

Desenvolvimento de uma metodologia analítica
para determinação de resíduos de
n-metilcarbamatos em amostras
de origem animal utilizando QuEChERS

João Filipe Silva Sousa

Mestrado em Química Forense

Departamento de Química

Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade de Coimbra



UNIVERSIDADE DE COIMBRA

joaosousa
CONFIDENCIAL

Desenvolvimento de uma metodologia analítica
para determinação de resíduos de
n-metilcarbamatos em amostras
de origem animal utilizando QuEChERS

João Filipe Silva Sousa

Dissertação apresentada para provas de Mestrado em Química, área de es-
pecialização em Química Forense



UNIVERSIDADE DE COIMBRA

Tese realizada sob orientação e coorientação de:

Prof. Dra. Maria Emília Azenha

(Departamento de Química, Faculdade de Ciências e Tecnologia, Universidade de Coimbra)

Prof. Dr. José Sousa Câmara

(Centro de Competências de Ciências Exatas e Engenharia, Universidade da Madeira)

Coimbra, 17 de Julho de 2014

Universidade de Coimbra

"O único lugar onde o sucesso vem antes do trabalho é no dicionário"

Albert Einstein
1879 / 1955

Agradecimentos

Este espaço é dedicado a todos aqueles, que de um modo muito particular, permitiram a realização deste trabalho.

À Prof(a). Dra. Emília Azenha (orientador) pela supervisão e orientação, e sobretudo pela paciência e pela persistência em ter acedido à minha supervisão.

Ao Prof. Dr. José Câmara (co orientador) pela orientação, supervisão, conhecimento e ajuda, amizade e paciência e sobretudo por nunca ter desistido de mim, sabendo das inúmeras dificuldades entretanto ultrapassadas durante os anos em que realizei o trabalho. O meu profundo agradecimento.

Ao Laboratório Regional de Veterinária e Segurança Alimentar (LRVSA), pela hospitalidade e sobretudo pela oportunidade de utilizar as suas instalações, equipamentos, reagentes e todo o material de laboratório necessário à realização do trabalho.

Ao Dr. Paulo Fernandes, Dr. Nelson Barros, Dra. Maria José, Técnico Leonardo Santo, e a todo o pessoal do LRVSA, pela amizade, dedicação e ajuda na orientação durante a difícil tarefa de finalização do trabalho.

Ao Centro de Química da Madeira (CQM)

Aos meus pais, irmão e namorada (futura esposa), pela paciência e dedicação em me terem apoiado no sentido de terminar o trabalho, sem eles nunca teria conseguido chegar ao fim.

Dedicatória

Gostaria de dedicar este trabalho, à Dra. Lúcia Oliveira, Técnica Superior Analista no LRVSA, falecida em Março de 2013.

Foi o seu exemplo de quem nunca desistiu de lutar pela vida, sendo esse o seu principal ideal, viver a vida, que me ajudou a ultrapassar todas as dificuldades, durante a execução deste trabalho.

O Ideal é a Vida (Fernando Pessoa)

A nossa vida sem ideais nenhuns, toda quotidiana, quer no presente quer pelo pensamento do futuro. Perdendo a religião, nada reavemos para a substituir; nem arte, porque a arte é, como religião, para muito poucos; nem ciência, que é para menos ainda, nem filosofia, que é para quase nenhuns.

Não me refiro à conduta mas a ideais. Uma sociedade nunca pode ser grande nem pura sem ideais, porque na moral que nasce, na moral para uso quotidiano e de quotidiana origem, caberá uma certa decência, uma honestidade, razoáveis instintos humanitários, mas não uma nobreza de qualquer espécie, não uma grandeza de carácter. E o ponto importante é este. O ideal é a vida (...).

Abreviaturas

AAS	Espectrometria por absorção atômica
AChE	Acetilcolinesterase
ACN	Acetonitrilo
ADME	Absorção, distribuição, metabolização e excreção
AEPT	Altura equivalente do prato teórico
AIPS	Associação Internacional para a prevenção do suicídio
C18	Octadecilsilano
CARAM	Centro de Abate da Região Autónoma da Madeira
CAS	Registo único no banco de dados de química (<i>Chemical Abstract Service</i>)
CV	Coefficiente de variação
ECD	Detetor por captura de eletrões
EDB	Dibromo etileno
EPA	Agência Americana para a proteção ambiental
FDA	Organização Americana para a Administração da alimentação e drogas
FAO	Organização das Nações Unidas para a Alimentação e Agricultura
ESI	Ionização por electrospray
FIFRA	Lei Federal dos Estados Unidos para inseticidas, fungicidas e rodenticidas.
FLD	Detetor por fluorescência
GC	Cromatografia gasosa
HPLC	Cromatografia líquida de alta eficiência
INML	Instituto Nacional de Medicina Legal
IR	Infravermelhos
LD₅₀	Dose letal
LLE	Extração Líquido Líquido
LOD	Limite de deteção
LOQ	Limite de quantificação
LRVSA	Laboratório Regional de Veterinária e Segurança Alimentar
MMR	Método multiresíduos
MRL	Limite máximo de resíduo
MS	Espectrometria de massa
NPD	Detetor de fósforo / azoto
OMS	Organização mundial de saúde
OPA	Ortoftaldeído
PI	Padrão interno
PSA	Amina primária e secundária
QuEChERS	do inglês <i>Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe</i> .
r²	Coefficiente de determinação da reta

RAM	Região Autónoma da Madeira
RL	Limite de reporte
RSD	Desvio padrão relativo
S	Desvio padrão
s²	Variância
SMR	Método para um só resíduo
SNC	Sistema nervoso central
SPE	Extração em fase sólida
t^{1/2}	Tempo de meia vida
Teste F	Teste de Fischer
Teste t	Teste t Student
TLC	Cromatografia em camada fina
t_R	Tempo de retenção
TRR	Tempo de retenção relativo
UE	União Europeia
UV	Ultra violeta

Resumo

Neste trabalho estudou-se e desenvolveu-se um método analítico para detecção e quantificação de *n*-metilcarbamatos em amostras de origem animal, baseado na extração dos analitos pelo método QuEChERS (**Q**uick, **E**asy, **C**heap, **E**ffective, **R**ugged and **S**afe) seguida de análise por cromatografia líquida de alta pressão com detetor de fluorescência (HPLC-FLD) com derivatização automática pós-coluna (*pickering*). Na primeira fase do trabalho, testou-se a eficiência do método extrativo, para os *n*-metilcarbamatos alvo. No desenvolvimento do método observou-se a necessidade de concentrar o extrato, o que foi conseguido por rotoevaporação, e reconstituído com a fase móvel inicial, água: acetonitrilo (H₂O:ACN, 90:10).

As melhores condições experimentais para a extração dos *n*-metilcarbamatos por QuEChERS foram obtidas usando 15 g de amostra e 10 mL de solvente extrator (ACN, acidificado com 1% de ácido acético (CH₃COOH)), 1 g de cloreto de sódio (NaCl), 4 g sulfato de magnésio (MgSO₄), 1 g de citrato de sódio tribásico dihidratado (C₆H₅Na₃O₇·2H₂O) e 0,5 g de citrato de sódio dibásico sesquihidratado (C₆H₆Na₂O₇·1.5H₂O) como sais para potenciarem o efeito de “*saltin-out*” no processo de partição.

A separação dos *n*-metilcarbamatos foi efetuada usando uma coluna capilar, para análise de carbamatos (C8 250 mm × 4.0 mm, 5 μm *particle size*), *Pickering Laboratories*, e a detecção foi feita com recurso ao detetor de fluorescência (FLD) após hidrólise e derivatização dos *n*-metilcarbamatos, no reator do sistema de derivatização automático (*Pickering* PCX), através do hidróxido de sódio (NaOH) a 100 °C seguida de reação com orto-ftaldeído (OPA) e 2-mercaptoetanol (C₂H₆OS).

Os resultados obtidos mostraram uma boa linearidade na gama da concentração estudada (0,03 – 0,30 mg kg⁻¹) com coeficientes de correlação superiores a 0,9994 e uma percentagem de recuperação entre 74% (aldicarbe sulfóxido) e 115% (metomil) para todos os *n*-metilcarbamatos nos três níveis de concentração (0,06; 0,18; 0,30 mg kg⁻¹). A repetibilidade e a precisão intermédia dos ensaios foi satisfatória com valores de % CV, inferiores a 1 % para ambos os parâmetros.

Os limites de detecção (0,0017 – 0,0084 mg kg⁻¹) e os limites de quantificação (0,0055 – 0,028 mg kg⁻¹) evidenciam a boa sensibilidade do método, para a análise de resíduos de *n*-metilcarbamatos em amostras de origem animal.

Abstract

In this work we studied and developed an analytical method for detection and quantification *n*-methylcarbamates in animal samples, based on the extraction of analytes by QuEChERS method (**Q**uick, **E**asy, **C**heap, **E**ffective, **R**ugged and **S**afe) and analysis by high pressure liquid chromatography using a fluorescence detector (HPLC-FLD) with post column, automatic derivatization (*Pickering*).

In the first phase of this work, we tested the efficiency of the extraction method, for the target *n*-methylcarbamates. In the development of this method was observed that it is necessary to concentrate the extract, which was obtained by rotoevaporation, and reconstituted with the initial mobile phase water: acetonitrile (H₂O: ACN 90:10). Optimum conditions for the extraction of *n*-methylcarbamates QuEChERS were obtained by using 15 g of sample and 10 mL of extractor solvent (ACN, acidified with 1% of acetic acid (CH₃COOH)), 1 g of sodium chloride (NaCl), 4 g magnesium sulfate (MgSO₄), 1 g of sodium citrate tribasic dihydrate (C₆H₅Na₃O₇ • 2H₂O) and 0.5 g of sodium citrate dibasic sesquihydrate (C₆H₆Na₂O₇ • 1.5H₂O) and salts potentiate the effect of "salting-out" in the partitioning process.

Separation of *n*-methylcarbamates was performed using a capillary column for analysis of carbamates (C8 250 mm × 4.0 mm, 5 mM particle size), Pickering Laboratories, and detection was performed with use of a fluorescence detector (FLD) after hydrolysis and derivatization of *n*-methylcarbamates in the reactor automatic derivatization (*Pickering* PCX) system by sodium hydroxide (NaOH) at 100 ° C followed by reaction with OPA and 2-mercaptoethanol (C₂H₆OS).

The results showed good linearity in the concentration range studied (0,03 to 0,30 mg kg⁻¹) with coefficients of correlation above 0,9994 and a recovery between 74% (aldicarb sulfoxide) and 115% (methomyl) for all the three *n*-methylcarbamates levels concentration (0,06; 0,18; 0,30 mg kg⁻¹). The repeatability and precision of the tests was satisfactory with values of % CV, below 1%.

The detection limits (0,0017 to 0,0084 mg kg⁻¹) and quantification limits (0,0055 to 0,028 mg kg⁻¹) show the good sensitivity of the methods for the analysis of waste *n*-methylcarbamatates in samples of animal origin.

(Esta Página foi deixada propositadamente em branco)

Objetivo

O objetivo deste trabalho é o de desenvolver uma metodologia analítica para a determinação de resíduos de pesticidas *n*-metilcarbamatos em amostras de origem animal, nomeadamente em músculo de suíno, com base no procedimento extrativo QuEChERS e com deteção por HPLC-FLD.

Foi utilizado como método de partida para o desenvolvimento deste trabalho, o método interno de análise de resíduos *n*-metilcarbamatos em amostras vegetais, **IT.MP.DSLA.01.26**, da divisão de análise de resíduos, do laboratório regional de veterinária e segurança alimentar da Região Autónoma da Madeira (LRVSA), já validado e utilizado em rotina.

Inicialmente o método QuEChERS, foi implementado para a determinação de resíduos de pesticidas em amostras de origem vegetal, sendo que são poucos os trabalhos divulgados no desenvolvimento deste método para a determinação de resíduos de pesticidas em amostras de origem animal.

Pretende-se que este método seja posteriormente implementado em rotina, na análise de *n*-metilcarbamatos em amostras de origem animal, que traga vantagens no que diz respeito ao aumento da capacidade analítica do laboratório, ao tempo de análise, custo e simplicidade de execução, comparação de eventuais resultados obtidos, e a eventual utilização em procedimentos analíticos com objetivos forenses, como sendo o despiste de intoxicações por pesticidas em animais domésticos e selvagens.

Índice de Figuras

Fig. 1.1 <i>Phytophthora infestans</i> ou míldio da batateira.....	27
Fig. 1.2 Frequência do uso de pesticidas (ton.) no Brasil e Índia	28
Fig. 1.3 Introdução dos resíduos de pesticidas na cadeia alimentar	29
Fig. 1.4 Venda de pesticidas entre 2000 e 2007 em Portugal continental e ilhas.....	35
Fig. 1.5 Venda de pesticidas entre 2000 e 2007 em Portugal continental e ilhas, por função	36
Fig. 1.6 Índice de risco de utilização de pesticidas em Portugal continental e ilhas.....	37
Fig. 1.7 Estruturas gerais: (a) Ácido carbâmico; (b) <i>n</i> -metilcarbamatos.	38
Fig. 1.8 Mecanismo de sinapse.....	45
Fig. 1.9 Hidrólise da acetilcolina pela AChE.	46
Fig. 1.10 Mecanismo de inibição da AChE.....	47
Fig. 2.1 Esquema geral de um MRM.....	52
Fig. 2.2 Diagrama esquemático representativo da extração líquido-líquido (LLE).....	53
Fig. 2.3 Sequência da extração por fase sólida (SPE)	54
Fig. 2.4 Método original do QuEChERS.	56
Fig. 2.5 Esquema geral do método QuEChERS utilizado no trabalho desenvolvido	57
Fig. 2.6 Extrato da matriz obtido após extração com ACN acidificado com 1% de ácido acético, com adição da “mistura QuEChERS” e com posterior centrifugação	58
Fig. 2.7 Influência do pH na eficiência de extração por QuEChERS.	59
Fig. 2.8 Metodologia do <i>Salting in</i> e <i>Salting out</i>	60
Fig. 2.9 Estrutura do PSA.....	61
Fig. 2.10 Extrato obtido após a fase dSPE com adição de PSA e MgSO ₄ e posterior centrifugação.....	61

Fig. 2.11 Princípio da separação cromatográfica.....	62
Fig. 2.12 Cromatografia em fase normal, fase móvel de polaridade baixa.....	63
Fig. 2.13 Cromatografia em fase reversa, fase móvel de polaridade alta.....	63
Fig. 2.14 Esquema da cromatografia líquida (HPLC).....	64
Fig. 2.15 Esquema da Cromatografia gasosa (GC).....	65
Fig. 2.16 Esquema de um detetor FPD.....	65
Fig. 2.17 Esquema de um detetor UV.....	66
Fig. 2.18 Esquema de um detetor FLD.....	66
Fig. 2.19 Desgaseificação do sistema de solventes em HPLC.....	68
Fig. 2.20 Diagrama esquemático utilizado neste trabalho, mostrando os componentes de um sistema HPLC-FLD, com derivatização automática pós-coluna.....	69
Fig. 2.21 Estrutura da fase estacionária da coluna C8.....	69
Fig. 2.22 Excitação e fluorescência molecular.....	71
Fig. 2.23 Modos de transformação do estado excitado molecular.....	72
Fig. 2.24 Reação do OPA com a histamina, resultando num composto fluorescente.....	73
Fig. 2.25 (a) Sistema de derivatização pré coluna; (b) Sistema de derivatização pós coluna.....	74
Fig. 2.26 Esquema da reação de derivatização de um <i>n</i> -metilcarbamato.....	75
Fig. 2.27 Matriz não fortificada.....	79
Fig. 2.28 Exemplo de cromatograma de um padrão 100% em ACN.....	79
Fig. 2.29 Exemplo de um cromatograma, com a matriz fortificada.....	80
Fig. 2.30 Curva de calibração para determinação da linearidade do método.....	81
Fig. 3.1 Preparação das soluções de trabalho.....	90
Fig. 3.2 Músculo de suíno cortado em cubos e congelado posteriormente.....	91
Fig. 3.3 Trituração / homogeneização da amostra.....	91

Fig. 3.4 Pesagem do músculo de suíno, previamente homogeneizado	93
Fig. 3.5 Fase de extração, matriz com ACN acidificado (1% de CH ₃ COOH)	94
Fig. 3.6 Fase da extração líquido-sólido 1 - “mistura QuEChERS”; 2 – 6,5 g da “mistura QuEChERS”; 3 e 4 – agitação e centrifugação.	95
Fig. 3.7 Resultado após o procedimento de extração QuEChERS antes do “clean-up”	95
Fig. 3.8 Fase do “ <i>Clean up</i> ” 1 e 2 – pipetar 3 mL do sobrenadante; 3 – colocar num tubo teflon de 10 mL; 4 – adição de 600 mg de MgSO ₄ e 200 mg de PSA; 5 – Agitação e centrifugação	96
Fig. 3.9 Evaporação e reconstituição do sobrenadante	96
Fig. 3.10 HPLC 1200 series da Agilent e Pinnacle PCX da Pickering	97
Fig. 4.1 Diluições para estudo das soluções padrões dos <i>n</i> -metilcarbamatos	100
Fig. 4.2 Solução padrão a 0,03 mg L ⁻¹ , 1 – aldicarbe sulfóxido, 2 – oxamil, 3 – metomil, 4 – 3-hidroxicarbofurão, 5 – aldicarbe, 6 – propoxur, 7 – carbofurão, 8 – carbaril, 9 – metiocarbe	101
Fig. 4.3 Procedimento para o estudo da seletividade do método	102
Fig. 4.4 Matriz sem fortificação (cromatograma a vermelho) e matriz fortificada 0,06 mg kg ⁻¹ (cromatograma a azul) em músculo de suíno. 1 – aldicarbe sulfóxido, 2 – oxamil, 3 – metomil, 4 – 3-hidroxicarbofurão, 5 – aldicarbe, 6 – propoxur, 7 – carbofurão, 8 – carbaril, 9 – metiocarbe	102
Fig. 4.5 Curvas de Calibração e gráficos de resíduos dos vários <i>n</i> -metilcarbamatos em músculo de suíno	105
Fig. 4.6 Procedimento experimental relativo ao calculo do efeito matriz.	107
Fig. 4.7 Procedimento experimental relativo à avaliação da precisão	111

Fig. 4.8 Procedimento na determinação da exatidão	115
Fig. 4.9 Percentagem de recuperação utilizada para o cálculo da exatidão	117
Fig. 4.10 Cromatogramas obtidos, da análise de amostras de músculo de suíno, obtidas em três superfícies comerciais distintas	119
Fig. A.1 Cromatogramas obtidos, da análise do padrão do Aldicarbe sulfóxido e Oxamil.....	138
Fig. A.2 Cromatogramas obtidos, da análise do padrão do Metomil e 3-hidroxicarbofurão.	139
Fig. A.3 Cromatogramas obtidos, da análise do padrão do Aldicarbe e Propoxur.....	140
Fig. A.4 Cromatogramas obtidos, da análise do padrão do Carbofurão e Carbaril	141
Fig. A.5 Cromatogramas obtidos, da análise do padrão do Metiocarbe.....	142

Índice de Tabelas

Tabela 1.1 Algumas categorias de pesticidas	24
Tabela 1.2 Categorias de toxicidade.....	31
Tabela 1.3 MRL's estipulados na diretiva europeia No 396/2005, utilizados como referência neste trabalho	33
Tabela 1.4 Produtos alimentares, monitorizados na UE no período de 2010 - 2012.....	34
Tabela 1.5 <i>n</i> -metilcarbamatos estudados neste trabalho	38
Tabela 1.6 Algumas características dos <i>n</i> -metilcarbamatos estudados	41
Tabela 2.1 Vários tipos de detetores disponíveis para uso em HPLC	70
Tabela 2.2 Etapas envolvidas no desenvolvimento de um método de HPLC/FLD	78
Tabela 2.3 Parâmetros a estudar num procedimento de validação de um método analítico.....	77
Tabela 3.1 Condições utilizadas em HPLC e PCX Pinnacle	98
Tabela 3.2 Gradiente das fases móveis.....	98

Tabela 4.1 Tempos de retenção dos nove <i>n</i> -metilcarbamatos obtidos a partir da injeção direta da solução padrão com concentração de 0,03 mg L ⁻¹	101
Tabela 4.2 Resultados relativos ao cálculo da curva de calibração para cada um dos nove <i>n</i> -metilcarbamatos.....	106
Tabela 4.3 Resultados relativos ao cálculo do efeito matriz, através dos testes <i>F</i> (Fischer) e <i>t</i> (Student) para cada um dos nove <i>n</i> -metilcarbamatos.....	108
Tabela 4.4 Resultados obtidos no estudo do parâmetro de validação do LOD e LOQ para os nove <i>n</i> -metilcarbamatos	109
Tabela 4.5 Estudo da repetibilidade (nº de replicados = 9)	112
Tabela 4.6 Estudo da precisão intermédia (nº de replicados = 9 com um analista diferente).....	113
Tabela 4.7 Estudo da exatidão / recuperação do método	116
Tabela A.1 Propriedades de alguns solventes utilizados em HPLC	113
Tabela A.2 Marca, pureza e validade dos padrões analíticos utilizados.....	113
Tabela A.3 Estudo da Linearidade e cálculo da curva de calibração.....	134
Tabela A.4 Limites de deteção e quantificação	135

Tabela A.5 Limites de detecção e quantificação.....	153
Tabela A.6 Calculo do efeito de matriz, através do Teste F (Fischer) para o Oxamil.....	136
Tabela A.6 Limites de detecção e quantificação.....	137

Índice

Agradecimentos	II
Dedicatória	III
Abreviaturas	IV
Resumo	VI
Abstract.....	VIII
Objetivo	XI
Índice de Figuras	XII
Índice de Tabelas.....	XVI

Capítulo I

23

1. Introdução.....	24
1.1 Perspectiva Histórica.....	24
1.2 Problemática social e ambiental.....	27
1.2.1 Problemática social e ambiental.....	34
1.3 <i>n</i> - metilcarbamatos	37
1.4 Mecanismo de toxicidade dos <i>n</i> -metilcarbamatos.	42
1.4.1 Farmacodinâmica e Farmacocinética dos <i>n</i> -metilcarbamatos.....	42
A. Absorção	43
B. Distribuição	43
C. Metabolismo.....	43
D. Eliminação	44
1.4.2 Toxicidade dos <i>n</i> -metilcarbamatos.....	45

Capítulo II	49
2 Metodologias Aplicadas	50
2.1 Métodos de análise de pesticidas	50
2.2 Método de extração QuEChERS.....	51
2.3 Química do QuEChERS	57
2.3.1 Salting in Salting out.....	60
2.4 Cromatografia.....	62
2.5 Cromatografia líquida de alta pressão (HPLC).....	67
2.6 Detecção por Fluorescência.....	70
2.7 Desenvolvimento e validação de métodos analíticos.....	75
2.7.1 Especificidade / Seletividade.....	78
2.7.2 Linearidade e definição da gama de trabalho.....	82
2.7.3 LOD e LOQ	84
2.7.4 Precisão.....	82
2.7.5 Exatidão.....	84
Capítulo III	87
3 Procedimento Experimental	88
3.1 Material.....	88
3.2 Preparação das soluções e amostras.....	89
3.2.1 Soluções padrão.....	89
3.2.2 Amostras.....	90
3.2.3 Processamento da Amostra.....	91
3.3 Procedimento de extração QuEChERS.....	93

3.4 Análise pós HPLC-FLD com derivatização automática pós coluna. 97

Capítulo IV 99

4 Resultados e Discussão 100

4.1 Estudo das soluções padrão dos *n*-metilcarbamatos em ACN..... 100

4.2 Seletividade 102

4.3 Linearidade do método 103

4.3.1 Efeito Matriz 107

4.4 Determinação do LOD e LOQ..... 109

4.5 Precisão 110

4.6 Exatidão. 114

4.7 Aplicabilidade em amostras reais..... 118

Capítulo V 120

Conclusões 121

Bibliografia 124

Anexo 132

(Esta Página foi deixada propositadamente em branco)

Capítulo I

1. Introdução.

1.1 Perspetiva Histórica.

Os pesticidas podem ser definidos como qualquer substância ou mistura de substâncias químicas, sintéticas ou naturais, usadas com intuito de prevenir, destruir, repelir ou mitigar qualquer praga [1]. Podem ser agrupados em várias categorias tendo por base o seu modo de ação (os rodenticidas, acaricidas, inseticidas, herbicidas, etc.) ou á sua natureza química (organofosforados, organoclorados, carbamatos, bupiridilos, etc.) (Tabela 1.1) [1] [2].

Tabela 1.1 Algumas categorias de pesticidas [2].

Classe	Grupo Químico	Designação Comercial
Algicida	Organoestânicos	<i>Brestar</i> [®]
Fungicida	Dicarboximida	<i>Captana</i> [®]
Herbicida	Triazinas	<i>Atrazina</i> [®]
Nematocida	Alcanos halogenados	<i>EDB</i> [®]
Inseticida	Carbamatos	<i>Carbari</i> [®]
Acaricidas	Formamidina	<i>Clordimeform</i> [®]

Estes produtos, ocupam atualmente uma posição importante na classe de produtos químicos mais usados pelo homem, como aliados no combate às mais variadas pragas, auxiliando o homem em áreas tão importantes como a segurança alimentar, ambiental e saúde pública. Por inerência ao seu grande consumo e utilização as consequências do uso destes produtos constituem um grande problema atual, devido a questões ambientais e de saúde pública causados pela sua utilização em grande escala.

De facto, embora com objetivo de ação muito concreto e distinto, a maioria dos pesticidas não são seletivos, aumentando assim consideravelmente o seu raio de ação, permitindo uma maior eficácia no seu objetivo final [3]. Contudo, e devido a esta forma de ação, os pesticidas poderão, na sua maioria, causar efeitos tóxicos adversos às espécies “não alvo”, como sejam, plantas, animais e até o próprio homem.

Embora a sua toxicidade seja uma certeza no que concerne aos mamíferos, a sua utilização é tida muitas vezes como necessária para fazer face a muitas necessidades do homem, incluindo o combate a pragas que colocam em risco a subsistência das culturas, a segurança alimentar e veterinária, a saúde pública, e destruindo vetores minimizando dessa forma a transmissão e progressão de várias doenças. Prova disso, são os registos das primeiras utilizações de produtos auxiliares do homem na agricultura como repelentes de pragas. Em 1500 A.C, *Ebers Papyrus*, registou várias formas de repelir insetos, em 1000 A.C, *Homero*, utilizava pó de enxofre como repelente, em 40-90 D.C, um farmacologista grego-romano *Pedânio Dioscórides*, regista pela primeira vez, os efeitos tóxicos do arsénio e enxofre, utilizados já como “pesticidas” [2] [4].

A partir de então outros registos houveram sobre vários minerais utilizados como pesticidas, como sendo, o cobre com propriedades fungicidas, através da mistura conhecida como calda bordalesa “*bordeaux mixture*” (cal apagada e sulfato de cobre), utilizado pela primeira vez em França em 1854, o hidrocianeto, utilizado pelos egípcios e romanos como fumigante em 1877, como auxiliar no combate a pragas de térmitas que assolavam os museus, destruindo a madeira dos mesmos. Os pesticidas desta forma, iriam tomando o seu lugar na utilidade diária do homem, sendo que até ao à década de 30 eram sobretudo feitos com base em produtos naturais ou inorgânicos à base de plantas ou pó de minerais encontrados na natureza [2] [4].

Entre 1935 e 1950, desenvolveram-se a maior classe de pesticidas, nomeadamente os inseticidas, tão necessários para o combate a pragas que assolavam as culturas e colocavam em risco a subsistência das populações. Em 1939 *Paul Müller*, descobriu os efeitos inseticidas, no que haveria de ser o pesticida (inseticida) mais popular até aos dias atuais, o diclorodifeniltricloroetano (DDT), um organoclorado, foi comerciali-

zado pela primeira vez em 1942, e teve logo um efeito positivo no controlo da epidemia do tifo e malária, mitigando os seus vetores. Juntamente com o DDT, outros pesticidas organoclorados foram descobertos na década de 40 como o lindano, o lordano, o heptacloro, a aldrina e a dieldrina [4].

No seguimento do sucesso obtido pelos organoclorados, houve necessidade de otimizar a eficácia dos inseticidas cujos efeitos tóxicos adjacentes não fossem tão colaterais como verificados com o DDT. Assim já nos finais dos anos 30, *Gebard Schrader*, químico alemão e considerado o pai dos organofosforados, sintetizou pela primeira vez o primeiro organofosforado o tetraetilpirofosfato (TEPP), comercializado pela primeira vez em 1944, mas sem muito sucesso, visto que a sua estabilidade em meio aquoso ditou o fim da sua utilização. Contudo, e quase em simultâneo, *Schrader* sintetizou alguns dos mais importantes organofosforados, como por exemplo o paratión, utilizado como um potente inseticida e acaricida, e praticamente inócuo para o meio ambiente, aliás uma das vantagens em relação aos organoclorados é a sua pouca bioacumulação e facilidade de biodegradação [4].

Embora os organofosforados sejam efetivamente mais biodegradáveis e pouco bioacumuláveis no que concerne ao meio ambiente, são de extrema toxicidade para os organismos não alvo, principalmente para os mamíferos onde se inclui o homem. Foi devido à sua extrema toxicidade para os mamíferos, que foram desenvolvidos organofosforados como o sarin, soman e tabun como “armas” de destruição massiva [4] [5].

Devido à toxicidade dos organoclorados e organofosforados, houve necessidade de formular novos pesticidas, cujos efeitos sobre o ambiente e o homem não fossem tão colaterais, e simultaneamente apresentassem uma elevada eficácia para com os organismos alvo. Assim, nos anos 50 começaram-se a sintetizar os carbamatos e os piretróides, ambos com menos impacto ambiental [2].

1.2 Problemática social e ambiental.

A utilização dos pesticidas é vasta e à semelhança de outros produtos químicos, há que considerar o balanço paradoxal entre os benefícios e riscos inerentes ao uso de pesticidas, para a saúde humana, degradação e qualidade ambiental.

Como exemplo dos benefícios dos pesticidas, existem os que controlam e mitigam a maioria dos vetores transmissores de doenças como a malária, tifo, dengue, filária, febre-amarela, encefalite viral, e muitas outras, sendo por isso indispensáveis no nosso quotidiano. No que respeita ao grande contributo dos pesticidas com benefícios para a população temos, como exemplo, a grande fome de 1845-1849 na Irlanda, em que a população irlandesa diminuiu em cerca de 25%, devido à morte de cerca de um milhão de irlandeses, bem como à emigração forçada de mais de um milhão, devido ao omiceto - *phytophthora infestans*, ou míldio da batateira (Fig. 1.1), um fungo que contaminou em larga escala a cultura da batata em toda a Europa, dizimando praticamente toda a plantação deste tubérculo na Irlanda [1] [2].



Fig. 1.1 *Phytophthora infestans* ou míldio da batateira.

Atendendo a que um terço da população irlandesa dependia única e exclusivamente da cultura da batata como meio de sobrevivência, a fome devastou grande parte da população. Certamente que a existência de um fungicida eficaz, tal como acontece atualmente, no controlo deste fungo, poderia ter evitado um número tão elevado de mortes.

Os herbicidas, são de extrema importância em casos de desflorestação e revitalização de campos agrícolas para evitar o aparecimento de pragas e infestantes arbóreas que possam “roubar” nutrientes às culturas principais. Outro dos exemplos mais significativo da importância e do efeito paradoxal entre benefício e risco atual dos pesticidas, foi o uso do DDT como controlador do vetor causador do tifo e da malária.

Certamente que os benefícios dos pesticidas não são de modo algum pretexto para o seu uso indiscriminado. Com o aparecimento de problemas de saúde relacionados com o uso de pesticidas, começaram a ser estudados os impactos que os mesmos teriam a longo prazo no ambiente e nos organismos vivos [2] [5].

O aumento da frequência das intoxicações em animais e até no próprio homem, relacionadas com a exposição aos pesticidas tornaram-se mais comuns, principalmente nos países onde a agricultura em larga escala é mais acentuada e massificada. Como exemplo descrevemos na Fig. 1.2, a frequência do uso de pesticidas (em toneladas) no Brasil e Índia [8] [9] [11].

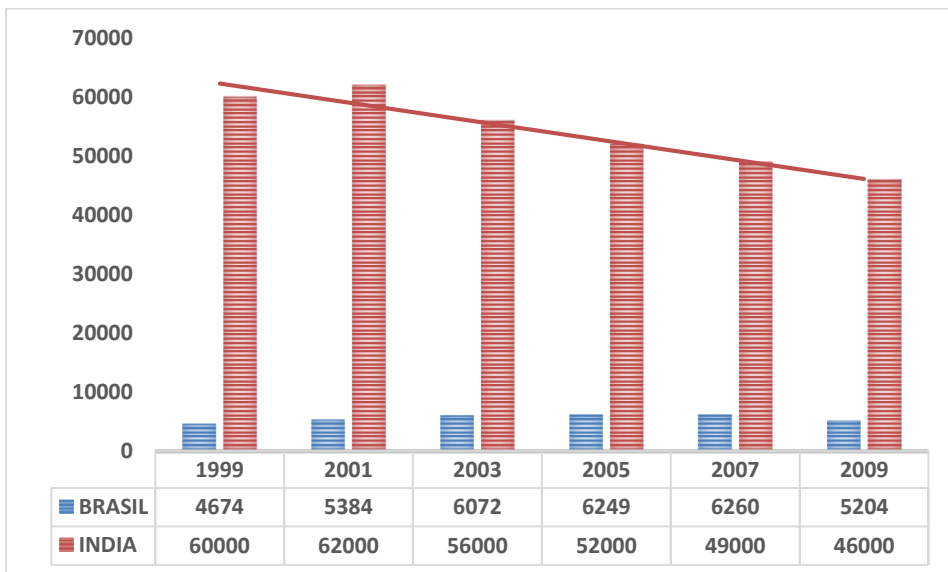


Fig. 1.2 Frequência do uso de pesticidas (ton.) no Brasil e Índia [11].

O uso massificado de pesticidas levanta outra problemática, a contaminação de águas subterrâneas. A lixiviação¹ é o principal mecanismo de “transporte” dos resíduos dos pesticidas e seus metabolitos até aos lençóis freáticos e cursos de água, grande parte dessa “poluição” é devida à pulverização de campos agrícolas, etc. Esta problemática, leva à contaminação da biosfera circundante, e conseqüentemente toda a cadeia alimentar que dela depende, terminando com a contaminação de produtos finais destinados ao consumo humano (Fig. 1.3) [2] [4] [5].

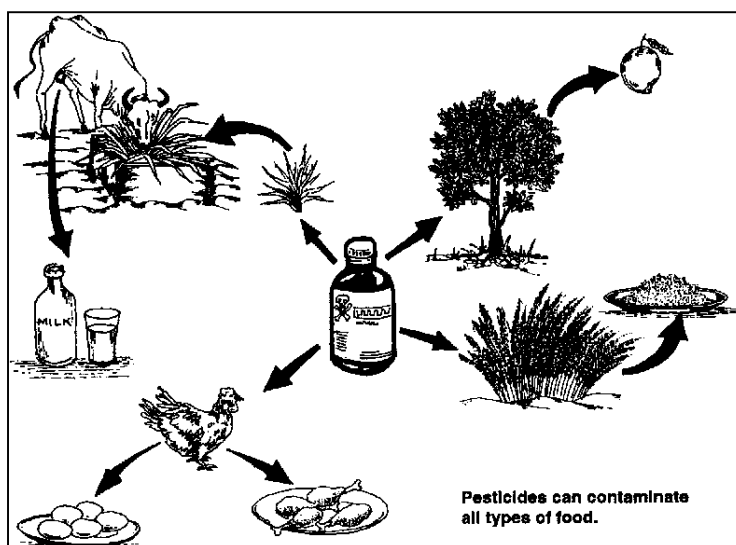


Fig. 1.3 Introdução dos resíduos de pesticidas na cadeia alimentar [11].

Os pesticidas, podem também afetar os ecossistemas através da sua forma de residual, que podem permanecer durante largos períodos quer no solo quer nos sistemas aquáticos. Muitas das vezes, estes mesmos resíduos são absorvidos pela vegetação, constituindo assim um grande fator de risco no que concerne à segurança ambiental e alimentar [5] [6] [7]. Em muitos casos a vegetação utilizada em rações animais podem possuir esses resíduos, fazendo com que passem a constar de alimentos tão essenciais para o homem como leite, ovos, carne, entre outros [7].

¹ É o processo de extração de uma substância ou substâncias, através da sua dissolução num líquido.

As reações que levam os pesticidas a se transformarem em resíduos, que posteriormente possam entrar na cadeia alimentar resultam em alterações na sua estrutura química, que podem torná-los persistentes. Do ponto de vista ambiental o destino ideal para um pesticida é a transformação em espécies inorgânicas, como água, dióxido de carbono, etc, infelizmente, em muitos casos, as espécies químicas resultantes são intermediárias com elevado tempo de meia vida ($t^{1/2}$), que podem ter um impacto negativo no meio ambiente [1] [2].

Assim, o processo de degradação dos pesticidas deve ser tido em conta aquando da sua aquisição e aplicação. Este processo depende de vários fatores, nomeadamente de natureza química, física e/ou biológica, e pode ocorrer pelas seguintes vias [2] [4] [5]:

- **Hidrólise** – normalmente resulta na formação de uma nova ligação C-OH ou C-H. Este processo é importante em algumas classes de pesticidas como os organofosforados e carbamatos onde se incluem os *n*-metilcarbamatos.
- **Oxidação - redução** – são reações químicas ou biológicas que envolvem a transferência de eletrões, sendo muitas destas reacções induzidas fotocataliticamente.
- **Biodegradação** – este tipo de degradação é induzida por microrganismos que transformam e metabolizam alguns dos pesticidas, mesmo os mais persistentes.
- **Fotodegradação** – este tipo de degradação é induzido pela luz solar, sendo que os pesticidas podem reagir diretamente a luz, ou podem reagir² secundariamente com espécies químicas reativas, fotoactivadas pela luz solar.

Além da problemática referente à segurança alimentar, os pesticidas começaram a ser utilizados também em etiologias médico legais, nomeadamente em intoxicações crónicas em contexto de trabalho agrícola e em intoxicações acidentais ou propositadas, como os suicídios. Dados da Organização Mundial de Saúde (OMS), revelam que os pesticidas são os principais produtos utilizados nos casos de suicídio em todo o

² Esta reação é denominada de fotólise

mundo. Todos os anos morrem por suicídio cerca de 900 000 pessoas em todo o mundo recorrendo a pesticidas [11] [12].

Atendendo à problemática atrás descrita e no que concerne ao uso em larga escala dos pesticidas, a união europeia (UE) teve necessidade de legislar e manter uma posição firme em relação à legislação aplicável aos pesticidas comercializados. A diretiva 91/414/CEE, de 15-04-1991 veio dar início à forte legislação aplicável aos pesticidas, ou fitofarmacêuticos³, que determina, que um pesticida agrícola só pode ser homologado, e com autorização de comercialização, com base na avaliação de um conjunto de dados científicos que demonstrem que a substância ativa utilizada na fabricação de pesticidas é eficaz para os fins a que se destina e não apresente riscos inaceitáveis para a saúde humana, animal e para o ambiente, tendo em conta os níveis de LD₅₀ (mg kg⁻¹) (Tabela 1.2) [10] [13]. Dos diversos parâmetros necessários a homologação de uma substância ativa estão [1] [10]:

- Solubilidade e persistência na água;
- Persistência no solo;
- Toxicidade aguda para os organismos aquáticos;
- Toxicidade para os organismos terrestres;
- Toxicidade para o homem;

Tabela 1.2 Categorias de toxicidade [1] [10].

Categoria	Oral		Dérmica	
	LD ₅₀ (mg/kg)	Nível Risco	LD ₅₀ (mg/kg)	Nível Risco
Categoria 1	<5	Fatal	<5	Fatal
Categoria 2	5-50	Fatal	50-200	Fatal
Categoria 3	50-300	Tóxico	200-1000	Tóxico
Categoria 4	300-2000	Nocivo	1000-2000	Nocivo
Categoria 5	2000-5000	Pode ser nocivo	2000-5000	Pode ser nocivo

³ Os produtos fitofarmacêuticos são substâncias ou preparações utilizadas para proteger plantas ou produtos agrícolas, denominadas de pesticidas.

A aprovação de uma substância ativa, na formulação de pesticidas, também está condicionada pela diretiva 2000/60/CE, denominada como “diretiva da água”, ou seja, quando os critérios de aprovação do uso de uma determinada substância ativa já não são cumpridos (91/414/CEE), ou quando o cumprimento da diretiva 2000/60/CE não é respeitado, a substância ativa deixa de estar autorizada no fabrico de pesticidas [1] [11]. Os dados que condicionam a homologação das substâncias ativas devem ser cedidos pelas empresas produtoras de pesticidas, utilizando para isso, laboratórios independentes e com idoneidade para a realização destes testes, sendo depois revelados à comissão avaliadora na UE. Assim a UE dispõe atualmente de uma base de dados, onde constam muitas das substâncias ativas utilizadas na formulação de pesticidas em toda a UE, que poderá ser consultada e verificado se as substâncias ativas estão ou não autorizadas no espaço Europeu. Contudo, e em benefício da segurança na utilização destas substâncias, a UE estabeleceu um prazo de 15 anos de aprovação das substâncias ativas, sendo que este prazo é proporcional aos eventuais riscos inerentes à sua longa utilização, e aos problemas inerentes ao longo período de utilização no meio ambiente [1] [10].

Além da proibição da utilização de pesticidas sem homologação por parte das entidades competentes de cada país, nomeadamente pelas comissões avaliadoras, que em Portugal é representada pela Direção Geral de Agricultura e Desenvolvimento Rural (DGADR), a UE foi mais longe, e implementou um conjunto de limites máximos de resíduos (MRL) (Tabela 1.3), que constituem os limites aceitáveis de resíduos de pesticidas em alimentos, de origem vegetal, animal ou processados, sem apresentar risco para a saúde humana ou animal. Estes níveis são constantemente atualizados, e constam de um relatório anual, emitido pela federação europeia para a segurança alimentar (EFSA), de onde constam, os MRL de cada substância ativa atualmente permitida, os estudos interlaboratoriais realizados para a convergência dos métodos utilizados e monitorização das substâncias utilizadas [10] [14] [15].

Tabela 1.3 MRL's estipulados na diretiva europeia No 396/2005, utilizados como referência neste trabalho [10][16].

Designação	MRL em músculo de suíno	Regulamento - UE
	mg kg ⁻¹	
Aldicarbe sulfóxido	0,01	
Oxamil	-	
Metomil	0,02	
3-Hidroxicarbofurão	0,01	Regulamento (CE) n.º 396/2005 do Parlamento Europeu e do Conselho, de 23 de Fevereiro de 2005
Aldicarbe	0,01	
Propoxur	0,05	
Carbofurão	0,01	
Carbaril	0,05	
Metiocarbe	0,05	

De acordo com a legislação em vigor (aprovada em 2010), alguns membros da UE, incluindo Portugal, participam em programas nacionais na determinação de resíduos de pesticidas, que posteriormente são reportados à EFSA. As normas legais atuais que orientam os procedimentos analíticos subordinados a esta problemática, são orientados pela diretiva n.º 882/2004 CE ⁴, que determinam, por exemplo, os alimentos a avaliar [10][15][16] (Tabela 1.4).

⁴ Diretiva EC N.º 882/2004 de 29-04-2004, OJ L 165, 30.4.2004, p. 1-141

Tabela 1.4 Produtos alimentares, monitorizados na UE no período de 2010 - 2012 [10] [15].

2010	2011	2012
Maçã	Feijão sem casca	Beringela
Repolho	Cenoura	Banana
Alho porro	Pepino	Manteiga
Alface	Carne de aves	Couve flor
Leite	-	Ovos
Pêssego	Citrinos	Sumo laranja
Peras	Peras	Ervilhas sem casca
Centeio e aveia	Arroz	Pimento
Morangos	Batata	Uvas
Carne de suíno	Espinafres	Farinha
Tomate	-	-

A seleção dos alimentos “chave”, foi baseada nos hábitos alimentares da população de cada estado membro, incluindo crianças e adultos, diferentes tipos de consumidores vegetarianos e não vegetarianos, e tentou abranger ao máximo, todas as vertentes no que a uma alimentação saudável diz respeito [15] [16].

1.2.1 Utilização de pesticidas em Portugal.

Segundo dados do Instituto Nacional de Estatística (INE), entre os anos 2000-2007, verifica-se que após se ter atingido um valor máximo de 17 451 toneladas, as vendas de pesticidas em Portugal decresceram a um ritmo médio anual de 2% até atingirem as 15 703 toneladas em 2006. Esta tendência foi, contudo, interrompida em 2007, ano em que se observou um novo aumento das quantidades vendidas que voltaram aos níveis contabilizados em 2004, superiores a 16 500 toneladas (Fig. 1.4) [3].

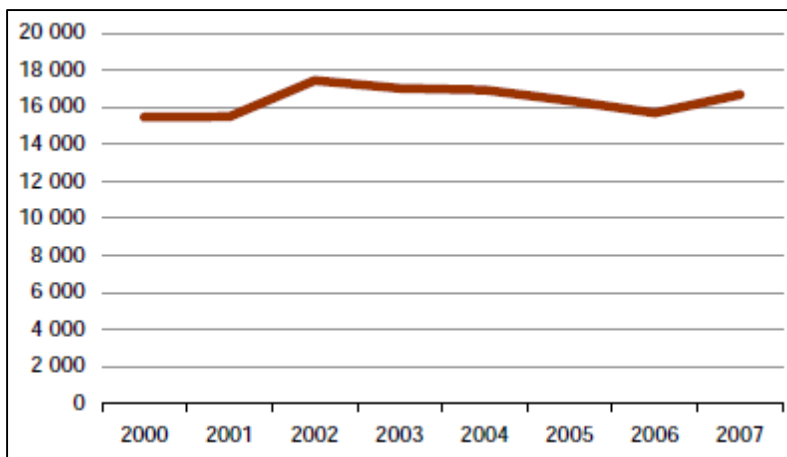


Fig. 1.4 Venda de pesticidas entre 2000 e 2007 em Portugal continental e ilhas. [3].

As variações do volume de vendas de pesticidas, observadas no período em análise, podem ficar a dever-se à constante desertificação e abandono da prática agrícola.

Analisando as vendas por tipos de função (Fig.1.5) mais significativos temos que [3]:

- Os “fungicidas” representaram 69% do total das vendas tendo o “enxofre” representado 78% do total deste grupo;
- Os “herbicidas”, apesar de menor importância com 13% das vendas, têm marcado posição no mercado, evidenciando, face a 2000, taxas médias anuais de crescimento positivas.
- A venda de “inseticidas/acaricidas” (com a inclusão do óleo mineral) atingiu 1 272 t, representando 7,6% das vendas totais e um aumento de cerca de 20% face ao ano anterior.

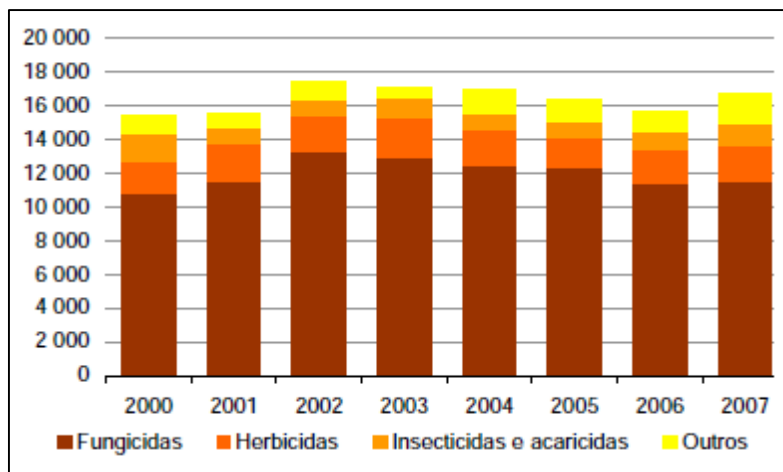


Fig. 1.5 Venda de pesticidas entre 2000 e 2007 em Portugal continental e ilhas, por função [3].

Em 2007, a venda de pesticidas por unidade de superfície agrícola utilizada, foi de 4,8 Kg por hectare. No entanto, se se excluir o enxofre, cuja toxicidade é relativamente mais baixa que a dos restantes pesticidas, esse valor atinge apenas 2,2 kg por hectare [3].

A utilização de pesticidas em Portugal, também está relacionada com as superfícies ocupadas com culturas, e pode relacioná-las com um maior risco de poluição. A incidência de superfícies ocupadas com as culturas da vinha, batata, hortícolas e flores por município determinou a definição de certas zonas no país a que se podem associar maiores riscos de poluição pela aplicação de pesticidas (Fig. 1.6). Nestas regiões, a área de vinha assumia relevância generalizada, mas surgia com especial incidência a Norte e Centro. Por outro lado, nos municípios do Oeste e da Madeira, registava-se um maior equilíbrio entre a superfície ocupada pelas várias culturas consideradas neste indicador [3].

Os índices mais baixos foram observados nos municípios do interior Alentejano, reflexo da reduzida ocupação por culturas consideradas de risco [3].

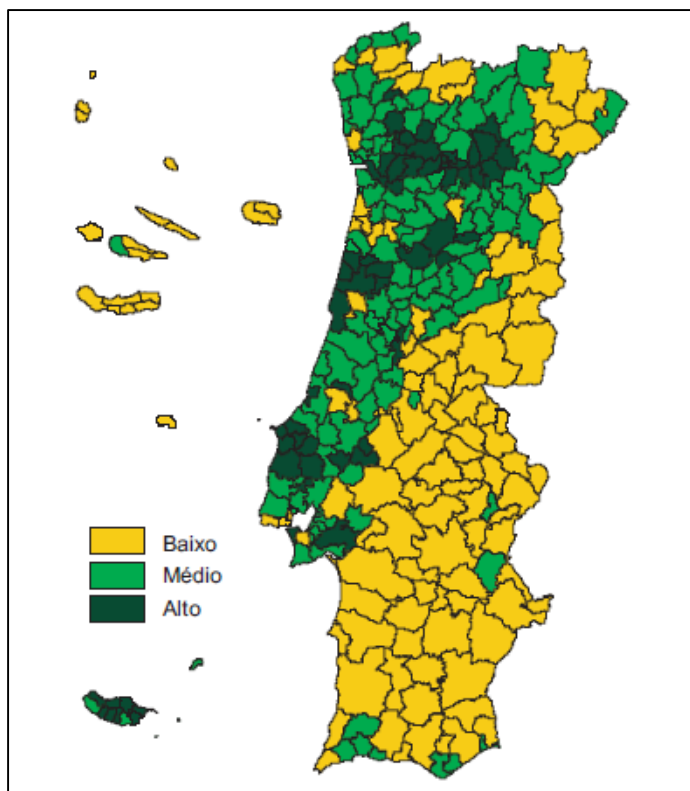


Fig. 1.6 Índice de risco de utilização de pesticidas em Portugal continental e ilhas [3].

1.3 *n* – metilcarbamatos.

Os *n*-metilcarbamatos constituem atualmente, um dos grupos de pesticidas mais utilizados. Estes pesticidas, são um subgrupo pertencente aos carbamatos, derivados do ácido carbâmico (H_2NCOOH) (Fig. 1.7) sendo que um dos átomos de hidrogénio ligado ao átomo de azoto é substituído por um grupo alquilo, normalmente metilo, e o átomo de hidrogénio ligado ao átomo de oxigénio é substituído por um grupo orgânico representado pelo radical (R) [2] [17].

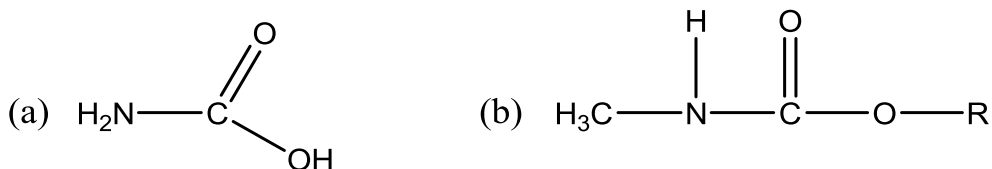
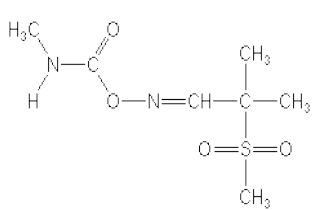


Fig. 1.7 Estruturas gerais: (a) Ácido carbâmico; (b) *n*-metilcarbamatos [17]

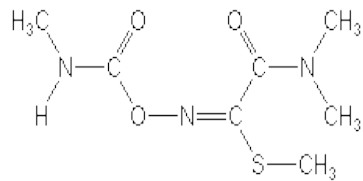
Quando o radical R de um carbamato corresponde ao grupo metil (CH₃), estamos perante os *n*-metilcarbamatos [2]. Estes pesticidas são comumente utilizados como inseticidas e foram desenvolvidos a partir da década de 50, logo após os organofosforados e em simultâneo com os piretróides. Tiveram um papel preponderante na substituição dos organoclorados e organofosforados, devido à sua menor ecotoxicidade [2].

Da grande variedade de *n*-metilcarbamatos comercialmente disponíveis, este trabalho debruçou-se no estudo de nove que compõem a lista de *n*-metilcarbamatos a determinar no Laboratório Regional de Veterinária e Segurança Alimentar, em várias matrizes de origem vegetal (Tabelas 1.5 e 1.6).

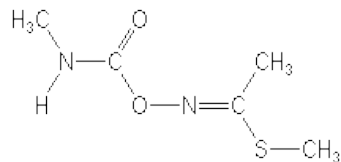
Tabela 1.5 *n*-metilcarbamatos estudados neste trabalho [2] [17].

<i>n</i> - metilcarbamatos	Estrutura
Aldicarbe Sulfóxido	

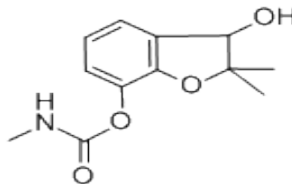
Oxamil



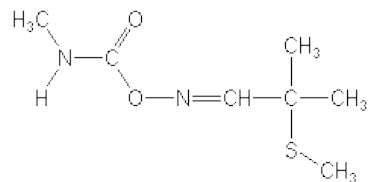
Metomil



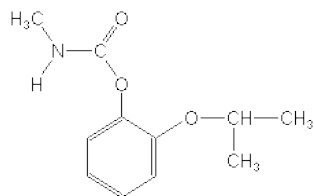
3-hidroxicarbofurão



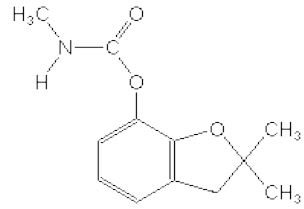
Aldicarbe



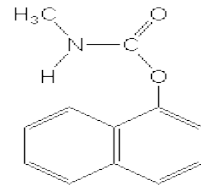
Propoxur



Carbofurão



Carbaril



Metiocarbe

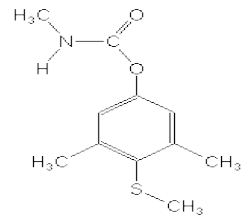


Tabela 1.6 Algumas características dos *n*-metilcarbamatos estudados [2] [10] [17].

n-metil carbamatos	Fórmula molecular	Ação ⁵	Culturas	Nome comercial	CAS	IUPAC
Aldicarbe Sul-fóxico	C ₇ H ₁₄ N ₂ O ₃ S	A; I; N	Café	<i>Temik 150</i> [®]	1646-87-3	2-metil-2-metilpropionaldeído-O-metilcarbamoioxima
Oxamil	C ₇ H ₁₃ N ₃ O ₃ S	A; I; N	Cereais e batata	<i>Vydate</i> [®]	23135-22-0	<i>N,N</i> -dimetil-2-metilcarbamoiloxiimino-2-(metiltio)acetamida
Metomil	C ₅ H ₁₀ N ₂ O ₂ S	I	Uvas, cereais e batata	<i>Lannate</i> [®]	16752-77-5	S-metilo N-(metilcarbamoiloxi)tioacetimidato
3-Hidroxi carbofurão	C ₁₂ H ₁₅ NO ₄	A; I; N	Cereais	<i>Anaspaζ</i> [®]	16655-82-6	2,3-dihidro-2,2-dimetilbenzofurão-7-il metilcarbamato
Aldicarbe	C ₇ H ₁₄ N ₂ O ₂ S	A; I; N	Cereais, batata, tomate, uva	<i>Temik</i> [®]	116-06-3	2-metil-2-(metiltio)propionaldeído-O-metilcarbamoiloxima
Propoxur	C ₁₁ H ₁₅ NO ₃	A; I	Plantas domésticas	<i>Baygon</i> [®]	114-26-1	2-isopropoxifenil metilcarbamato
Carbofurão	C ₁₂ H ₁₅ NO ₃	A; I; N	Cereais, batata, tomate, uva	<i>Furadan</i> [®]	1563-66-2	2,3-diidro-2,2-dimetilbenzofurão-7-il methylcarbamato
Carbaril	C ₁₂ H ₁₁ NO ₂	A; I	Cereais	<i>Serin</i> [®]	63-25-2	1-naftil metilcarbamato
Metiocarbe	C ₁₁ H ₁₅ NO ₂ S	A; I	Cereais, batata, tomate, uva e alface	<i>Mesural</i> [®]	2032-65-7	4-metiltio-3,5-xilil metilcarbamato

⁵ A – acaricida; I – inseticida; N – nematocida

Devido à sua utilização em larga escala, os *n*-metilcarbamatos, constituem atualmente um dos grupos com maior taxa de resíduos em alimentos e a classe com maior número de casos de intoxicações, seja em contexto laboral, seja nos vários contextos médico-legais, principalmente em casos de suicídio [11]. A sua toxicidade, embora reduzida para com a vida animal, tem sido particularmente gravosa, existindo inúmeros casos de intoxicações acidentais por parte de animais domésticos e selvagens [12] [18]

1.4 Mecanismo de toxicidade dos *n* - metilcarbamatos.

1.4.1 Farmacodinâmica e farmacocinética dos *n* - metilcarbamatos.

A metabolização de um pesticida (ADME), nos tecidos animais, dá início a uma sequência de processos metabólicos autónomos que vão determinar a sua concentração ao longo do processo metabólico nos diferentes tecidos e fluidos [2] [5].

A ADME compreende 4 etapas diferenciadas:

- Absorção;
- Distribuição;
- Metabolismo;
- Excreção.

A metabolização e excreção podem ser substituídas por um só passo, a eliminação, uma vez que, a eliminação pelo organismo da substância em questão, requer obrigatoriamente a junção dos dois procedimentos acima referenciados.

A. Absorção.

A absorção relaciona o “ponto de entrada” do pesticida com o local da sua absorção. Este “passo” da ADME é de extrema importância para a farmacocinética já que a administração ou o “sítio” por onde é administrado, é um factor importante na determinação da taxa de absorção.

A absorção pode ser: oral, dérmica ou por inalação quer pela boca ou nariz, sendo que cada uma destas vias de absorção terá taxas e “extensões” de absorção diferenciadas [2] [5].

B. Distribuição.

A distribuição das substâncias ativas do pesticida pelo organismo é um processo que depende de diversos factores, como a corrente sanguínea nos tecidos no caso de uma intoxicação em mamíferos, o grau da absorção pelo organismo, o grau de ionização da substância, o seu peso molecular, e a sua propensão à ligação a proteínas.

Um aspecto importante na interpretação de resultados analíticos é a compreensão do mecanismo de distribuição do composto entre o sangue e os tecidos, em particular quando há apenas um tipo de amostra. Muitos pesticidas, possuem uma grande afinidade para diversas proteínas que logo após a sua ingestão são capazes de alterarem as suas propriedades biológicas [2] [5].

C. Metabolismo.

A maioria das substâncias ingeridas podem ser destruídas no estômago, aliás, o estômago será mesmo uma das barreiras mais eficazes nos mamíferos, precisamente contra a ação de substâncias exógenas e estranhas ao organismo hospedeiro. Porém, e

graças às suas características químicas, os pesticidas dificilmente serão “barrados” pela ação enzimática ou ácida do estômago, sendo a sua absorção iniciada logo no contato inicial com as mucosas nos pontos de entrada [2] [5].

Em relação à metabolização dos pesticidas podem existir dois tipos, a fase I e fase II.

➤ **Fase I:**

- reações de oxidação, N- e O-desalquilação, formação de sulfóxidos, hidroxilação, redução e hidrólise.

➤ **Fase II:**

- reações de conjugação com ácido glucorónico, por acetilação ou metilação ou ainda por conjugação com aminoácidos e sulfatos.

Quando os pesticidas são ingeridos, por exemplo de forma intencional por via oral, estes são absorvidos e passam logo, na sua maioria, para a circulação mesentérica e para o fígado, onde são metabolizados, antes da entrada na circulação sistêmica. Contudo, e como já referido anteriormente, a toxicidade do pesticida poderá ser tal, que a ação do mesmo poderá ter início pela absorção na mucosa gástrica, sem ser necessário a sua absorção na mucosa intestinal [2] [5].

D. Eliminação.

A maioria dos resíduos de pesticidas é eliminada do organismo através do metabolismo hepático e excreção por via renal.

A excreção ocorrerá maioritariamente a nível renal através da urina, contudo, também poderá ocorrer através da transpiração, digestão e excreção intestinal.

Sendo a filtração renal um processo onde apenas a substância livre (sem ligação proteica) é eliminada poderá, nalguns casos, ocorrer reabsorção já que numa intoxicação grave haverá excesso de biodisponibilidade do tóxico no organismo.

O processo de eliminação pelos rins poderá ser até totalmente ineficaz já que muitos dos pesticidas, quando ingeridos, poderão inviabilizar a própria excreção devido à destruição do “tecido” renal [2] [5].

1.4.2 Toxicidade dos *n*-metilcarbamatos.

Para o normal funcionamento do SNC é necessário que as células que o constituem, os neurónios, se comuniquem entre si, isto é, transmitam o seu potencial de ação. Essa comunicação faz-se através de estruturas designadas por sinapses. O mecanismo de toxicidade dos *n*-metilcarbamatos atuam precisamente nesse mecanismo, e deve-se sobretudo à capacidade que estes pesticidas possuem, à semelhança do que acontece com os organofosforados, de inibir a enzima acetilcolinesterase (AChE). Se bem que com o mesmo mecanismo de toxicidade, os *n*-metilcarbamatos fazem-no de uma forma reversível, ou seja, com a terapêutica adequada e dentro do tempo considerável a situação de inibição pode ser reversível, enquanto as intoxicações por organofosforados são de carácter permanente, quanto à sua irreversibilidade.

A AChE, pertence à classe de enzimas que catalisam e hidrolisam a acetilcolina existente na fenda sináptica que corresponde à região de interligação entre dois neurónios, que garantem a passagem do impulso nervoso, cujo procedimento é denominado de sinapse (Fig. 1.8) [2] [5] [19].

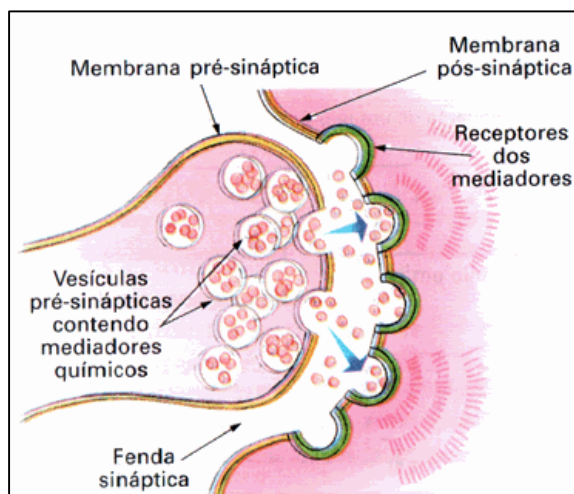


Fig. 1.8 Mecanismo de sinapse [20].

Este procedimento, acontece entre o axónio de um neurónio e o dendrito de outro neurónio. Quando o impulso nervoso percorre o neurónio e chega às terminações do axónio, ocorre a libertação da acetilcolina acumulada em vesículas que são libertadas precisamente na fenda sináptica, este neurotransmissor, vai agir como mediador na transmissão do impulso nervoso. Esta sucessão de procedimentos, estimula a membrana pós sináptica, provocando uma modificação na permeabilidade local, assim irá ocorrer um novo impulso nervoso. Deste modo, de sinapse em sinapse, os impulsos são gerados desde os centros coordenadores nervosos, como o cérebro, até à região onde irá terminar esse mesmo impulso, como um músculo.

Se para acontecer o impulso e a sua transmissão, é necessária a presença de acetilcolina na fenda sináptica, para que exista repouso do neurónio, e cesse o impulso nervoso, é necessária a desativação desse neurotransmissor. Assim acontece, com a enzima AChE, que irá hidrolisar a acetilcolina em colina e ácido acético (Fig. 1.9) [2] [5] [19].

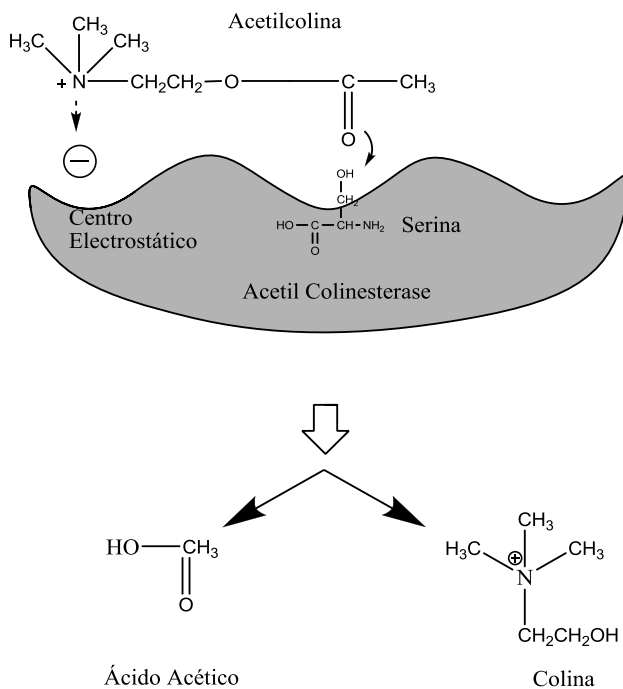


Fig. 1.9 Hidrólise da acetilcolina pela AChE.

Os *n*-metilcarbamatos, exercem a sua toxicidade por meio da inibição reversível da atividade da AChE e conseqüentemente da estimulação excessiva dos recetores nicotínicos e muscarínicos.

A AChE hidrolisa a acetilcolina em ácido acético e colina impedindo assim a acumulação excessiva do neurotransmissor acetilcolina nas fendas sinápticas (Fig.1.10). O que acontece na fenda sináptica com a inibição da AChE, é a acumulação excessiva de acetilcolina, promovendo uma “*overdose*” de acetilcolina, provocando a hiperexcitação de todos os recetores nervosos, levando a uma hiperexcitação nervosa, com uma estimulação constante levando os organismos à morte por exaustão [4] [9] [19].

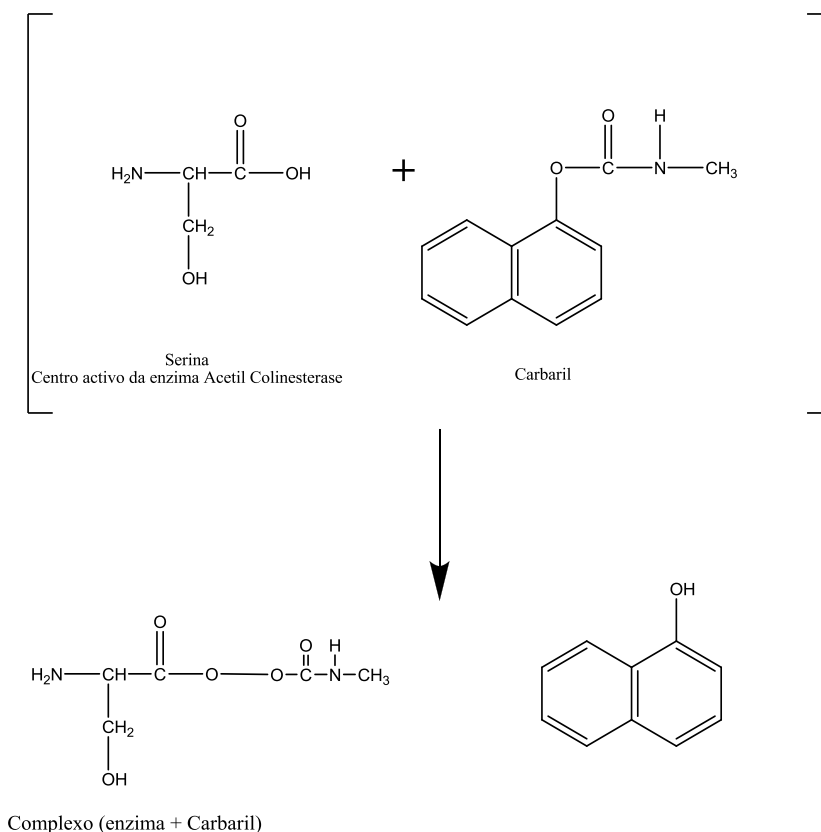


Fig. 1.10 Mecanismo de inibição da AChE [2].

Em relação aos efeitos crônicos das intoxicações no homem por *n*-metilcarbamatos, as lesões macro e microscópicas associadas são escassas, embora alguns estudos revelem hemorragias internas, edema e congestão nos pulmões em 91.1% dos casos, congestão no fígado em 64% dos casos e congestão generalizada nos rins em 43.4% dos casos, sendo por isso os pulmões os órgãos alvo das intoxicações por este tipo de pesticidas [12].

Apesar da ação dos *n*-metilcarbamatos ser geralmente transitória sobre a AChE, quando existem exposições a doses pequenas, a atividade nos mamíferos tende a retornar à fase estável e normalizada dentro de 6 horas após a exposição ao pesticida, ainda assim encontram-se na literatura relatos de inibição prolongada (pelo menos de 60 horas) em seres humanos intoxicados com estes inseticidas [12]. Ademais, e em relação às intoxicações em mamíferos a reativação espontânea da AChE, é muito lenta na generalidade dos mamíferos jovens e praticamente inexistente em mamíferos mais velhos, e poderá ser muito diferenciada na sua reativação ou dificuldade em reativar de animal para animal, pois o metabolismo difere em muito da espécie em questão [22] [23].

Tal como já referido anteriormente, são inúmeros os casos de intoxicações em animais domésticos e em algumas necropsias de animais foram encontrados grânulos de coloração enegrecida no conteúdo gástrico, facto que levou à suspeita da presença de agentes tóxicos que posteriormente se confirmou ser de *n*-metilcarbamatos [23].

Em alguns estudos realizados em cães e gatos, esta inibição, foi observada em doses superiores a 0.1 mg.kg⁻¹ [23].

O aumento do número de mortes em animais poderá ser devido à alta toxicidade dos *n*-metilcarbamatos, à pouca fiscalização na compra e revenda destes produtos, e, nos casos mais extremos, relacionado com o mercado paralelo, usando clandestinamente estes produtos como raticidas, e como extermínio de animais domésticos.

Em casos de intoxicação voluntária de animais domésticos, estes produtos, são misturados em matrizes comuns e de fácil consumo pelos animais, como farinha, trigo, carne ou peixe, etc., e por vezes utilizados também nas suas casas pulverizando as zonas de descanso dos animais [21].

Capítulo II

2 Metodologias Aplicadas.

2.1 Métodos para análise de pesticidas.

Os métodos publicados para a análise de resíduos de pesticidas em produtos de origem vegetal ou animal são muito semelhantes. São habitualmente utilizados métodos multirresíduos, “*multiple residues methods*” (MRM) sempre que uma amostra apresenta um historial desconhecido da exposição a pesticidas, ou quando não se procura um pesticida alvo mas sim um conjunto de pesticidas pertencentes à mesma classe química.

Os MRM apresentam a vantagem de determinarem simultaneamente mais do que um resíduo de pesticida numa única análise, o que permite uma diminuição do tempo e do custo de análise. O primeiro MRM foi desenvolvido na década de 60 por *Mill's*, ficando o método denominado com o mesmo nome, e foi aplicado na determinação de organoclorados não polares, em matrizes pouco lipídicas [24] [25].

Por vezes, quando se suspeita da presença de determinado pesticida que devido às suas características não possa ser determinado por MRM, deve ser utilizado um método alternativo específico para esse composto, como por exemplo os métodos para determinar um único resíduo, “*single method residues* (SMR)”, como por exemplo a determinação do pesticida glifosato.

A metodologia geral para a determinação de resíduos, quer seja por MRM ou SMR, envolve os passos de extração, separação e deteção com especial atenção para uma correta identificação e confirmação do composto em causa. A extração dos resíduos da matriz da amostra é efetuada através de solventes apropriados como acetonitrilo (ACN), metanol (MeOH), éter de petróleo ou diclorometano (CH₂Cl₂).

No nosso caso, utilizou-se a metodologia QuEChERS, um MRM amplamente utilizado na determinação de resíduos de inúmeros pesticidas, tais como os *n*-metilcarbamatos em frutos, vegetais e cereais, utilizando como solvente extrator o ACN acidificado com 1% de ácido acético. O método demonstrou ser eficiente para extrair cerca de 200 pesticidas numa grande variedade de matrizes alimentares nomeadamente frutos e vegetais tais como laranjas e alface, tanto para análise por cromatografia gasosa com detetor de massas (GC-MS) como por cromatografia líquida com detetor de massa/massa (HPLC-MS/MS) [26].

No que diz respeito à aplicação do método a matrizes contendo um elevado teor de gordura (ovos e leite), verificou-se que o método não é muito eficaz na extração de pesticidas lipofílicos, mas apresenta resultados adequados na extração sobre alimentos pouco “gordos” e na extração de pesticidas polares e semi-polares de uma grande variedade de matrizes alimentares [26] [27].

Após a extração segue-se uma fase de purificação ou “*clean-up*” com o objetivo de remover as substâncias interferentes obtendo-se uma solução final na qual o solvente deve ser apropriado para a determinação quantitativa através do método selecionado. Normalmente o solvente utilizado é a fase móvel de entrada no sistema cromatográfico [29]. A determinação de pesticidas é efetuada através de GC e/ou HPLC utilizando diversos tipos de detetores consoante o tipo de pesticida utilizado [26] [27].

No trabalho realizado, pretendeu-se aliar o método QuEChERS já utilizado para HPLC e GC com deteção por espectrometria de massa (MS), fósforo e azoto (NPD) e por captura de eletrões (ECD), ao sistema HPLC com deteção por fluorescência (FLD).

2.2 Método de extração QuEChERS.

O processo de extração é um passo fundamental na análise química que tem por objetivo extrair os compostos alvo para posterior separação, caracterização e quantificação. A maior parte do tempo de análise do desenvolvimento e da validação do

método analítico é consumida nesta fase e é também a fase que pode originar mais erros.

Este processo pode apresentar dificuldades específicas nomeadamente em matrizes complexas como é o caso deste trabalho, que pretende determinar resíduos de *n*-metilcarbamatos em amostras de origem animal.

Os processos de extração tradicionais, normalmente utilizam uma elevada quantidade de solventes orgânicos e são geralmente processos morosos, de difícil execução e dispendiosos (Fig.2.1).

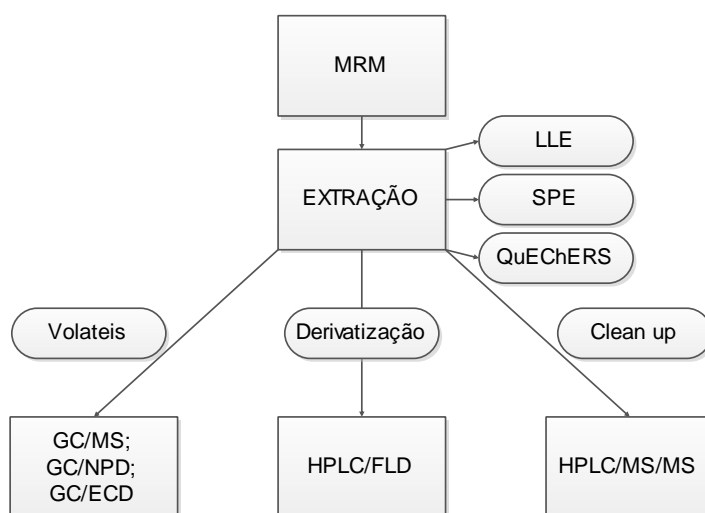


Fig. 2.1 Esquema geral de um MRM [26].

Considerando que o tempo despendido com a análise aumenta exponencialmente com a adição de novos resíduos de pesticidas no processo analítico, a maioria dos laboratórios não dispõe de meios para realizar a análise a um número elevado de resíduos.

Alguns dos resíduos, devido à sua especificidade, não são compatíveis a com maioria dos MRM, como sendo os resíduos com acidez, alcalinidade e polaridade elevadas.

Em suma, para cobrir a maioria dos resíduos, os laboratórios teriam de despende avultados orçamentos com equipamento, reagentes, analistas e tempo de análise, e

por isso a maioria dos laboratórios de análise de resíduos não monitoriza, na sua rotina diária, uma larga gama de pesticidas [28].

Os procedimentos extrativos mais comuns utilizados na extração de pesticidas, envolvem extração líquido – líquido (LLE) (Fig. 2.2) e extração em fase sólida (SPE) (Fig. 2.3), usando adsorventes como o C 18, florasil, alumina e sílica gel [28] [29].

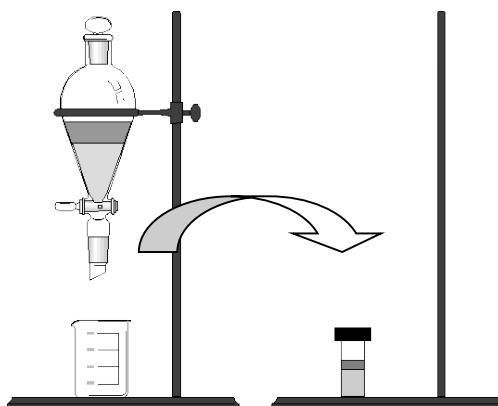


Fig. 2.2 Diagrama esquemático representativo da extração líquido-líquido (LLE).

O processo extrativo LLE, baseia-se na diferente solubilidade dos compostos em diferentes solventes, ocorrendo a transferência do soluto da amostra para o solvente extrator. É normalmente utilizado para remover seletivamente uma determinada substância a partir de uma matriz ou para remover as impurezas que nela se encontram. A seletividade desta extração pode ser alterada, variando por exemplo o pH no processo extrativo. Estão envolvidas, neste processo extrativo, duas fases imiscíveis, por norma, uma aquosa e outra orgânica.

Este método tem como principais desvantagens a morosidade, fraca automação e a possibilidade de poder surgir uma terceira fase (emulsão) que complica o processo de separação, além da problemática ambiental criada pela utilização de grandes quantidades de solventes orgânicos na maioria dos procedimentos extrativos.

Em meados da década de 70 surgiu a SPE, apresentando-se como uma técnica simples e prática para a preparação de amostras, sendo o método extrativo mais comumente utilizado em laboratórios de análise de resíduos.

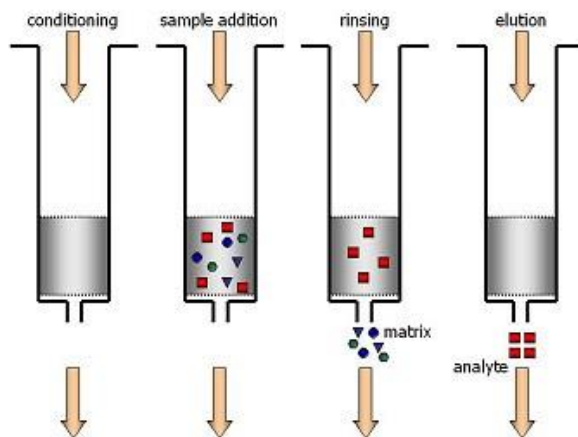


Fig. 2.3 Sequência da extração por fase sólida (SPE).

O procedimento extrativo 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. Sendo que a fase sólida é seletiva para algumas analitos, os interferentes e moléculas dos solventes são descartadas do adsorvente, ficando retidos os analitos. Posteriormente são removidos do adsorvente por eluição utilizando um solvente apropriado.

A SPE apresenta diversas vantagens, tais como, tempo de preparação reduzido; elevadas taxas de recuperação; extratos puros; possibilidade de automatização; compatível com a análise cromatográfica; processamento conjunto de várias amostras; adaptável a diferentes volumes de amostra; não ocorre formação de emulsões. Todas estas características tornam este processo no mais utilizado em procedimentos analíticos por HPLC-MS [29]. Uma vez que existem diferentes adsorventes, a especificidade de extração pode ser incrementada, já que existe a possibilidade de escolher um adsorvente que interaja mais especificamente com a molécula em estudo. Estas interações

estabelecem-se entre as moléculas do analito e os grupos funcionais da fase estacionária (interações polares, hidrofóbicas e iónicas). A seletividade adicional proporcionada por esta técnica leva a uma diminuição da possibilidade de efeitos de matriz, o que permite ao analista atingir menores tempos de corrida na técnica cromatográfica utilizada, além de obter uma elevada reprodutibilidade. Contudo, os custos para aquisição dos cartuchos, o seu carácter descartável e o tempo da extração, são alguns dos inconvenientes deste procedimento.

Idealmente um procedimento de extração MRM deverá obedecer a alguns critérios para serem adotados pelos laboratórios de análise de resíduos, como sendo a rapidez no processo extrativo, fácil execução, material e pessoal especializado necessário para executar o procedimento, diminuir o volume de reagentes utilizado e rentabilizar ao máximo o procedimento, diminuindo os custos inerentes a este tipo de procedimentos.

Como método inovador e alternativo à SPE, na análise de resíduos de pesticidas em matrizes biológicas de origem animal, este trabalho baseou-se num método de dispersão da matriz em fase sólida (dSPE) o QuEChERS (Fig. 2.4).

Este método, MRM, veio precisamente colmatar a necessidade de diminuir o tempo de extração, reduzir e rentabilizar o pessoal técnico, material e equipamento e o espaço laboratorial também poderá ser reduzido substancialmente, já que um só técnico num único espaço poderá realizar todo o processo extrativo.

Esta metodologia, desenvolvida entre os anos de 2000 e 2002 por *M. Anastassiades*, químico alemão, e apresentada pela primeira vez em 2003, envolve uma extração sólido-líquido seguida de uma extração em fase sólida dispersiva, tendo sido designada por QuEChERS devido às iniciais “**Q**uick, **E**asy, **C**heap, **E**ffective, **R**ugged and **S**afe”. A eficácia e rapidez deste método foi demonstrada através da realização de um procedimento extrativo referente a 30 amostras vegetais entre os 20 e 30 minutos [26] [30] [31].

O trabalho foi desenvolvido no laboratório alemão de química e veterinária, em Estugarda, e impulsionou os métodos extrativos nos laboratórios de segurança alimentar, tais como no LRVSA, na Ilha da Madeira, onde foi desenvolvido este trabalho.

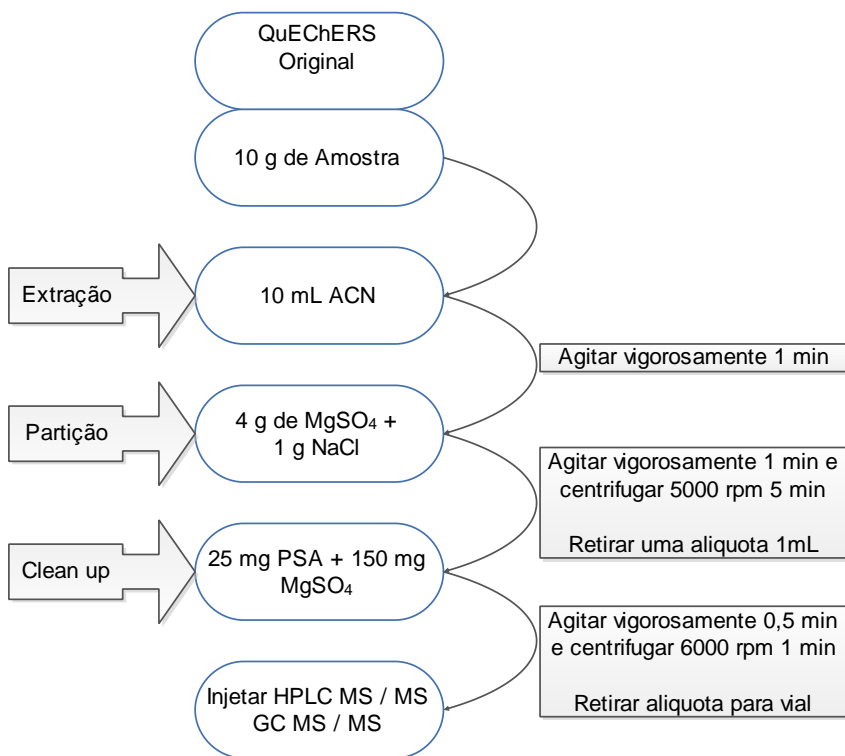


Fig. 2.4 Método original do QuEChERS [26].

O trabalho desenvolvido para análise em alimentos seguiu a estrutura esquematizada na Fig. 2.5.

O método foi desenvolvido inicialmente para a análise em GC – MS/MS e HPLC – MS/MS, para a determinação simultânea de 80 pesticidas, mas cedo se percebeu que este método de extração viria a revolucionar os procedimentos de rotina existentes em laboratórios de análise de resíduos de pesticidas em alimentos. Este procedimento além de um processamento rápido de amostras em simultâneo, também demonstrou ser eficiente em extrair cerca de 200 pesticidas numa grande variedade de matrizes alimentares nomeadamente em frutos e vegetais, tanto para análise por GC-MS como para HPLC-MS/MS [26].

Este procedimento foi sujeito a sucessivas validações através de inúmeros ensaios interlaboratoriais, onde posteriormente foi implementado numa norma europeia (EN 15662) [26] [32].

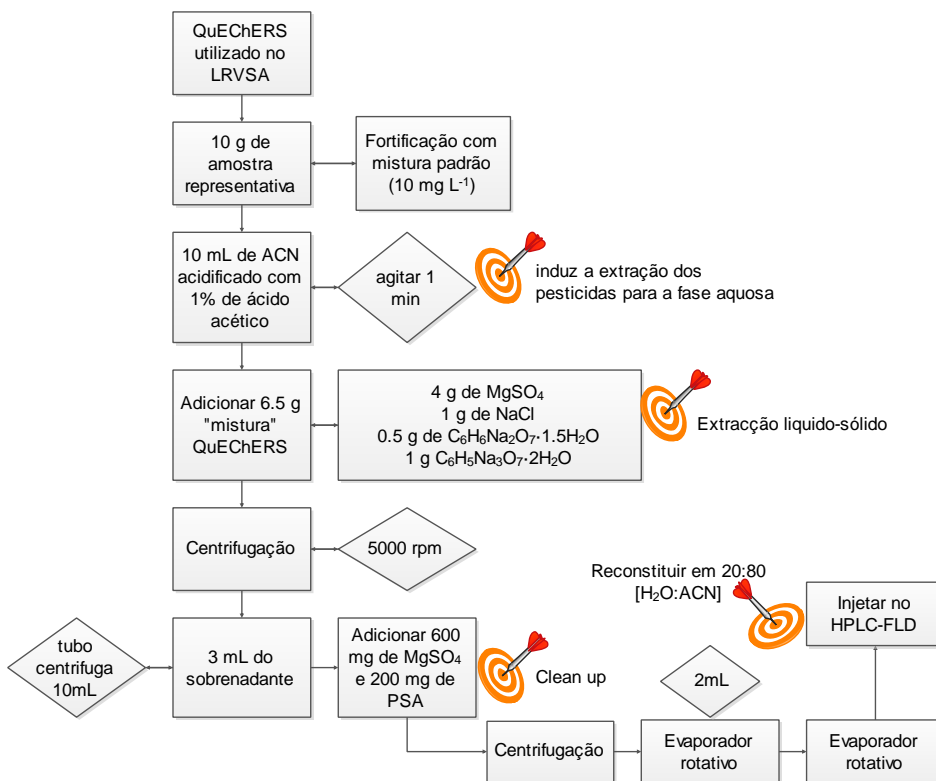


Fig. 2.5 Esquema geral do método QuEChERS utilizado no trabalho desenvolvido.

2.3 Química do QuEChERS.

O método QuEChERS envolve uma fase de extração líquido-sólido com ACN (contendo 1% de ácido acético, CH₃COOH), seguida de uma “limpeza” denominada de extração em fase sólida dispersiva através da adição de 4 g de sulfato de magnésio (MgSO₄); 1 g de cloreto de sódio (NaCl); 0.5 g de citrato de sódio dibásico sesquihidratado (C₆H₆Na₂O₇·1.5H₂O) e 1 g citrato de sódio tribásico dihidratado

($C_6H_5Na_3O_7 \cdot 2H_2O$), denominada no nosso trabalho como “mistura QuEChERS” (Fig.2.6) [26] [32] [33].



Fig. 2.6 Extrato da matriz obtido após extração com ACN acidificado com 1% de ácido acético, com adição da “mistura QuEChERS” e com posterior centrifugação.

Como observado na Fig. 2.5, este trabalho alterou o procedimento original do QuEChERS, com a adição de 0.5 g de citrato de sódio dibásico sesquihidratado ($C_6H_6Na_2O_7 \cdot 1.5H_2O$) e 1 g citrato de sódio tribásico dihidratado ($C_6H_5Na_3O_7 \cdot 2H_2O$), de acordo com as indicações do método interno do LRVSA para análise de *n*-metilcarbamatos em amostras de origem vegetal. A adição de $C_6H_6Na_2O_7 \cdot 1.5H_2O$ e $C_6H_5Na_3O_7 \cdot 2H_2O$, permite manter o pH entre 5 e 5.5, pH ideal (Fig. 2.7) para a extração de resíduos ácidos e alcalinos, já que a maioria dos pesticidas não se degrada em meio ácido, permitindo assim a sua estabilidade durante o procedimento extrativo [26] [32] [33].

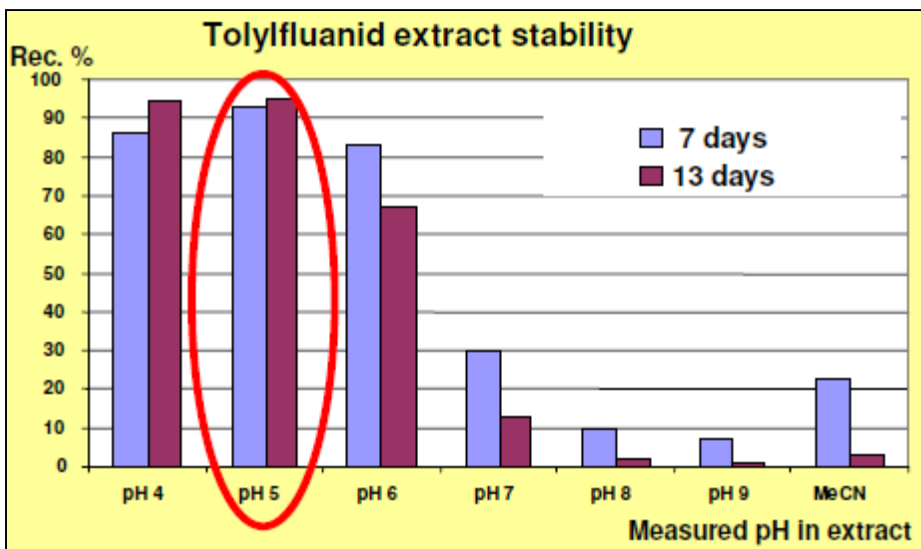


Fig. 2.7 Influência do pH na eficiência de extração por QuEChERS [33].

Na literatura encontra-se o exemplo da tolilfluand, uma sulfamida utilizada como pesticida, e na Fig. 2.7, podemos observar que para este pesticida, a taxa de recuperação é maior para um pH 5 mesmo após 13 dias [33] [36]. Contudo, este pH é estendido a outros resíduos, abrangendo de certa forma a maioria das classes de pesticidas incluindo os organoclorados, organofosforados e *n*-metilcarbamatos. Para o trabalho em causa o LRVSA já anteriormente estudara o pH ideal para a determinação de *n*-metilcarbamatos em amostras de origem vegetal, e verificado que o pH 5 seria o mais indicado, pelo que, o trabalho foi realizado utilizando esse pH, indo ao encontro com um dos propósitos deste trabalho, cujo principal objetivo era adaptá-lo às amostras de origem animal, com alto teor de proteínas animais, sem alterar o método já implementado [34] [35].

As adaptações ao método QuEChERS, depois da divulgação do procedimento original, têm-se multiplicado e mostrado importantes de acordo com a realidade dos diferentes laboratórios que o adotam, sobretudo devido à análise de compostos suscetíveis à degradação nas condições de extração descritas no método inicial, ou seja, que sejam muito suscetíveis à influência de ácidos e/ou bases.

2.3.1 Salting *in* Salting *out*

Uma das principais etapas do procedimento extrativo QuEChERS, é o “*salting out*”, processo no qual as substâncias solúveis em água são removidas da fase aquosa, através da adição de sais como o NaCl e MgSO₄ [34].

Este efeito diminui a solubilidade de moléculas orgânicas em água, e é comumente utilizado na purificação de proteínas e moléculas de ADN [37].

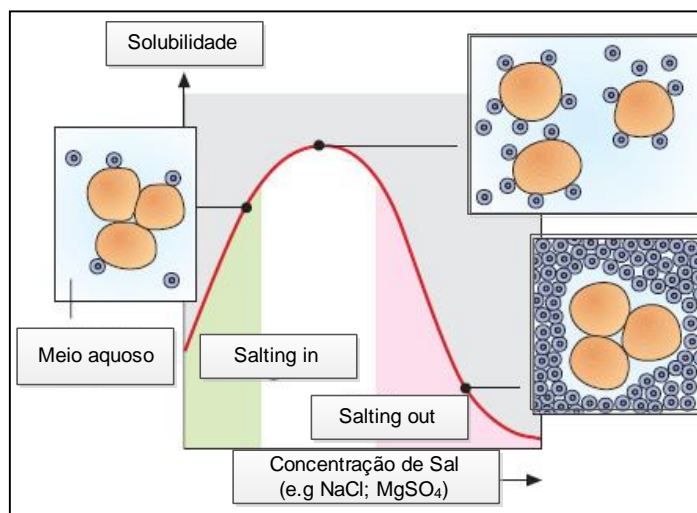


Fig. 2.8 Metodologia do *Salting in* e *Salting out*. [37]

Assim o efeito de “*salting out*” (Fig. 2.8) diminui a solubilidade da matéria orgânica, à medida que aumenta a concentração de sal na solução [37].

Após a primeira centrifugação, logo após a adição da “mistura QuEChERS”, retira-se uma alíquota e realiza-se o “*clean up*” pelo procedimento dSPE, utilizando-se amina secundária e primária (PSA) (Fig. 2.9) juntamente com MgSO₄, para extração de todos os resíduos de água e componentes lipídicos e açúcares [34].

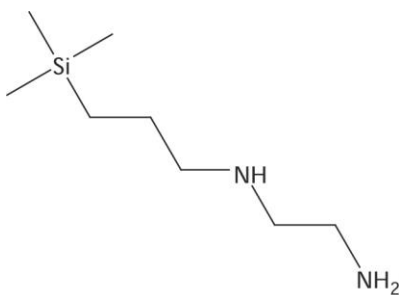


Fig. 2.9 Estrutura do PSA.

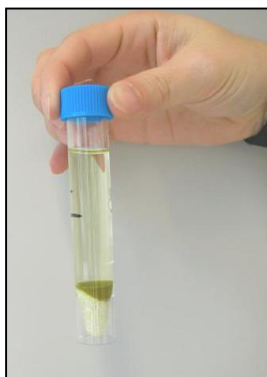


Fig. 2.10 Extrato obtido após a fase dSPE com adição de PSA e MgSO₄ e posterior centrifugação.

Para além do PSA foram também efetuados estudos utilizando outros adsorventes tais como C₃H₇-NH₂ (aminopropilo), alumina-N, GCB (negro de carbono), C₃H₇-CN (cianopropilo), SAX (amina quaternária) e ODS (octadecilsilano) chegando-se à conclusão de que a PSA utilizada isoladamente ou em combinação com o GCB ou MgSO₄ (Fig. 2.10) é mais eficaz na purificação dos extratos. Por outro lado, no processamento de extratos com quantidades elevadas de clorofila, como o caso de extratos vegetais, a purificação do extrato deverá ser com GCB, já que o PSA não remove resíduos de clorofila, prejudicando a purificação do extrato.

Este último passo por vezes é excluído do procedimento analítico, bastando apenas filtrar o extrato obtido logo após a centrifugação, estando pronta a ser injetada no HPLC ou GC [33] [34].

2.4 Cromatografia.

A cromatografia é considerada uma técnica de separação poderosa e versátil, utilizada na maioria dos laboratórios de análises químicas, toxicológicas e biológicas.

A determinação de resíduos de pesticidas é habitualmente efetuada por técnicas cromatográficas diferentes, sempre de acordo com as especificidades do resíduo a determinar. Segundo algumas das “*guidelines*” europeias, a identificação de resíduos de pesticidas, deverá obedecer a técnicas que empreguem princípios cromatográficos tais como, HPLC e GC, acoplados a detetores como MS, FLD ou UV.

A cromatografia, em termos genéricos, é uma técnica de separação baseada na distribuição dos componentes de uma mistura entre um fluido (fase móvel ou eluente) e um adsorvente (fase estacionária). A fase estacionária pode ser um sólido ou um líquido depositado num sólido inerte, empacotado numa coluna ou espalhado por uma superfície formando uma camada fina, como sendo no caso da cromatografia em camada fina (TLC) [22]. Por sua vez, os analitos com mais “afinidade” química com a fase estacionária ficam retidos mais tempo nesta, sendo o contrário também verdade, ou seja os analitos que não possuem uma afinidade com a fase estacionária, são eluídos mais rapidamente juntamente com a fase móvel, sendo que esta separação é efetuada normalmente através de colunas cromatográficas (Fig. 2.11) [39].

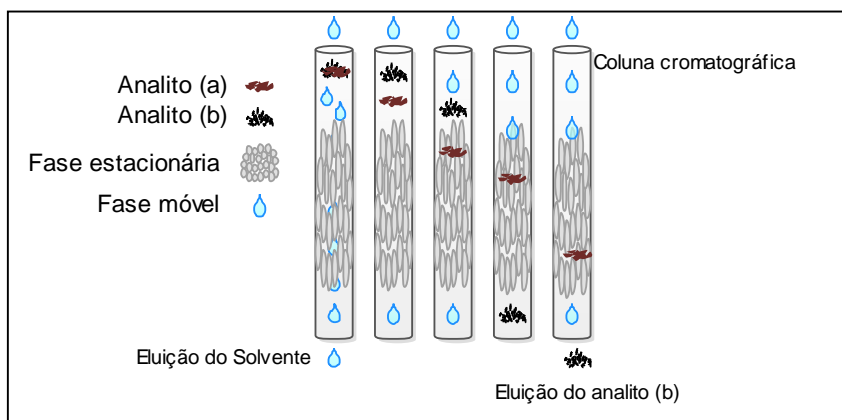


Fig. 2.11 Princípio da separação cromatográfica.

Em relação à fase estacionária, também existem diferentes denominações, quanto à sua polaridade, ou seja, quando esta é mais polar que a fase móvel, a cromatografia líquida é denominada de cromatografia líquida de fase normal (Fig. 2.12), na situação contrária, quando a fase estacionária é menos polar que a fase móvel, estamos perante um tipo de cromatografia líquida de fase reversa (Fig. 2.13) [39].

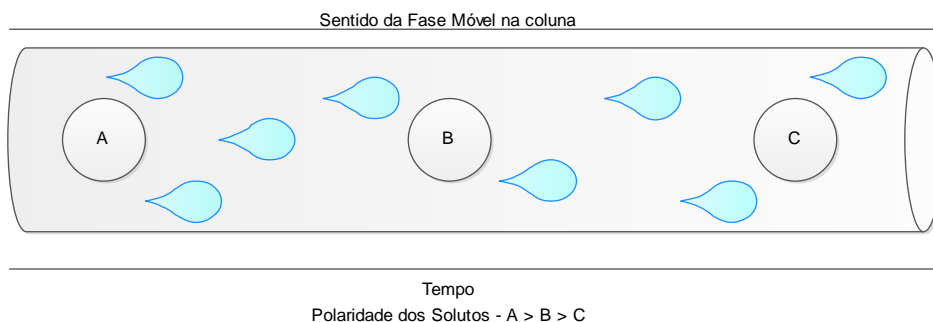


Fig. 2.12 Cromatografia em fase normal, fase móvel de polaridade baixa.

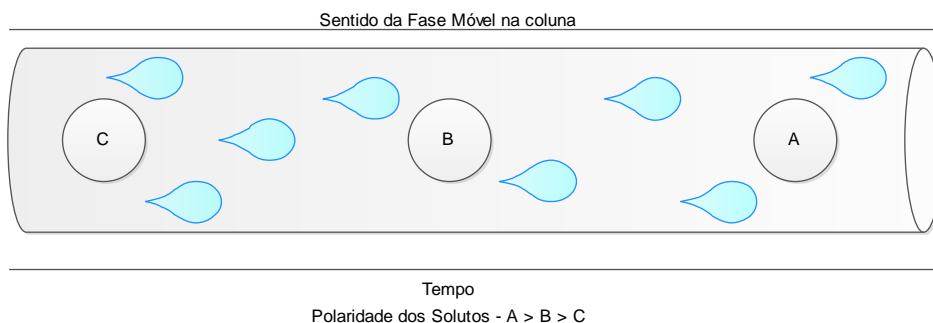


Fig. 2.13 Cromatografia em fase reversa, fase móvel de polaridade alta.

As fases móveis vão diferenciar as diferentes técnicas cromatográficas existentes, as mais comuns são a cromatografia líquida de alta pressão (HPLC) (Fig. 2.14) e a cromatografia em fase gasosa (GC) (Fig. 2.15), associadas a vários detetores que devem ser escolhidos consoante as características dos compostos a pesquisar, como por exemplo o FPD (detetor fotométrico de chama) (Fig. 2.16), o UV (detetor por Ultra violeta) (Fig. 2.17), o FLD (detetor por fluorescência) (Fig. 2.18), o NPD (detetor de

azoto e fósforo), o ECD (detetor por captura de eletrões), o MS (espetrometria de massa) e o IR (detetor por infra vermelhos) [39].

O HPLC, é um tipo de cromatografia que emprega uma fase móvel líquida e uma fase estacionária sólida, compactada na coluna. Este sistema para que possa ter um fluxo razoável e constante trabalha a altas pressões, esta técnica está descrita em pormenor mais à frente neste capítulo. Por sua vez, o GC, é um tipo de cromatografia que emprega uma fase móvel gasosa e uma fase estacionária sólida ou líquida⁶, e cujos analitos terão de ser suficientemente voláteis ou semi - voláteis e estáveis nessa condição. As temperaturas num forno de GC, poderão ser elevadas (entre os 150°C e os 300°C logo, os compostos que se degradam a estas temperaturas não poderão ser detetados por esta técnica cromatográfica [39].

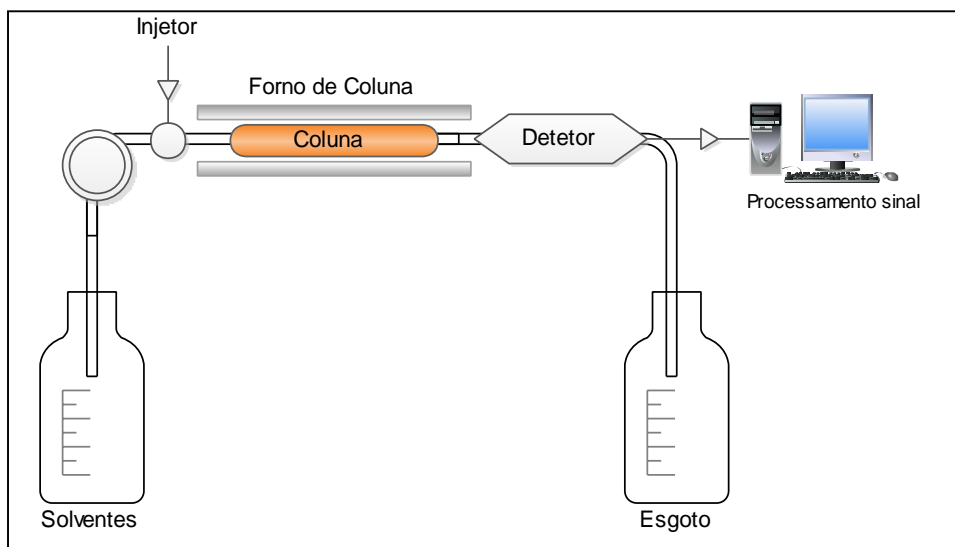


Fig. 2.14 Esquema da cromatografia líquida (HPLC).

⁶ No caso de fase sólida designa-se por cromatografia Gás-sólido (GC-S) e no caso de fase líquida designa-se por cromatografia Gás-líquido (GC-L)

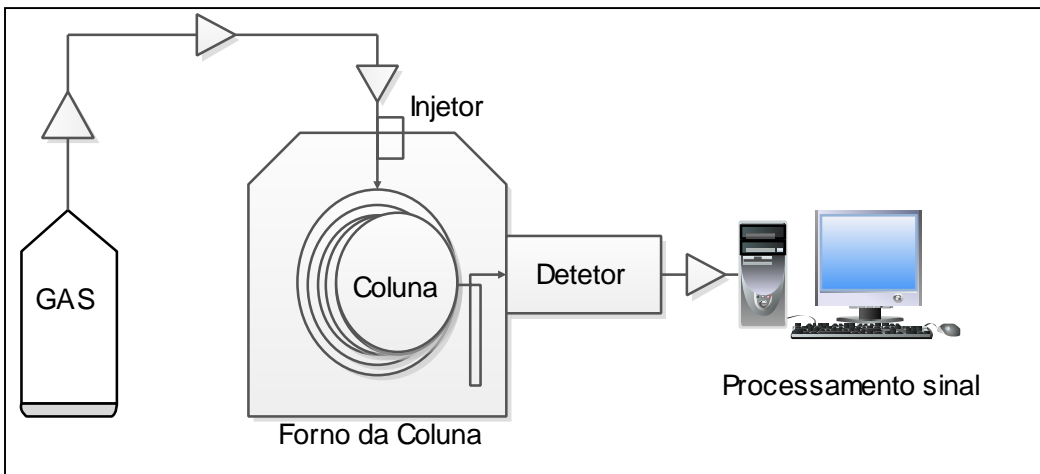


Fig. 2.15 Esquema da Cromatografia gasosa (GC).

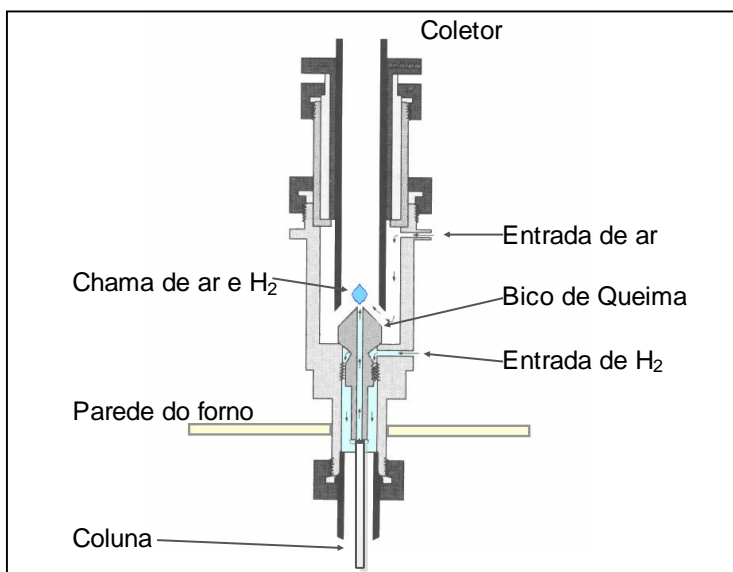


Fig. 2.16 Esquema de um detector FPD.

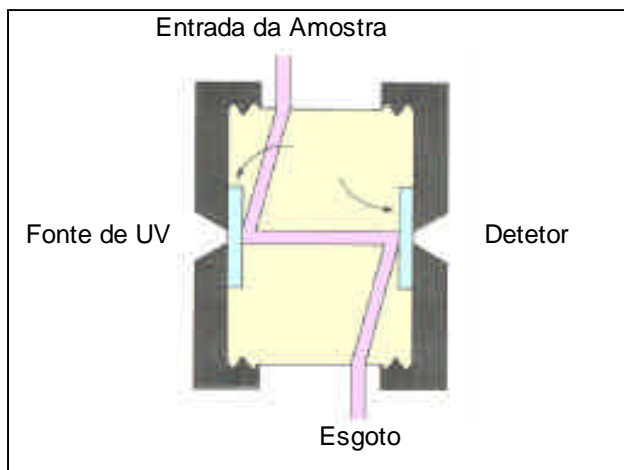


Fig. 2.17 Esquema de um detector UV.

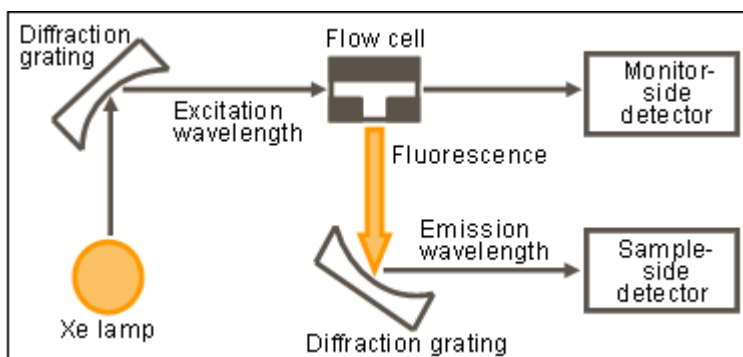


Fig. 2.18 Esquema de um detector FLD.

Em relação às fases móveis, também denominadas de eluentes, podem ser fases aquosas ou orgânicas, consoante o analito e fase estacionária em causa, sendo que os mais habituais são, água, metanol e acetonitrilo, em cromatografia líquida [39].

A determinação dos analitos, só poderá ser possível com a variedade de detetores existente, que permitem uma maior seletividade no que concerne aos analitos. Os pesticidas como por exemplo os organoclorados e alguns organofosforados devem ser pesquisados preferencialmente utilizando os detetores ECD, NPD e FPD [49] [50]. No caso específico dos *n*-metilcarbamatos, a opção preferencial é a análise e deteção utilizando o sistema cromatográfico HPLC com detetor FLD ou MS [39].

Em suma, e de acordo com o que foi já dito em parágrafos anteriores, o principal objetivo da cromatografia é separar um ou mais analitos numa mesma mistura, sendo a detecção dos analitos processada por uma sucessão de picos, correspondentes aos analitos separados, denominado de cromatograma.

2.5 Cromatografia líquida de alta pressão (HPLC).

A técnica de HPLC é uma técnica adequada para a separação dos componentes (espécies iônicas, macromoléculas, constituintes termolábeis) de soluções líquidas e utiliza-se quer para fins analíticos quer para fins preparativos e em escala comercial. Esta técnica baseia-se no princípio de que uma determinada substância, ao passar por uma coluna cromatográfica com um determinado enchimento e fase móvel, pode ser identificada tendo como base o tempo de retenção, dependendo do fluxo, comprimento e diâmetro da coluna [39].

A separação ocorre através de um mecanismo de interação seletiva entre as moléculas presentes na amostra e duas fases, uma móvel e outra estacionária. Os diferentes constituintes da amostra, devido às suas características físico-químicas específicas, interagem de modo distinto com as fases móveis e estacionárias, resultando daí diferentes velocidades de migração, permitindo o desenvolvimento da separação cromatográfica [46]. Assim, de modo a exemplificar o funcionamento desta técnica cromatográfica utilizada neste trabalho, a amostra é injetada na coluna usando uma microseringa (na cromatografia analítica) ou uma válvula de injeção (em sistemas preparativos) e é homoganeamente distribuída no topo da coluna. A fase móvel ⁷, transportando a amostra, é forçada a percolar através da coluna por uma ação externa que pode ser a simples força da gravidade – cromatografia de baixa pressão – ou uma

⁷ Também denominada de Sistema de solventes

força mais intensa gerada por uma bomba peristáltica – cromatografia de alta pressão também chamada cromatografia de alta eficiência ou HPLC, de modo a superar a resistência da coluna ao escoamento da fase móvel [39].

As fases móveis (Anexo Tabela A.1) são normalmente preparadas, antes de qualquer passo no procedimento analítico, para que o sistema possa ser calibrado antes de iniciar a corrida cromatográfica, e guardadas em reservatórios de vidro, que permitem o acesso por linhas que ligam os mesmos ao sistema HPLC. Este sistema permite em simultâneo, manter a pressão dentro dos mesmos, permitindo também a desgaseificação automática com a entrada de gases, como por exemplo o hélio, para evitar a “entrada de bolhas de ar” dentro do sistema (Fig. 2.19) [39] [40] [41].

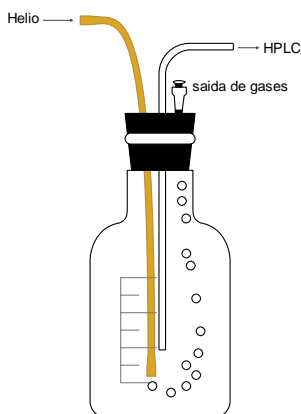


Fig. 2.19 Desgaseificação do sistema de solventes em HPLC.

No processo de eluição os componentes migram com velocidades diferentes e são identificados à saída da coluna num detetor que fornece um registo contínuo da composição da amostra analisada.

Na realização deste trabalho, foi utilizado o método cromatográfico HPLC-FLD, com derivatização automática pós coluna (Fig. 2.20).

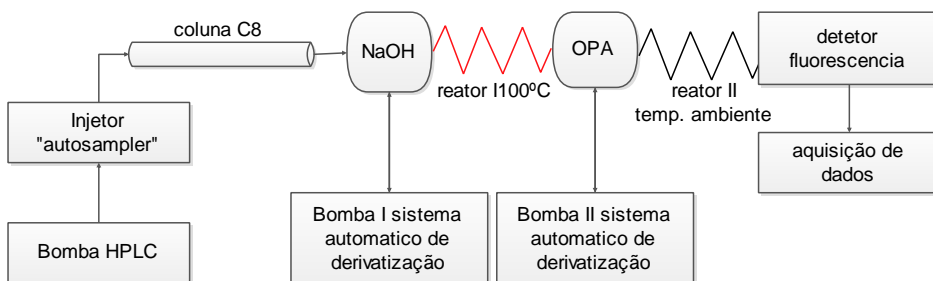


Fig. 2.20 Diagrama esquemático utilizado neste trabalho, mostrando os componentes de um sistema HPLC-FLD, com derivatização automática pós-coluna.

A separação dos *n*-metilcarbamatos estudados foi conseguida através da coluna capilar, *Carbamate Analysis* (C8 250 mm × 4.0 mm, 5 µm tamanho de partícula) (Fig. 2.21) [40].

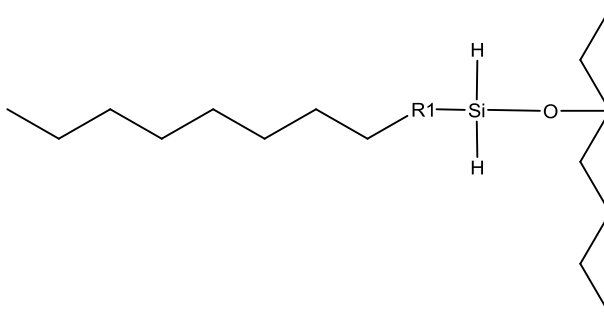


Fig. 2.21 Estrutura da fase estacionária da coluna C8.

A sílica modificada com o grupo octil covalentemente ligado retém os analitos por meio de interações de *Van de Waals*, forças dipolo-dipolo, ligações de hidrogênio ou por forças electrostáticas [40].

2.6 Detecção por Fluorescência.

Um dos primeiros passos no desenvolvimento de cromatografia líquida moderna foi a automação pela adição de um detector acoplado em linha com o HPLC. A variedade de instrumentos analíticos que foram utilizados como detectores revolucionou a cromatografia tal como a conhecemos hoje.

Originalmente, os instrumentos trabalhavam individualmente sendo a separação cromatográfica totalmente separada da detecção sendo assim, o trabalho mais moroso, menos sensível e na maioria das vezes mais suscetível a erros. A maior sensibilidade dos detectores utilizados em HPLC foi-se tornando cada vez mais necessária em certa medida pela aplicação da cromatografia na rotina clínica e pesquisa médica levando ao desenvolvimento de detectores capazes de detectar com maior fidelidade e maior sensibilidade substâncias em quantidades também elas cada vez mais pequenas (Tabela 2.1) [42] [43] [46].

Tabela 2.1 Vários tipos de detectores disponíveis para uso em HPLC [49].

Detector	Tipo ⁸	Sensibilidade à temperatura	Sensibilidade máxima ⁹
Absorção por UV	S	Baixa	2×10^{-10}
Fluorimetria	S	Baixa	10^{-11}
Electroquímica	S	1.5 % °C	10^{-12}
Condutimetria	S	2% °C	10^{-8}
Absorção por IR	S	Baixa	10^{-6}
Espectrometria de massa (MS)	G	-	10^{-10}

⁸ S – Seletivo; G - Geral

⁹ Sensibilidade para g/mL

No que diz respeito ao trabalho desenvolvido, a detecção por fluorescência foi a utilizada na detecção dos *n*-metilcarbamatos. Este tipo de detecção é geralmente mais sensível do que a detecção de absorção por UV/visível, embora o número de compostos naturalmente fluorescentes seja bastante limitado, e menos sensível do que a detecção por MS.

A fluorescência, é um tipo de espectrometria eletromagnética, que quantifica a emissão de luz de uma determinada partícula excitada previamente.

Posteriormente, e com a passagem dessa mesma partícula ao seu estado fundamental ou de menor energia, há emissão sob a forma de radiação.

Como podemos verificar pelo diagrama da Fig. 2.22, podemos visualizar a representação dos diferentes níveis de energia eletrônica. Este diagrama, relaciona as transições entre o nível fundamental de energia e os níveis energéticos para onde ocorre a excitação molecular e a emissão da energia radiante (sob forma de luz) aquando da passagem das moléculas de um estado excitado para o seu estado fundamental [43] [44].

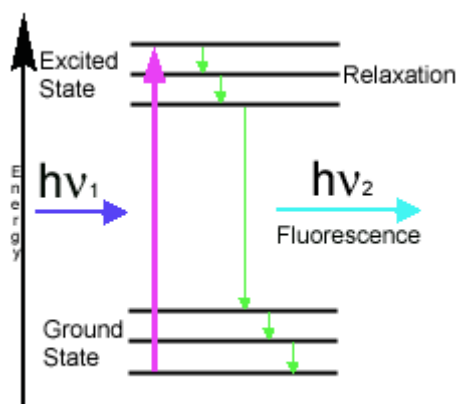


Fig. 2.22 Excitação e fluorescência molecular.

Quando se dá a excitação molecular (Fig. 2.23), e esta passa a um estado de maior energia, a molécula é excitada a um estado excitado *singlete* (S_n), em seguida, a mesma

molécula sofre relaxação e passa ao seu estado excitado *singlete*, de menor energia (S_1). A partir do estado S_1 , a molécula poderá tender para uma das seguintes situações [46].

- Se não houver diferenças significativas de energia entre o estado excitado e o estado fundamental, a molécula poderá ser levada ao seu estado de menor energia sem emissão de qualquer radiação eletromagnética.
- Se a diferença energética entre o estado excitado e o estado fundamental for significativa, a molécula emitirá radiação na forma de luz, isto é, fluorescência.

Na espectrometria por fluorescência, que permite a identificação de compostos fluorescentes, a emissão de luz observada é diretamente proporcional à concentração dos compostos analisados [46].

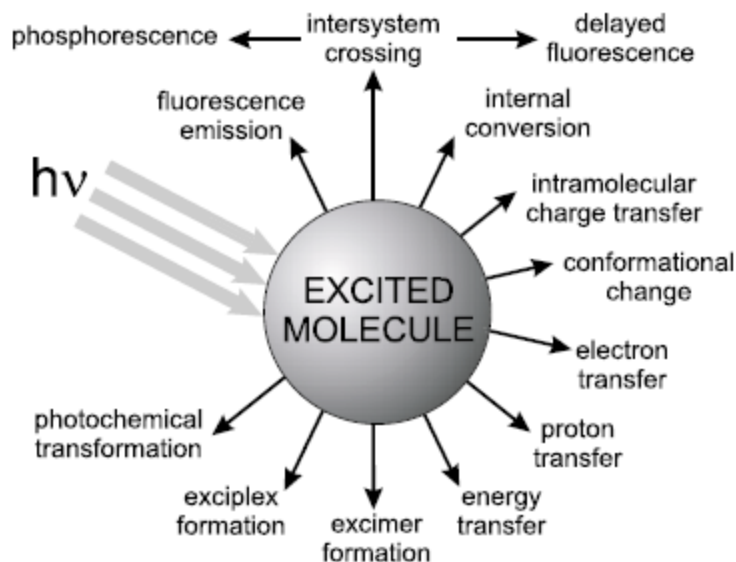


Fig. 2.23 Modos de transformação do estado excitado molecular [53].

A detecção por fluorescência necessita, na maioria das vezes, da chamada derivatização pré- ou pós-coluna para tornar as substâncias não fluorescentes em substâncias fluorescentes, logo detetáveis [50] [46].

O agente derivatizante mais utilizado na determinação por fluorescência de *n*-metilcarbamatos são o ortoftaldeído (OPA) e a principal vantagem que este reagente possui em relação aos outros reagentes derivatizantes, é que este reage rapidamente e possibilita a detecção de resíduos com valores de MRL muito baixos. A Fig. 2.24, representa a reação química entre a histamina e o reagente derivatizante OPA [40].

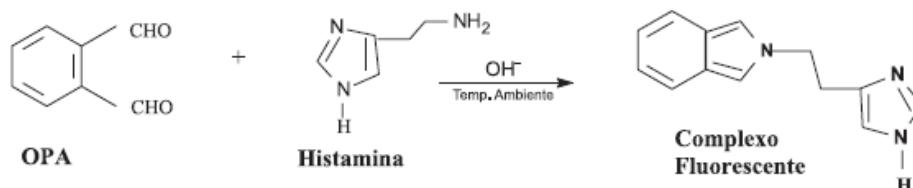


Fig. 2.24 Reação do OPA com a histamina, resultando num composto fluorescente [40].

A estratégia principal de uma boa separação cromatográfica, baseia-se em uma boa resolução dos picos, assumindo que os componentes em estudo poderão ser detetados sem problemas de maior. Contudo muitos dos compostos a detetar, como os alifáticos, ácidos carboxílicos ou aminoácidos, são de difícil detecção por detetores por absorção, fluorescência ou eletroquímicos. Assim a derivatização constitui uma opção para ultrapassar este problema, possibilitando que a muitos compostos sejam detetados por fluorescência, como é o caso dos *n*-metilcarbamatos. [45].

A derivatização poderá ser implementada num sistema de HPLC, antes ou depois da entrada da amostra na coluna, diferenciando uma derivatização pré ou pós coluna (Fig. 2.25).

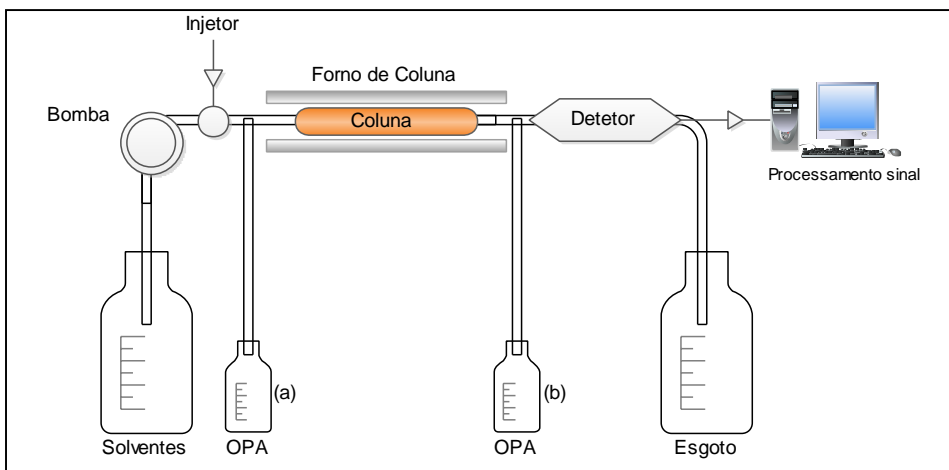


Fig. 2.25 (a) Sistema de derivatização pré coluna; (b) Sistema de derivatização pós coluna.

No trabalho desenvolvido utilizou-se uma derivatização automática pós-coluna, aumentando assim a sensibilidade e seletividade do método, e de forma a aumentar a eficiência da derivatização, os compostos são hidrolisados em primeiro lugar pelo reagente hidrolisante, (hidróxido de sódio, NaOH) no reator I do sistema de derivatização a 100°C e desta reação resultará um grupo álcool (R-OH), um ião carbonato (CO_3^{2-}) e metilamina (CH_3NH_2). No passo seguinte, no reator II do sistema automático de pós-derivatização, que se encontra à temperatura ambiente, o grupo metilamina reage com o OPA e um composto nucleófilo, resultante do 2-mercaptoetanol ($\text{HSCH}_2\text{CH}_2\text{OH}$), para a formação de um composto altamente fluorescente (Fig. 2.26) [40].

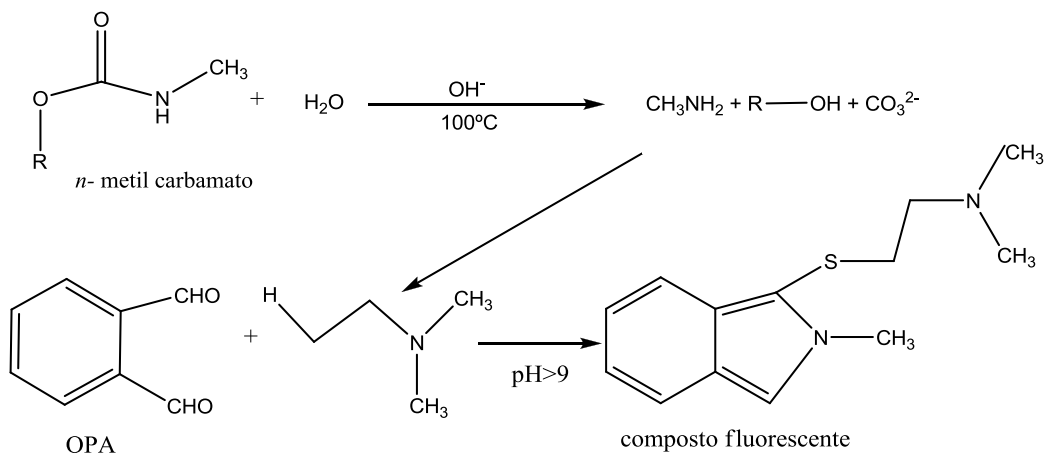


Fig. 2.26 Esquema da reação de derivatização de um *n*-metilcarbamato [40].

2.7 Desenvolvimento e validação de métodos analíticos.

A validação de um ensaio analítico consiste em demonstrar, através de evidências objetivas, que o mesmo é adequado para uma dada análise, assim de acordo com a Tabela 2.2, podemos dividir as diferentes fases da validação, no que concerne a um método analítico de HPLC-FLD.

Tabela 2.2 Etapas envolvidas no desenvolvimento da generalidade de um método de HPLC-FLD.

Fases	Parâmetros	Descrição
1	Geral	Definir qual o objetivo do método, os analitos a estudar e matrizes de interesse
2	FLD	Verificação dos procedimentos de derivatização, incluindo os parâmetros do sistema automático de pós-derivatização.
3	Cromatografia	Seleção da coluna, fases móveis, parâmetros cromatográficos como fluxo, temperatura da coluna, volume de injeção, etc.
4	Validação preliminar	Verificação de curvas de calibração em solvente para testar o sistema cromatográfico e derivatização automático.
5	Validação final	Estudo dos parâmetros da validação de acordo com as “ <i>guide lines</i> ” do laboratório em causa.

Os parâmetros a estudar dependem das características do ensaio analítico (e.g. ensaio qualitativo ou quantitativo), do tipo e complexidade da amostra, e não menos importante, da experiência que o laboratório já tenha na utilização do método (Tabela 2.3). O processo de validação não pode de forma nenhuma ser separado do processo de desenvolvimento do método, porque o desenvolvimento de um método analítico é um processo “flutuante” e muito pouco metódico, devido às várias alterações e condições que poderão aparecer durante o processo de análise. A validação e o desenvolvimento de um método constituem desta forma um processo interativo, ou seja os resultados da validação podem tornar necessária a alteração de um dos parâmetros do método, o que por sua vez poderá levar ao início de todo o processo de validação. Estes parâmetros poderão sofrer alterações mediante os diferentes tipos de laboratórios e “*guide lines*” seguidas, mas regra geral, são estes os mais comumente utilizados para a validação de um método analítico [48].

Os ensaios da validação da metodologia analítica envolvida neste trabalho, foram efetuados tendo por base as normas descritas no “*Method Validation and Quality Control Procedures for Pesticide Residues Analysis in Food and Feed*”, (SANCO/12495/2011), e a metodologia desenvolvida foi baseado no método interno da divisão de análise de resíduos do laboratório regional da Região Autónoma da Madeira, IT.MP.DSLA.01.26 método interno de análise de resíduos *n*-metilcarbamatos em amostras vegetais.

Tabela 2.3 Parâmetros a estudar num procedimento de validação de um método analítico.

Tipo de confirmação	Linearidade.	LOD ¹⁰	LOQ ¹¹	Exatidão	Precisão	Seletividade / especificidade
Qualitativo ¹²	+	+	-	-	+	+
Quantitativo	+	+	+	+	+	+

Na validação do método analítico para a determinação dos nove *n*- metilcarbamatos, foram avaliados os seguintes parâmetros:

- Especificidade / Seletividade
- Gama de trabalho / Linearidade
- LOD e LOQ
- Precisão (Repetibilidade, reprodutibilidade e precisão intermédia)
- Exatidão / recuperação do método

¹⁰ Limite de deteção

¹¹ Limite de quantificação

¹² Teste de identificação

2.7.1 Especificidade / Seletividade.

Estes parâmetros avaliam a existência de compostos interferentes que possam comprometer a capacidade do método analítico em identificar inequivocamente o(s) analito(s) em causa, e diferencia-los de outros interferentes como isómeros, metabolitos, substâncias endógenas ou exógenas, componentes da própria matriz, etc. [48] [49].

Como interferentes, podemos também identificar várias condicionantes como, reações químicas existentes durante a corrida cromatográfica entre analitos e fases móveis, formação de complexos, absorção por parte de componentes da matriz ou fases móveis, interações bioquímicas (imunoquímicas ou enzimáticas), aparecimento de complexos redox.

A especificidade e a seletividade, são dois parâmetros que estão intimamente ligados ao fenómeno de deteção, sendo a especificidade relativa a um método específico para um único analito e a seletividade referente a um método para a deteção de vários analitos, com capacidade de distinção entre eles.

Neste trabalho, e tendo em conta que estão em causa a determinação de vários analitos, estudou-se a seletividade. Uma das formas para a determinação deste parâmetro, é injetando um número representativo de amostras brancas, e comparando-as com amostras da mesma matriz mas fortificadas com o analito em estudo, de modo a verificar a presença ou não de interferentes e o efeito dos mesmos.

Assim, podemos visualmente comprovar o resultado positivo para a matriz fortificada com o nosso analito, e o resultado negativo para a matriz sem o analito, através da comparação de ambos os cromatogramas.

Nas figuras seguintes (Figs. 2.27, 2.28 e 2.29), podemos verificar, um exemplo prático da verificação deste parâmetro, podemos verificar que na matriz não fortificada, não existem interferentes que possam colocar em causa a determinação inequívoca do analito de interesse, comparavelmente com a matriz fortificada. Para se excluir que o pico existente na matriz fortificada não era um “artefacto da matriz” injetou-se o padrão puro na mesma concentração (0,06 mg kg⁻¹), verificando-se a verosimilhança entre cromatogramas.

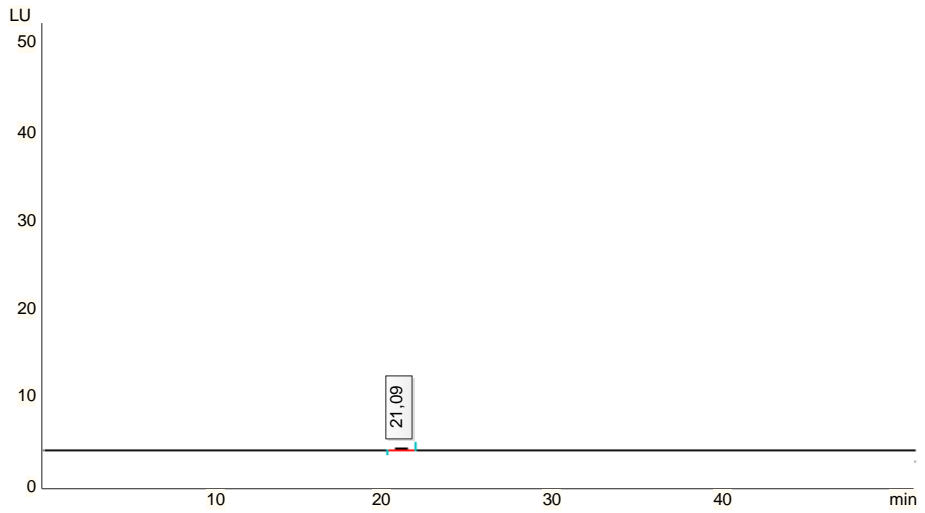


Fig. 2.27 Matriz não fortificada.

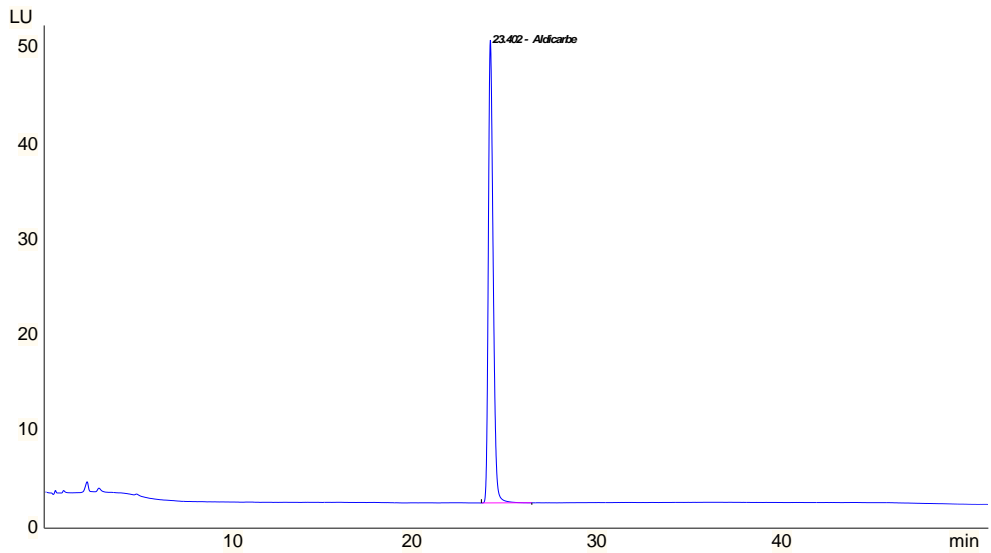


Fig. 2.28 Exemplo de cromatograma de um padrão 100% em ACN.

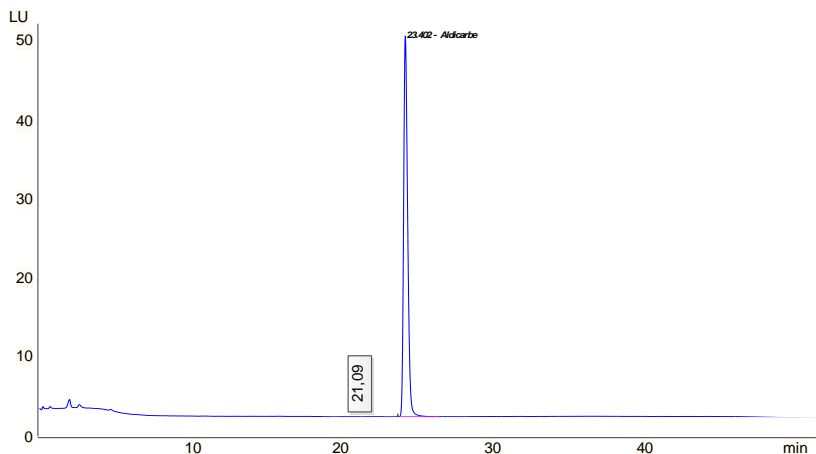


Fig. 2.29 Exemplo de um cromatograma, com a matriz fortificada.

Neste trabalho, a avaliação do parâmetro seletividade foi determinado por comparação dos cromatogramas dos padrões puros, matriz sem fortificação e matriz fortificada, e verificação visual de algum interferente que pudesse colocar em causa a determinação inequívoca deste parâmetro.

2.7.2 Gama de trabalho e linearidade.

Para qualquer método quantitativo, existe uma gama de concentrações do analito em causa, no qual o método poderá ter aplicabilidade, sendo que os primeiros valores dessa gama de concentrações podem ser relativos ao LOD e LOQ, definindo-se como “gama de trabalho”. A gama de trabalho estudada, deverá ter em conta os valores pretendidos, ou seja, no caso deste trabalho, a gama de trabalho abrange os valores a determinar na rotina laboratorial para a determinação de *n*-metilcarbamatos em amostras de origem animal (0,03 – 0,30 mg kg⁻¹) [48] [50].

A linearidade do método avalia o intervalo de concentrações onde a resposta instrumental é proporcional à concentração do analito, demonstrando que os sinais analíticos obtidos são diretamente proporcionais à concentração do analito na amostra, dentro do intervalo especificado [48].

Recomenda-se que o estudo da linearidade do método seja feito recorrendo a uma curva de calibração com pelo menos 5 concentrações distintas (Fig. 2.30). A análise do ajuste dos dados é efetuado através do coeficiente de determinação (r^2), que deverá ser próximo de 1, e do gráfico de resíduos onde a distribuição dos mesmos deverá ser aleatória.

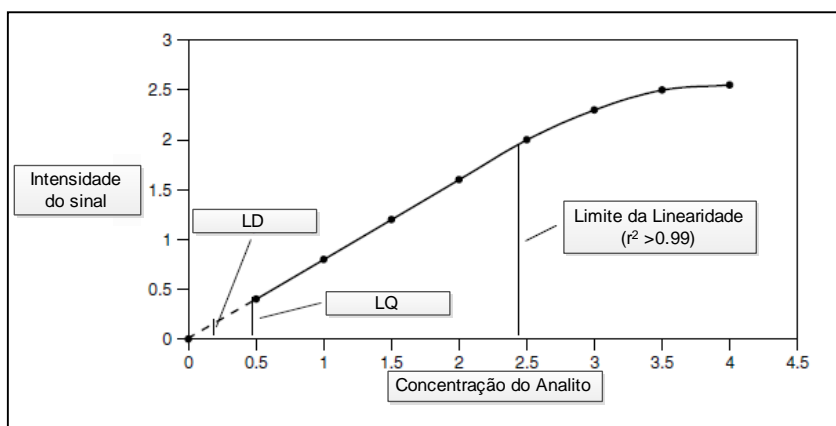


Fig. 2.30 Curva de calibração para determinação da linearidade do método.

Para proceder à determinação da linearidade, é construída para cada analito uma reta de calibração, devendo ser preparada na mesma matriz que a do estudo previsto, por adição de concentrações conhecidas do mesmo. O número de pontos de calibração para a construção da reta deve ser suficiente de forma a definir, adequadamente, a relação concentração / resposta. Por outro lado, devem geralmente ser eleitos em função do intervalo de concentrações que se espera estudar [48].

2.7.3 LOD e LOQ.

O LOD de uma substância define-se como a menor concentração da substância que pode ser detetada e diferenciada do “ruído de fundo” do cromatograma sem, no entanto, ser ainda possível quantificá-la. Em termos quantitativos, o LOD é determinado pela equação 2.1 [48].

$$\text{LOD} = \left(\frac{3.3 \times S_{\frac{y}{x}}}{b} \right) \quad (\text{Equação 2.1})$$

Onde:

- $S_{\frac{y}{x}}$ desvio padrão residual da curva de calibração.
- b declive da reta.

O LOQ corresponde à menor concentração da substância que pode ser determinada e quantificada com precisão e exatidão. Em geral, o LOQ pode ser considerado o ponto mínimo da reta de calibração do analito, isto, quando se trabalha em níveis baixos de concentrações.

Em termos quantitativos, o LOQ é determinado pela equação 2.2 [48].

$$\text{LOQ} = \left(\frac{10 \times S_{\frac{y}{x}}}{b} \right) \quad (\text{Equação 2.2})$$

Onde:

- $S_{\frac{y}{x}}$ desvio padrão residual da curva de calibração (equação 2.3).

$$S_{\frac{y}{x}} = \sqrt{\frac{\sum_{t=1}^N [y_i - (a + b_{xi})]^2}{N - 2}} \quad (\text{Equação 2.3})$$

- b declive da reta.

2.7.4 Precisão.

A precisão de um método analítico descreve a proximidade das medidas individuais do analito quando o procedimento é aplicado repetidamente a múltiplas alíquotas de um mesmo volume homogêneo de uma matriz, ou seja, permite observar o grau de concordância (grau de dispersão) entre uma série de medidas obtidas a partir de uma amostra homogênea [48] [51].

Este parâmetro de validação, engloba a variabilidade dos resultados em três situações, a utilização do método analítico em condições idênticas, isto é, medições efetuadas com o mesmo procedimento, mesmo analista, mesma instrumentação (repetibilidade), avaliar a imprecisão a um nível mais abrangente, refletindo as diferenças aleatórias esperadas para a comparação dos mesmos resultados entre laboratórios distintos (reprodutibilidade intralaboratorial) e medir a concordância entre os resultados obtidos no mesmo laboratório, variando alguns itens, como analista e/ou equipamentos (precisão intermédia).

Para o cálculo da repetibilidade devemos efetuar várias análises, com pelo menos 5 réplicas, para cada um dos níveis de fortificação, neste caso RL 4RL e 8RL (RL=0,03 mg kg⁻¹), avaliando posteriormente o grau de concordância entre os resultados das várias medições sucessivas, efetuadas sob as mesmas condições de medição.

Na reprodutibilidade, avaliamos a imprecisão ao nível mais abrangente, refletindo as diferenças aleatórias esperadas na comparação dos resultados obtidos entre os vários laboratórios envolvidos.

No caso da precisão intermédia, este parâmetro refere-se à concordância entre resultados do mesmo laboratório, embora obtidos em dias diferentes, com analistas e equipamentos diferentes.

Tanto a repetibilidade como a precisão intermédia são traduzidas pelo coeficiente de variação (% CV) ou desvio padrão relativo (do inglês *random standart deviation* % RSD), cujo valor deve ser inferior a 20% (equação 2.4) [48].

$$\% \text{ CV} = \frac{s}{\bar{x}} \times 100 \quad (\text{Equação 2.4})$$

Onde:

- *s* desvio padrão (equação 2.5)
- \bar{x} média dos resultados (equação 2.6)
- CV coeficiente de variação.

$$s = \left[\sum_{i=1}^n \frac{(x_i - \bar{x})^2}{N-1} \right]^{\frac{1}{2}} \quad (\text{Equação 2.5})$$

$$\bar{x} = \sum_{i=1}^n \frac{x_i}{N} \quad (\text{Equação 2.6})$$

Onde:

- *N* – número total das medidas
- x_i - medidas individuais

2.7.5 Exatidão.

A exatidão é definida como sendo a concordância entre o resultado de um ensaio e o valor de referência aceite como verdadeiro, ou seja exprime a concordância entre o valor real determinado pelo método (resultado obtido) e o valor de referência (resultado esperado) [48].

As amostras possuem inúmeros componentes, que poderão interferir com a análise cromatográfica, logo a medida pode ser afetada por um erro sistemático e/ou por um erro aleatório. No entanto, a exatidão é frequentemente usada apenas para descrever a componente do erro sistemático, isto é, sendo definida como a diferença entre a média dos resultados de uma série de ensaios e um valor teórico aceite como exato, podendo ser expressa como um desvio entre essa média e o valor considerado verdadeiro, ou como percentagens de recuperação de um dado analito em estudos efetuados sobre amostras fortificadas.

A exatidão, também confere um carácter “fidedigno” ao método extrativo selecionado, já que, as amostras biológicas devido à sua complexa composição, necessitam de procedimentos de extração eficientes, que sejam capazes de eliminar possíveis interferências e extrair os analitos de interesse, sem que essas etapas, procedentes do processo de extração, possam conduzir à perda inevitável dos nossos analitos [48]. Este parâmetro, exatidão, pode ser determinado de várias maneiras, como a utilização de padrões de referência, método de adição de padrão, comparação de métodos ou procedimentos analíticos validados e pelo cálculo da percentagem de recuperação da quantidade conhecida do analito adicionado à amostra, sendo este último o procedimento adotado neste trabalho.

Para a avaliação da exatidão foram injetadas em triplicado no sistema HPLC - FLD as soluções de amostra fortificada em três níveis de concentração, tal como indicado (2RL, 6RL, e 10RL, sendo que RL = 0,03 mg kg⁻¹).

Determinaram-se as áreas obtidas e foi calculada para cada um dos compostos em estudo a percentagem de recuperação para cada nível de concentração nas matrizes analisadas.

A recuperação do método mede o rendimento da extração, ou seja, a fração de massa do analito contido na amostra que se encontra presente no extrato final do processo extrativo. De um modo simples, este parâmetro avalia a “capacidade do método de extração em extrair” com alto rendimento o nosso analito da matriz em causa, sem a perda do mesmo.

A percentagem de recuperação pode ser obtida através da equação 2.7 [48].

$$\text{Recuperação (\%)} = \frac{\text{valor medido}}{\text{valor teórico fortificado}} \times 100 \quad (\text{Equação 2.7})$$

Os ensaios de recuperação, são tão mais exatos quanto mais próximo dos 100%, sendo que recuperações entre 70 e os 120% poderão ser considerados para uma boa sensibilidade e exactidão do método [48]

Outro dos parâmetros que poderiam ser estudados junto com a exatidão, seria o “*carryover*”, que consiste no estudo dos fenómenos de arrastamento em conjunto com a eficiência da extração, obtida através da exatidão [48] [49].

Este procedimento consiste, na injeção de amostras fortificadas, em três níveis de fortificação, para o estudo da eficiência da extração, juntamente com duas amostras “brancas”, que seriam injetadas entre as amostras fortificadas, para detectar uma possível contaminação. Posteriormente visualizava-se os cromatogramas das amostras “brancas” e visualizávamos a existência de contaminação por parte das amostras fortificadas.

Este passo não foi concretizado, por não fazer parte dos procedimentos de validação de métodos analíticos em rotina no LRVSA.

Capítulo III

3 Procedimento Experimental.

3.1 Material.

Para a execução deste trabalho foram adquiridos os seguintes materiais e reagentes; acetonitrilo (ACN) (99.8% pureza, Merck®), metanol (MeOH) (99.9% pureza, Carlo Erba® HPLC Gold Ultragradient), 2-mercapto-etanol (HSCH₂CH₂OH) (98% pureza, Merck®), ortoftaldeído (C₈H₆O₂, OPA) (97% pureza, Fluka®), ácido bórico (H₃BO₃) (99.8% pureza, Sigma-Aldrich®), hidróxido de sódio (NaOH) (99% pureza, Riedel-de Haën®), citrato de sódio dibásico sesquihidratado (C₆H₆Na₂O₇·1.5H₂O) (99% pureza, Sigma-Aldrich®), citrato de sódio tribásico dihidratado (C₆H₅Na₃O₇·2H₂O) (98% pureza, Sigma-Aldrich®), cloreto de sódio (NaCl) (99.8% pureza, Fischer Scientific®), sulfato de magnésio (MgSO₄) (96% purity, Panreac®), amina primária e secundária (PSA) (100% pureza, Supelco®), ácido acético (CH₃COOH) (99.9% pureza, Merck®), foram adquiridos à empresa JMGS – José Manuel Gomes dos Santos, Lda, reagentes para análise e uso científico – material de laboratório (Odivelas, Portugal). Os padrões dos *n*- metil carbamatos, aldicarbe sulfóxido, oxamil, metomil, 3-hidroxi-carbofurão, aldicarbe, carbofurão, propoxur, carbaril e metiocarbe, foram adquiridos à empresa Dr. Ehrenstorfer® GmbH (Augsburg – Germany), sendo a pureza de todos os padrões superior a 98%. Utilizou-se durante todo o método analítico e validação água ultrapura (18.2 MΩ.cm a 25 °C) obtida através do sistema purificador Milli-Q (Millipore-Simplicity® 185, França); a derivatização pós coluna dos *n*- metil carbamatos foi obtida com o sistema de derivatização automática pinnacle PCX (Pickering® Laboratories, USA); o HPLC-FLD Agilent® 1200 series, foi adquirido à empresa SOQUÍMCA (Lisboa, Portugal) e a coluna analítica (C8 5µm, 4.0 × 250 mm) adquirida à Pickering® Laboratories (USA); foi utili-

zado também utilizado o vortex Heidolph® instruments reax top (Germany), a Centrifuga P-select meditronic BL-S, o dispensador automático Opus Hirschmann Laborgate® 20 mL ex 20°C, o Rotavapor Heidolph® Laborota 4001 efficient, a Balança precisa gravimetrics XB 1200C Dietikon, Swit. Todas as amostras usadas neste trabalho, foram filtradas com filtros de 0.20 µm Grace Davison Discovery®, USA, o método QuEChERS usa tubos teflon de 50 mL.

3.2 Preparação das soluções e amostras.

3.2.1 Soluções padrão.

As soluções padrão (Anexo - Tabela A.2) utilizadas para a mistura dos *n*-metilcarbamatos, foram obtidas por diluição das diferentes “soluções mãe” com concentração de 400 mg L⁻¹. Estas soluções individuais de cada padrão, encontravam-se previamente preparadas e armazenadas a 1.5°C. A sua preparação foi da responsabilidade dos técnicos analistas do LRVSA, que por norma não permite a sua realização por estranhos ao serviço.

A partir das soluções mãe de 400 mg L⁻¹ de cada um dos padrões, preparou-se uma “solução mistura” intermédia de 200 mg L⁻¹ de todos os padrões, e posteriormente uma solução de trabalho a 10 mg L⁻¹, resultado da diluição da solução mistura intermédia de 200 mg L⁻¹ (Fig.3.1). Todas estas soluções foram armazenadas a 1.5°C.

Para o cálculo das várias diluições utilizou-se a seguinte expressão (equação 3.1):

$$\text{Concentração}_{\text{inicial}} \times \text{Volume}_{\text{inicial}} = \text{Concentração}_{\text{final}} \times \text{Volume}_{\text{final}} \quad (\text{Equação 3.1})$$

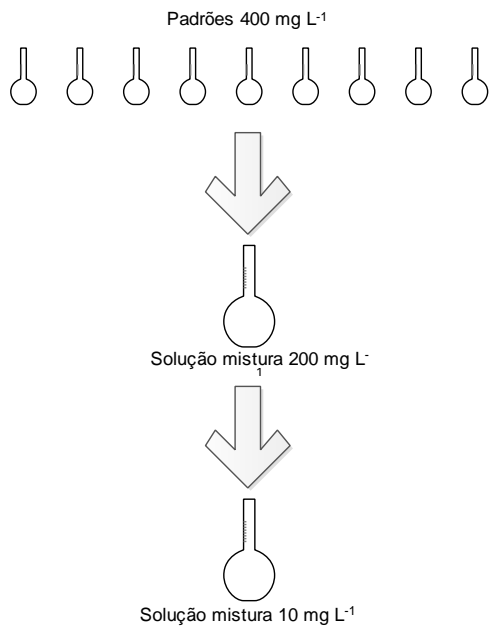


Fig. 3.1 Preparação das soluções de trabalho.

3.2.2 Amostras.

A amostra utilizada durante toda a validação do método, foi fornecida pelo centro de abate da Região Autónoma da Madeira (CARAM), e foi previamente rastreada, por um sistema cromatográfico HPLC - MS/MS, após procedimento extrativo, para excluir a presença de *n*-metilcarbamatos ou de outros analitos que possam colocar em causa a validação.

Para aplicação do método as amostras foram obtidas num supermercado local.

3.2.3 Processamento da Amostra.

Utilizou-se aproximadamente 150 g de músculo de suíno (Fig. 3.2), cedido pelo CARAM. Estas amostras foram cortadas em pequenos cubos e congeladas (-18°C) durante aproximadamente 24h.



Fig. 3.2 Músculo de suíno cortado em cubos e congelado posteriormente.

Posteriormente, a amostra foi triturada intensivamente, até se obter uma mistura fina homogênea, voltando-se a congelar (-18°C) até ao momento da extração (Fig. 3.3).



Fig. 3.3 Trituração / homogeneização da amostra.

Em relação ao processamento da amostra para fins de análise de resíduos de pesticidas em alimentos, a OMS define alguns aspectos gerais da metodologia referentes à recolha da amostragem, processamento e posterior armazenamento [11].

No que diz respeito às amostras, a OMS refere que estas devem ser analisadas o mais rapidamente possível após a sua colheita antes da ocorrência de alguma alteração física ou química [11]. No caso de ser necessário conservar as amostras por longos períodos antes da sua análise, devem utilizar-se, sempre que possível, recipientes estanques e o armazenamento deve ser efetuado sob refrigeração. Como possíveis fontes de degradação de pesticidas destaca-se a luz. Desta forma, a amostra e todas as soluções e extratos devem ser mantidos ao abrigo da luz.

O tipo de material a utilizar durante a análise não deve interferir com a amostra. Assim, todos os solventes e reagentes a utilizar devem estar isentos de substâncias que possam interferir ou que provoquem alguma degradação dos pesticidas na amostra. Os solventes devem possuir um elevado grau de pureza e devem ser sempre efetuados ensaios em branco por forma a demonstrar a ausência de interferência com a matriz a analisar [11] [27].

3.3 Procedimento de extração QuEChERS.

Pesou-se 10 ± 0.1 g de amostra, previamente processada, para um tubo de teflon de 50 mL (Fig. 3.4).



Fig. 3.4 Pesagem do músculo de suíno, previamente homogeneizado.

Fortificaram-se as amostras com a mistura padrão com os nove *n*-metilcarbamatos em estudo: aldicarbe sulfóxido, oxamil, metomil, 3- hidróxicarbofurão, aldicarbe, carbofurão, propoxur, carbaril e metiocarbe (solução padrão de 10 mg L^{-1}) para os diferentes níveis da curva de calibração (0,03; 0,12; 0,24; 0,36; 0,48; 0,30 mg kg^{-1}).

Posteriormente foram adicionados 10 mL de ACN acidificado (1% de CH_3COOH), e agitou-se vigorosamente durante aproximadamente 1 min para induzir a extração dos pesticidas para a fase aquosa (Fig. 3.5).



Fig. 3.5 Fase de extração, matriz com ACN acidificado (1% de CH_3COOH).

Seguidamente foi adicionada a “mistura QuEChERS” de 4 g de MgSO_4 , 1 g de NaCl , 0.5 g de $\text{C}_6\text{H}_6\text{Na}_2\text{O}_7 \cdot 1.5\text{H}_2\text{O}$ e 1 g $\text{C}_6\text{H}_5\text{Na}_3\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$. Centrifugou-se a 3000 rpm durante 5 min (Fig. 3.6).



Fig. 3.6 Fase da extração líquido-sólido 1 - “mistura QuEChERS”; 2 - 6,5 g da “mistura QuEChERS”; 3 e 4 - agitação e centrifugação.

Foi pipetado 3 ml do sobrenadante obtido após a centrifugação anterior (Fig. 3.7) para um tubo teflon de 10 mL aos quais se adicionaram 600 mg de MgSO_4 e 200 mg de PSA, seguindo-se nova agitação durante 5 minutos num agitador tipo vortex e centrifugação durante 5 minutos a 3000 rpm (Fig. 3.8).



Fig. 3.7 Resultado após o procedimento de extração QuEChERS antes do “clean-up”.

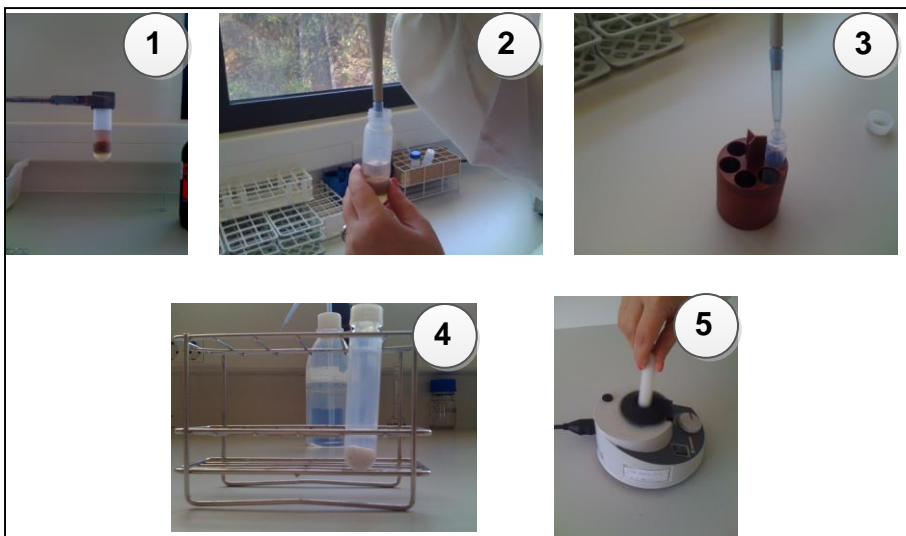


Fig. 3.8 Fase do “*Clean up*” 1 e 2 – pipetar 3 mL do sobrenadante; 3 – colocar num tubo teflon de 10 mL; 4 – adição de 600 mg de $MgSO_4$ e 200 mg de PSA; 5 – Agitação e centrifugação.

Foi retirado 2 ml do sobrenadante para um balão e esta solução foi evaporada em rotaevaporador e completada para cerca de 1 ml com 10:90 (ACN: H_2O) (Fig. 3.9).



Fig. 3.9 Evaporação e reconstituição do sobrenadante.

3.4 Análise pós HPLC-FLD com derivatização automática pós-coluna.

A análise foi efetuada utilizando um cromatógrafo líquido com detetor de fluorescência (1200 series Agilent Technologies, Alemanha) acoplado com um sistema de derivatização automático, pós coluna Pinnacle PCX da Pickering Laboratories (Fig. 3.10), EUA, software HPLC 1200 series, equipado com uma Coluna carbamate analysis (serial 002831) C8 4.0 m × 250 mm, 5 μm (Pickering Laboratories, E.U.A).



Fig. 3.10 HPLC 1200 series da Agilent e Pinnacle PCX da Pickering.

As condições cromatográficas finais obtidas após otimização do método estão descritas nas Tabelas 3.1 e 3.2.

Tabela 3.1 Condições utilizadas em HPLC e PCX Pinnacle.

Fluxo	0,900 mL min. ⁻¹
Temp. coluna	40 °C
Equilíbrio	10 min.
Volume Injeção	100 µL
λ Excitação	330 nm
λ Emissão	465 nm
Temp. reator	100 °C
Vol. Hidrolisante	0,3 mL min. ⁻¹
Vol. OPA	0,3 mL min. ⁻¹

Tabela 3.2 Gradiente das fases móveis.

Tempo min.	% A	% B
	[10% ACN: 90% H ₂ O]	[80% ACN: 20% H ₂ O]
0,00	95	5
5,00	95	5
40,00	47,2	52,8
45,00	20	80
50,00	20	80
50,10	95	5
55,00	95	5

Capítulo IV

4 Resultados e Discussão.

4.1 Estudo das soluções padrão dos *n*-metilcarbamatos em ACN.

O cromatograma para o estudo dos padrões foi obtido através da injeção direta da solução padrão a $0,03 \text{ mg L}^{-1}$, obtida a partir da diluição da solução de trabalho de 10 mg L^{-1} , (Fig. 4.1).

Este cromatograma (Fig. 4.2) foi o ponto de partida para a identificação dos *n*-metilcarbamatos e a determinação dos tempos de retenção (t_r) por HPLC/FLD (Tabela 4.1).

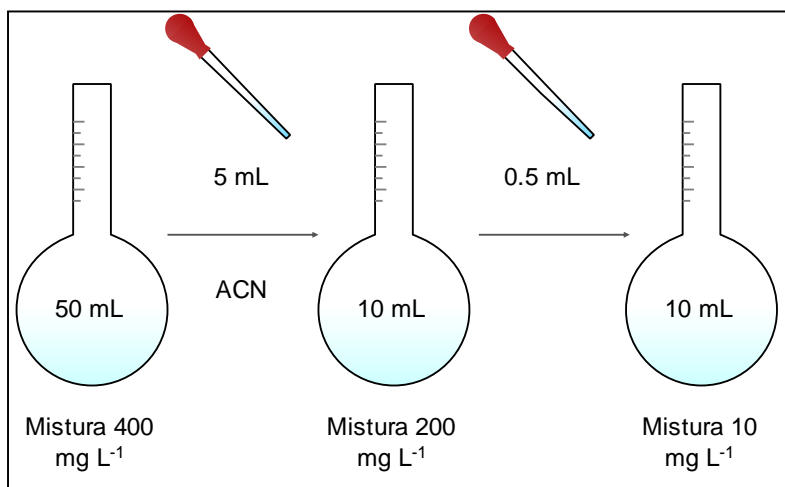


Fig. 4.1 Diluições para estudo das soluções padrões dos *n*-metilcarbamatos.

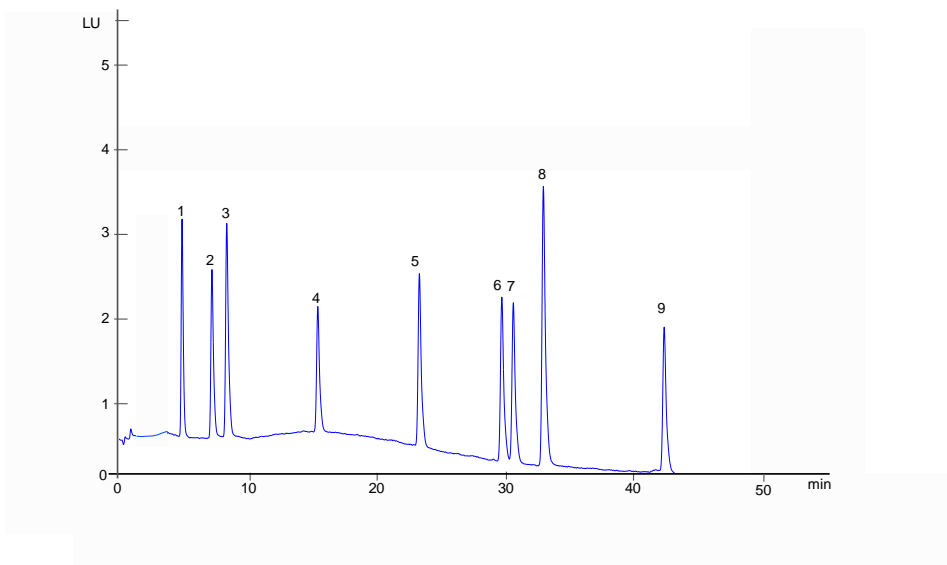


Fig. 4.2 Solução padrão a $0,03 \text{ mg L}^{-1}$, 1 – aldicarbe sulfóxido, 2 – oxamil, 3 – metomil, 4 – 3-hidroxicarbofurão, 5 – aldicarbe, 6 – propoxur, 7 – carbofurão, 8 – carbaril, 9 – metiocarbe.

Tabela 4.1 Tempos de retenção dos nove *n*-metilcarbamatos obtidos a partir da injeção direta da solução padrão com concentração de $0,03 \text{ mg L}^{-1}$.

<i>n</i> -metilcarbamato	t_r (min)
Aldicarbe Sulfóxido	4,880
Oxamil	7,270
Metomil	8,380
3-Hidroxicarbofurão	15,480
Aldicarbe	23,400
Propoxur	30,200
Carbofurão	30,940
Carbaril	33,410
Metiocarbe	43,440

Em anexo encontram-se os cromatogramas de cada um dos nove *n*-metilcarbamatos injetados individualmente.

4.2 Seletividade.

Para a avaliação da seletividade, foi utilizado o método por comparação dos cromatogramas da matriz com fortificação e da matriz sem fortificação (Fig. 4.3).

Assim, injetaram-se 2 soluções: 1 - matriz fortificada com $0,06 \text{ mg kg}^{-1}$, a partir da solução de trabalho a 10 mg L^{-1} ; 2 - matriz não fortificada.

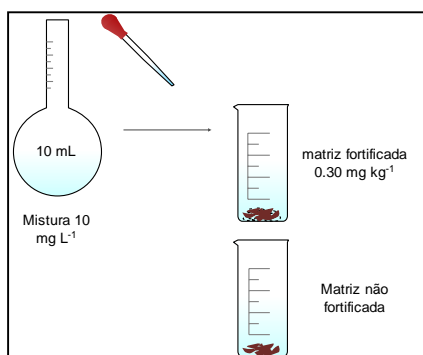


Fig. 4.3 Procedimento para o estudo da seletividade do método.

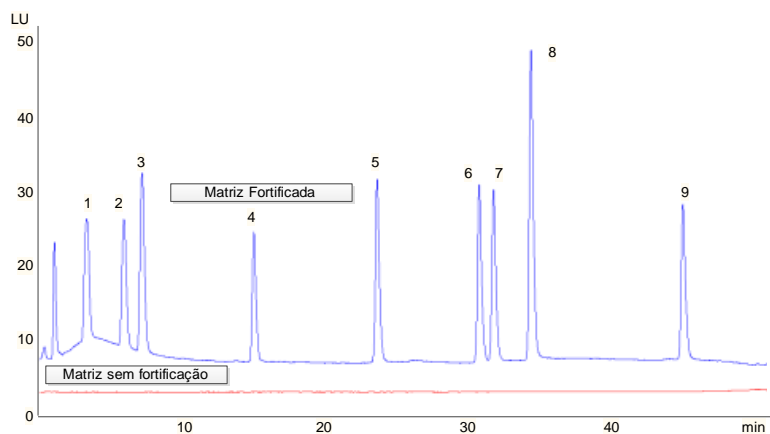


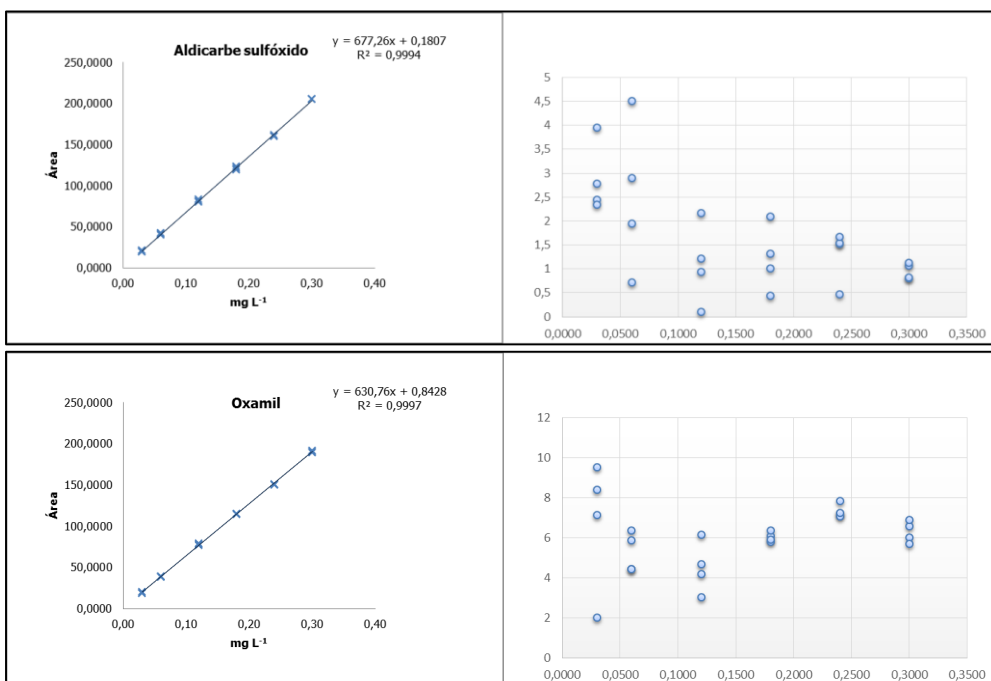
Fig. 4.4 Matriz sem fortificação (cromatograma a vermelho) e matriz fortificada $0,06 \text{ mg kg}^{-1}$ (cromatograma a azul) em músculo de suíno. 1 – aldicarbe sulfóxido, 2 – oxamil, 3 – metomil, 4 – 3-hidroxicarbofurão, 5 – aldicarbe, 6 – propoxur, 7 – carbofurão, 8 – carbaril, 9 – metiocarbe.

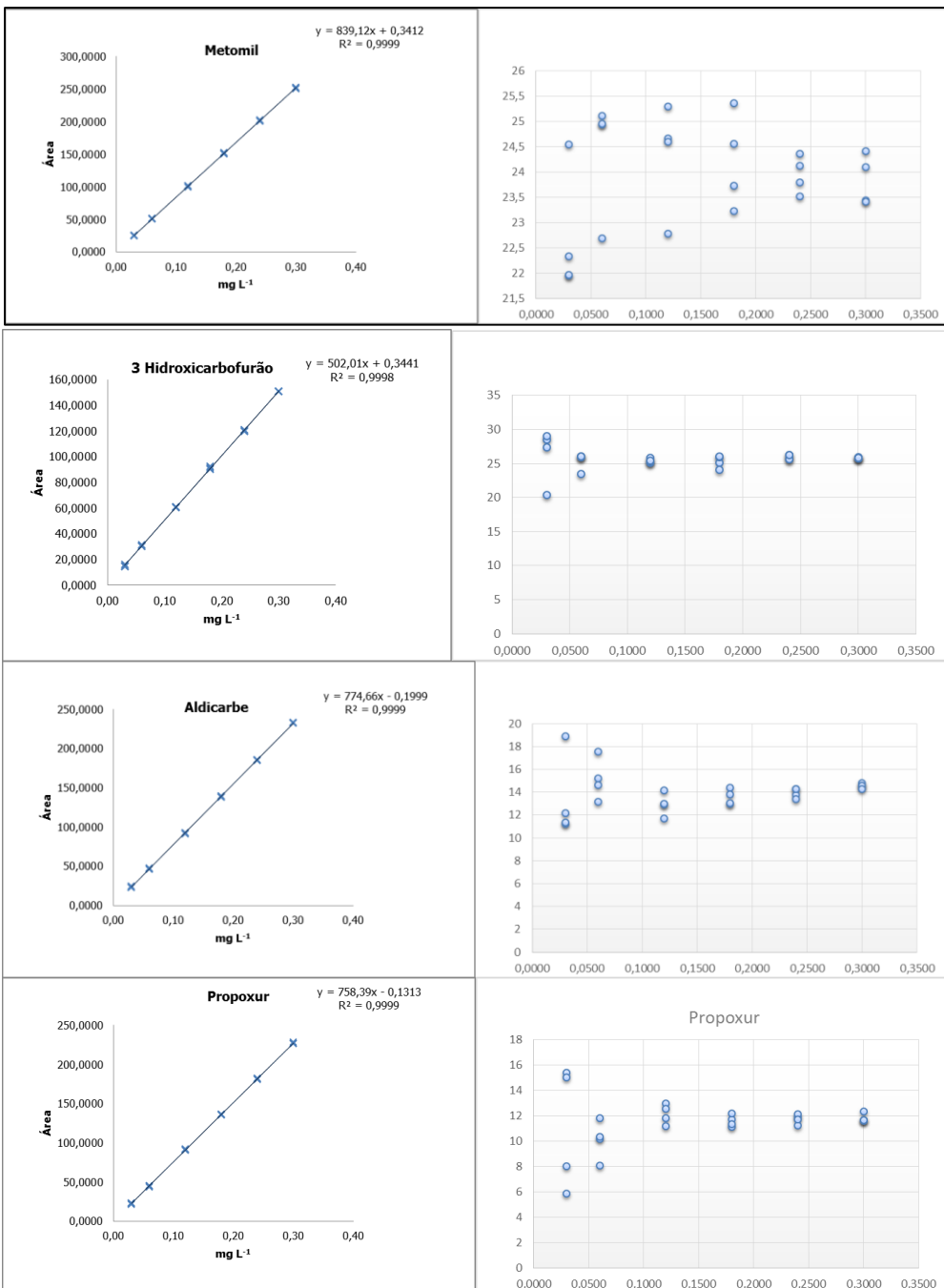
Podemos verificar a partir da Fig. 4.4, que não existem interferentes significativos na matriz, que possam colocar em causa a determinação da seletividade do método.

4.3 Linearidade do método.

Para a determinação da linearidade foi preparada uma curva de calibração e respetivo gráfico de resíduos com 6 pontos de concentrações em quadruplicado de 0,03 a 0,3 mg kg⁻¹, por fortificação de alíquotas de 1 mL de extrato de músculo de suíno (branco), a partir da solução padrão de trabalho dos nove *n*-metilcarbamatos de 10 mg L⁻¹ (Fig. 4.5).

Após a injeção das amostras procedeu-se à obtenção das curvas de calibração e à análise dos resultados (Tabela 4.2), verificando-se havia existência de uma relação linear. Os resultados obtidos que permitiram verificar a linearidade do método foram sujeitos a um tratamento estatístico através da folha de cálculo Excel (Anexo - Tabela A.3).





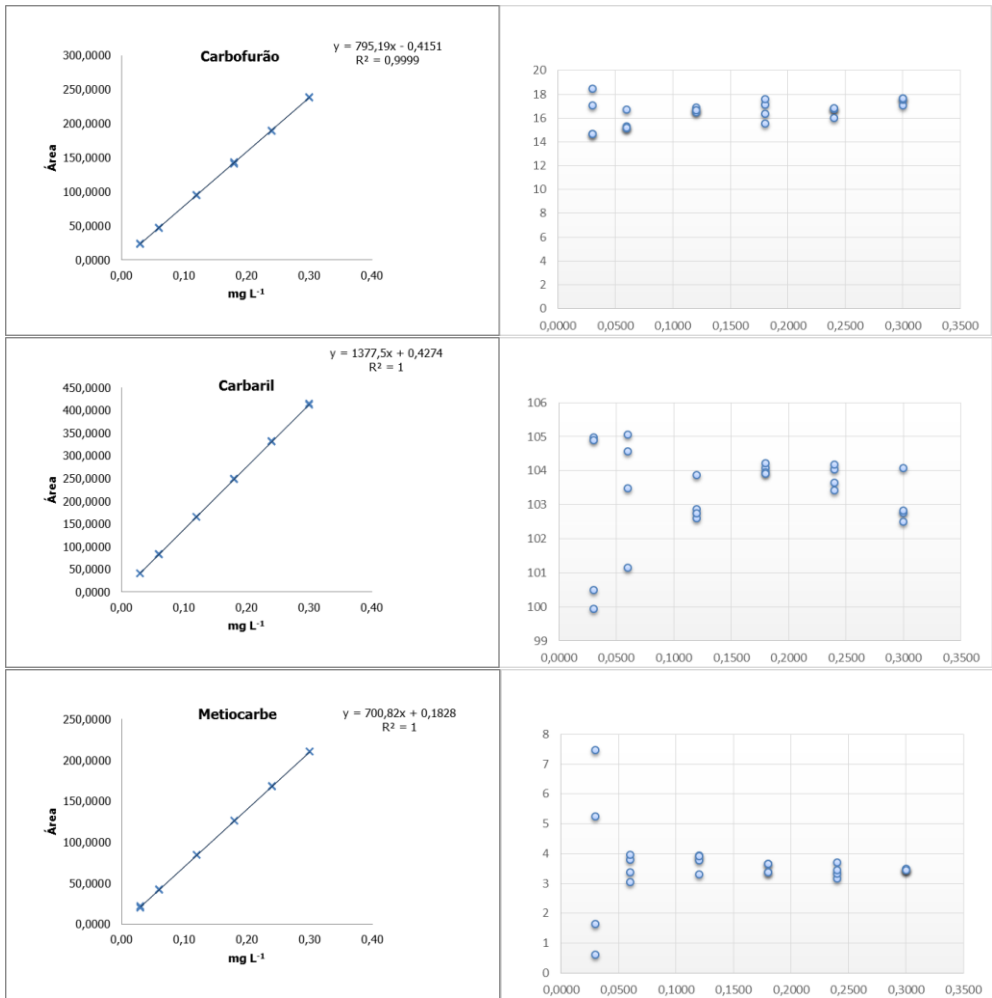


Fig. 4.5 Curvas de Calibração e gráficos de resíduos dos vários *n*-metilcarbamatos em músculo de suíno.

Tabela 4.2 Resultados relativos ao cálculo da curva de calibração para cada um dos nove *n*-metilcarbamatos.

Pico	<i>n</i> - metilcarbamatos	Equação da reta	r ²	Gama (mg kg ⁻¹)
1	Aldicarbe Sulfoxido	y=677,1x+0,1807	0,9994	0,03 – 0,30
2	Oxamil	y=630,76x+0,8428	0,9997	0,03 – 0,30
3	Metomil	y=839,12x+0,3412	0,9999	0,03 – 0,30
4	3-Hidroxi-carbofurão	y=502,01x+0,3441	0,9998	0,03 – 0,30
5	Aldicarbe	y=774,66x-0,1999	0,9999	0,03 – 0,30
6	Propoxur	y=839,8x-0,006	0,9999	0,03 – 0,30
7	Carbofurão	y=795,19x-0,4151	0,9999	0,03 – 0,30
8	Carbaril	y=1377,5x+0,4274	1,0000	0,03 – 0,30
9	Metiocarbe	y=700,82x+0,1828	1,0000	0,03 – 0,30

Os critérios de aceitação das curvas de calibração foram a inclusão do valor zero na intersecção da curva com o eixo das ordenadas e um coeficiente de correlação (r²) superior a 0,9994. No que diz respeito aos gráficos de resíduos, atendendo a que os resíduos calculados distribuem-se aleatoriamente em torno das linhas de reta dos respectivos gráficos, podemos confirmar a linearidade do método para os analitos em estudo, pelo contrário, no caso de tendências sistemáticas na análise dos gráficos de resíduos indicam a não linearidade.

No que diz respeito à gama de trabalho, para alguns destes *n*-metilcarbamatos, uma concentração de 0,03 mg kg⁻¹ como primeiro ponto da curva de calibração, poderá não ser suficiente e possivelmente será necessário que seja criada uma curva de calibração que abranja valores mais pequenos, da ordem dos 0,01 mg kg⁻¹.

Este estudo compreendeu apenas o estudo da linearidade de 0,03 a 0,30 mg kg⁻¹, pois abarca grande parte das concentrações verificadas em ilícitos onde os *n*-metilcarbamatos são protagonistas e não é expectável em caso de ilícito grave que concentrações 0,01 mg kg⁻¹ sejam encontradas, mas sim concentrações superiores a 0,03 mg

kg⁻¹ [15]. A curva de linearidade poderá mais tarde vir a ser adaptada à rotina do laboratório, permitindo proceder a uma quantificação com uma curva mais adequada à concentração presente nas amostras.

4.3.1 Efeito Matriz.

Através do estudo da linearidade, calculou-se o “efeito matriz” através dos valores obtidos na 9 injeções efetuadas na calibração de 0,06 mg kg⁻¹, em comparação com o mesmo número de injeções mas numa solução padrão na mesma concentração (Fig.4.6).

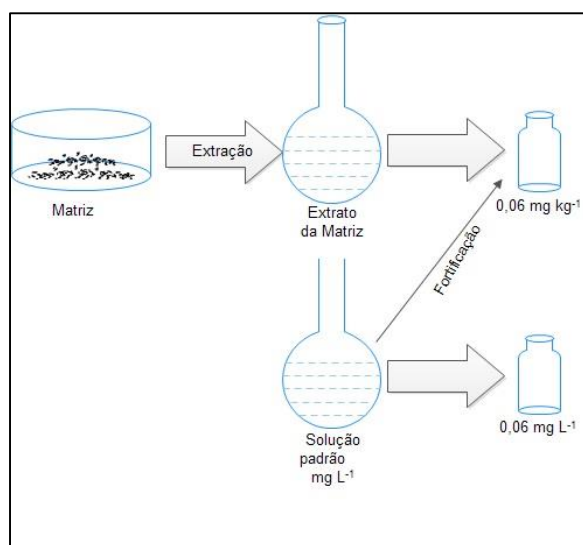


Fig. 4.6 Procedimento experimental relativo ao cálculo do efeito matriz.

O efeito de matriz é um importante parâmetro a ser avaliado durante o desenvolvimento e validação de um método analítico. Este efeito ocorre quando substâncias inerentes à matriz biológica eluem em simultâneo com os compostos de interesse, colocando em causa a validação do ensaio analítico.

Para os *n*-metilcarbamatos, oxamil, aldicarbe, carbofurão, carbaril e metiocarbe, e tendo como valores de referência obtidos (Tabela 4.3), o teste *F Fischer* conduz a

valores de teste de 1,197; 2,674; 1,118; 0,007 e 2,968, que são inferiores aos valores previstos pela distribuição F unilateral ao nível de confiança de 95% (0,291 e 3,43), sendo aceite a nossa hipótese nula, “*a matriz não tem efeitos significativos na validação do método*”.

Para os *n*-metilcarbamatos, aldicarbe sulfóxido, metomil, 3-hidroxicarbofurão e propoxur, os valores do teste F (0,655; 13,702; 29,362; 0,923) foram superiores ao valor crítico de F, rejeitando-se a hipótese nula, assim sendo, promoveu-se a análise dos mesmos valores sob a forma do teste *t Student*, para excluir em definitivo se a matriz têm ou não efeitos significativos que possam colocar em causa a validação do método.

Os valores do T experimental calculados (1,416; 1,653; 0,419; 0,910) foram inferiores ao valor T crítico (1,860), para um nível de confiança de 95%, sendo aceite a nossa hipótese nula, “*a matriz não tem efeitos significativos na validação do método*”.

Tabela 4.3 Resultados relativos ao cálculo do efeito matriz, através dos testes F (Fischer) e t (Student) para cada um dos nove n-metilcarbamatos.

<i>n</i> -metilcarbamatos	Matriz		Calibração		Teste F		Teste T	
	Média das áreas	Desvio Padrão	Média das áreas	Desvio Padrão	F _{experimental}	F _{crítico}	T _{experimental}	T _{crítico}
Aldicarbe Sulfoxido	30,490	0,410	30,490	0,506	0,655	0,291	1,416	1,860
Oxamil	39,921	1,919	39,921	1,754	1,197	3,438		
Metomil	50,664	1,859	50,664	0,502	13,702	3,438	1,653	1,860
3-hidroxicarbofurão	30,592	2,271	30,592	0,419	29,362	3,438	0,419	1,860
Aldicarbe	47,523	1,537	47,523	0,940	2,674	3,438		
Propoxur	47,533	2,804	47,533	2,919	0,923	0,291	0,910	1,860
Carbofurão	49,371	2,712	49,371	2,564	1,118	3,438		
Carbaril	71,118	1,359	71,118	10,787	0,007	0,264		
Metiocarbe	40,949	2,957	40,949	1,716	2,968	3,438		

Critério de aceitação da hipótese nula (H0), "matriz sem efeito significativo sobre a validação do método", valor de F ou T experimental tem de ser menor que o valor crítico

4.4 Determinação do LOD e LOQ.

Os LOD e LOQ dos pesticidas em estudo (Tabela 4.4), foram preparados, através da injeção de 10 replicados para cada pesticida, no ponto mais baixo da curva (0,03 mg kg⁻¹) ou seja, perto do limite de detecção esperado, por fortificação de um branco de músculo de suíno a partir da solução padrão a 10 mg L⁻¹

Uma vez obtidos os valores, o LOD e o LOQ são calculados aplicando as equações 2.1 e 2.2 respetivamente.

Tabela 4.4 Resultados obtidos no estudo do parâmetro de validação do LOD e LOQ para os nove *n*-metilcarbamatos.

<i>n</i> -metilcarbamatos	LOD (mg kg ⁻¹)	LOQ (mg kg ⁻¹)
Aldicarbe Sulfóxido	0,0027	0,0090
Oxamil	0,0035	0,0115
Metomil	0,0035	0,0116
3-hidroxicarbofurão	0,0038	0,0128
Aldicarbe	0,0084	0,0279
Propoxur	0,0034	0,0113
Carbofurão	0,0034	0,0112
Carbaril	0,0017	0,0055
Metiocarbe	0,0045	0,0148

Pela rápida observação da Fig. 4.7, podemos verificar ainda, que a maioria dos limites LOD e LOQ encontram-se abaixo dos MRL's estipulados (Tabela 1.3), ou seja, o limite de quantificação é inferior ao valor da concentração do primeiro calibrador da reta de calibração, para todos os *n*-metilcarbamatos estudados, o que está em conformidade com os requisitos estabelecidos no estabelecimento deste parâmetro.

No caso do Oxamil, que não possui MRL em amostras de origem animal, não será permitido qualquer valor de resíduos de *n*-metilcarbamatos neste tipo de amostras pelo que, podemos deduzir que qualquer valor encontrado incorre num ilícito.

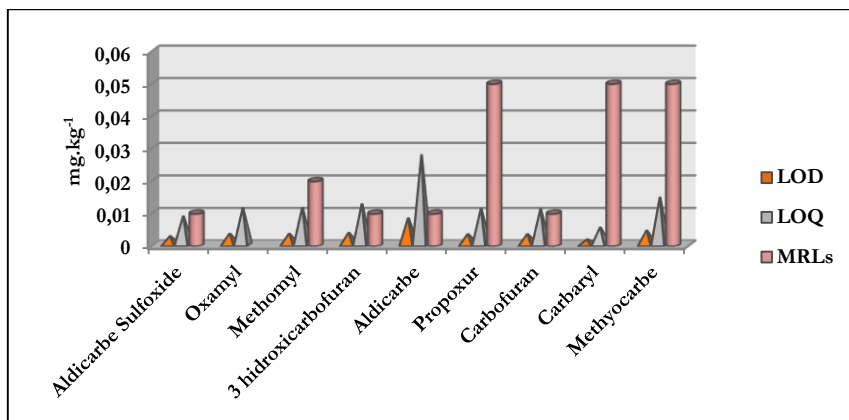


Fig. 4.7 Comparação entre o MRL estipulado e os valores obtido no estudo do LOD e LOQ.

Os cálculos auxiliares para a avaliação deste parâmetro foram efetuados com auxílio do Excel, e estão apresentados em anexo (Anexo - Tabelas A.4, A.5, A.6).

4.5 Precisão.

A avaliação da precisão do método foi obtida através do cálculo da repetibilidade e precisão intermédia através da variação do operador.

A repetibilidade do método foi estudada pela da injeção de 9 replicados independentes, preparados por fortificação de amostras de musculo de suíno nos 3 níveis de concentração já referenciados (0,06; 0,18 e 0,30 mg kg⁻¹), a partir da solução de trabalho de 10 mg L⁻¹ (Fig. 4.7).

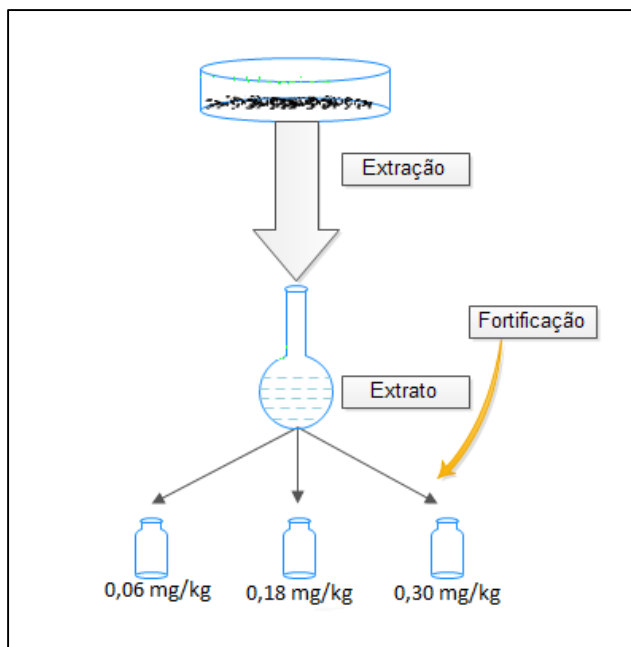


Fig. 4.7 Procedimento experimental relativo à avaliação da precisão.

Depois de injetadas as amostras, calculou-se a média, desvio padrão, e o coeficiente de variação.

A precisão intermédia do método foi estudada pela da injeção de 9 replicados independentes, preparados por fortificação de amostras de músculo de suíno nos 3 níveis de concentração já referenciados (0,06; 0,18 e 0,30 mg kg⁻¹), este ensaio foi reproduzido por um técnico analista do LRVSA.

Depois de injetadas as amostras, calculou-se, a média, desvio padrão e o coeficiente de variação (Tabelas 4.5 e 4.6)

Tabela 4.5 Estudo da repetibilidade (n° de replicados = 9).

<i>n</i> - metilcarbamatos	0,06 mg kg ⁻¹			0,18 mg kg ⁻¹			0,30 mg kg ⁻¹		
	Média	Desvio Padrão	% CV	Média	Desvio Padrão	% CV	Média	Desvio Padrão	% CV
Aldicarbe Sulfóxido	30,90	0,43	1,41	106,83	0,77	0,72	159,71	1,07	0,67
Oxamil	41,85	2,04	4,86	110,69	4,40	3,96	171,21	1,74	1,01
Metomil	59,00	1,84	3,12	149,92	1,63	1,09	197,27	1,49	0,76
3-hidroxicarbofurão	30,95	0,68	2,18	79,53	1,00	1,26	138,36	0,69	0,50
Aldicarbe	49,60	1,18	2,38	133,52	0,97	0,72	257,99	0,64	0,25
Propoxur	49,00	1,49	3,04	140,50	5,04	3,59	216,33	3,24	1,50
Carbofurão	46,09	0,69	1,50	121,44	0,87	0,72	235,17	0,46	0,19
Carbaril	78,97	0,55	0,69	215,29	2,51	1,17	450,00	8,76	1,95
Metiocarbe	41,08	1,12	2,73	118,97	0,43	0,36	197,91	1,18	0,59

Critério de aceitação % CV <20%

Tabela 4.6 Estudo da precisão intermédia (nº de replicados = 9 com um analista diferente)

<i>n</i> - metilcarbamatos	0,06 mg kg ⁻¹			0,18 mg kg ⁻¹			0,30 mg kg ⁻¹		
	Média	Desvio Padrão	% CV	Média	Desvio Padrão	% CV	Média	Desvio Padrão	% CV
Aldicarbe Sulfóxido	30,70	0,65	2,10	105,26	3,31	3,14	159,20	1,11	0,70
Oxamil	41,91	0,73	1,73	109,76	1,24	1,13	171,70	0,34	0,20
Metomil	61,13	1,29	2,11	150,40	0,19	0,13	202,07	0,23	0,12
3-hidroxicarbofurão	33,52	1,79	5,33	86,18	1,30	1,51	134,98	0,13	0,10
Aldicarbe	50,76	0,48	0,83	137,99	0,85	0,62	253,61	0,41	0,16
Propoxur	48,40	0,53	1,09	132,70	0,44	0,33	220,73	0,85	0,39
Carbofurão	45,90	0,44	0,93	110,63	0,71	0,64	234,67	0,54	0,23
Carbaril	76,06	2,12	2,78	231,08	2,89	1,25	449,29	4,37	0,97
Metiocarbe	41,08	0,59	1,43	119,71	0,46	0,38	197,96	2,23	1,13

Critério de aceitação % CV <20%

Para o estudo da precisão intermédia, poderiam ser realizadas algumas alterações, como sendo o tempo de extração, reagentes, o técnico, a operacionalidade do equipamento, o que poderia alterar o normal funcionamento do laboratório, contudo e devido às “contingências laboratoriais”, optou-se por apenas designar um técnico diferente para a realização do procedimento.

A avaliação da precisão em termos de repetibilidade e de precisão intermédia tem como base o cálculo do % CV, que no ideal, não deverá ser superior a 20%. Verificando as Tabelas 4.4 e 4.5 podemos verificar que este critério foi cumprido nos dois parâmetros da precisão, sendo possível concluir que o método se encontra validado em termos da precisão do método.

4.6 Exatidão.

No que concerne a este trabalho, e de acordo com as normas do LRVSA, foi utilizado a recuperação do método como forma de avaliar a exatidão.

Assim, este parâmetro foi calculado como percentagem de recuperação do método, procedendo-se à comparação da quantidade conhecida do analito adicionado à amostra e posterior procedimento de extração, com a quantidade de analito encontrado na calibração em matriz, após o procedimento de extração, utilizando a equação 4.1. Para a determinação deste parâmetro de validação, foram determinadas 3 níveis de fortificação como sendo 2RL, 6RL, e 10RL, sendo que $RL = 0,03 \text{ mg kg}^{-1}$, preparadas a partir da solução da mistura a 10 mg L^{-1} (Fig. 4.8).

Para cada um destes níveis, foram preparadas dois tipos de amostra, músculo de suíno fortificado antes da extração, e músculo de suíno fortificado antes da fase de evaporação.

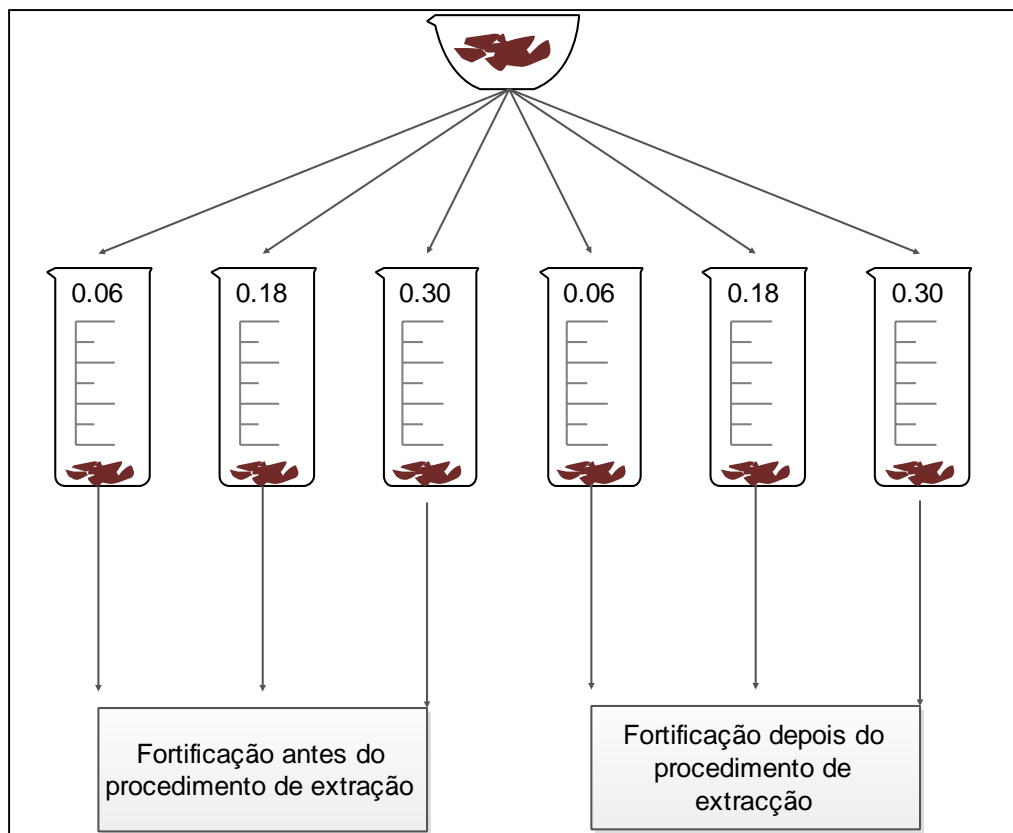


Fig. 4.8 Procedimento na determinação da exatidão.

Posteriormente ambas as amostras após processo de evaporação foram eluídas na fase de entrada (10% ACN: 90% H₂O).

O valor de percentagem de recuperação (Tabela 4.7 e Fig. 4.9) foi obtido a partir da injeção dos 3 níveis de fortificação em quintuplicado.

Tabela 4.7 Estudo da exatidão / recuperação do método.

Pico	<i>n</i> -metilcarbamatos	Recuperação (%)		
		0,06 (mg kg ⁻¹)	0,18(mg kg ⁻¹)	0,30(mg kg ⁻¹)
1	Aldicarbe Sulfoxido	74,39	90,09	89,22
2	Oxamil	105,20	98,55	89,78
3	Metomil	115,18	98,90	79,88
4	3-Hidroxicarbofurão	102,10	93,11	92,19
5	Aldicarbe	107,58	97,81	106,38
6	Propoxur	105,89	100,46	94,87
7	Carbofurão	102,75	86,02	98,42
8	Carbaril	98,84	91,05	110,25
9	Metiocarbe	97,57	94,26	94,71

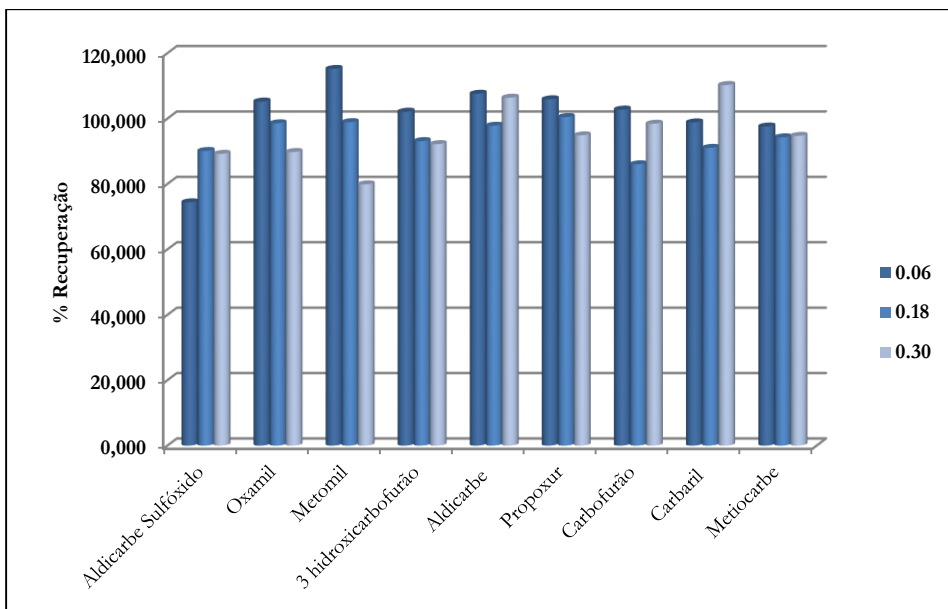


Fig. 4.9 Percentagem de recuperação utilizada para o cálculo da exatidão.

Pela observação da Fig. 4.9, podemos verificar que os valores de recuperação deste método analítico, situam-se entre os 75 e os 115%, sendo possível concluir que o método se encontra validado em termos da exatidão do método.

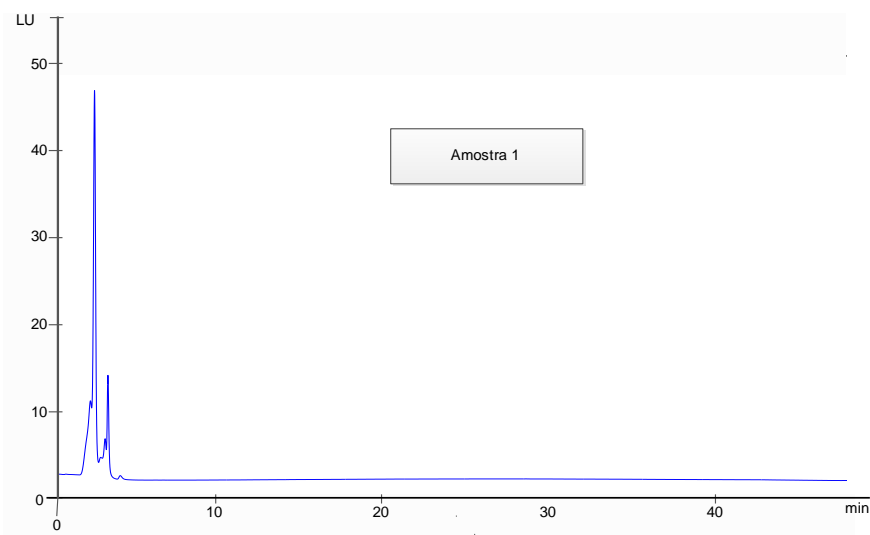
Verificou-se também e em simultâneo com o estudo da exatidão, a ocorrência de fenómenos relacionados com “*carryover*” ou arrastamento, para despiste de qualquer contaminação que pudesse haver nas amostras entre injeções.

Para determinação do “*carryover*”, foram injetadas entre as amostras correspondentes à determinação da exatidão, amostras brancas, pelo que não se verificou quaisquer fenómenos relativos a contaminações de amostra para amostra.

4.7 Aplicabilidade em amostras reais.

Após validação do método no LRVSA, procedeu-se à aplicação do método analítico a amostras obtidas em três superfícies comerciais distintas, na área do Funchal, e procedeu-se de acordo com o método analítico estabelecido.

Na Fig. 4.10, verifica-se que nenhuma das amostras obtidas, apresentava indícios da presença de qualquer *n*-metilcarbamato.



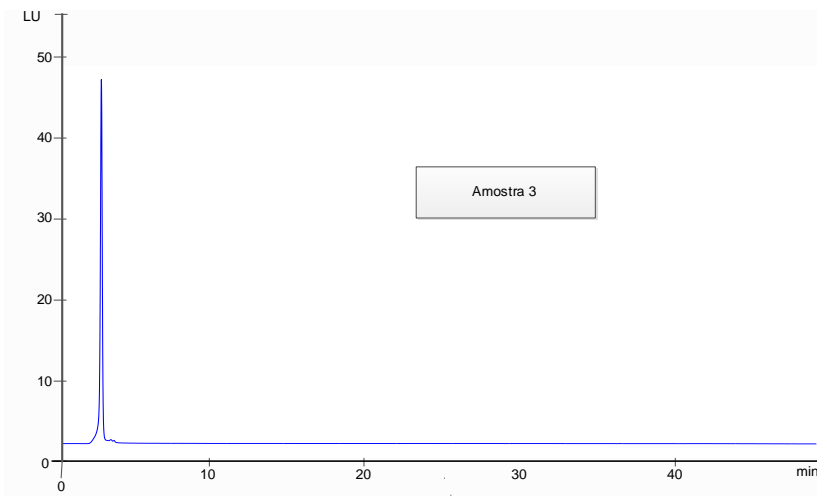
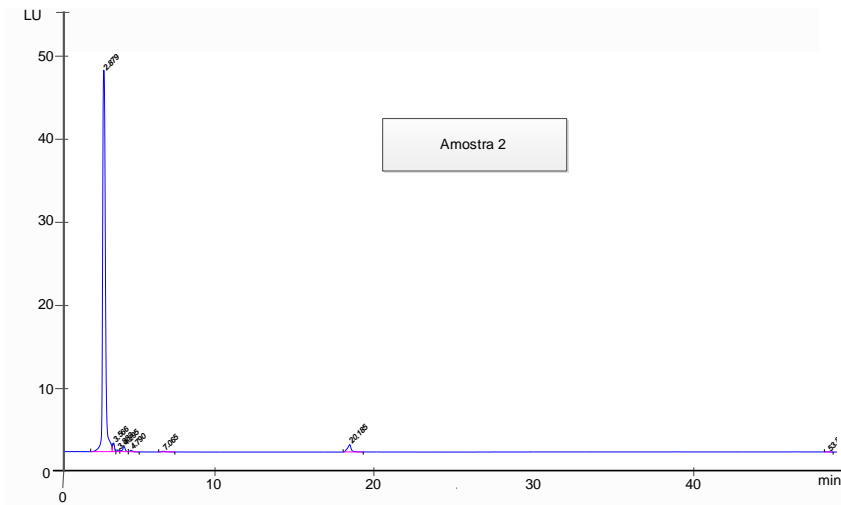


Fig. 4.10 Cromatogramas obtidos, da análise de amostras de músculo de suíno, obtidas em três superfícies comerciais distintas.

Capítulo V

Conclusões.

A deteção, identificação e quantificação de *n*-metilcarbamatos em amostras biológicas de origem animal, fazem parte dos planos de rastreio e segurança alimentar estabelecidos pela UE.

Por isso, é necessária uma resposta adequada, rápida e eficaz aos procedimentos de averiguação no âmbito da segurança alimentar de resíduos de *n*-metilcarbamatos em amostras de origem animal, que possam comprometer de certa forma a salubridade dos alimentos em causa, colocando em risco a saúde dos consumidores.

A determinação dos *n*-metilcarbamatos em amostras de origem animal, não é prática comum nos laboratórios de segurança alimentar mas justifica-se pelo fato de estes serem os pesticidas mais utilizados atualmente na agricultura, sendo por isso utilizados na mitigação de pragas em culturas muitas vezes utilizadas na base da alimentação dos animais domésticos utilizados posteriormente para o consumo humano.

A utilização do procedimento extrativo dispersivo QuEChERS na determinação de *n*-metilcarbamatos em amostras de origem animal, deveu-se ao fato de estas amostras possuírem uma quantidade de gordura associada o que dificulta a extração dos resíduos, e conseqüentemente a deteção por outros procedimentos tais como a SPE [52] [53] [54] [55].

No decorrer do desenvolvimento deste método analítico, houve a necessidade de recorrer a adaptações do método extrativo utilizado na rotina do LRVSA para a deteção dos mesmos resíduos mas em vegetais e frutos, como por exemplo a necessidade de evaporar a amostra e reconstitui-la com a fase móvel de entrada, o que para a deteção dos mesmos resíduos em vegetais e frutos não acontecia, o sobrenadante era apenas filtrado e injetado diretamente no HPLC-MS/MS.

No processamento da amostra também se fizeram algumas adaptações, como cortar grosseiramente a amostra e congelar antes do seu processamento visto que o fracionamento das amostras diretamente tornava-se difícil devido ao elevado conteúdo de gordura, água, fibras musculares, etc.

Com o objetivo de comprovar a obtenção de resultados válidos e comparáveis, a metodologia foi validada através dos parâmetros mais importantes do procedimento de validação utilizados no LRVSA durante o seu processo de acreditação pelo IPAC, como a seletividade, linearidade do método, repetibilidade e precisão intermédia, limites de determinação e quantificação e exatidão.

A detecção por fluorescência revelou-se adequada em termos de sensibilidade e seletividade, observou-se que não existem interferentes da matriz que possam comprometer a seletividade do método garantindo uma boa avaliação quantitativa dos analitos, embora os procedimentos internacionais para este tipo de análise especifiquem que é preferível a quantificação posterior por HPLC-MS/MS [57].

As condições cromatográficas, HPLC-FLD, também demonstraram serem adequadas à boa separação dos analitos, com picos cromatográficos simétricos, que garantem uma boa quantificação dos analitos nas amostras, embora não sendo um método cromatográfico rápido, pois a determinação dos nove *n*-metilcarbamatos ocorreu num intervalo de 55 min.

A não utilização de um padrão interno, resulta da não existência de erros que pudessem de qualquer forma interferir com a validação do método e com a impossibilidade da obtenção do mesmo durante o período da realização do trabalho, esses erros normalmente são associados ao efeito matriz, que por vezes dificulta ou impossibilita a seletividade do método. Pelos resultados obtidos no cálculo do efeito de matriz, cujos testes estatísticos (F e t) revelam que a matriz não tem qualquer tipo de efeito na validação do método [60]

Atualmente existem poucos trabalhos onde associam o método extrativo QuEChERS com amostras de origem animal, e da comparação direta com outros métodos já descritos, este método associa duas componentes novas, o método extrativo em uma matriz de origem animal com algum teor de gordura e a associação com detecção por fluorescência [62] [64].

Este método poderá ser estendido a outras áreas da segurança alimentar e clínica veterinária já que poderá ser utilizado para o diagnóstico de intoxicações de animais domésticos e aplicação de terapêutica adequada, determinação da morte por envenenamento, etc. Poderá ser utilizado em amostras de outros animais como aves, peixes etc., desde que estudados todos os parâmetros da validação, e que estes sejam os adequados.

Atendendo aos resultados obtidos, a metodologia analítica apresentada está apta a ser aplicada à análise de amostras biológicas de origem animal que cheguem aos serviços de análise de resíduos do LRVSA para o rastreio da presença e quantificação de *n*-metilcarbamatos.

Com vista à melhoria do método, será pertinente estudar a melhor forma de realizar o “*clean-up*” a amostras com maior teor de gordura, aumentando assim a variabilidade das amostras de origem animal, utilizadas.

A escolha dos nove *n*-metilcarbamatos prende-se com a capacidade analítica do LRVSA, pois estes *n*-metilcarbamatos são os mais requisitados nas análises efetuadas no LRVSA e também dos mais utilizados na agricultura segundo dados da UE [15]. Com este trabalho fica aberta a possibilidade do LRVSA estabelecer outra grande área de análise de resíduos, como a determinação da causa de morte de animais domésticos por intoxicação. Só em Portugal entre 1992 a 2002 houve registo de 220 casos de intoxicação de animais por pesticidas, em que 96 são animais domésticos, 33 são espécies cinegéticas e 91 espécies protegidas. Para fazer face a esta problemática a UE aplicou a diretiva 91/43/CEE do Conselho europeu que no seu artigo 15 proíbe a captura e/ou abate das espécies da fauna selvagem por todos os meios, entre eles referindo-se à utilização de pesticidas para esses fins [15] [16].

Bibliografia

- [1]. Amaro, P., A política de redução dos pesticidas em Portugal, 2007, ISA/Press Portugal.
- [2]. Hodgson E., A textbook of modern toxicology, 3^a edition, North Carolina State University, North Carolina, 2004.
- [3]. Indicadores Agro - Ambientais 1989-2007, Instituto Nacional de Estatística, I.P., Lisboa, Portugal.
- [4]. Curtis D. Klaassen, P. D., Casarett & Doull's Toxicology, The Basic Science of Poisons. 7^a Edition ed.; University of Kansas Medical Center: Kansas City.
- [5]. Sue Jickells, Adam Negrusz. Clark's Analytical Forensic Toxicology. Cambridge: Pharmaceutical Press, 2008.
- [6]. Anastasio, J. D., Sharp, Claire R., Acute aldicarb toxicity in dogs: 15 cases (2001–2009). *Journal of Veterinary Emergency and Critical Care* 2011, 21 (3), 253-260.
- [7]. Flores V., Ribeiro J., Neves A., Queiroz E., Organoclorados: um problema de saúde pública. *Ambiente & Sociedade* 2004, VII (2).
- [8]. Wesseling C, Keifer M, McConnell R, Rosenstock L, Hogstedt C., Long-term Neurobehavioral Effects of Mild Poisonings with Organophosphate and n-Methyl Carbamate Pesticides among Banana Workers, *Int J Occup Environ Health* 2002, 8 (1), 27-34.

- [9]. Karalliedde, R. K., Organophosphate toxicity and occupational exposure, *Occupational Medicine* 2004, 75 (54:69).
- [10]. The European Union Report on Pesticide Residues in Food. In *EFSA Journal* 2013, EFSA, Ed. 2013.
- [11]. World Health Organization, (WHO), Determination of pesticide residues 1998.
- [12]. Júnior José F., Eugénia Alves M., Sousa Guerreiro A., Intoxicação por Organofosforados. *Medicina Interna*, Lisboa 1999, 6 (2).
- [13]. Jones DE, G. R. J., Nader PB, Holladay SD., Organochlorine detection in the shed skins of snakes. *Ecotoxicol Environ Saf* 2005, 60 (3), 282-7.
- [14]. Angélique Lazartigues, C. F.; Robert Baudot , Laure Wiest , Cyril Feidt , Marielle Thomas, Cécile Cren-Olivé,, Multiresidue method for the determination of 13 pesticides in three environmental matrices: water, sediments and fish muscle. *Talanta* 2011, 85, 1500-1507.
- [15]. European Commission, Health and consumers, [online], [ec.europa.eu / dgs / health_consumer /Index_en.htm](http://ec.europa.eu/dgs/health_consumer/Index_en.htm)
- [16]. European Food Safety Authority (EFSA), [online], <http://www.efsa.europa.eu/>.
- [17]. IUPAC, Nomenclature for Chromatography, *Pure & Appl. Chem.* 1993, 65 (4), 819-872.
- [18]. George T. Allen, J. K. V., Richard K. Stroud, Cornells G. Vendel, Robert H. Poppenga, Lynn; Thompson, J. A. S., and W. Emmett Braselton, Winter Poisoning of Coyotes and Raptors with Furadan-Laced Carcass Baits. *Journal of Wildlife Diseases* 1996, 32, 385-389.

- [19]. Casida, J. E., Mode of Action of Carbamates, Annual Review of Entomology 1963, 8 (1), 39-58.
- [20]. Crentinho.wordpress.com/2009/tecido-nervoso, [online], consultado a 04/06/2014.
- [21]. Ladislav N., Alena Honzlová J. M., Petr O., Kamil K., Oldřich V., Václav R., Petr C., Incidental poisoning of animals by carbamates in the Czech Republic. Journal of Applied Biomedicine 2011, 9, 157-161.
- [22]. Pires, A. R. S., Envenenamento por Paraquat em cães e gatos. 2009.
- [23]. Wang, Y.; Kruzik, P.; Helsberg, A.; Helsberg, I.; Rausch, W.-D., Pesticide poisoning in domestic animals and livestock in Austria: A 6 years retrospective study, Forensic science international 2007, 169 (2), 157-160.
- [24]. Larson S.J., Capel P.D., Pesticides in surface water, Ann Harbor Press Inc, 1997.
- [25]. Hercegová A., D. M., Maitisova E., Sample preparation methods in the analysis of pesticides residues in baby food with subsequent chromatographic determination. Journal Chromatography A 2007, 1153, 54-73.
- [26]. Anastassiades M., L. S. J., Stajnbaher D., Schenck F. J. , Fast and Easy Multiresidue Method Employing Acetonitrile Extraction/Partitioning and “Dispersive Solid-Phase Extraction” for Determination of Pesticide Residues in Produce Journal of AOAC International 2003, 86, 1417-1423.
- [27]. European Commission, Health and consumers, [online], http://www.eurl.pesticides.eu/library/docs/srm/1stws2006_lecture_anastassiades_quechers.pdf.

- [28]. F.J. Schenck, A.N. Brown, L.V. Podhorniak, A. Parker, M. Reliford, J.W. Wong, A Rapid Multiresidue Method for Determination of Pesticides in Fruits and Vegetables by Using Acetonitrile Extraction/Partitioning and Solid-Phase Extraction Column Cleanup, *J. AOAC Int.* 91 (2008) 422.
- [29]. Determination of Pesticide Residues in Foods by Acetonitrile Extraction and Partitioning with Magnesium Sulfate: Collaborative Study. (S.J. Lehotay, *J. AOAC Int.* 90 (2007) 485.
- [30]. Stubbings, G. B., Timothy, The development and validation of a multiclass liquid chromatography tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) procedure for the determination of veterinary drug residues in animal tissue using a QuEChERS (Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe) approach. *Analytica Chimica Acta* 2009, 637, 68-78.
- [31]. Lazartigues A. W., Laure B. R.; Thomas M., Feidt, C., Cren-Olivé C., Multiresidue method to quantify pesticides in fish muscle by QuEChERS-based extraction and LC-MS/MS. *Anal Bional Chem* 2011, 400, 2185-2193.
- [32]. Pihlstrom T., Anastassiades M., Andersson A., Kok A., Erecius Poulsen M., Fernández-Alba A., Gamón M., Lippold R., Malato O., Medina P., Masselter S., Mol H., Reynolds S., Valverde A., R. Method Validation And Quality Control Procedures For Pesticide Residues Analysis In Food And Feed. Document No. SANCO/10684/2009.
- [33]. Quenchers.cvua-stuttgart.de/pdf/baselabilecaptan.pdf.
- [34]. QuEChERS—A Mini-Multiresidue Method for the Analysis of Pesticide Residues in Low-Fat Products, [online], <http://www.quechers.com>.

- [35]. Anastassiades, M.; Lehotay, S. J.; Stajnbaher, D.; Schenck, F. J., Fast and Easy Multiresidue Method Employing Acetonitrile Extraction/Partitioning and “Dispersive Solid-Phase Extraction” for the Determination of Pesticide Residues in Produce. In *Journal of AOAC International*, 2003, 86, 1417-1423
- [36]. Dispersive Solid-Phase Extraction for the Determination of Sulfonamides in Chicken Muscle by Liquid Chromatography. (A. Posyniak, J. Zmudzki, K. Mitrowska, J. Chromatogr. A 1087 (2005) 259.
- [37]. Miller S.A., Dykes D.D., Polesky H. F., A simple salting out procedure for extracting ADN from human nucleated cells. *PMC* 1988, 16 (3), 1215.
- [38]. D’Asaro, J., An automated and simultaneous solid-phase extraction of D9-tetrahydrocannabinol and 11-nor-9-carboxy-D9-tetrahydrocannabinol from whole blood using the Zmark Rapid Trace with confirmation and quantitation by GC-EI-MS. *J. Anal. Toxicology*. 2000, 24, 289-95.
- [39]. Hanai, T., *HPLC A Practical Guide*. The Royal Society of Chemistry 1999.
- [40]. Ofitserova M., Rasmussen W., Pickering M., Accelerated aminoacid analysis using HPLC with post-column derivatization, [online], www.pckeringlabs.com.
- [41]. Chust, R., Introdução à cromatografia de líquidos (HPLC), *Boletim da SPQ* 1990, 39, 43-45.
- [42]. Garret, J. S., *Introduction to Chromatographic Separations*, On-line Course (CEM333). University, M. S., Ed. Michigan State, 2000.

- [43]. Stafford, S. C.; Lin, W., Determination of oxamyl and methomyl by high-performance liquid chromatography using a single-stage postcolumn derivatization reaction and fluorescence detection. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 1992, 40 (6), 1026-1029.
- [44]. Snyder, L. R., and Kirkland, J. J., *Introduction to Modern Liquid Chromatography*. New York, 1979.
- [45]. Unger, K. K.; Trudinger, U. Em *High Performance Liquid Chromatography*; Brown, P.R.; Hartwick, R. A., eds.; Wiley: New York, 1989, cap. 3.
- [46]. Valeur B., *Molecular Fluorescence Principles and applications*, Wiley-VCH Verlag GmbH, 2001.
- [47]. Zeferos C.S., Bais A.F., *Solar Ultraviolet Radation*. Springer 1995.
- [48]. Ermer, J., Validation in pharmaceutical analysis, *J Pharm Biomed Anal.*, 2001, 24, 755-767.
- [49]. Taylor, P., Method development and optimization of LC-MS. In: *Applications of LC-MS in toxicology*. Poletti A, Ed., Pharmaceutical press 2006, 23-42.
- [50]. Jemal, H., High-throughput quantitative bioanalysis by LC/MS/MS, *Biomed Chromatography*, 2000, 14, 422-29.
- [51]. McDowall, R., Sample preparation of biomedical analysis. *J. Chromatography* 1989, 49, 3-58.
- [52]. Carmelo García Pinto, M. E. F. L., Sara Herrero Martín, Ana María Casas Ferreira, José Luis Pérez Pavón, Bernardo Moreno Cordero, Simplified QuEChERS approach for the extraction of chlorinated compounds from soil samples, *Talanta* 2009, 81 (1-2), 385-391.

- [53]. Argauer, R. J.; Eller, K. I.; Ibrahim, M. A.; Brown, R. T., Determining Propoxur and Other Carbamates in Meat Using HPLC Fluorescence and Gas Chromatography/Ion Trap Mass Spectrometry after Supercritical Fluid Extraction. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 1995, 43 (10), 2774-2778.
- [54]. L. Li, H. Zhang, C. Pan, Z. Zhou, S. Jiang, F. Liu, Multiresidue Analytical Method of Pesticides in Peanut Oil Using Low-Temperature Cleanup and Dispersive Solid Phase Extraction by GC-MS, *J. Sep. Sci.* 30 (2007) 2097.
- [55]. K. Banerjee, D.P. Oulkar, S.B. Patil, S.H. Patil, S. Dasgupta, R. Savant, P.G. Ad-sule, Single-Laboratory Validation and Uncertainty Analysis of 82 Pesticides De-termined in Pomegranate, Apple, and Orange by Ethyl Acetate Extraction and Liquid Chromatography/Tandem Mass Spectrometry, *J. AOAC Int.* 91 (2008) 1435.
- [56]. Thompson, U. J. K. M., *Analytical Chemistry*, Toronto.
- [57]. D. Osmar; A. Michele; Kolberg Diana; Zanella Renato, Development and valida-tion of an analytical method for the determination of histamine in wines using high performance liquid chromatography with fluorescence detection, *Química Nova* 2007, 30 (1), 18-21.
- [58]. Basset MV, Wendelken SC, Pepich BV, Munch DJ, Improvements to EPA method 531.1 for the analysis of carbamates that resulted in the development of U.S. EPA method 531.2, *J. Chromatogr.* 2003 Feb 41 (2) 100-6.
- [59]. PCX 5100 User's Manual, PCX 5100 Post-column derivatization Instrument for carbamate and glyphosate determination, Pickering Laboratories, USA, July 1997.

- [60]. Kuaert, G.; Moeller, M.; Maurer, M.; Steinmeyer, S.; Toennes, S., Statistical evaluation of analytical findings from corresponding blood and oral fluid taken at the roadside. *Ann. Toxicol. Anal.* 2002, 14 (3), 226.
- [61]. RA. Gustafson; ET. Moolchan; A. Barnes; B. Levine; MA. Huestis, Validated method for simultaneous determination of delta9- tetrahydrocannabinol (THC), 11- hydroxy-THC-THC and 11-nor-9- carboxy-THC in human plasma using solid phase extraction and gas chromatography-mass spectrometry with positive chemical ionization. *J. Chromatogr. B.* 2003, 798, 145-54.
- [62]. F. Schenck, J. Wong, C. Lu, J. Li, J.R. Holcomb, L.M. Mitchell, Multiresidue Analysis of 102 Organophosphorus Pesticides in Produce at Parts-Per-Billion Levels Using a Modified QuEChERS Method and Gas Chromatography with Pulsed Flame Photometric Detection, *J. AOAC Int.* 92 (2009) 561.
- [63]. Takada, T. N., K., *Anal. Chim. Acta* 1979, 107, 129.
- [64]. Takino, M.; Yamaguchi, K.; Nakahara, T., Determination of Carbamate Pesticide Residues in Vegetables and Fruits by Liquid Chromatography, Atmospheric Pressure Photoionization, Mass Spectrometry and Atmospheric Pressure Chemical Ionization, Mass Spectrometry, *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2004, 52 (4), 727-735.
- [65]. <http://info.biotech-calendar.com/bid/94138/Riverside-Microbiology-Research-Uncovers-Role-of-RNA-Silencing-in-Phytophthora-Pathogenesis>, [online], consultado em 20-03-2013.

Anexo

Tabela A.1 Propriedades de alguns solventes utilizados em HPLC.

Solvente	UV¹³ (nm)	Viscosidade a 25 °C ¹⁴
Acetato de Etilo	256	0,43
Acetona	330	0,30
Água	191	0,90
Benzeno	280	0,60
Ciclohexano	200	0,90
Clorofórmio	245	0,53
Diclorometano	233	0,41
Etanol	210	1,10
Isocetano	197	0,47
Isopropanol	205	1,90
Metanol	205	0,54
Pentano	195	0,22
Tolueno	285	0,55

Tabela A.2 Marca, pureza e validade dos padrões analíticos utilizados.

Pesticida	Marca	Pureza	Validade
Aldicarbe sulfóxido	Dr Ehrenstorfer GmbH	97,7%	01-04-2015
Oxamil	Dr Ehrenstorfer GmbH	99,5%	30-06-2013
Metomil	Dr Ehrenstorfer GmbH	98,8%	16-07-2013
3-hidroxi carbofurão	Dr Ehrenstorfer GmbH	96,0%	10-09-2012
Aldicarbe	Dr Ehrenstorfer GmbH	98,5%	03-02-2015
Propoxur	Dr Ehrenstorfer GmbH	99,5%	01-01-2018
Carbofurão	Dr Ehrenstorfer GmbH	99,5%	01-03-2016
Carbaril	Dr Ehrenstorfer GmbH	98,5%	30-11-2014
Metiocarbe	Dr Ehrenstorfer GmbH	98,5%	01-03-2015

¹³ Valores de absorvância > 1

¹⁴ cP unidade

Tabela A.3 Estudo da Linearidade e cálculo da curva de calibração.

Nível (RL=0,03mg kg)	A _{analito}									
	Aldicarbe Sulfóxido	Oxamil	Metomil	3-Hidroxi-carbofurão	Aldicarbe	Propoxur	Carbofurão	Carbaril	Metiocarbe	
RL	0,0300	20,00	19,04	25,00	14,88	23,00	23,66	24,29	42,02	20,37
	0,0300	21,31	20,09	25,00	14,66	24,37	21,70	23,50	40,99	21,57
	0,0300	19,93	18,78	25,53	16,33	22,80	22,14	24,00	41,10	20,16
	0,0300	20,98	18,55	25,08	14,55	22,83	23,58	23,50	42,00	22,03
2RL	0,0600	41,11	38,22	51,07	30,21	47,99	44,96	47,64	82,10	42,06
	0,0600	42,65	39,01	50,08	30,21	46,19	45,04	46,99	83,05	42,37
	0,0600	42,00	38,42	51,00	31,26	46,80	44,12	47,06	83,70	42,43
	0,0600	40,02	39,01	51,00	30,21	47,03	45,63	47,01	83,50	42,20
4RL	0,1200	83,22	76,45	101,54	60,41	93,00	92,01	95,23	165,03	84,14
	0,1200	82,22	79,00	101,49	61,01	92,00	91,68	94,88	166,05	84,66
	0,1200	81,37	77,65	102,06	60,95	92,01	90,56	95,01	165,23	84,53
	0,1200	80,46	78,04	100,01	60,75	90,99	91,08	95,00	165,15	84,65
6RL	0,1800	123,32	114,68	153,06	91,43	138,95	136,40	142,03	249,15	126,20
	0,1800	120,48	115,00	152,07	90,46	139,65	136,99	143,00	249,00	126,21
	0,1800	121,55	114,90	151,06	90,32	137,92	135,65	141,06	249,33	126,55
	0,1800	119,52	114,32	150,46	92,74	138,00	135,96	143,57	248,95	126,56
8RL	0,2400	160,25	151,00	202,37	120,00	185,99	182,12	190,00	332,00	167,88
	0,2400	161,95	151,24	201,99	121,00	185,07	182,47	190,02	331,38	168,13
	0,2400	160,21	150,00	201,00	121,00	184,56	180,99	190,15	331,00	168,34
	0,2400	160,00	150,98	201,46	120,00	185,96	181,78	188,78	332,26	168,77
10RL	0,3000	205,54	191,13	253,02	150,89	233,49	226,94	239,22	415,02	210,35
	0,3000	205,64	190,00	252,37	150,70	232,94	227,07	238,01	412,37	210,43
	0,3000	205,00	191,79	251,04	151,02	233,00	227,05	238,99	412,46	210,49
	0,3000	205,02	189,37	250,99	150,75	232,42	228,50	239,21	411,82	210,35

Tabela A.4 Limites de detecção e quantificação.

Aldicarbe Sulfóxido			Oxamil			Metomil		
[calibração] mg kg ⁻¹	A _{pest}	[analito] mg kg ⁻¹	[calibração] mg kg ⁻¹	A _{pest}	[analito] mg kg ⁻¹	[calibração] mg kg ⁻¹	A _{pest}	[analito] mg kg ⁻¹
0,030	19,999	0,029	0,030	19,039	0,030	0,030	24,999	0,029
0,030	21,309	0,031	0,030	20,089	0,032	0,030	24,149	0,028
0,030	19,929	0,029	0,030	18,779	0,030	0,030	25,529	0,030
0,030	20,979	0,031	0,030	18,546	0,029	0,030	26,679	0,031
0,030	19,769	0,029	0,030	19,657	0,031	0,030	26,569	0,031
0,030	19,876	0,029	0,030	18,654	0,029	0,030	25,321	0,029
0,030	21,325	0,031	0,030	17,965	0,028	0,030	26,981	0,031
0,030	20,147	0,030	0,030	18,326	0,029	0,030	25,999	0,030
0,030	19,999	0,029	0,030	19,255	0,030	0,030	26,994	0,031
0,030	20,190	0,030	0,030	20,125	0,032	0,030	24,789	0,029
Média_{area} = 20,352 Média [analito]= 0,030 Desvio padrão (S(y/x))= 0,000895			Média_{area} = 19,044 Média [analito]= 0,030 Desvio padrão (S(y/x))= 0,001154			Média_{area} = 25,801 Média [analito]= 0,030 Desvio padrão (S(y/x))= 0,001157		
LD	0,0027	mg kg ⁻¹	LD	0,0035	mg kg ⁻¹	LD	0,0035	mg kg ⁻¹
LQ	0,0090	mg kg ⁻¹	LQ	0,0115	mg kg ⁻¹	LQ	0,0116	mg kg ⁻¹
CV	2,9843		CV	3,8465		CV	3,8579	

Tabela A.5 Limites de detecção e quantificação.

3 Hidroxiocarbofurão			Aldicarbe			Propoxur		
[calibração] mg kg ⁻¹	A _{pest}	[analito] mg kg ⁻¹	[calibração] mg kg ⁻¹	A _{pest}	[analito] mg kg ⁻¹	[calibração] mg kg ⁻¹	A _{pest}	[analito] mg kg ⁻¹
0,030	14,879	0,030	0,030	22,999	0,027	0,030	23,659	0,030
0,030	14,659	0,029	0,030	24,369	0,028	0,030	21,699	0,028
0,030	16,329	0,033	0,030	22,799	0,026	0,030	22,139	0,028
0,030	14,549	0,029	0,030	22,829	0,026	0,030	23,579	0,030
0,030	14,129	0,028	0,030	27,419	0,032	0,030	23,779	0,030
0,030	15,032	0,030	0,030	27,418	0,032	0,030	24,032	0,031
0,030	15,147	0,030	0,030	28,001	0,032	0,030	23,999	0,031
0,030	14,456	0,029	0,030	29,012	0,034	0,030	22,987	0,029
0,030	15,324	0,031	0,030	27,500	0,032	0,030	24,502	0,031
0,030	15,639	0,031	0,030	26,989	0,031	0,030	23,658	0,030
Média _{area} = 15,014 Média [analito]= 0,030 Desvio padrão (S(y/x))= 0,001279			Média _{area} = 25,934 Média [analito]= 0,030 Desvio padrão (S(y/x))= 0,002787			Média _{area} = 23,403 Média [analito]= 0,030 Desvio padrão (S(y/x))= 0,001125		
LD	0,0038	mg kg ⁻¹	LD	0,0084	mg kg ⁻¹	LD	0,0034	mg kg ⁻¹
LQ	0,0128	mg kg ⁻¹	LQ	0,0279	mg kg ⁻¹	LQ	0,0113	mg kg ⁻¹
CV	4,2641		CV	9,2915		CV	3,7509	

Tabela A.6 Limites de detecção e quantificação.

Carbofurão			Carbaril			Metiocarbe		
[calibração] mg kg ⁻¹	A _{pest}	[ana- lito] mg kg ⁻¹	[calibração] mg kg ⁻¹	A _{pest}	[ana- lito] mg kg ⁻¹	[calibração] mg kg ⁻¹	A _{pest}	[ana- lito] mg kg ⁻¹
0,030	24,288	0,031	0,030	42,016	0,031	0,030	20,372	0,028
0,030	23,500	0,030	0,030	40,987	0,030	0,030	21,574	0,030
0,030	24,000	0,031	0,030	41,099	0,030	0,030	20,160	0,028
0,030	23,500	0,030	0,030	42,001	0,031	0,030	22,031	0,031
0,030	23,200	0,030	0,030	41,600	0,030	0,030	20,316	0,028
0,030	23,023	0,030	0,030	41,887	0,031	0,030	22,369	0,031
0,030	22,987	0,030	0,030	40,997	0,030	0,030	21,489	0,030
0,030	22,997	0,030	0,030	39,897	0,029	0,030	23,135	0,032
0,030	23,327	0,030	0,030	40,012	0,029	0,030	22,796	0,032
0,030	21,054	0,027	0,030	41,325	0,030	0,030	20,917	0,029
Média_{area} = 23,188			Média_{area} = 41,182			Média_{area} = 21,516		
Média [analito]= 0,030			Média [analito]= 0,030			Média [analito]= 0,030		
Desvio padrão (S(y/x))= 0,001120			Desvio padrão (S(y/x))= 0,000551			Desvio padrão (S(y/x))= 0,001485		
LD	0,0034	mg kg ⁻¹	LD	0,0017	mg kg ⁻¹	LD	0,0045	mg kg ⁻¹
LQ	0,0112	mg kg ⁻¹	LQ	0,0055	mg kg ⁻¹	LQ	0,0148	mg kg ⁻¹
CV	3,7325		CV	1,8381		CV	4,9487	

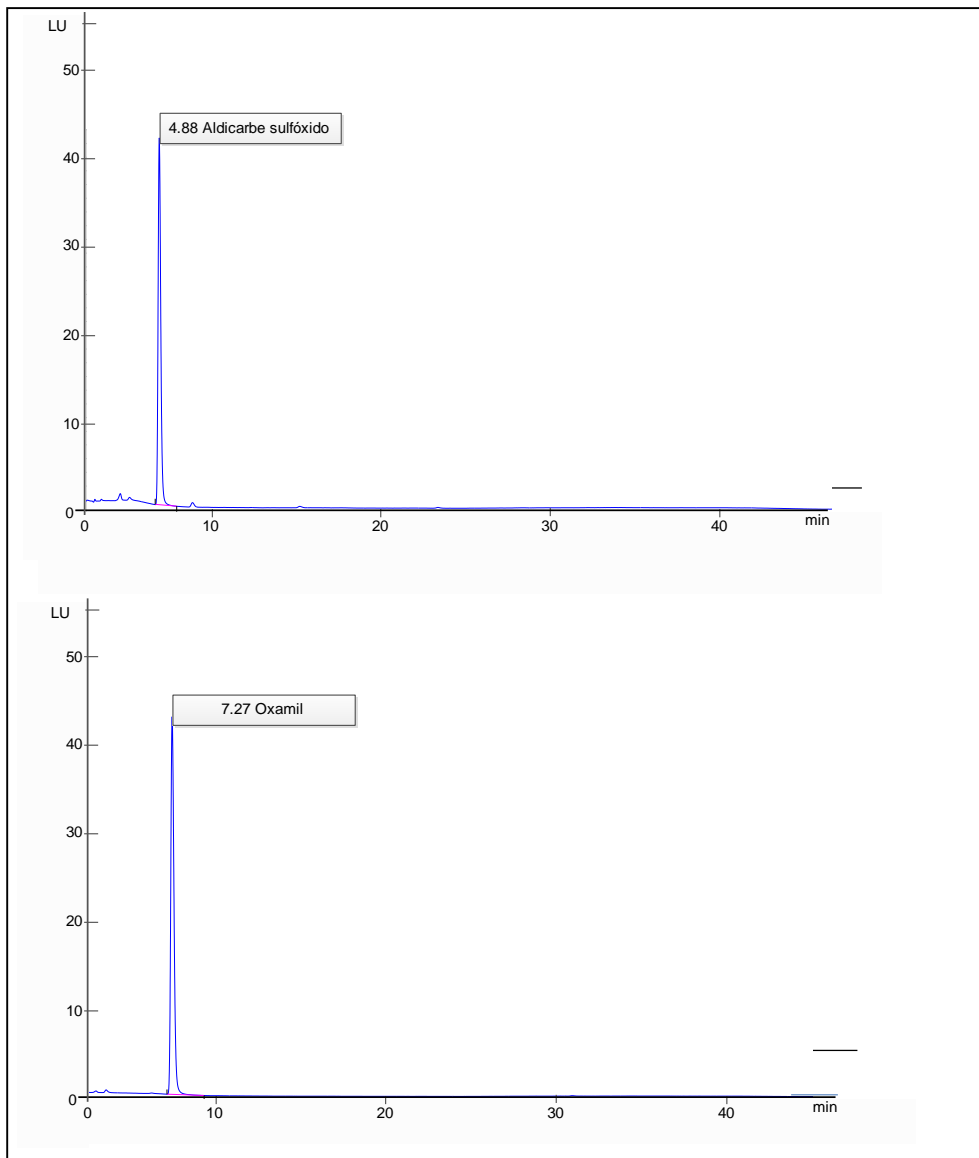


Fig. A.1 Cromatogramas obtidos, da análise do padrão do Aldicarbe sulfóxido e Oxamil.

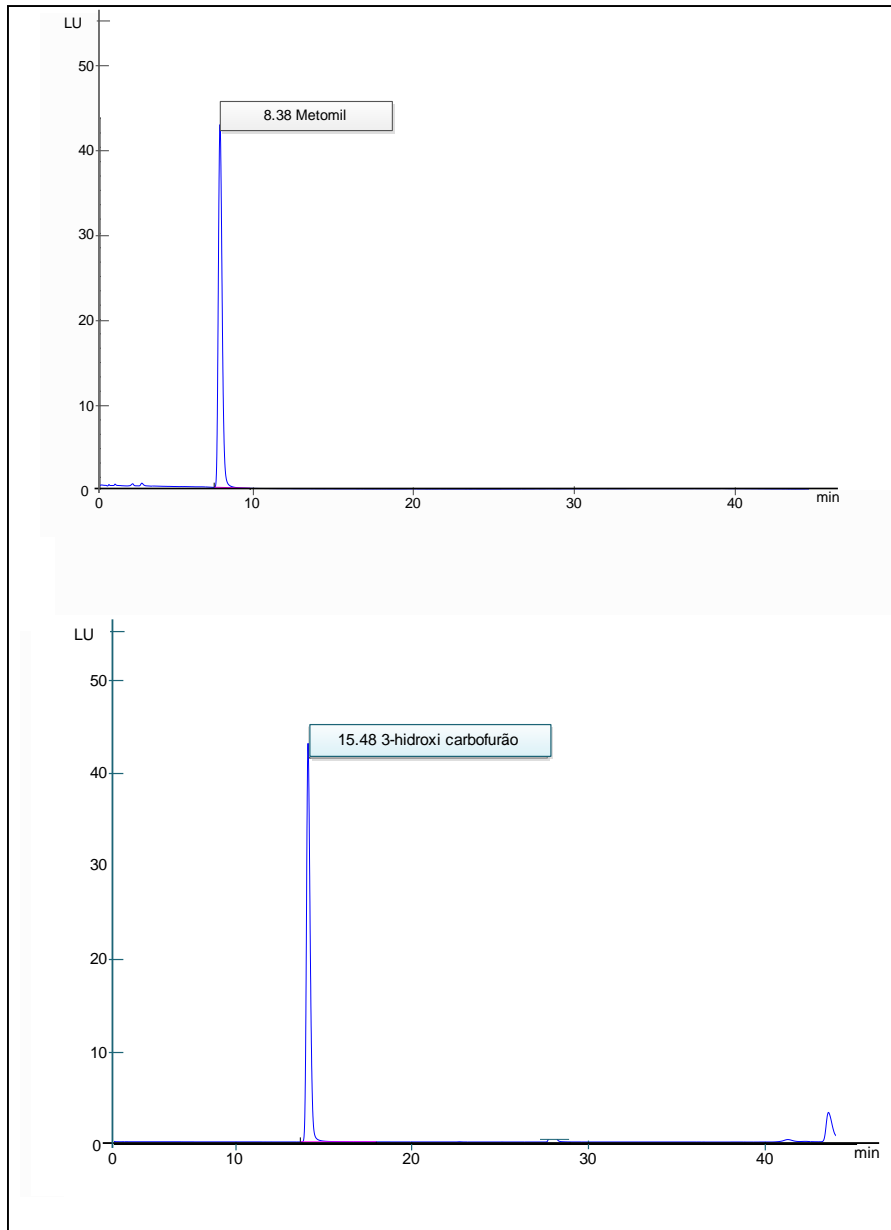


Fig. A.2 Cromatogramas obtidos, da análise do padrão do Metomil e 3-hidroxicarbofurão.

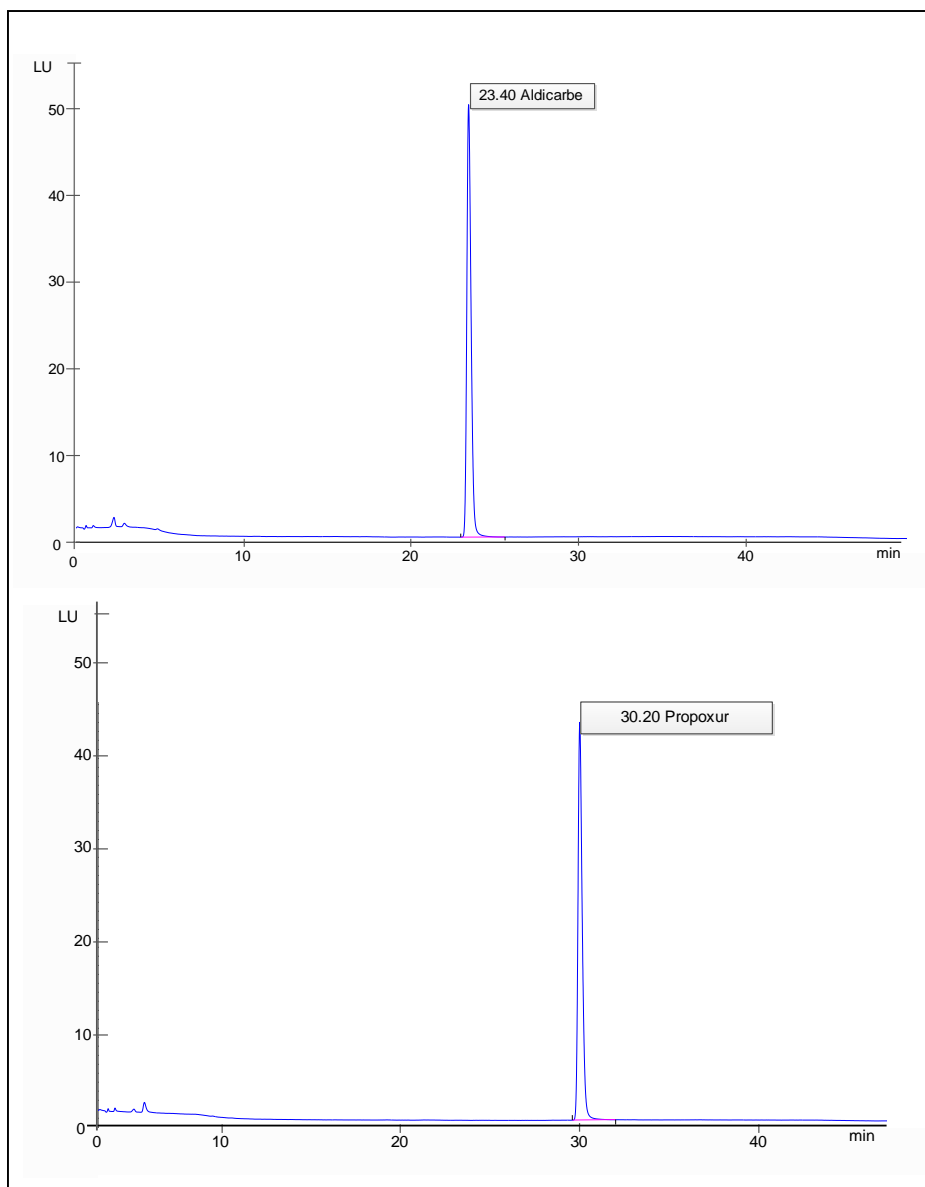


Fig. A.3 Cromatogramas obtidos, da análise do padrão do Aldicarbe e Propoxur.

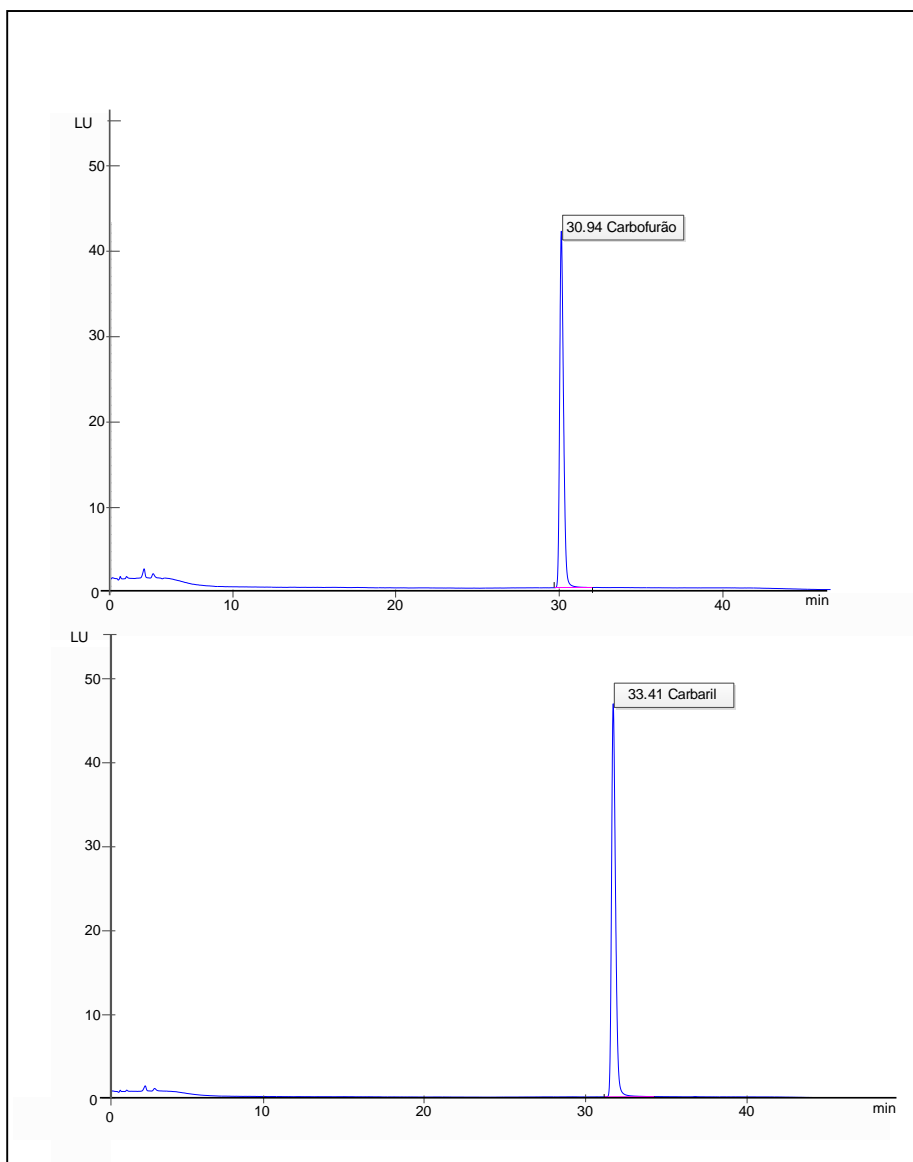


Fig. A.4 Cromatogramas obtidos, da análise do padrão do Carbofurão e Carbaril.

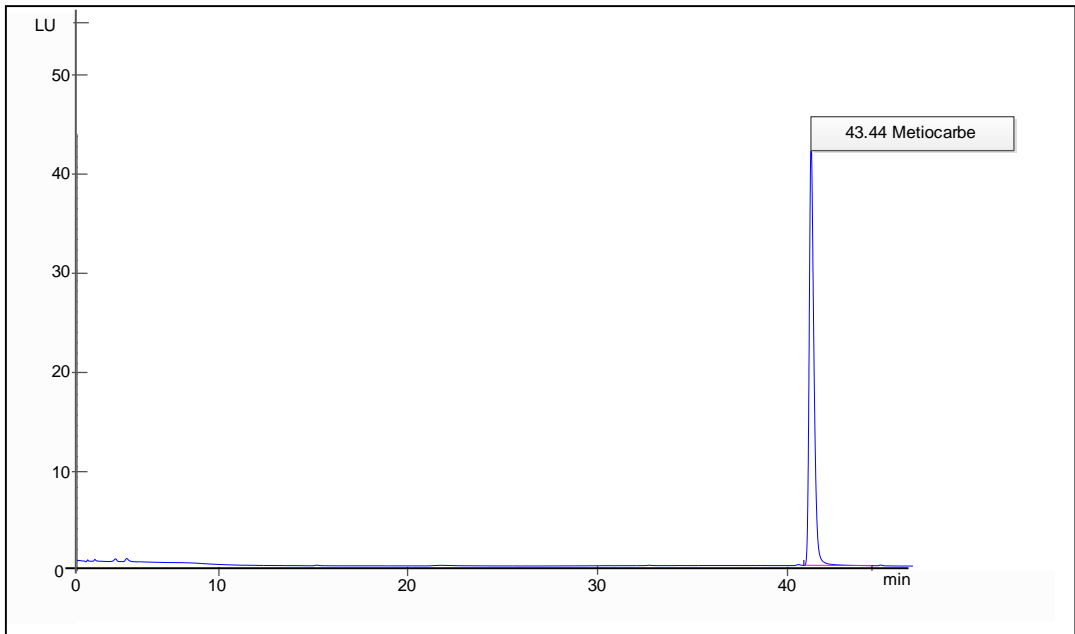


Fig. A.5 Cromatogramas obtidos, da análise do padrão do Metiocarbe.