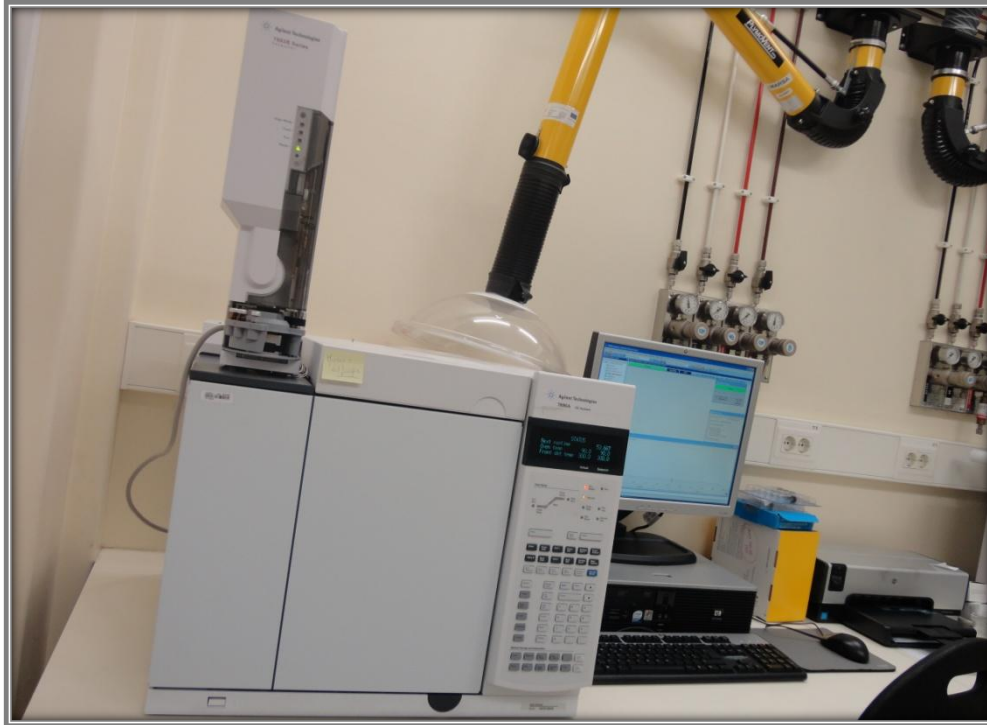


**Figura 4.** Imagem dos *vials* para GC, capsulador e respectivas cápsulas metálicas<sup>57</sup>.

Também foram necessários os seguintes equipamentos:

- Agitador automático (Heidolph, Relax 2);
- Agitador vortex (IKA<sup>®</sup> Vortex, Genius 3);
- Balança analítica (Mettler Toledo<sup>®</sup>, Modelo PB 3002/Fact);
- Sistema *Manifold* para SPE;
- Bomba de vácuo (Diaphragm<sup>®</sup> vacuum pump, MZ 2C);
- Centrífuga (Eppendorf<sup>®</sup>, 5804R);
- Centrífuga (Eppendorf<sup>®</sup> *miniSpin*);
- Evaporador de corrente de azoto com banho de água (Caliper<sup>®</sup>, Turbovap LV);
- Cromatógrafo Gasoso HP6890 Hewlett Packart, modelo 7890A (Figura 5), equipado e programado da seguinte forma:
  - ✓ Injetor *Split/splitless*, Hewlett Packart<sup>®</sup> (Injeção de 1 µl);
  - ✓ Detector (µECD) G2397A, Hewlett Packart<sup>®</sup>;
  - ✓ Fase móvel: hélio (1.4 ml/min-1);
  - ✓ Coluna cromatográfica (fase estacionária) configurada com fenil (50%) metilsiloxano (15m x 250 µm (di), 0.50 µm de espessura de filme), H50, Hewlett Packart<sup>®</sup>.
  - ✓ Temperaturas do equipamento: Injetor (250°C - isotérmico);
  - ✓ Detector: (300°C isotérmico);
  - ✓ Forno a 90°C (1 min)  $\xrightarrow{10^{\circ}\text{C}/\text{min}}$  180°C (0 min)  $\xrightarrow{2^{\circ}\text{C}/\text{min}}$  232°C (0 min)  $\xrightarrow{4.5^{\circ}\text{C}/\text{min}}$  280°C (7 min);

- ✓ Gás auxiliar do detector: árgon/metano (95/5%) a  $60 \text{ ml/min}^{-1}$ ;
- ✓ Amostrador Automático 7683, Hewlett Packard® com capacidade para 8 amostras.



**Figura 5.** Cromatógrafo de fase gasosa com detector de captura electrónica Hewlett Packard HP 6890<sup>57</sup>.

As amostras de polpa de maçã fresca utilizadas nos ensaios de recuperação foram cedidas pela Empresa Compal/Sumol.

### **3.3 Preparação das Soluções Padrão dos Pesticidas**

Das Ampolas de 1 mL, que continham cada um dos pesticidas com concentração de  $100 \mu\text{g/mL}$ , foram retirados 0.1 mL para os balões volumétricos de 10 mL, perfazendo-os com metanol de forma a obter uma solução stock de  $1 \mu\text{g/mL}$ , para cada fitofarmacêutico.

A partir das soluções padrão stock, de  $1 \mu\text{g/mL}$ , foram preparadas diferentes concentrações de soluções de trabalho, utilizadas para a construção de curvas de

calibração. As soluções de trabalho para análise em GC-ECD foram preparadas em metanol, para a gama de concentrações de 0.005, 0.01, 0.02, 0.03, 0.1 e 0.3 µg/mL. Contudo, esta gama de concentrações foi alterada no decorrer do trabalho, uma vez que as curvas de calibração não apresentavam coeficientes de correlação aceitáveis. Assim sendo, de forma a colmatar esta evidência definiram-se duas novas gamas de concentrações. As gamas de concentrações estabelecidas foram a 0.2, 0.05, 0.04, 0.03, 0.02, 0.01, 0.005, 0.002 µg/mL e a 0.1, 0.04, 0.035, 0.025, 0.017, 0.009, 0.004, 0.001 µg/mL, preparadas em metanol.

### 3.4 Validação da Técnica de Cromatografia Gasosa com Detector de Captura de Electrões (GC-ECD)

#### 3.4.1 Validação de Métodos Analíticos

Inicialmente injectou-se no GC-ECD, individualmente e em duplicado, a solução padrão stock de 1 µg/mL referente a cada pesticida nas gamas de concentrações definidas. Deste modo, determinou-se para cada um dos pesticidas o tempo de retenção ( $t_r$ ) e as gamas de concentrações, que melhor se ajustassem a uma curva de calibração linear. A linearidade foi testada através do teste de Mandel (ou *Fisher*), que estima qual dos modelos, linear ou polinomial, proporciona um melhor ajuste dos pontos à recta da curva de calibração, e ainda, através da comparação do Valor do Teste (PG) (Equação 3) e do Teste de *Fisher-Snedecor* (F) (Equação 4). O valor teste PG é calculado de acordo com a seguinte equação:

$$PG = \frac{DS^2}{Sy_2^2} \quad \text{Equação 3}$$

Em que,

$DS^2$  é a diferença das variâncias e  $Sy_2$  é o Desvio padrão residual do ajuste polinomial.



### 3.4.1.1 Teste de Fisher-Snedecor (F)

Para a determinação estatística da linearidade recorre-se ao teste de *Fisher-Snedecor*, também designado teste de Mandel.

O teste de *Fisher-Snedecor* é uma distribuição de probabilidade contínua que surge frequentemente como uma distribuição nula na análise da variância <sup>56</sup>. É utilizado para testar se a variância ou desvio padrão de dois conjuntos de dados são significativamente diferentes e comparar a precisão de dois métodos. O teste avalia ainda, a razão entre as variâncias, gerando uma estatística com distribuição F, de modo a que o F estatístico devolvido seja maior ou igual a 1, para tal, é necessário colocar sempre o valor mais alto da variância em numerador.

O Teste de *Fisher* é determinado segundo a equação apresentada de seguida:

$$F = \frac{S_1^2}{S_2^2} \quad \text{Equação 4}$$

Em que,

$S_1^2$  e  $S_2^2$  são duas variâncias.

Caso o valor do Teste de F seja superior ao valor do Teste PG é considerada a existência de um ajuste linear.

Posteriormente efectuou-se a mistura das soluções padrão stock de 1 µg/mL dos pesticidas. Foram realizadas duas misturas distintas de modo a evitar a junção dos tempos de retenção muito próximos dos diferentes pesticidas. A mistura I é constituída pelos pesticidas *Lindano*,  $\alpha$ -*BHC*,  $\delta$ -*BHC*, *Aldrina*, *Dasanit*, *Heptacloro*, *Heptacloro (Isómero A)* e *Nitrofenol*. Por outro lado, a mistura II é constituída pelo  $\beta$ -*BHC*, *Disulfoton*, *Terbufos*, *Heptacloro (Isómero B)* e pela *Dieldrina*. De seguida fizeram-se várias diluições da solução mistura I e da solução mistura II, de forma a obter as gamas de concentrações definidas, 0.1 a 0.001 µg/mL e 0.2 a 0.002 µg/mL respectivamente, e determinar a homogeneidade de variâncias para cada pesticida.

O estudo da homogeneidade de variâncias das gamas de concentrações estabelecidas foi realizado através do Teste de *Fisher*. Para tal, foram injectadas,

individualmente, 10 réplicas das soluções de mistura do primeiro e do último valor das gamas de concentração, 0.001-0.002 µg/mL e 0.1-0.2 µg/mL, respectivamente, de modo a verificar a existência de diferenças significativas entre as variâncias  $S_1^2$  e  $S_{10}^2$ .

A precisão do método foi avaliada tendo em conta a repetibilidade e a reprodutibilidade. Para tal, determinaram-se para cada um dos compostos, por interpolação na curva de calibração, a percentagem do valor de concentração obtido em função do valor esperado, assim como o coeficiente de correlação para os vários pesticidas.

O limite de detecção (LD) e o limite de quantificação (LQ) do método foram determinados através da concentração do padrão mais baixo (P1) das duas gamas definidas, obtidos a partir das 10 réplicas injectadas anteriormente. O P1 é expresso em µg/mL.

A expressão matemática utilizada para o cálculo do limite de detecção é apresentada de seguida (Equação 5).

$$L.D. \cong X_0 + 3,3.\sigma_0 \quad \text{Equação 5}$$

E o limite de quantificação foi calculado a partir da seguinte equação (Equação 6).

$$L.Q. \cong X_0 + 10.\sigma_0 \quad \text{Equação 6}$$

Em que,

$X_0$  é o tempo inicial, que neste caso é igual a 0 e o  $\sigma_0$  é o desvio padrão referente às 10 réplicas de P1<sup>42</sup>.

Para que os limiares analíticos do método sejam considerados aceitáveis para determinada gama de concentrações, o valor do LQ deve ser inferior à concentração do padrão mais baixo (P1). Tanto o LD como o LQ são geralmente expressos em unidades de concentração.

### 3.4.1.2 Teste *t-Student*

O teste *t-Student* ou somente teste *t* é um teste de hipótese que utiliza conceitos estatísticos para rejeitar ou não uma hipótese nula, caso a estatística do teste siga uma distribuição *t-Student*<sup>54</sup>.

O teste *t* é normalmente utilizado em médias de réplicas, por exemplo, na comparação de duas médias resultantes de dois procedimentos diferentes, para comparar a exactidão ou na comparação de uma média com um valor de referência. E é determinado através da seguinte fórmula matemática (Equação 7).

$$t = \frac{\bar{x} - \mu_0}{\frac{s}{\sqrt{n}}} \quad \text{Equação 7}$$

Sendo,

$\bar{x}$  a média das réplicas,  $\mu_0$  o valor fixo utilizado para comparar com a média das réplicas,  $s$  o desvio padrão das várias leituras da concentração mais baixa da gama de concentrações e  $n$  o número de réplicas<sup>55</sup>.

A exactidão do método foi avaliada através de ensaios de recuperação. Estes ensaios foram obtidos pelo método de Extração em Fase Sólida.

### 3.4.1.3 Processo de Extração em Fase Sólida com colunas de sílica

Inicialmente pesou-se rigorosamente três porções de 10g de amostra homogeneizada (polpa de maçã fresca) para três tubos de centrífuga de 50 mL etiquetados como mistura I, mistura II e branco (matriz não fortificada). De seguida as amostras foram agitadas no vortex. Com uma seringa adicionou-se 0.5 mL da solução padrão de fortificação de 1 µg/mL de cada mistura, nos respectivos tubos de centrífuga, tendo o cuidado de depositar a solução sobre a amostra sem tocar nas paredes do tubo. Agitaram-se as misturas, amostra com padrão de fortificação, no vortex durante 3 minutos para uma completa homogeneização.

Pesou-se para cada um dos três tubos de centrífuga limpos, 2g de areia, 15g de  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  e 2g de  $\text{NaHCO}_3$ , agitando os tubos de seguida. Adicionou-se a cada tubo 10 mL de solvente de extracção e fechou-se bem os tubos.

Transferiu-se o conteúdo dos tubos preparados anteriormente para os tubos de centrífuga que contêm as amostras, com o auxílio de um funil de bocal largo. Agitou-se vigorosamente com a mão durante alguns segundos, e depois durante 5 minutos no agitador mecânico. Posteriormente centrifugou-se a mistura presente nos tubos a 20 °C, 1800 rpm durante 1 minuto, de modo a promover a separação das 2 camadas.

Entretanto adicionou-se 50  $\mu\text{L}$  de solução ácido acético em acetato de etilo a cada um dos 3 tubos de evaporador presentes dentro da *Manifold*, e, colocou-se um cartucho de SPE de sílica gel (não condicionado) por cima de cada tubo.

Após a centrifugação transferiu-se imediatamente 2,5 mL dos extractos centrifugados para cada cartucho e deixou-se eluir, gota a gota, para os tubos de evaporador.

Terminada a passagem dos extractos para os tubos de evaporador, procedeu-se à eluição do extracto presente no cartucho com 3 mL (1mL + 2mL) de solvente de extracção. Após a passagem da maior parte da solução de lavagem, forçou-se a saída do restante solvente para o tubo, ligando a bomba de vácuo durante alguns segundos. Evaporou-se o eluído em banho de água com corrente de azoto a  $38 \pm 2^\circ\text{C}$ , 15 psi de azoto, durante aproximadamente 20 minutos, dissolvendo posteriormente os resíduos em 1 mL de metanol. Agitaram-se os tubos no vortex, durante 3 minutos. Transferiu-se cada um dos sobrenadantes obtidos no vortex para um *ependorf* e colocaram-se a centrifugar na centrífuga de *ependorfs* durante 10 minutos, a 10 000 rpm. De seguida, transferiram-se os sobrenadantes (extractos) com uma micropipeta para as seringas, onde são filtrados e transferidos para os *vials* de GC, de modo a serem analisados.

### 3.5 Extracção em Fase Sólida com coluna C<sub>18</sub>

O procedimento seguido para a SPE com colunas C<sub>18</sub> foi o descrito por *Backer, JT* na *Application Note* EN – 011<sup>62</sup>.

Este processo de extracção teve início com a pesagem de três porções de 15g de amostra homogeneizada (polpa de maçã fresca) para três tubos de centrífuga de 50 mL etiquetados como mistura I, mistura II e branco. De seguida adicionou-se 15 mL de metanol a cada tubo, e fortificou-se os respectivos tubos de centrífuga com 0.5 mL de solução padrão de 1 µg/mL de cada mistura, tendo atenção para deitar a solução sobre a amostra sem tocar nas paredes do tubo. As misturas foram homogeneizadas no vortex, durante 2 minutos e centrifugadas durante 20 minutos, a 2000 rpm e a 20°C, de forma a obterem-se 2 fases. Posteriormente retiraram-se 10 mL de sobrenadante (extracto) de cada tubo para balões volumétricos de 25 mL, perfazendo-os com água ultra pura.

Os cartuchos foram condicionados com 2 x 3 mL de metanol, seguido de 2 x 3 mL de água ultra pura, tendo o cuidado de não deixar secar o cartucho.

Com a bomba de vácuo desligada, adicionou-se 2 mL de água ultra pura a cada cartucho e transferiu-se 20 mL de extracto, do reservatório para a coluna com o auxílio do adaptador e ligando a bomba de vácuo para forçar a saída. Seguidamente lavou-se o cartucho com 3 mL de água ultra pura e deixou-se secar sob vácuo durante 10 minutos. Removeu-se o reservatório e o adaptador, e fez-se a eluição do extracto contido nos cartuchos, com 3 x 0.5 mL de n-hexano. O eluído dos 3 cartuchos foi recolhido para os respectivos tubos de evaporador, aos quais foi adicionado 0.5 mL de n-hexano. As soluções obtidas foram transferidas com uma seringa para os *vials* de GC e posteriormente analisadas no GC-ECD.

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 Validação da Técnica de Cromatografia Gasosa com Detector de Captura de Electrões (GC-ECD)

#### 4.1.1 Validação do Método Analítico

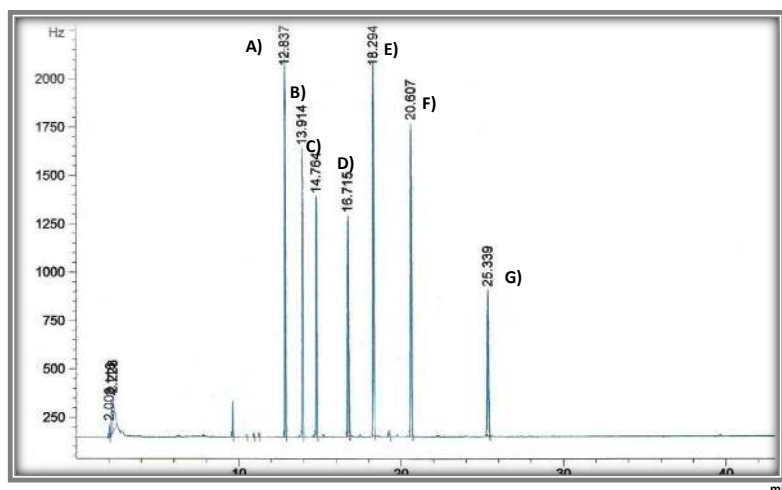
Os resultados obtidos para a validação do método de GC-ECD serão apresentados de seguida e englobam parâmetros como: a selectividade, a linearidade, a precisão, os limiares analíticos (LD e LQ) e a exactidão, estudados pela ordem referida.

##### 4.1.1.1 Estudo da Selectividade

A selectividade de um método instrumental de separação é a capacidade que esse método possui para distinguir um determinado componente numa mistura complexa sem que haja interferência de outros componentes <sup>42</sup>. Este parâmetro é o primeiro a ser utilizado para a validação e desenvolvimento de um método, porque se este não for assegurado, a maior parte dos outros parâmetros (linearidade, precisão e exactidão) poderão ficar comprometidos <sup>48</sup>.

Para a determinação da selectividade identificou-se por GC-ECD o tempo de retenção ( $t_r$ ) de cada composto em estudo e avaliou-se a resolução existente entre os vários compostos, tendo em conta a análise de brancos.

Os tempos de retenção foram obtidos a partir das maiores áreas dos picos presentes nos cromatogramas das réplicas das soluções padrão dos vários pesticidas, com a concentração de 1µg/ml (Figura 6).



**Figura 6.** Cromatograma de uma das réplicas das soluções padrão, com concentração de 1 µg/ml: A)  $\alpha$ -BHC, B) Lindano, C)  $\sigma$ -BHC, D) Heptacloro, E) Aldrina, F) Heptacloro (Isómero A) e G) Nitrofenol (Adaptado)<sup>57</sup>.

Como podemos observar na Tabela II, de uma forma geral todos os pesticidas apresentaram tempos de retenção relativamente afastados, à exceção do *Disulfoton* e do  $\sigma$ -BHC que exibiram uns tempos de retenção muito próximos, sendo de 14.7 e 14.8 minutos respectivamente. Apesar da proximidade existente entre os tempos de retenção de alguns pesticidas, o GC-ECD teve a capacidade de separá-los, demonstrando grande sensibilidade.

**Tabela II.** Valores dos Tempos de retenção dos 13 pesticidas em estudo.

Composto	T <sub>r</sub> (min)
<i>Dasanit</i>	27.7
<i>Terbufos</i>	14.1
<i>Disulfoton</i>	14.7
$\beta$ -BHC	13.7
Heptacloro (Isómero B)	20.4
Dieldrina	23.9
$\alpha$ -BHC	12.8
Lindano	13.9
$\sigma$ -BHC	14.8
Heptacloro	16.7
Aldrina	18.3
Heptacloro (Isómero A)	20.6
Nitrofenol	25.3

#### 4.1.1.2 Estudo da Linearidade

A linearidade é a capacidade do método demonstrar que os resultados obtidos são directamente proporcionais à concentração do pesticida em estudo, dentro de uma determinada gama de concentrações <sup>63</sup>.

O estudo da linearidade consistiu fundamentalmente na construção de curvas de calibração. Estas foram traçadas a partir de 6 concentrações distintas que variam de acordo com a gama de concentração estipulada para cada pesticida. A curva de calibração permite a obtenção de parâmetros como o coeficiente de correlação ( $r$ ) que possibilitam a avaliação da linearidade do método para cada analito em estudo. Os resultados obtidos para o teste de linearidade estão presentes na tabela III.

Os coeficientes de correlação de todos os pesticidas estão compreendidos entre os 0.989 e 0.999, sendo o *Dasanit* o pesticida que apresenta o  $r$  mais baixo e o Nitrofenol o que apresenta o  $r$  mais alto. Sabendo que o grau de confiança é de 95% todos os fitofarmacêuticos obedecem ao grau de confiança considerado. No entanto, o valor do coeficiente de correlação não é o único requisito a ter em conta <sup>64</sup>. A linearidade também foi testada através do Teste de Mandel. Este teste permite estimar qual dos modelos (linear ou polinomial) proporciona o melhor ajuste dos pontos da curva de calibração através da comparação entre o Valor do Teste (PG) e o valor tabelado de *Fisher-Snedecor* (F). A função só é considerada linear se  $PG < F$ .

A homogeneidade de variâncias dos intervalos de trabalho foi testada de forma independente através do teste de *Fisher*. Para tal, o primeiro e o último padrão das curvas de calibração para os pesticidas estudados foram analisados em 10 réplicas independentes. As variâncias associadas ( $S_1^2$  e  $S_6^2$ ) foram calculadas para verificar se existiam ou não diferenças significativas entre elas <sup>65</sup>.

Visto os resultados obtidos para o teste de linearidade apresentarem coeficientes de correlação superiores a 0.95 e constituírem uma função considerada linear, verifica-se que o ajuste polinomial não é significativamente melhor que o linear para todos os pesticidas. Assim sendo, a gama de concentrações estipulada para cada pesticida é a adequada, permitindo a construção de curvas de calibração com um bom ajuste linear, assegurando a linearidade ao método.



**Tabela III.** Gama de concentrações estipulada para cada pesticida, e respectivos coeficientes de correlação (r).

Composto	Gama	r
<i>Dasanit</i>	0.05-0.005	0,989
<i>Terbufos</i>	0.05-0.005	0,993
<i>Disulfoton</i>	0.2-0.01	0,993
$\beta$ -BHC	0.2-0.01	0,999
Heptaclo-ro (Isómero B)	0.05-0.005	0,993
Dieldrina	0.04-0.001	0,992
$\alpha$ -BHC	0.1-0.009	0,998
Lindano	0.1-0.009	0,998
$\sigma$ -BHC	0.1-0.009	0,997
Heptaclo-ro	0.1-0.009	0,999
Aldrina	0.1-0.009	0,999
Heptaclo-ro (Isómero A)	0.1-0.009	0,999
Nitrofenó	0.1-0.009	0,999

#### 4.1.1.3 Estudo da Precisão

A precisão avalia a tendência dos resultados entre ensaios independentes, repetidos em amostras idênticas, nas mesmas condições analíticas, com o mesmo operador e no mesmo local. A precisão é geralmente expressa como desvio padrão relativo (RSD), também designado como coeficiente de variação (CV) <sup>10</sup>.

Para determinar a precisão da metodologia em questão fizeram-se 10 determinações independentes de cada solução padrão de todos os pesticidas. Foram estudadas 6 concentrações distintas para cada fitofarmacêutico de acordo com a sua gama.

Através da tabela que se segue (Tabela IV) podemos observar que o método é mais preciso para o Nitrofenó, pois apresenta o coeficiente de variação menor, de 4,32%, e menos preciso para o *Disulfoton*, pois possui um CV de 12,71%, superior ao de todos os analitos. Contudo, todos os coeficientes de variação são inferiores a 20%,

corroborando o que está descrito na literatura e transmitindo uma boa precisão ao método.

Segundo alguns autores, a validação da precisão de métodos de análise de misturas complexas só é aceite para valores de coeficientes de variação até 20% para substâncias estudadas por GC <sup>66, 55</sup>.

Neste estudo embora não seja necessário aplicar esta estratégia, uma forma de melhorar a precisão do método é aumentando o número de réplicas <sup>55</sup>.

**Tabela IV.** Valores dos Desvios Padrão e dos Coeficientes de Variação (%) dos 13 compostos estudados.

Composto	Desvio Padrão (µg/mL)	Coefficiente de Variação (CV) %
<i>Dasanit</i>	0,0027	10,2
<i>Terbufos</i>	0,0021	8,0
<i>Disulfoton</i>	0,0067	12,7
<i>β-BHC</i>	0,0025	4,7
Heptacloro (Isómero B)	0,0021	8,1
Dieldrina	0,0019	8,4
<i>α-BHC</i>	0,0027	5,9
Lindano	0,0028	6,1
<i>σ-BHC</i>	0,0041	9,0
Heptacloro	0,0027	5,9
Aldrina	0,0021	4,6
Heptacloro (Isómero A)	0,0026	5,8
Nitrofenol	0,0020	4,3

#### 4.1.1.4 Estudo dos Limiares Analíticos: Limite de Detecção e Limite de Quantificação

Considerando que o limite de detecção (LD) representa a menor concentração a partir do qual é possível detectar a presença do analito com uma certeza estatística razoável, utilizando um determinado procedimento experimental e que o limite de quantificação (LQ) é a menor concentração de substância quantificada com um nível aceitável de precisão e veracidade <sup>10, 55</sup>, efectuaram-se as suas avaliações através do desvio padrão da Concentração do Padrão mais baixo (P1) dos 10 ensaios realizados

para cada pesticida. Os resultados obtidos foram muito satisfatórios como se pode verificar na Tabela V.

Em todos os pesticidas o limite de quantificação apresentou um valor inferior ao padrão de concentração mais baixa.

Deste modo, os limites de detecção e os limites de quantificação foram validados para os 13 pesticidas estudados, nas gamas de concentração estipuladas.

É importante salientar ainda que os valores dos limiares analíticos, nomeadamente o LQ de cada pesticida, determinados nos alimentos, devem ser inferiores aos limites máximos de resíduos estipulados pelas entidades competentes, como é o caso da União Europeia (EU).

Como podemos verificar na Tabela V todos os pesticidas estudados apresentam valores de LQ inferiores aos LMRs estabelecidos. Segundo o regulamento (CE) N° 396/2005 aplica-se o limite máximo de resíduos padrão de 0.01 mg/kg<sup>67</sup>.

**Tabela V.** Valores dos Limites de Detecção e Limites de Quantificação dos 13 compostos estudados.

<b>Composto</b>	<b>Gama</b>	<b>P1</b> (µg/mL)	<b>LD</b> (µg/mL)	<b>LQ</b> (µg/mL)
<i>Dasanit</i>	0.05-0.005	<b>0.005</b>	<b>0,0007</b>	<b>0,002</b>
<i>Terbufos</i>	0.05-0.005	<b>0.005</b>	<b>0,0017</b>	<b>0,005</b>
<i>Disulfoton</i>	0.2-0.01	<b>0.01</b>	<b>0,0023</b>	<b>0,007</b>
<i>β-BHC</i>	0.2-0.01	<b>0.01</b>	<b>0,0005</b>	<b>0,002</b>
Heptacloro (Isómero B)	0.05-0.005	<b>0.005</b>	<b>0,0002</b>	<b>0,001</b>
Dieldrina	0.04-0.001	<b>0.001</b>	<b>6,37E-05</b>	<b>0,0002</b>
<i>α-BHC</i>	0.1-0.009	<b>0.009</b>	<b>0,0011</b>	<b>0,003</b>
Lindano	0.1-0.009	<b>0.009</b>	<b>0,0013</b>	<b>0,004</b>
<i>σ-BHC</i>	0.1-0.009	<b>0.009</b>	<b>0,0033</b>	<b>0,009</b>
Heptacloro	0.1-0.009	<b>0.009</b>	<b>0,0025</b>	<b>0,008</b>
Aldrina	0.1-0.009	<b>0.009</b>	<b>0,0007</b>	<b>0,002</b>
Heptacloro (Isómero A)	0.1-0.009	<b>0.009</b>	<b>0,0008</b>	<b>0,002</b>
Nitrofenol	0.1-0.009	<b>0.009</b>	<b>0,0019</b>	<b>0,006</b>

Desta forma, o método analítico fica validado, garantindo que as características de desempenho são adequadas para as condições aplicadas no CG-ECD.

#### 4.1.1.5 Estudo da Exactidão

A exactidão é designada como a concordância entre o resultado de um ensaio e o valor de referência aceite como convencionalmente verdadeiro <sup>42</sup>.

A exactidão do método cromatográfico foi avaliada através de ensaios de recuperação. A recuperação mede o rendimento da extracção, ou seja, a fracção de massa do analíto contido na amostra que se encontra presente no extracto final. Reflecte a quantidade de determinado analíto recuperado no processo de extracção, em relação à quantidade presente na amostra <sup>46</sup>. Esta deve ser calculada pela razão entre a quantidade de substância adicionada e a quantidade de substância recuperada, expressa em percentagem <sup>10</sup>.

Este parâmetro foi estimado através da fortificação de uma determinada quantidade de amostra de polpa de maçã fresca, com um nível de concentração de padrões conhecido. As soluções de amostra fortificada foram posteriormente injectadas no sistema GC-ECD e analisadas em duplicado nas mesmas condições analíticas. Determinadas as áreas de cada pico obtido no cromatograma para os diferentes compostos em estudo, calculou-se a percentagem de recuperação média para cada fitofarmacêutico, tendo em conta o nível de concentração adicionado à matriz. Os resultados obtidos estão presentes na Tabela VI.

De acordo com os resultados apresentados o valor mínimo de recuperação foi de 10% e o máximo de 114%, à excepção do *Disulfoton* que não foi detectado. De uma forma geral, os resultados para os compostos em análise foram relativamente satisfatórios.

A recuperação demonstra a eficácia da extracção de um método analítico dentro de determinados limites de variabilidade. Não necessita ser de 100%, até porque em termos práticos não é possível, uma vez que ocorrem sempre perdas durante o processo extractivo, mas a recuperação deve ser constante, exacta e reprodutível <sup>46</sup>.

Os valores de recuperação na ordem dos 10 % obtidos para o Nitrofenol e para o Heptacloro podem ser explicados devido à moderada e baixa solubilidade (25 e 4.5%) respectivamente, que estes pesticidas apresentam em metanol, o solvente utilizado para dissolver o resíduo obtido aquando da Extração em Fase Sólida (SPE) com colunas de sílica <sup>68,69</sup>. O Nitrofenol tem uma solubilidade moderada no solvente utilizado, por isso seria de prever que apresentasse uma recuperação superior, contudo como é um

pesticida que se fotodegrada rapidamente quando em solução<sup>68</sup>, apresentou um valor de recuperação menor.

De uma forma geral, para compostos organoclorados com carácter menos polar não se obteve uma recuperação adequada. Provavelmente o facto dos índices de recuperação destes pesticidas terem sido baixos está ligado maioritariamente à polaridade do solvente (metanol) utilizado na etapa de eluição dos compostos durante a SPE. Por estes compostos apresentarem um carácter pouco polar, o solvente não teve força (polaridade) suficiente para elui-los do cartucho de sílica, ficando assim retidos no cartucho<sup>70</sup>.

Por outro lado os fitofarmacêuticos organofosforados *Dasanit* e *Terbufos* apresentaram uma recuperação de 114 % e 119 % respectivamente. Estes valores podem ser explicados devido à elevada solubilidade que estes possuem em solventes orgânicos, nomeadamente metanol e ainda, poderem eventualmente estar ligados ao efeito de matriz. Relativamente ao *Disulfoton*, um pesticida igualmente organofosforado, não foi detectado devido provavelmente às propriedades que apresenta. É um composto apolar, e como tal só é facilmente miscível em compostos com polaridade relativa muito baixa como é o caso do n-hexano, tolueno entre outros solventes apolares<sup>71,72</sup>. Portanto, o solvente utilizado na SPE não é eficaz para a extracção deste pesticida, uma vez que não o dissolve na fase final do processo de extractivo, e consequentemente não o recupera.

**Tabela VI.** Recuperações obtidas a partir da fortificação da polpa da maçã fresca com 0.125 µg/ml de pesticida.

Composto	Recuperação Média (%)
<i>Dasanit</i>	114
<i>Terbufos</i>	119,1
<i>Disulfoton</i>	Não detectado
<i>β-BHC</i>	80,0
Heptacloro (Isómero B)	27,5
Dieldrina	21,5
<i>α-BHC</i>	40,0
Lindano	68,5
<i>σ-BHC</i>	96,2
Heptacloro	9,5
Aldrina	19,6
Heptacloro (Isómero A)	26,0
Nitrofenol	9,5

Em suma, o método de extracção em questão (SPE com coluna de sílica) só se mostra eficiente para seis (*Dasanit*, *Terbufos*,  $\beta$ -*BHC*,  $\alpha$ -*BHC*,  $\sigma$ -*BHC*, Lindano) dos treze pesticidas em estudo.

## 4.2 Comparação do Método de Extração em Fase Sólida com cartuchos de sílica e com cartuchos C<sub>18</sub>

Numa primeira fase, a purificação da amostra foi efectuada por extracção em fase sólida, utilizando colunas de sílica gel e o metanol como eluente. Posteriormente, a amostra foi submetida ao método SPE com colunas C<sub>18</sub>, bem como, a todo o procedimento proposto por *Backer, JT*<sup>62</sup>.

Avaliou-se a recuperação obtida no sistema de extracção em fase sólida com colunas de sílica, comparando a resposta obtida com a recuperação obtida no processo de extracção em fase sólida com colunas C<sub>18</sub>. Os valores de recuperação obtidos estão indicados na tabela VII.

De uma forma geral, podemos observar que se obtiveram melhores recuperações na SPE com coluna de sílica do que com a coluna C<sub>18</sub>, com a excepção do *Disulfoton* que não foi recuperado, do  $\beta$ -*BHC* e do Nitrofenol que apresentaram valores de recuperação superiores na SPE com colunas C<sub>18</sub>.

Sendo o *Disulfoton* um fitofarmacêutico apolar é facilmente miscível em solventes apolares, como é o caso do n-hexano<sup>73</sup>, deste modo, explica-se o facto de este não ter sido recuperado no método SPE que utilizou o metanol como eluente, um solvente com alta polaridade, e se ter obtido uma recuperação de 69.9 % na SPE com colunas C<sub>18</sub>, cujo eluente foi o n-hexano. Relativamente ao  $\beta$ -*BHC*, apesar de ser um pesticida dos mais polares da família dos hexaclorobenzenos (BHC), apresentou uma recuperação de 80% no método de extracção com coluna de sílica, e de 95.9% na SPE com coluna C<sub>18</sub>, verifica-se assim que o  $\beta$ -*BHC* polar teve uma recuperação maior no método com eluente apolar, este resultado poder-se-á dever ao facto de neste método terem sido utilizados cartuchos C<sub>18</sub> (octadecilsilano), e para além disso, estes terem sido condicionados com metanol e água, dois solventes com alta polaridade. Outra hipótese que poderá explicar este resultado, é o facto do volume de eluição ter sido baixo e feito em 3 vezes, pois quanto menor o volume de eluição, maior o fator de pré-concentração.

Por exemplo, a dessorção é mais eficiente se for feita 2 ou 3 vezes com 1 mL, em vez de uma única vez com 2 ou 3 mL <sup>53</sup>.

Quanto ao Nitrofenol obteve-se melhor recuperação no SPE com cartucho C<sub>18</sub> do que com cartucho de sílica porque apresenta uma solubilidade moderada em metanol e mais alta em n-hexano e outros solventes apolares <sup>68</sup>.

Relativamente ao  $\sigma$ -BHC, o facto de este ser um dos pesticidas mais polares da família do BHC, e como tal, não ser solúvel em n-hexano, faz com que a sua recuperação pelo método SPE com coluna C<sub>18</sub>, não se demonstre eficiente.

**Tabela VII.** Recuperações obtidas a partir da SPE com colunas de sílica e colunas C<sub>18</sub>.

Composto	Recuperação (%)	
	Coluna de sílica	Coluna de C <sub>18</sub>
<i>Dasanit</i>	114,0	56,5
<i>Terbufos</i>	119,1	74,1
<i>Disulfoton</i>	Não detectado	69,9
$\beta$ -BHC	80,0	95,9
Heptacloro (Isómero B)	27,5	5,1
Dieldrina	21,5	2,3
$\alpha$ -BHC	40,0	16,2
Lindano	68,5	21,5
$\sigma$ -BHC	96,2	Não detectado
Heptacloro	9,5	8,0
Aldrina	19,6	2,7
Heptacloro (Isómero A)	26,0	2,1
Nitrofenol	9,5	48,0

Em resumo, o método de extracção com colunas C<sub>18</sub> só foi eficiente para três (Disulfoton,  $\beta$ -BHC e Nitrofenol) dos treze pesticidas estudados.

## 5. CONCLUSÃO E CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os pesticidas são utilizados na agricultura para o controlo de pragas e consequente aumento de produtividade, com vista à satisfação das necessidades alimentares ao nível mundial <sup>60</sup>. Contudo, nos últimos anos tem havido uma preocupação crescente em relação à presença de resíduos de pesticidas nos alimentos, pois devido à sua toxicidade podem provocar efeitos adversos na saúde, principalmente das crianças que são mais susceptíveis a possíveis danos devido à sua baixa massa corporal <sup>29</sup>.

Visto ser inevitável a presença de resíduos de pesticidas nos alimentos, e tendo em consideração a protecção da saúde dos consumidores, entidades competentes estabeleceram limites máximos de resíduos nos alimentos (LMRs), abaixo dos quais o risco para a saúde não é significativo. Assim sendo, é fundamental ter uma metodologia validada que permita a quantificação de resíduos de pesticidas nos alimentos e que garanta a fiabilidade dos resultados. Segundo a literatura, a técnica seleccionada para a análise multi-resíduo de pesticidas em produtos de origem vegetal é a cromatografia gasosa. No presente trabalho, procedeu-se à validação do método de cromatografia gasosa com detector de captura de electrões (GC-ECD), para a determinação de resíduos de pesticidas em produtos de origem vegetal. Determinou-se para tal, a selectividade, a linearidade, a precisão, o limite de detecção e o limite de quantificação e a exactidão do método.

De acordo com os resultados obtidos, a cromatografia gasosa com detector de captura de electrões provou ser uma óptima técnica para a determinação dos 13 pesticidas estudados, uma vez que, tendo em conta todas as condições estabelecidas, obedeceu a todos os parâmetros necessários à validação de um método.

Na validação do método obtiveram-se resultados muito satisfatórios. O método GC-ECD para a análise dos pesticidas organoclorados e organofosforados estudados, demonstrou ser bastante sensível permitindo a separação dos compostos, e, permitiu atingir os níveis de concentração desejados. As curvas de calibração apresentaram coeficientes de correlação com um valor mínimo de 0.989 e um bom ajuste linear para as gamas de concentração definidas para cada pesticida, deste modo assegurou-se a linearidade do método. Os coeficientes de variação obtidos para todos os compostos estão compreendidos entre os 4.32% e os 12.71%, isto é, bastante inferiores a 20%,



conferindo assim uma grande precisão ao método. Os valores dos limites de detecção e de quantificação foram apropriados à determinação dos pesticidas analisados. O limite de quantificação mais alto foi de 0.009 µg/mL, inferior ao limite máximo de resíduos padrão de 0.01 µg/mL, estabelecido na legislação. Assim sendo, concluiu-se que as características de desempenho do método analítico são bastante adequadas para as condições aplicadas.

O método de extração em fase sólida provou ser uma boa técnica para a preparação de amostras de origem vegetal. As recuperações obtidas com as colunas de sílica foram significativamente melhores do que as obtidas com as colunas C<sub>18</sub>.

Apesar dos valores obtidos no estudo da exactidão, estabeleceu-se que estes não foram suficientemente significativos para colocar em causa a aceitação deste parâmetro nem a consequente validação do método cromatográfico. Pois, caso tivessem sido realizados ensaios interlaboratoriais ou utilizados materiais de referência este parâmetro poderia ter sido reforçado.

Assim sendo, conclui-se que o método de cromatografia gasosa com detector de captura de electrões foi validado nos laboratórios do Departamento de Alimentação e Nutrição (DAN), no Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge, possibilitando uma determinação fiável de resíduos de pesticidas em produtos de origem vegetal.

É de salientar ainda que devido à escassez de informação disponível nesta área é fundamental a execução de novas pesquisas, de modo a aumentar o conhecimento relativo a este tipo de equipamento e a otimizar as condições para a determinação de cada um dos compostos tóxicos, nocivos à saúde existentes nos alimentos de origem vegetal.

## 6. BIBLIOGRAFIA

1. Amaro P (2003) *A Protecção Integrada*. ISA Press. Cadaval. 1-458.
2. Fenik J, Tankiewicz M, Biziuk M (2011) Properties and determination of pesticides in fruits and vegetables. *Trends in Analytical Chemistry*. 30(6): 814-826.
3. LeDoux M (2011) Analytical methods applied to the determination of pesticide residues in foods of animal origin. A review of the past two decades. *Journal of Chromatography A*. 1218: 1021-1036.
4. Casida JE, Quistad GB (1998) Golden Age of Insecticide Research: Past, Present, or Future? *Annual Reviews Entomology*. 43: 1-16.
5. Aliferis KA, Jabaji S (2011) Metabolomics – A robust bioanalytical approach for the discovery of the modes-of-action of pesticides: A review. *Pesticide Biochemistry and Physiology*. 100:105-117.
6. Mnif W, Hassine AIH, Bouaziz A, Bartegi A, Thomas O, Roig B (2011) Effect of Endocrine Disruptor Pesticides: A Review. *International Journal of Environmental Research and Public Health*. 8:2265-2303.
7. FAO (1997) <http://www.bvsde.paho.org/bvstox/i/fulltext/fao07/fao07.pdf> (Acedido a 15/10/2011).
8. Zenebon O, Pascuet NS, Tiglea P (2008) *Métodos Físico-Químicos para Análise de Alimentos*. Instituto Adolfo Lutz 4(1): 33-994 . In: Toledo HHB, Rocha SB, Kussumi TA, Lemes VRR. (2008) *Resíduos de Pesticidas*. Brasil. Ministério da Saúde. 687-705.
9. Yamashita MGN (2008) Análise de legibilidade e compreensão de rótulos de agrotóxicos: estudo com agricultores da região de Londrina, Paraná. *Associação de Ensino e Pesquisa de Nível Superior do Design do Brasil*. 1694-1703.
10. Cunha S (2007) Autenticidade e Segurança de Azeites e Azeitonas: Desenvolvimento de metodologias cromatográficas para o doseamento de triacilgliceróis, fitosteróis, tocoferóis/tocotrienóis e pesticidas. *Dissertação de Doutoramento. Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto*. 1-394.
11. Amaro P (2009) *É indispensável e urgente reduzir os elevados riscos de mortalidade das abelhas pelos pesticidas*. X Fórum Nacional de Apicultura. Ourém. 1-12.

12. Brussel (2008) *Commission Staff Working Document - Monitoring of Pesticides Residues in Products of Plant Origin*. Commission of the European Communities Press. European Union. 1-40.
13. Jongen W (2005) *Improving the safety on fresh fruit and vegetables*. CRC Press. Netherlands. 1-639.
14. Vilarinho F (2009) Validação da Determinação de Resíduos de Pesticidas em Produtos Transformados de Origem Vegetal para Alimentação Infantil. *Tese de Mestrado. Universidade Técnica de Lisboa*. 1-94.
15. Cieslik E, Sadowska-Rociek A, Ruiz JMM, Surma-Zadora M (2011) Evaluation of QuEChERS method for the determination of organochlorine pesticide residues in selected groups of fruits. *Food Chemistry* 125: 773–778.
16. Köhne JM, Köhne S, Šimunek J (2009) A review of model applications for structured soils: b) Pesticide transport. *Journal of Contaminant Hydrology* 104:36-60.
17. Ribas PP, Matsumura ATS (2009) A química dos agrotóxicos: impacto sobre a saúde e meio ambiente. *Revista Liberato*. 14(10): 149-158.
18. Vettorazzi G (1982) *International Perspectives for the safety evaluation of pesticide residues in food: Toxicological Evaluation and Dietary Exposure*. II Seminário Internacional sobre Resíduos de Plaguicidas. 135-171.
19. Matsadiq G, Hua HL, Renb HB, Zhou YW, Liu L, Cheng J (2011) Quantification of multi-residue levels in peach juices, pulps and peels using dispersive liquid–liquid microextraction based on floating organic droplet coupled with gas chromatography-electron capture detection. *Journal of Chromatography B*. 879: 2113–2118.
20. OCDE (1995) *Guidelines on aid and environment n.º 6: Guidelines for aid agencies on pest and pesticide management*. OCDE. Paris. 1-46.
21. WHO (1990) *Public health impacts of pesticides used in agriculture*. <http://www.who.int/en/> (Acedido a 21/10/2011).
22. Amaro P (2007) *A Política de Redução dos Riscos dos Pesticidas em Portugal*. ISA Press. Cadaval. 1-176.
23. Teixeira H, Proença P, Alvarenga M, Oliveira M, Marques EP, Vieira DN (2004) Pesticide intoxications in the Centre of Portugal: three years analysis. *Forensic Science International* 143: 199–204.

24. Ssebugere P, Wasswa J, Mbabazi J, Nyanzi SA, Kiremire BT, Marco JAM (2010) Organochlorine pesticides in soils from south-western Uganda. *Chemosphere* 78: 1250–1255.
25. Santos SP (2002) A Química dos Insecticidas (Parte I). *A European Journal of Chemical Physics and Physical Chemistry*. 3: 43-49.
26. Williams PL, James RC, Roberts SM (2000) *Principles of Toxicology Environmental and Industrial Applications*. John Wiley & Sons Inc. Canadá. 1-575.
27. Sharma D, Nagpal A, Pakade YB, Katnoria JK (2010) Analytical methods for estimation of organophosphorus pesticide residues in fruits and vegetables: A review. *Talanta* 82: 1077 – 1089.
28. Fidbo (2012) Doença de Parkinson e Pesticidas. <http://www.dr-organico.com.br/doenca-de-parkinson-e-pesticidas/> (Acedido a 21/06/2012).
29. Queiroz SCN, Ferracini VL, Rosa MA (2011) Validação de Método Multirresíduo para Determinação de Pesticidas em Alimentos empregando QueChers e UPLC - MS/MS. *Química Nova*. XY: 1 – 8.
30. Amaro P (2010) A Deficiente Informação Aumenta os Riscos dos Pesticidas em Portugal. *Revista de Ciências Agrárias*. 272 – 284.
31. Jornal Oficial da União Europeia (2003) Directiva 2003/14/CE da Comissão de 10 de Fevereiro de 2003 que altera a Directiva 91/321/CEE relativa às fórmulas para lactantes e fórmulas de transição. <http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2003:041:0037:0040:PT:PDF> (Acedido a 20/10/2012).
32. [http://www.pesticideinfo.org/Detail\\_Chemical.jsp?Rec\\_Id=PC33103](http://www.pesticideinfo.org/Detail_Chemical.jsp?Rec_Id=PC33103) (Acedido a 22/10/2011).
33. <http://en.wikipedia.org/wiki/Heptacloro> (Acedido a 22/10/2011).
34. <http://wiki.medpedia.com/Terbufos> (Acedido a 22/10/2011).
35. <http://wiki.medpedia.com/Fensulfothion> (Acedido a 22/10/2011).
36. Degani ALG, Cass QB, Vieira PC (1998) Cromatografia: um breve ensaio. *Química Nova* 7: 21-25.
37. Castanho J (SD) <http://jacintocastanho.planetaclix.pt/cromatografia.htm> (Acedido a 23/10/2011).

38. Georgakopoulos P, Zachari R, Mataragas M, Athanasopoulos P, Drosinos EH, Skandamis PN (2011) Optimisation of octadecyl (C18) sorbent amount in QuEChERS analytical method for the accurate organophosphorus pesticide residues determination in low-fatty baby foods with response surface methodology. *Food Chemistry* 128: 536 – 542.
39. Li A, Imasaka T, Uchimura T, Imasaka T (2011) Analysis of pesticides by gas chromatography/multiphoton ionization/mass spectrometry using a femtosecond laser. *Analytica Chimica Acta* 701: 52– 59.
40. Tendinha C (2009) Monitorização de Pesticidas em águas para consumo humano: Um desafio para os laboratórios. *Segurança e Qualidade Alimentar* 7: 39-41.
41. Rodrigues NR (2006) Agrotóxicos: Análises de resíduos e Monitoramento. *MultiCiência*. 7:1-7.
42. Pimentel RV (2007) Desenvolvimento de Metodologias Analíticas para a Determinação de Resíduos de Pesticidas em Medicamentos à Base de Plantas. *Tese de Mestrado. Faculdade de Farmácia da Universidade de Lisboa*. 1-154.
43. Pereira DCF (2007) Detecção de Subprodutos da Desinfecção com cloro em água dessalinizada. *Tese de Mestrado. Faculdade de Ciências da Universidade do Porto*. 1-139.
44. Jin B, Xie L, Guo Y, Pang G (2011) Multi-residue detection of pesticide in juice and fruit wine: A review of extraction and detection methods. *Food Research International*. 1 – 11.
45. Leite M (2011) Desenvolvimento e Optimização de uma Metodologia Analítica para a Determinação de  $\alpha$ - e  $\beta$ - Amanitina em urina humana por LC-MS/MS. *Tese de Mestrado. Faculdade de Ciências Tecnológicas da Universidade de Coimbra*. 1-136.
46. Mendes ASR (SD) Implementação e Validação de Métodos Analíticos. <http://www3.uma.pt/valimed/livro%202004/artigo6-AR.pdf> (Acedido a 21/10/2011).
47. Brito NM, Junior OPA, Polese L, Ribeiro ML (2003) Validação de Métodos Analíticos: Estratégia e Discussão. *Ecotoxicologia e Meio Ambiente* 13:129-146.

48. Cassiano NM, Barreiro JC, Martins LRR, Oliveira RV, Cass QB (2009) Validação em Métodos Cromatográficos para a Análise de Pequenas Moléculas em Matrizes Biológicas. *Química Nova* 32(4): 1021-1030.
49. Almeida CMM, Bronze MR (2005) Validação de metodologias analíticas. Cadernos de Formação da Ordem dos Farmacêuticos: Ordem dos Farmacêuticos. *Research Opportunities Forum*. 1-34.
50. Imoto M (2004) Validação do Método Multiresíduo para Pesticidas Organohalogenados em Maçã por Cromatografia Gasosa com Captura de Elétrons (GC/ECD) e Cromatografia Gasosa com Espectrometria de Massa (GC/MS). *Tese de Mestrado. Universidade Federal do Paraná*. 1-134.
51. Barreira MJMM (2009) Ocorrência da Patulina em Alimentos destinados a lactantes e crianças: Optimização e validação do método de análise por SPE-HPLC-UV. *Tese de Mestrado. Faculdade de Farmácia da Universidade de Lisboa*. 1-240.
52. Silva RJNB, Dias PMVBF, Camões MFGFC (2012) Development and validation of a grouping method for pesticides analysed in foodstuffs. *Food Chemistry*. 1-12.
53. Kurz MHS (2007) Estudo de Métodos empregando Extração em Fase Sólida e Análise por HPLC-DAD e GC-ECD para a Determinação de Resíduos de Pesticidas em Águas e da Degradação a Campo. *Tese de Doutorado. Universidade Federal de Santa Maria*. 1-161.
54. Imoto MN, Freitas RJS (2008) Determinação dos limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) em análise de resíduos de pesticidas organohalogenados por cromatografia em fase gasosa. *Ecotoxicologia e Meio Ambiente* 18: 35-44.
55. Ribani M, Bottoli CBG, Collins CH, Jardim ICSF, Melo LFC (2004) Validação em Métodos Cromatográficos e Eletroforéticos. *Química Nova* 27(5): 774-780.
56. Wikipédia (2012) [http://pt.wikipedia.org/wiki/Distribuição\\_F\\_de\\_Fisher-Snedecor](http://pt.wikipedia.org/wiki/Distribuição_F_de_Fisher-Snedecor) (Acedido a 31/07/2012).
57. Original da autora (26/06/2012).
58. Caldas SS, Gonçalves FF, Primel EG, Prestes OD, Martins ML, Zanella R (2011) Principais Técnicas de Preparo de Amostras para a Determinação de Resíduos de Agrotóxicos em Água por Cromatografia Líquida com Detecção

- por arranjo de Diodos e por Espectrometria de Massas. *Quimica Nova*. 34(9):1604-1617.
59. Wilkowska A, Biziuk M (2011) Determination of pesticide residues in food matrices using the QuEChERS methodology. *Food Chemistry* 125: 803-812.
60. Furlani RPZ, Marcilio KM, Leme FM, Tfouni SAV (2011) Analysis of pesticide residues in sugarcane juice using QuEChERS sample preparation and gas chromatography with electron capture detection. *Food Chemistry* 126: 1283–1287.
61. Pinho GP, Neves AA, Queiroz MELR, Silvério FO (2009) Efeito de Matriz na Quantificação de Agrotóxicos por Cromatografia Gasosa. *Quimica Nova* 32 (4): 987-995.
62. Baker JT (2004) *Application Note - Extraction of Organochloropesticides from Plant or Animal Tissue*. <http://www.avantormaterials.com/Technical/Technical-Literature-Library/Laboratory-Application-Notes.aspx> (Acedido a 4/06/2012).
63. Paschoal JAR, Rath S, Airoidi FPS, Reyes FGR (2008) Validação de Métodos Cromatográficos para a Determinação de Resíduos de Medicamentos Veterinários em Alimentos. *Quimica Nova* 31 (5): 1190-1198.
64. Santana AKM, Nunes LCC, Medeiros FPM, Silva MJ, Lavra ZMM, Rolim-Neto PJ (2007) Otimização e Validação do Método Analítico Volumétrico para Quantificação de Carbonato de Cálcio. *Journal of Basic and Applied Pharmaceutical Sciences* 28 (2): 177-183.
65. Huber L (1998) Validation of analytical methods: review and strategy. *LC/GC International*. 96-105.
66. Santos AS (2010) Avaliação de Diferentes Sorventes para Extração em Fase Sólida de Pesticidas em Água. *Tese de Mestrado. Universidade Federal de Sergipe*. 1-73.
67. European Food Safety Authority (2011) The 2009 European Union Report on Pesticide Residues in Food. *EFSA Journal* 9(11): 1 – 529.
68. Silva JC (2010) Desenvolvimento de Metodologia Analítica para Determinação de Microcistina – LR e Agrotóxicos em Águas Superficiais utilizando as Técnicas de Cromatografia Líquida e Cromatografia Gasosa acopladas a Espectrometria de Massas. *Tese de Mestrado. Universidade Federal de Ouro Preto*. 1-179.

69. [http://www.inchem.org/documents/pds/pds/pest19\\_e.htm](http://www.inchem.org/documents/pds/pds/pest19_e.htm) (Acedido a 4/07/2012).
70. Halimah M, Pauzi A, SOH SC (2008) Multiresidue Analysis of Organochlorine Pesticides in Oil Matrix using Solid Phase Extraction. *Malaysian Palm Oil Board*. 386: 411-412.
71. FAO (SD) [http://www.fao.org/ag/AGP/AGPP/Pesticid/JMPR/Download/94\\_eva/disulfot.pdf](http://www.fao.org/ag/AGP/AGPP/Pesticid/JMPR/Download/94_eva/disulfot.pdf) (Acedido a 5/07/2012).
72. NIST (2011) <http://webbook.nist.gov/cgi/cbook.cgi?ID=C298044 &Mask=2000> (Acedido a 3/07/2012).
73. [http://www.fao.org/ag/AGP/AGPP/Pesticid/JMPR/Download/98\\_eva/Disulfot.PDF](http://www.fao.org/ag/AGP/AGPP/Pesticid/JMPR/Download/98_eva/Disulfot.PDF) (Acedido a 3/07/2012).