



MARIA INÊS ALMEIDA MARQUES

Licenciada em Ciências de Engenharia Química e Bioquímica

DETERMINAÇÃO DOS RESÍDUOS POLARES AMPA E GLUFOSINATO EM FRUTOS E VEGETAIS POR UHPLC-MS/MS.

MESTRADO EM ENGENHARIA QUÍMICA E BIOQUÍMICA

Universidade NOVA de Lisboa
Setembro, 2022



DETERMINAÇÃO DOS RESÍDUOS POLARES AMPA E GLUFOSINATO EM FRUTOS E VEGETAIS POR UHPLC-MS/MS

MARIA INÊS ALMEIDA MARQUES

Licenciada em Ciências de Engenharia Química e Bioquímica

Orientadora: Mestre Vera Cristina Calção Canelas,
Responsável Técnica do Laboratório de Química, SGS Portugal

Coorientadores: Professor Mário Fernando José Eusébio,
Professor Auxiliar, Universidade NOVA de Lisboa

Júri:

Presidente: Doutor Paulo Alexandre da Costa Lemos,
Professor Auxiliar, FCT-NOVA

Arguentes: Doutora Maria Margarida Boavida Gonçalves,
Professora Associada, FCT-NOVA

Orientador: Professor Mário Fernando José Eusébio,
Professor Auxiliar, FCT-NOVA

Determinação dos resíduos polares AMPA e glufosinato em frutos e vegetais por UHPLC-MS/MS

Copyright © Maria Inês Almeida Marques, NOVA School of Science and Technology | FCT NOVA

A NOVA School of Science and Technology | FCT NOVA e a Universidade NOVA de Lisboa têm o direito, perpétuo e sem limites geográficos, de arquivar e publicar esta dissertação através de exemplares impressos reproduzidos em papel ou de forma digital, ou por qualquer outro meio conhecido ou que venha a ser inventado, e de a divulgar através de repositórios científicos e de admitir a sua cópia e distribuição com objetivos educacionais ou de investigação, não comerciais, desde que seja dado crédito ao autor e editor.

Aos meus pais, que sempre acreditaram nos meus sonhos.

AGRADECIMENTOS

A realização desta dissertação não teria sido possível sem a intervenção e apoio de várias pessoas que me acompanharam ao longo desta caminhada desafiante. A todas quero expressar o meu profundo agradecimento.

Ao professor Mário Eusébio, quero agradecer pela compreensão, apoio, disponibilidade e sentido crítico demonstrado ao longo deste trabalho.

À Mestre Vera Canelas, responsável pelo Laboratório Químico da SGS, quero agradecer pela oportunidade de realizar este trabalho, por todas as aprendizagens e conselhos dados e pela simpatia com que sempre me recebeu.

Aos meus colegas de laboratório Ana Rita, Eleonora, Francisco e Mariana quero agradecer pela companhia, boa disposição, ensinamentos e apoio sempre demonstrado.

Em especial, quero agradecer à Mariana Ribeiro pela paciência, dedicação e amizade ao longo destes meses. Agradeço por me ter orientado e incentivado a ultrapassar os momentos mais difíceis.

Aos meus pais, à minha família, ao meu namorado e aos meus amigos mais próximos, quero agradecer pela compreensão, motivação, companhia e carinho demonstrados ao longo deste percurso. Agradeço por terem acreditado sempre em mim e não me terem deixado desistir.

Aos meus colegas de curso, aqueles com quem tive a sorte de partilhar estes 5 anos, quero agradecer por todos os momentos únicos e aprendizagens que guardarei sempre com muito carinho. São amigas que irei levar para a vida.

E por último, mas não menos importante, gostaria de agradecer ao meu grupo da JAP pela amizade, companhia e união que evoluiu nestes últimos meses.

Agradeço do fundo do meu coração a todos os que estiveram presentes nesta caminhada. Muito Obrigada!

"Fizeste-nos, Senhor, para Ti, e o nosso coração anda inquieto enquanto não descansar em Ti." (Santo Agostinho).

RESUMO

Os pesticidas polares são largamente utilizados em agricultura de forma a prevenir e a aniquilar pragas comuns devido ao seu baixo custo e elevada eficácia. O incumprimento das boas práticas agrícolas promove a acumulação destes compostos no solo, o que resulta na contaminação dos alimentos. A realização desta dissertação teve como objetivo a implementação e validação de um método analítico para a determinação dos pesticidas polares AMPA e glufosinato em frutos e vegetais. A análise foi realizada com recurso à Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência acoplada à Espectrometria de Massa em *Tandem*, UHPLC-MS/MS, com ionização por *electrospray*. Durante o desenvolvimento do método foram otimizadas as condições do equipamento e do método de extração. A validação do método proposto seguiu as orientações do guia SANTE/11312/2021 com a avaliação dos parâmetros: gama de trabalho e linearidade da curva de calibração, limiares analíticos, precisão, exatidão, efeitos matriz e incerteza do método. O método analítico abrange uma gama de trabalho entre 0,01 e 0,2 mg/kg. De forma a minimizar os efeitos de matriz significativos efetuaram-se as calibrações em matriz. As curvas de calibração apresentam um coeficiente de correlação superior a 0,995, sendo que os testes estatísticos aplicados comprovam também a sua linearidade. Os limites de deteção e quantificação obtidos foram 0,003 mg/kg e 0,010 mg/kg, respetivamente. Os coeficientes de variação obtidos nos ensaios de repetibilidade e de precisão intermédia foram inferiores a 16%. Em relação à exatidão, as taxas de recuperação obtidas para o AMPA foram entre 72% e 116% e para o glufosinato entre 82% e 119%. A estimativa da incerteza expandida foi inferior a 29%. Os critérios de aceitação foram cumpridos, pelo que se conclui que o objetivo proposto foi atingido e o método analítico pode ser implementado em rotina no laboratório da SGS.

Palavras chave: AMPA, Glufosinato, UHPLC-MS/MS, Validação do método analítico, Matrizes alimentares de origem vegetal, Extração por solvente.

ABSTRACT

Polar pesticides are widely used in agriculture to control common pests due to their low cost and high effectiveness. Failure to follow good agricultural practices promotes the accumulation of these compounds in the soil, leading to food contamination. The purpose of this dissertation was to implement and validate an analytical method for the determination of polar pesticides AMPA and glufosinate in fruits and vegetables. The analysis was performed using Ultra-High-Performance Liquid Chromatography coupled with Tandem Mass Spectrometry, UHPLC-MS/MS, with electrospray ionization. During the method development process, the equipment conditions and extraction method were optimized. Validation of the proposed method followed the guidelines of the SANTE/11312/2021 with the evaluation of the parameters: working range and linearity of the calibration curve, limits of detection and quantification, precision, accuracy, matrix effects, and method uncertainty. The analytical method covers a working range of 0,01 to 0,2 mg/kg. To minimize significant matrix effects matrix calibrations were performed. The calibration curves show correlation coefficients greater than 0,995 and the applied statistical tests also demonstrate their linearity. The limits of detection and quantification obtained were 0,003 mg/kg and 0,010 mg/kg, respectively. The coefficients of variation obtained in the repeatability and intermediate precision tests were less than 16%. Regarding accuracy, the recovery rates obtained for AMPA were from 72% to 116% and for glufosinate from 82% to 119%. Measurement uncertainties were less than 29%. The acceptance criteria have been met, so it can be concluded that the proposed objective has been achieved and the analytical method can be routinely implemented in the SGS laboratory.

Keywords: AMPA, Glufosinate, UHPLC-MS/MS, Method validation, Food matrix of plant origin, Solvent Extraction.

ÍNDICE

1	INTRODUÇÃO	1
1.1	Enquadramento	1
1.2	SGS.....	3
1.3	Glufosinato e AMPA.....	4
1.3.1	Propriedades físico-químicas	6
1.3.2	Mecanismo de ação	7
1.3.3	Toxicidade e Limites Máximos de Resíduos	9
2	ESTADO DE ARTE	11
2.1	Método de Extração.....	11
2.2	LC-MS/MS.....	16
2.2.1	Cromatografia Líquida	19
2.2.2	Espetrometria de Massa em tandem (MS/MS).....	31
2.2.3	Efeito Matriz.....	34
2.3	Validação do método Analítico	35
2.3.1	Especificidade e Seletividade.....	37
2.3.2	Quantificação.....	38
2.3.3	Precisão.....	41
2.3.4	Exatidão	43
2.3.5	Estimativa de incertezas	44
2.4	Comparação de resultados na literatura.....	45

3	MATERIAIS E MÉTODOS	49
3.1	Equipamento e material	49
3.2	Reagentes.....	50
3.3	Preparação de soluções.....	50
3.4	Amostras.....	51
3.5	Procedimento experimental.....	52
3.5.1	Extração das amostras.....	52
3.5.2	Ensaio de recuperação	54
3.5.3	Reta de Calibração em Matriz.....	54
3.5.4	Reta de Calibração em Solvente	55
3.6	Condições para a Análise LC-MS/MS	55
3.7	Validação do método de ensaio.....	57
4	APRESENTAÇÃO E DISCUSSÃO DOS RESULTADOS OBTIDOS.....	61
4.1	Resultados do desenvolvimento do método cromatográfico	61
4.1.1	Seleção da coluna cromatográfica	62
4.1.2	Hypercarb.....	65
4.2	Otimização do UHPLC-MS/MS	65
4.3	Otimização dos parâmetros da extração	68
4.3.1	Estabilidade das soluções de trabalho.....	68
4.3.2	Estudo da etapa de redução da temperatura dos extratos	70
4.3.3	Estudo da etapa de diluição	71
4.4	Validação do método	71
4.4.1	Gama de Trabalho e Linearidade.....	72
4.4.2	Especificidade e Seletividade.....	77
4.4.3	Limiares Analíticos	79
4.4.4	Precisão.....	80
4.4.5	Exatidão	82

4.4.6	Estimativa da Incerteza do Método	83
4.4.7	Efeito Matriz	84
5	CONCLUSÕES E PROPOSTAS DE TRABALHO FUTURO	87
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	91
A	APÊNDICE: RETAS DE CALIBRAÇÃO	103
B	APÊNDICE: LIMITES ANALÍTICOS.....	107
C	APÊNDICE: PRECISÃO.....	109
D	APÊNDICE: ENSAIOS DE RECUPERAÇÃO.....	117
E	APÊNDICE: ESPECIFICAÇÃO TÉCNICA DE SERVIÇO	121

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.1 - Representação da fórmula química do glufosinato e do sal glufosinato-amónio...	4
Figura 1.2 - Representação da fórmula química do AMPA.....	5
Figura 1.3 - Biodegradação do glifosato em AMPA nos solos.....	5
Figura 2.1 - Representação esquemática de um método analítico genérico.....	12
Figura 2.2 - Representação esquemática das etapas do método QuPPe original.....	14
Figura 2.3 - Equipamento LC-MS/MS disponível no laboratório da SGS Portugal.....	19
Figura 2.4 – Representação esquemática da separação de dois componentes numa mistura por cromatografia.....	20
Figura 2.5 - Representação gráfica que exemplifica a concentração de cada analito à medida que vão atravessando a coluna.....	20
Figura 2.6 - Exemplo de um cromatograma onde se observa o tempo de retenção, a largura da linha de base e o tempo morto para solutos não retidos.....	22
Figura 2.7 - Curva de Van Deemter para vários tamanhos de partículas.....	24
Figura 2.8 - Representação esquemática de um injetor automático.....	26
Figura 2.9 - Relação entre a polaridade da fase móvel e do soluto, e o tempo de retenção para cromatografia de fase normal e de fase reversa.....	28
Figura 2.10 - Representação esquemática de um MS/MS com um analisador de massas triplo quadrupolo.....	31
Figura 2.11 - Esquema simplificado da fonte de ionização por <i>electrospray</i> demonstrando o efeito do Cone de Taylor.....	32
Figura 2.12 - Representação esquemática de um analisador quadrupolo.....	33
Figura 2.13 - Representação Esquemática das etapas para a validação do método analítico..	36
Figura 3.1 - Representação esquemática do método de extração QuPPe adaptado.....	53

Figura 4.1 - Cromatogramas obtidos para o primeiro e último ponto da reta de calibração na matriz de pimento para análise na coluna Ascentis Express	63
Figura 4.2 - Observação da perda de retenção do analito glufosinato na análise com a coluna Hypercarb.....	65
Figura 4.3 - Estudo da otimização das energias de colisão para o analito AMPA.....	67
Figura 4.4 - Representação dos picos cromatográficos obtidos para o AMPA e para o glufosinato para uma concentração de 0,1 ppm	68
Figura 4.5 - Estudo da estabilidade da solução de trabalho 3, com a concentração de 1 ppm, para o AMPA e para o glufosinato.....	69
Figura 4.6 - Representação gráfica das retas de calibração.....	73
Figura 4.7 - Representação gráfica da análise de resíduos	75
Figura 4.8 - Representação gráfica do teste de RIKILT	76
Figura 4.9 - Representação do cromatograma do ponto PC2 da reta de calibração em matriz para o AMPA e glufosinato.....	78
Figura 4.10 - Representação gráfica do efeito Matriz.....	84

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1.1 - Propriedades físico-químicas dos pesticidas	6
Tabela 1.2 - Limites Máximos de Resíduos em produtos alimentares, nomeadamente Frutos e Legumes.....	10
Tabela 2.1 - Breve descrição sobre 4 técnicas de limpeza utilizadas na extração	17
Tabela 2.2 - Métodos analíticos dos artigos científicos estudados para a determinação de AMPA e glufosinato em matrizes alimentares por LC-MS/MS	47
Tabela 3.1 - Concentração das soluções stock de AMPA e glufosinato para análise	50
Tabela 3.2 - Volume a adicionar da Solução de Trabalho para os ensaios de fortificação.....	54
Tabela 3.3 - Reta de Calibração em Matriz com dois analitos.....	55
Tabela 3.4 - Condições cromatográficas do método analítico para análise.....	56
Tabela 3.5 - Condições definidas para o Espectrómetro de Massa	57
Tabela 3.6 - Transições de massas e energias de colisão utilizadas na análise	57
Tabela 3.7 - Resumo dos parâmetros a validar com os respetivos critérios.....	60
Tabela 4.1 - Resultados dos principais testes de otimização do método cromatográfico para a coluna Ascentis Express HILIC	64
Tabela 4.2 - Resultados obtidos no estudo da estabilidade da solução de trabalho 3.....	69
Tabela 4.3 - Resultados do efeito matriz obtido durante o estudo da etapa de redução de temperatura dos extratos.....	70
Tabela 4.4 - Coeficiente de correlação, Coeficiente de determinação, Sensibilidade, Gama de trabalho e Coeficiente de variação do método.	73
Tabela 4.5 - Teste de homogeneidade de variâncias para as retas de calibração em matriz... ..	74
Tabela 4.6 - Resultados da aplicação do teste de Mandel.	75
Tabela 4.7 - Resumo dos resultados obtidos através da aplicação dos testes estatísticos para a validação da gama de trabalho e linearidade do método.....	77

Tabela 4.8 -Tempo de retenção para 0,01 mg/kg	78
Tabela 4.9 -Resultados da Razão iónica.....	79
Tabela 4.10 -Cálculo dos Limiares analíticos pelo desvio padrão da curva de calibração	79
Tabela 4.11 -Cálculo dos Limiares analíticos pela análise de brancos de matriz fortificados...	80
Tabela 4.12 -Resumo dos resultados obtidos no estudo da repetibilidade do equipamento..	80
Tabela 4.13 -Resumo dos resultados obtidos no estudo da repetibilidade do método	81
Tabela 4.14 -Resumo dos resultados obtidos no estudo da precisão intermédia do método.	82
Tabela 4.15 -Resumo dos resultados obtidos na realização dos ensaios de recuperação.....	82
Tabela 4.16 - Resultados obtidos na avaliação da incerteza expandida do método analítico.	83
Tabela 4.17 - Resultados do cálculo do Efeito Matriz.	85
Tabela A.1 - Retas de Calibração para o AMPA para as matrizes de Mirtilo e Pimento.....	103
Tabela A.2 - Retas de Calibração para o glufosinato para as matrizes de Mirtilo e Pimento.	103
Tabela A.3 - Resultados obtidos pela aplicação do método mínimo dos quadrados para ambos os analitos.	104
Tabela A.4 - Curvas de calibração em solvente para o AMPA e glufosinato.....	104
Tabela A.5 - Resultados obtidos na análise de resíduos para o analito AMPA e glufosinato	105
Tabela A.6 - Resultados obtidos pelo Teste de Rikilt para o analito AMPA	105
Tabela A.7 - Resultados obtidos pelo Teste de Rikilt para o analito glufosinato	105
Tabela B.1 - Dados obtidos durante os ensaios de recuperação.....	107
Tabela C.1- Resultados obtidos durante o estudo da repetibilidade do equipamento para o analito AMPA na matriz de Mirtilo.....	109
Tabela C.2 - Resultados obtidos durante o estudo da repetibilidade do equipamento para o analito AMPA na matriz de Pimento.....	110
Tabela C.3 - Resultados obtidos durante o estudo da repetibilidade do equipamento para o analito Glufosinato na matriz de Mirtilo.....	110
Tabela C.4 - Resultados obtidos durante o estudo da repetibilidade do equipamento para o analito Glufosinato na matriz de Pimento vermelho	111
Tabela C.5 - Resultados obtidos durante o estudo da repetibilidade do método para o analito AMPA nas matrizes em estudo.	112
Tabela C.6 - Resultados obtidos durante o estudo da repetibilidade do método para o analito Glufosinato nas matrizes em estudo.....	113
Tabela C.7 - Resultados obtidos durante o estudo da precisão intermédia através de ensaios de repetibilidade realizados em dois dias diferentes para o AMPA na matriz de mirtilo	113

Tabela C.8 - Resultados obtidos durante o estudo da precisão intermédia para o AMPA na matriz de pimento.....	114
Tabela C.9 - Resultados obtidos durante o estudo da precisão intermédia para o Glufosinato na matriz de mirtilo.....	115
Tabela C.10 - Resultados obtidos durante o estudo da precisão intermédia para o glufosinato na matriz de pimento.....	115
Tabela D.1 - Resultados dos ensaios de recuperação para o AMPA na matriz mirtilo.....	117
Tabela D.2 - Resultados dos ensaios de recuperação para o AMPA na matriz pimento.....	118
Tabela D.3 - Resultados dos ensaios de recuperação do glufosinato para a matriz mirtilo....	119
Tabela D.4 - Resultados dos ensaios de recuperação para o glufosinato na matriz pimento.	120

LISTA DE SIGLAS E ACRÓNIMOS

AMPA	Ácido aminometilfosfónico (<i>Aminomethylphosphonic acid</i>)
ASE	Extração acelerada por solvente (<i>Accelerated solvent extraction</i>)
CV	Coeficiente de Variação
d-SPE	Extração em fase sólida dispersiva (<i>dispersive-Solid Phase Extraction</i>)
EFSA	Autoridade europeia para a Segurança Alimentar (<i>European Food Safety Authority</i>)
EM	Efeito Matriz
EPSP	Enzima 5-enolpiruvilshiquimato-3-fosfato sintase
ESI	Ionização por <i>Electrospray</i>
ETS	Especificação Técnica de Serviço
EURL	Laboratório de Referência da União Europeia (<i>European Union Reference Laboratories</i>)
FAO	Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura (<i>Food and Agriculture Organization of the United Nations</i>)
FMOC-Cl	Cloroformiato de 9-fluorenilmetila
GAP	Boas práticas agrícolas (<i>Good Agricultural Practices</i>)
GC-MS/MS	Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa em <i>tandem</i> (<i>Gas Chromatography with tandem mass spectrometry</i>)

HILIC	Cromatografia Líquida com Interação Hidrofílica (<i>Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography</i>)
HPLC	Cromatografia Líquida de Elevada Eficiência (<i>High-Performance Liquid Chromatography</i>)
IL-IS	Padrão interno de Isótopos Análogos (<i>Isotope-Labeled Internal-Standard</i>)
LC-MS/MS	Cromatografia Líquida acoplada à espectrometria de massa em <i>tandem</i> (<i>Liquid Chromatography with tandem mass spectrometry</i>)
LMR	Limite Máximo de Resíduos
LOD	Limite de Detecção (<i>Limit of Detection</i>)
LOQ	Limite de Quantificação (<i>Limit of Quantification</i>)
MIPs	<i>Molecularly Imprinted Polymers</i>
MPA	Ácido 2-metilfosfínico-acético
MPP	Ácido 3-metilfosfínico-propiónico
MS/MS	Espectrometria de Massa em <i>tandem</i> (<i>tandem Mass Spectrometry</i>)
MWCNT	<i>Multi walled carbon tubes</i>
m/z	Razão massa-carga (<i>mass-to-charge ratio</i>)
NGA	Ácido N-acetil glufosinato
PSA	<i>Primary secondary amine</i>
PGC	Carbono grafite poroso (<i>Porous Graphitic Carbon</i>)
QuEChERS	<i>Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe</i>
QuPPE	<i>Quick Polar Pesticide Method</i>
RI	Razão Iônica
SRM	Métodos de Resíduo Único (<i>Single Residue Method</i>)
SPE	Extração em fase sólida (<i>Solid-phase extraction</i>)
SPME	Microextração em fase sólida (<i>Solid-phase microextraction</i>)
UHPLC	Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência (<i>Ultra high performance Liquid Chromatography</i>)

INTRODUÇÃO

1.1 Enquadramento

Os frutos e os vegetais são alimentos ricos em vitaminas, minerais e fibras fundamentais para uma dieta saudável e equilibrada [1]. A Organização Mundial da Saúde (WHO) recomenda o consumo diário de cinco porções destes alimentos, pois apresentam vários benefícios como a redução do risco de doenças cardíacas, prevenção de diabetes, obesidade, e até alguns tipos de cancro [2].

A agricultura moderna caracteriza-se pela utilização de novas técnicas e equipamentos e pelo aumento do número de investigações na área agrícola sobre a utilização de uma vasta diversidade de produtos fitofarmacêuticos, fertilizantes e aditivos [3]. O crescimento da população mundial leva à necessidade do acréscimo da produção alimentar, pelo que, surge a necessidade da utilização destes fitofarmacêuticos de forma a assegurar o controlo de pragas de insetos, infestações fúngicas, ervas daninhas e outras doenças [4].

A Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura (FAO) define o termo pesticida como: "*any substance, or mixture of substances (...) intended for repelling, destroying or controlling any pest, including (...) unwanted species of plants causing harm during or otherwise interfering with the production, processing, storage, transport, or marketing of food, agricultural commodities (...) or animal feeding stuffs (...)*" [5]. A utilização destes fitofarmacêuticos, de acordo com as boas práticas de agricultura, resulta no aumento da quantidade produzida, na medida que evita perdas desnecessárias nas colheitas, e na melhoria da qualidade dos alimentos [6].

A utilização excessiva destes produtos leva à contaminação dos solos por resíduos de pesticidas, pelo que este assunto se tornou uma questão importante devido à elevada

persistência e toxicidade de alguns pesticidas [7]. A difusão destes agroquímicos apresenta consequências diretas na biodiversidade dos solos, no funcionamento dos ecossistemas e na segurança alimentar, e como tal, pode afetar a realização de vários objetivos de desenvolvimento sustentável, estabelecidos pela Assembleia Geral das Nações Unidas [7, 8].

A presença de resíduos de pesticidas em produtos alimentares é uma preocupação global porque apresenta impactos negativos na saúde, dependendo do meio e da quantidade de exposição. As principais vias de exposição de pesticidas aos seres humanos são através do seu consumo em alimentos, como frutos, vegetais e cereais [9]. O impacto na saúde depende do tipo de pesticida, pelo que podem afetar o sistema nervoso, causar irritabilidade na pele e olhos, afetar o sistema endócrino ou até serem classificados como cancerígenos [10,11].

Infelizmente, a agricultura biológica não é uma alternativa viável para reduzir a utilização destes pesticidas devido aos baixos rendimentos de produção associados [1]. A alternativa prende-se então na formação dos agricultores sobre a utilização dos fitofarmacêuticos, conforme as boas práticas agrícolas e regulamentação imposta, e os seus efeitos adversos na saúde e no meio ambiente, enquanto se impulsiona a procura de alternativas mais sustentáveis e eficazes [1].

As organizações responsáveis pela segurança alimentar, como a Autoridade Europeia para a Segurança Alimentar, EFSA, em conjunto com os governos, têm vindo a desenvolver e implementar diretrizes e regulamentações claras, de forma a monitorizar a presença destes resíduos em alimentos e a assegurar a segurança e qualidade dos alimentos [12]. Portanto, é imperativo o desenvolvimento de métodos analíticos capazes de analisar estes alimentos e confirmar e quantificar a presença de pesticidas nos mesmos, de forma a assegurar o cumprimento dos limites máximos de resíduos [1].

No presente relatório, os pesticidas em estudo são o glufosinato e o AMPA, que se definem como pesticidas polares, pertencendo à classe de herbicidas. A sua elevada utilização deve-se, não só ao seu baixo custo, mas também à elevada eficácia na prevenção e aniquilação de pragas comuns, o que contribui para o crescimento das culturas e a obtenção de frutos com características desejáveis para o consumidor [5, 13, 14].

Porém, vários estudos referem a dificuldade em identificar estes resíduos polares através de métodos gerais para identificação de pesticidas, pois são pouco retidos nas colunas cromatográficas comumente utilizadas, como as C18, devido às características físico-químicas destes analitos, como a fraca solubilidade em solventes orgânicos apolares [15]. Surge assim a necessidade de desenvolver métodos singulares alternativos para a determinação destes compostos [16].

Posto isto, o **objetivo** desta dissertação prende-se na implementação e validação de um método analítico para a determinação do herbicida polar glufosinato e o resíduo AMPA, em amostras alimentares de frutos e vegetais, no laboratório da SGS, com auxílio da técnica de Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência acoplada à Espectrometria de Massa em *tandem* com ionização por *electrospray*, UHPLC-MS/MS. A validação do método analítico terá como base o estudo da gama de trabalho e linearidade da curva de calibração, dos limiares analíticos e da precisão e exatidão do método.

Neste trabalho pretende-se também desenvolver o estudo de um método analítico que determina estes resíduos polares com a utilização de uma coluna cromatográfica que opera no modo de cromatografia líquida de interação hidrofílica (HILIC), em alternativa à coluna de carbono grafitico poroso Hypercarb.

1.2 SGS

A empresa SGS é líder mundial em inspeção, verificação, testes e certificação, fundada a 12 de dezembro de 1878 [17]. Desde então tornou-se numa referência mundial em qualidade e integridade [17]. Revolucionou o mercado de comércio de grão nas docas de Rouen, França, onde a qualidade e quantidade do grão era verificada e inspecionada na chegada ao porto, de forma a representar o exportador e assim defender-lhe os seus direitos [18]. A curto prazo, este serviço de inspeção aumentou os lucros dos exportadores ao reduzir as perdas associadas à viagem. O sucesso notável deste serviço fez com que a empresa se tenha tornado líder no mercado de inspeção de grão em 1913, contando com 45 escritórios espalhados pela Europa [17].

Um ano após o início da Primeira Guerra Mundial, a SGS transferiu a sua sede de Paris para Genebra na Suíça e, anos mais tarde, adotou o nome que por hoje ainda é reconhecida, *Société Générale de Surveillance* [17]. A constante postura empreendedora da empresa permitiu, durante o século XX, a diversificação dos seus serviços de inspeção para os mais variados setores como indústria, petróleo, gás, agrícola e produtos químicos [18]

Dentro do setor de agricultura e alimentação, a SGS disponibiliza serviços de análise de contaminantes em alimentos através das tecnologias mais avançadas. A análise a resíduos de pesticidas em frutas e legumes é uma das substâncias restritas abrangidas pelos serviços de teste de contaminantes [19]. Os laboratórios de análise responsáveis pela análise de resíduos de pesticidas atuam em conformidade com a ISO 17025 e a ISO 9001:2008 [19].

Os laboratórios da SGS dispõem das tecnologias de cromatografia líquida com espectrometria de massa em *tandem* (LC-MS/MS) e cromatografia em fase gasosa acoplada com espectrometria de massa (GC-MS) para a identificação e quantificação de mais de 400 resíduos específicos [19] e distinguem-se no mercado pela qualidade e especificidade dos resultados. Os métodos analíticos de ensaio utilizados pela SGS garantem que os alimentos analisados cumprem os limites máximos de resíduos (LMR) de acordo com os regulamentos mundiais [20].

1.3 Glufosinato e AMPA

O glufosinato e o glifosato são herbicidas comumente utilizados em práticas agrícolas [11]. O ácido aminometilfosfónico (AMPA) é o principal metabolito resultante da aplicação do glifosato [21]. A utilização destes herbicidas nas culturas agrícolas, tem vindo a aumentar consideravelmente devido ao desenvolvimento de plantas geneticamente alteradas, de forma a resistirem aos efeitos destes analitos [11].

O **glufosinato** (Figura 1.1) é um herbicida não seletivo aplicado no período pós-emergência. Habitualmente é utilizado no controlo de gramíneas e em várias espécies de erva daninhas nos campos agrícolas e industriais [22]. Na sua forma de sal amónio (glufosinato-amónio), é um herbicida de amplo espectro solúvel em água, não volátil e com um carácter de ácido fraco [23]. Não é recomendado que seja aplicado em pré-emergência devido à sua rápida degradação pelos microrganismos [24].

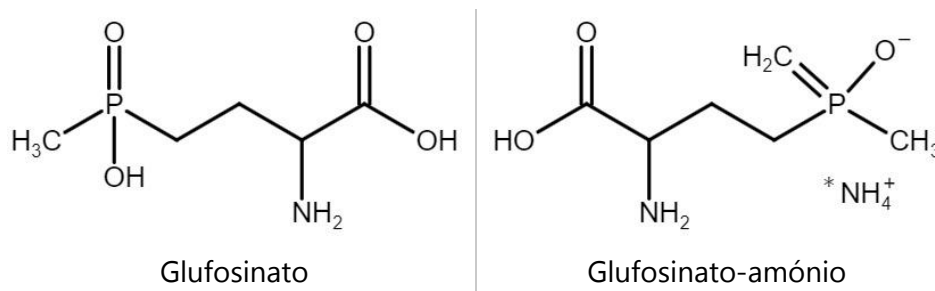
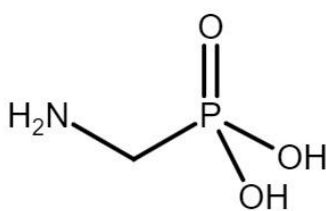


Figura 1.1 - Representação da fórmula química do glufosinato e do sal glufosinato-amónio.

O glufosinato apresenta-se no mercado sob várias designações comerciais como: Basta S, da Bayer CropScience [23], Harvest [25] ou Kaspar [26]. Estes produtos comerciais são compostos por uma mistura racémica entre o composto sintético D e o produto natural L-fosfotricina, produzido por várias espécies da *Streptomyces* [15, 27]. Apenas o estereoisómero L da fosfotricina inibe a enzima glutamina sintase [28, 29].

A degradação do glufosinato-amônio nos solos leva à formação do ácido N-acetil glufosinato (NGA) e do ácido 3-metilfosfínico-propiónico (MPP) [30], que por sua vez tende a decompor-se em ácido 2-metilfosfínico-acético (MPA), caso as condições climáticas se proporcionem [31].

O **AMPA** (Figura 1.2) é o primeiro produto de degradação do herbicida glifosato, frequentemente encontrado nos solos e em águas subterrâneas [32]. Ao partilharem as mesmas propriedades químicas, o AMPA é também classificado como um composto com uma toxicologia importante de se estudar [33, 34].



AMPA

Figura 1.2 - Representação da fórmula química do AMPA.

No solo, os microrganismos degradam o glifosato em condições aeróbias e anaeróbias [35]. A principal via metabólica no solo envolve a formação de CO₂ e do ácido aminometilfosfínico (AMPA) [35]. As bactérias presentes nos solos decompõem o glifosato em AMPA, como demonstrado na Figura 1.3.

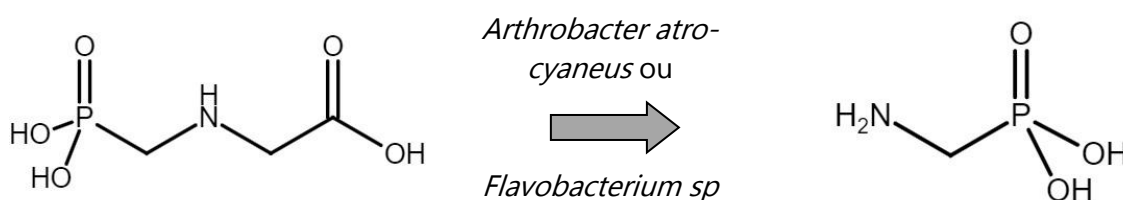


Figura 1.3 - Biodegradação do glifosato em AMPA nos solos. Adaptado de [32, 36].

Não é certo que o aparecimento do AMPA no meio ambiente derive apenas da degradação do glifosato. Outros estudos sugerem que pode surgir da degradação de detergentes que contêm ácidos fosfóricos, etilenodiamina tetra (EDTMP) ou dietilenotriamina penta (DTPMP) [37]. Contudo, o AMPA representa entre 13,3% e 50,1% do glifosato aplicado nas culturas agrícolas e também se degrada no solo, embora seja a um ritmo mais lento do que o glifosato, tornando-se num resíduo com alguma persistência no meio ambiente [35].

A determinação conjunta dos analitos mencionados anteriormente é uma tarefa desafiante tendo em conta que se trata de compostos polares, altamente solúveis em água e pouco solúveis na maioria dos solventes orgânicos [15].

1.3.1 Propriedades físico-químicas

A solubilidade em água, o cologaritmo da constante de acidez (pka), a pressão de vapor, o coeficiente de partição octanol-água (Kow), o coeficiente de adsorção de carbono orgânico no solo (Koc) e o tempo de meia-vida são algumas **características físico-químicas** que permitem relacionar a eficácia com o comportamento dos herbicidas quando aplicados [38].

O Koc relaciona a afinidade do herbicida com o carbono orgânico, obtido através da divisão do indicador da afinidade do herbicida pelos coloides orgânicos e minerais do solo pelo teor de carbono orgânico no solo [38]. O valor de Koc disponível para cada composto é um valor médio encontrada na literatura [38]. É possível estabelecer uma correlação entre os valores de Kow e Koc, pois quanto maior for a lipofilicidade do herbicida, maior é a adsorção do analito à fração orgânica do solo, o que resulta em menores perdas por lixiviação [38].

Na Tabela 1.1 apresentam-se as características físico-químicas que interferem na ação do glufosinato e do AMPA.

Tabela 1.1 - Propriedades físico-químicas dos pesticidas [38–40]

	Glufosinato	AMPA
Fórmula molecular	C ₅ H ₁₂ NO ₄ P	CH ₆ NO ₃ P
Nº CAS	51276-47-2	1066-51-9
Massa Molar (g/mol)	181,13	111,04
Solubilidade a 20°C (g/L)	46,3 [41]	56 [35]
Cologaritmo da constante de acidez, pka	pka1 = <2; pka2 = 2,9; pka3= 9,8 [41]	pka1= 1,8; pka2=5,4; pka3= 10 [34]
Coeficiente de partição octanol-água, log Kow	-4,0	-2,76 [42]
Coeficiente de partição carbono orgânico-água, Koc (ml/g)	755	2 002
Ponto de fusão (°C)	230 [26]	338 [26]
Pressão de vapor (mPa)	10 ⁻²	10 ⁻²
Tempo de meia vida	7 a 20 dias	76 a 240 dias [43]

O glufosinato é um ácido fosfínico pertencente à família dos compostos organofosforados [44]. É um herbicida hidrofílico com $\log K_{ow}$ de -4 e, por isso, requer a adição de um adjuvante para facilitar a absorção do produto [45]. Define-se como um composto não volátil, com uma pressão de vapor inferior a 1 mPa, contando com diferentes valores para a constante de ionização devido aos grupos amina e hidroxilo presentes na sua estrutura [41].

De acordo com o valor do K_{oc} , o glufosinato demonstra alguma adsorção aos colóides do solo, porém apresenta um potencial de lixiviação no solo baixo devido à rápida e intensa biodegradação no solo. Como já foi referido, este é um herbicida de contacto que não sofre translocação nas plantas, pelo que é necessário haver uma boa distribuição do produto nas folhas, de forma a atingir a eficácia esperada [38].

O tempo de meia-vida do glufosinato em condições normais é de uma semana, podendo atingir os 20 dias em dias secos e frios, que dificulta a degradação por parte dos microrganismos [45]. O glufosinato é considerado como um herbicida não persistente na natureza, contudo os metabolitos que advêm da sua degradação poderão persistir no meio ambiente [31].

O AMPA é também um analito polar não volátil, com um baixo peso molecular. Este é facilmente ionizável apresentando três valores de pka [34]. Para certas propriedades físicas, como pressão de vapor e solubilidade, não há concordância entre os valores da literatura, pelo que se considera que estes sejam semelhantes aos do glifosato. Tanto o glifosato como o AMPA possuem um valor de K_{oc} elevado, ou seja, são herbicidas que possuem uma elevada afinidade com os colóides orgânicos e minerais do solo, o que lhes permite ter também um potencial de lixiviação no solo mínimo [38].

Estima-se que o glifosato apresente um tempo de meia vida entre 5 e 21 dias [36]. Estudos afirmam que o AMPA é mais persistente que o glifosato no meio ambiente, como um tempo de meia-vida que poderá variar entre os 76 e 240 dias [43, 46]. Ora, este é consideravelmente maior que o do glifosato, o que acresce a preocupação ambiental em relação a este analito.

1.3.2 Mecanismo de ação

Em relação ao mecanismo de ação do herbicida, de acordo com o artigo *Bioactivity of herbicides* [27], o glufosinato e o glifosato integram o grupo de herbicidas com função de inibir ou a formação de módulos biológicos (como açúcares, aminoácidos e ácidos gordos) ou

a sua junção, para a formação de biopolímeros [27]. Mais especificamente, os herbicidas em questão interferem na síntese dos aminoácidos [27].

O glufosinato inibe, irreversivelmente, a enzima glutamina sintase, responsável pela produção de glutamina [27]. A enzima encontra-se nos cloroplastos e catalisa a primeira reação de incorporação da amónia nas células vegetais, através da redução dos nitratos [38]. Ou seja, a inatividade da enzima promove a intoxicação das células por acumulação de amónia nos cloroplastos, inibindo a fotorrespiração e os processos fotossintéticos, o que resulta no emurchecimento e clorose das folhas e consequente morte das ervas daninhas, após 1 a 2 semanas do tratamento [28, 44]. Em relação aos mamíferos, estes possuem outros sistemas metabólicos que conseguem compensar os efeitos causados pela inatividade da enzima glutamina sintase [28].

No relatório efetuado em 2012 pela Autoridade Europeia para a Segurança Alimentar (EFSA), com o objetivo de rever a avaliação do risco associado à substância ativa do glufosinato, foram analisadas duas fórmulas concentradas "Basta 14 SL" e "Basta 18 SL", que contém 150g/L e 200g/L de glufosinato, respetivamente [23].

No relatório em questão é referido que para uma **aplicação responsável e consciente**, este deve ser aplicado diretamente no solo por pulverização, de forma a controlar as ervas daninha, em condições ao ar livre [23]. A taxa de aplicação recomendada para a maioria das colheitas é de até 1,5 kg de substância ativa por hectare, no máximo duas aplicações ao ano, com um intervalo mínimo de 30 dias entre aplicações [23]. De forma a agir de acordo com as boas práticas agrícolas (GAP), deve-se consultar as tabelas com a informação em relação às doses por hectare antes de se iniciar o tratamento, pois pode variar entre culturas [44].

Como já foi referido, o glufosinato é um herbicida não-seletivo, pelo que deve-se ter o cuidado de pulverizar apenas as folhas das plantas infestantes, sem atingir as folhas da cultura [38]. Após a aplicação, a absorção pelas folhas requer até seis horas sem chuva [45].

O glifosato inibe a enzima 5-enolpiruvilshiquimato-3-fosfato sintase (EPSP sintase) necessária para a via do *shikimato* (via do ácido chiquímico), que corresponde a uma via metabólica responsável pela biossíntese dos três aminoácidos aromáticos: fenilalanina, tirosina e triptofano [27, 28]. Esta via metabólica não ocorre no sistema dos mamíferos, o que promove a seletividade deste composto [28].

Os estudos sobre o impacto do AMPA na saúde e no meio ambiente ainda são limitados, pois este composto não faz parte das soluções de pulverização, visto que a sua presença depende da degradação por parte dos microrganismos.

No estudo elaborado por Araújo *et al*, afirmam que a aplicação dos herbicidas durante vários anos, leva à mais rápida degradação quando em comparação com a primeira aplicação do fitofarmacêutico [47]. Isto deve-se ao facto de os microrganismos presentes no solo terem sofrido um desenvolvimento e estarem mais adaptados ao processo de biodegradação. Ora, este comportamento progressivo poderá traduzir-se num aumento da presença do AMPA no meio ambiente.

1.3.3 Toxicidade e Limites Máximos de Resíduos

Apesar de os herbicidas glifosato e glufosinato serem considerados como relativamente seguros para os seres humanos e animais, existe um grande debate na comunidade científica acerca da suspeita de terem efeitos prejudiciais na saúde [11].

Existem estudos sobre a **toxicidade** destes analitos, que concluem que o glifosato é tóxico para o sistema nervoso, sistema hematopoiético, sistema endócrino e para o sistema reprodutor [11]. Desde 2015, a Agência Internacional de Pesquisa em Cancro (IARC) integrou este pesticida no grupo 2A de classificação: "*probably carcinogenic to humans*" [48]. Ora, isto criou uma grande preocupação na sociedade que gerou controvérsia entre as autoridades reguladores, com a EFSA a discordar desta nova avaliação [49].

Quanto ao metabolito AMPA, ainda não foram realizados estudos suficientes sobre o seu efeito na saúde, porém alguns indicam que poderá ter efeitos genotóxicos nas células dos seres humanos e animais, como a criação de danos no ADN, aberrações cromossómicas, stress oxidativo, entre outros [49]. Estudos de toxicidade *in vitro* revelaram que o AMPA afeta os glóbulos vermelhos nos seres humanos [32]. No trabalho realizado por Roustan *et al*, concluem que o AMPA possui um maior efeito tóxico para as células (citotóxico) do que o glifosato [50].

Embora não haja provas concretas que sugiram efeitos nocivos do glufosinato nos seres humanos, alguns estudos confirmam que este pode ter efeitos nocivos em animais por intoxicação aguda e pode apresentar efeitos tóxicos no fígado e sistema reprodutor [11]. Os impactos da exposição dos seres humanos a estes resíduos, através da cadeia de alimentação, ainda são desconhecidos [11].

A aplicação de fitofarmacêuticos para proteção das culturas pode resultar na presença de resíduos nos produtos agrícolas. Esta concentração, quando existente deve ser aceitável e não deve ter impacto na saúde dos seres humanos [5]. A EFSA é a entidade responsável por avaliar este risco para os consumidores, estabelecendo assim os **limites máximos de resíduos** (LMR) [12, 51]. De forma a cumprir o valor que foi considerado aceitável, o agricultor deve

cumprir as doses de utilização, o número e o intervalo entre aplicações descritas no rótulo do fitofarmacêutico a aplicar [12].

Na Tabela 1.2 encontram-se os limites máximos de resíduos em frutos e legumes, com base nos regulamentos da Comissão Europeia 441/2012 e 845/2015 e no relatório da EFSA sobre os analitos em estudo [52–54].

O Regulamento de Execução 585/2020 da Comissão Europeia refere que: “Quando a definição dos resíduos de um pesticida incluir mais de um composto (substância ativa e/ou metabolito ou produtos de degradação ou de reação), os Estados-Membros devem apresentar os resultados das análises em conformidade com a definição completa dos resíduos. (...)” [55]. Ou seja, para este estudo deve-se ter em consideração que os LMR existentes na UE estabelecidos para o glufosinato englobam a soma do glufosinato e os seus sais, ácido 3-metilfosfínico-propiónico (MPP) e o ácido N-acetil glufosinato (NGA). O mesmo acontece para os LMR do glifosato, que estão estabelecidos para a soma do glifosato, AMPA e N-acetil glifosato em todos os produtos vegetais [44, 54].

Tabela 1.2 - Limites Máximos de Resíduos em produtos alimentares, nomeadamente Frutos e Legumes, de acordo com [52–54]

LMR (mg/kg)		AMPA	Glufosinato
Frutos	Mirtilo, Morango e Limão	0,1	0,5
	Laranja	0,5	0,1
Legumes	Pimento	0,1	0,1
	Batata	0,5	0,3
	Espinafres	0,1	0,5
	Espargos	0,1	0,4
	Milho doce	3	0,1
Outros		0,1	0,1

Para os produtos alimentares que não tenham sido fixados o teor máximo de resíduos de pesticidas, assume-se por defeito 0,01 mg/kg, conforme estipulado pelo regulamento da Comissão Europeia 815/2015 [52]. Com o aumento da utilização destes herbicidas, que com põem um risco para a saúde e o ambiente, surge a necessidade de desenvolver métodos viáveis para identificar estes resíduos e assegurar que os LMR's são cumpridos [5].

ESTADO DE ARTE

2.1 Método de Extração

A análise de resíduos de pesticidas através de métodos analíticos surge da necessidade de controlar a presença destes compostos em alimentos, águas superficiais e solos [56]. A monitorização de resíduos de pesticidas em alimentos é essencial para garantir o cumprimento dos LMR's, promovendo a segurança alimentar [1].

Nos últimos anos tem-se vindo a observar uma preocupação generalizada, nomeadamente pelas organizações responsáveis pela segurança alimentar como a EFSA, em diminuir os LMR para concentrações mínimas, atingindo o nível do ppb [56, 57]. Ora, isto representa um desafio para os laboratórios responsáveis pela deteção, quantificação e identificação de centenas de diferentes pesticidas em vários tipos de matrizes [57].

Atualmente, os resíduos polares encontram-se presentes numa variedade de matrizes e, por isso, vários autores tem vindo a desenvolver métodos capazes de determinar a presença destes resíduos polares em águas de superfície [58], no solo [49] e em alimentos [16, 59].

Como já foi referido no subcapítulo anterior, estes compostos apresentam diferentes propriedades, como alta polaridade e baixa volatilidade, e tem de ser determinados em matrizes com diferentes composições, que poderão interferir na análise [60]. Todas estas características, tanto dos analitos como das matrizes, aumentam a necessidade de desenvolver métodos de análise avançados e altamente seletivos [56].

Os métodos para análise de resíduos de pesticidas envolvem três etapas: extração do composto de interesse da matriz, determinação dos analitos (separação, deteção, identificação e quantificação) e, por fim, tratamento dos dados e comunicação dos resultados [57], como sugerido na Figura 2.1. A maioria dos métodos encontrados na literatura baseiam-se em

extrações genéricas seguidas de análise por cromatografia gasosa e/ou cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massa [61].

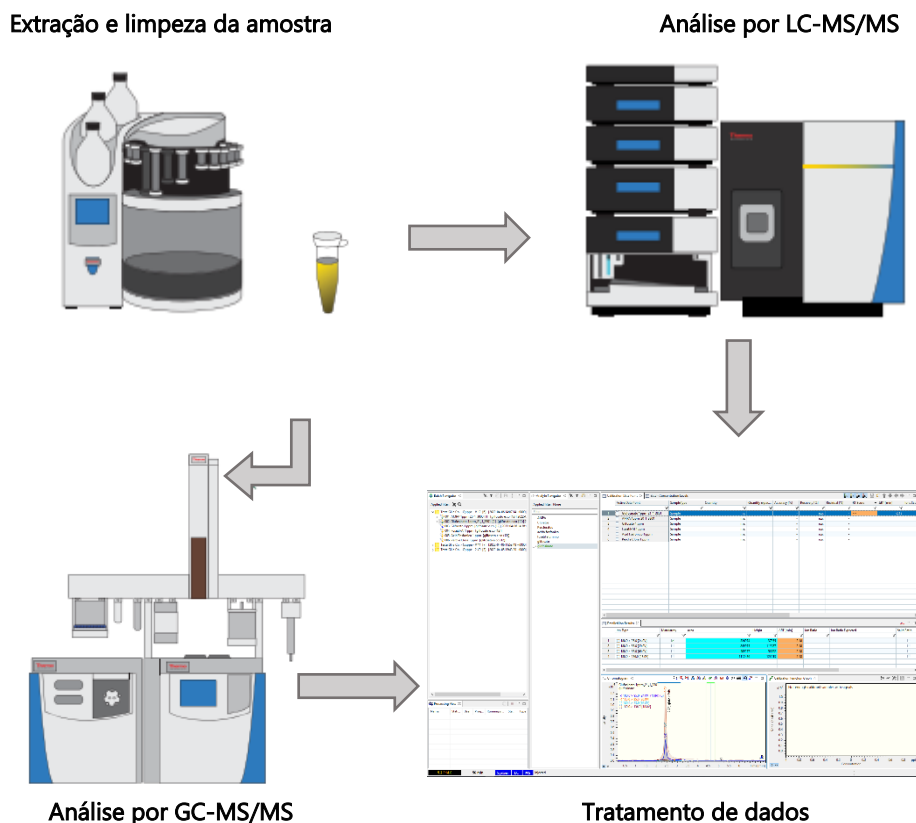


Figura 2.1 - Representação esquemática de um método analítico genérico. Adaptado de:[57]

A etapa inicial do processo de extração é a **preparação da amostra**. O regulamento nº752/2014 estabelece o procedimento de como são pesados e triturados os frutos e legumes para o teste dos pesticidas em métodos acreditados [62]. Ao diminuir o tamanho das partículas promove-se a homogeneidade da amostra e aumenta-se a acessibilidade ao resíduo de interesse, sendo que este apresenta um tamanho mínimo [63]. De seguida, as amostras alimentares devem ser armazenadas no frio de forma a atrasar a degradação dos analitos.

O principal objetivo da **etapa de extração** é isolar os compostos de interesse das suas matrizes complexas, utilizando um método de extração apropriado [63]. Os pesticidas presentes em amostras líquidas, são normalmente extraídos utilizando as técnicas de extração em fase sólida (SPE) ou microextração em fase sólida (SPME) [58].

Para matrizes sólidas, a técnica mais utilizada é a extração com um solvente, nomeadamente acetona, metanol, acetato de etilo ou acetonitrilo [56]. Após a adição do solvente, a mistura é sujeita a um processo, como agitação, de forma a induzir a migração dos analitos da

matriz para a solução extrativa [63]. Atualmente, já existem técnicas avançadas que promovem a eficiência da extração como extração acelerada por solvente (*accelerated solvent extraction*, ASE) ou extração com solvente assistida por microondas (*microwave assisted solvent extraction*, MASE), entre outras [56].

Não existe um método universal para determinar todos os herbicidas nas várias matrizes existentes. A abordagem que mais se assemelha a um método universal é a aplicação de métodos de multi-resíduos que chegam a incluir algumas centenas de compostos, como por exemplo o método QuEChERS [56, 64].

O método de multi-resíduos **QuEChERS** (*Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe*) surge em 2003 e define-se como um método simples, rápido e económico para a determinação de resíduos de pesticidas em frutas e vegetais [64]. O procedimento envolve uma extração líquido-líquido com acetonitrilo e, como etapa de limpeza, utiliza a técnica de extração em fase sólida dispersiva (d-SPE), com a utilização de sulfato de magnésio (MgSO₄) e de *primary secondary amine* (PSA) como absorventes. O d-SPE com PSA remove os componentes polares da matriz, como ácidos orgânicos, alguns pigmentos e açúcares. GC-MS/MS e LC-MS/MS são os equipamentos indicados pelo método para quantificação e identificação dos pesticidas [64]. Segundo os autores do método QuEChERS, através deste obtêm-se, em média, percentagens de recuperação superiores a 95% [64].

Através do método QuEChERS não é possível determinar a existência dos pesticidas polares, pois normalmente estes decompõem-se ou perdem-se durante a extração e apresentam uma retenção pouco eficaz nas colunas de HPLC em fase reversa devido às suas propriedades. Por isso, estes resíduos polares tem sido alvo de investigação por parte da comunidade científica, de forma a desenvolver um método que utiliza diferentes fases estacionárias para analisar compostos polares [65].

Surge assim o método **QuPpe** (*Quick Polar Pesticides Method*) que utiliza diferentes mecanismos de separação, de forma a determinar estes pesticidas em alimentos de origem vegetal [16]. Este método determina os resíduos polares AMPA e glufosinato numa vasta variedade de amostras de frutos e legumes, cereais, leguminosas secas, sementes oleaginosas, frutos secos e mel [16].

O método QuPpe (Figura 2.2) foi desenvolvido pelo Laboratório de Referência da União Europeia para a determinação de pesticidas que necessitam de um Método de Resíduo Único (EURL-SRM). Este define-se como um método rápido para a análise de pesticidas polares em alimentos de origem vegetal, envolvendo extração com metanol acidificado e medição em LC-

MS/MS, com o auxílio de uma coluna de carbono gráfico poroso, a Hypercarb desenvolvida pela empresa Thermo Scientific [16].

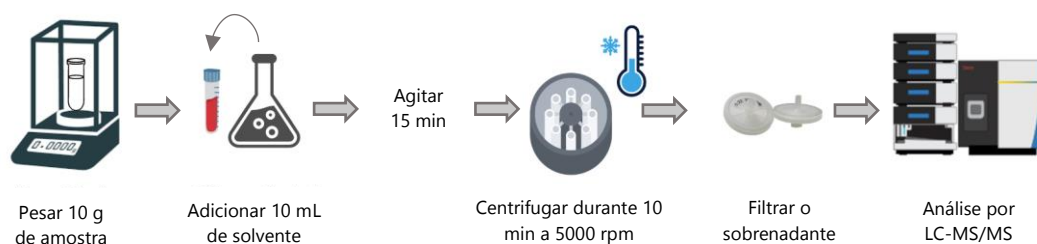


Figura 2.2 - Representação esquemática das etapas do método QuPPE original. Adaptado de: [16].

Devido à simplicidade do método pela falta de uma etapa de limpeza observam-se efeitos matriz significativos. [16]

Ao longo dos últimos anos, tem-se vindo a estudar alterações ao método QuPPE, de forma a torná-lo mais eficiente. Uma das alternativas apresentada no estudo de Chiarello *et al*, é a extração destes herbicidas polares com água acidificada em matrizes de óleos alimentares. Esta é uma opção mais sustentável por não necessitar de solventes orgânicos [60]. Esta adaptação do método foi validada para um LOQ de 0,005 mg/kg para o AMPA e 0,01 mg/kg para o glufosinato [60]. Segundo o artigo em questão, obtiveram-se taxas de recuperações entre 81,4% e 119,4% [60].

Outros trabalhos apresentam como alternativa para a determinação destes resíduos polares, a derivatização ou a cromatografia por permuta iónica [66, 67]. Ora, estas abordagens apresentam um problema de compatibilidade com a deteção por ESI-MS, devido à presença de sais e compostos não voláteis [68].

A reação de **derivatização** dos analitos de interesse é necessária em alguns casos, de forma a aumentar a deteção dos compostos, facilitando a sua determinação por cromatografia [15, 56]. A etapa de derivatização acresce duração e complexidade à análise, é limitada na aplicação nos métodos de multi-resíduos [68], diminui a reprodutibilidade [15] e poderá ser uma fonte de erros analíticos [56].

A grande parte dos procedimentos descritos na literatura científica para a determinação de AMPA e glufosinato por derivatização utilizam o FMOC-Cl (cloroformiato de 9-fluorenilmetila) como reagente de derivatização [15, 56].

Os trabalhos desenvolvidos por Han *et al* e Zhang *et al*, estudam a possibilidade de determinar a presença de glufosinato em matrizes alimentares, através da derivatização dos compostos com o reagente FMOC-Cl [11, 69]. Os estudos obtêm bons resultados na validação do método para a determinação do glufosinato, obtendo um LOQ entre 0,005 mg/kg e 0,01

mg/kg e recuperações entre 80% a 108% para o primeiro artigo, e recuperações entre 90,3% e 95,4% para o artigo de Zhang *et al* [11, 69]. Porém, ambos os autores referem, que para matrizes alimentares complexas, existe uma forte possibilidade de haver contaminação da coluna causada pelos subprodutos da derivatização e pelas interferências das matrizes [11, 69].

No estudo desenvolvido por Jasons *et al*, sugere-se a determinação destes analitos com um diferente reagente, cloreto de dansil (cloreto de 5-naftaleno-1-sulfonil) em matrizes de pepino e mel, de forma a tentar resolver os problemas observados na utilização do agente FMOC-Cl [68]. O artigo reporta um LOQ de 0,01 mg/kg para o AMPA e glufosinato nas matrizes estudadas, e conclui que os principais subprodutos da derivatização são eluídos na coluna antes dos analitos de interesse, pelo que não interferem com a análise no espectrómetro de massa [68].

Como referido anteriormente, a inexistência de uma etapa de limpeza no método analítico, apesar de diminuir o seu custo, promove o efeito matriz, onde os compostos presentes na matriz interferem na análise.

Posto isto, vários trabalhos têm vindo a estudar a hipótese de acrescentar uma etapa de limpeza ao método QuPPE, que não remova os seus analitos de interesse [21, 70]. Na Tabela 2.1 encontram-se resumidas algumas técnicas de limpeza, que vários autores mencionam na análise de resíduos do AMPA e glufosinato em matrizes alimentares. As técnicas que se destacam pela relação ótima entre facilidade de manuseamento e resultados são os MIPs, os cartuchos HLB e o d-SPE de quitosano.

Já existem estudos que utilizam os *Molecularly imprinted polymers* para determinação do glifosato e AMPA em águas naturais [71]. A aplicação dos MIPs na determinação dos resíduos de pesticidas representa um avanço tecnológico devido ao aumento da seletividade em relação a outros métodos [72]. Devido à elevada seletividade destes enchimentos, é possível atingir limites de deteção mais baixos, reduzindo também os efeitos matriz [73].

Os *Dispersive Solid phase extraction* (d-SPE) são uma alternativa relativamente aos cartuchos convencionais SPE. Os tipos de absorventes comumente utilizados na determinação de resíduos polares são: C18 (octadecil), GCB (*Graphitic carbon black*), Florisil, quitosano e grafeno [21]. A grande vantagem dos d-SPE é a versatilidade do método visto que é possível utilizar diferentes quantidades e/ou misturar vários absorventes. É uma técnica simples e eficiente que facilita a extração e contribui para a remoção de componentes da matriz que podem interferir com a análise [74, 75].

O autor Piotr Kaczynski desenvolveu um estudo pormenorizado onde compara a utilização de vários absorventes em matrizes de frutos e legumes, para a determinação de resíduos

de herbicidas polares [21]. O artigo em questão obtém uma taxa de recuperação entre 64 e 97%, com um CV inferior a 20% para todos os produtos estudados [21]. Observam-se ainda efeitos matriz desprezáveis quando se utiliza o quitosano para os extratos de trigo, batata e ervilhas, sendo os valores do efeito matriz registados de -15%, -6% e -4%, respetivamente [21].

Nos trabalhos de Arias *et al*/e Cabrera *et al*/foram estudados os efeitos de vários absorventes, que poderão incorporar a rotina de extração do QuEChERS [74, 75]. Ambos os artigos referem que o quitosano remove de forma eficiente os componentes da matriz que podem interferir com a ionização do analito na etapa da espetrometria de massa [74, 75].

No entanto, estas técnicas de limpeza aumentam o tempo e o custo da análise e podem introduzir erros associados à manipulação das amostras. Uma solução apontada pelos autores do método QuPPE para reduzir o efeito matriz é a diluição do extrato, 5 a 10 vezes antes da injeção no equipamento [16]. Esta tem sido uma abordagem que tem vindo a ser comumente utilizada na análise de resíduos de pesticidas em frutos e legumes [56].

Segundo o estudo realizado por Ferrer *et al*/, a diluição do extrato é um método fácil e eficiente para reduzir os componentes que interferem com a análise e assim minimizar os efeitos matriz [76]. De forma a confirmar se a diluição do extrato influencia a forma do pico cromatográfico, no trabalho elaborado por Adams *et al*/, compara-se o pico do glufosinato sem diluição com o obtido após uma diluição de 10 vezes em água. A última abordagem resultou numa forma de pico com menos distorção [77].

Em suma, com a abordagem de diluir o extrato antes da injeção, é possível reduzir os efeitos adversos na quantificação dos herbicidas polares, sendo esta uma forma simples e rápida de melhorar os resultados analíticos [57]. Ora, isto deve-se também ao avanço tecnológico dos instrumentos de deteção e quantificação, que ao serem mais sensíveis e seletivos, tornam possível a simplificação das etapas de extração [56].

2.2 LC-MS/MS

O aparecimento de novas substâncias ativas no mercado, o aumento da complexidade na definição de resíduos, incluindo os metabolitos e compostos com uma composição química semelhante aos pesticidas, e a consequente aplicação de regulamentação mais restritiva promove o desenvolvimento de métodos analíticos mais avançados [56].

Tabela 2.1 - Breve descrição sobre 4 técnicas de limpeza utilizadas na extração de AMPA e glufosinato, comparando os resultados obtidos.

Técnica	Breve descrição	Características de Utilização	Resultados
SPE- MIPS	Os <i>Molecularly imprinted polymers</i> (MIPs) consistem num polímero que apresenta uma seletividade pré-determinada para um único analito ou grupo de analitos relacionados estruturalmente, produzidos a partir da tecnologia de impressão molecular [72]. Estes polímeros são sintetizados com cavidades desenhadas especificamente para certas moléculas, visto que apenas retêm a molécula de interesse ou compostos com estrutura semelhante. Estas cavidades são formadas através da utilização de uma molécula modelo que garante a sua seletividade [73].	Na Affinisep existe um cartucho de SPE com MIPs específicos para o glifosato, AMPA e glufosinato para um volume de 3ml, 6 ml e 12 ml. Estes estão referenciados como: <i>AFFINIMIP® SPE Glyphosate cartridge</i> [78]. É necessário condicionar os cartuchos de acordo com o guia de utilização específico [78].	<u>Recuperações:</u> Maçã: 86%-96% Mel: 89%-104% Cereais: 93% - 101% Chá Preto: 81% -103% Canábis: 70% - 81% Referência: [78]
SPE –Oasis HLB	É um absorvente universal para compostos ácidos, neutros e básicos. O Oasis HLB é absorvente hidrofílico-lipofílico-balanceado, molhável pela água, de fase inversa. É feito a partir de dois monómeros, a N-vinilpirrolidona hidrofílica e o divinilbenzeno lipofílico [33]. Os cartuchos da Oasis HLB contém um polímero universal de fase reversa como absorvente, que foi desenvolvido para a extração de uma vasta gama de compostos ácidos, básicos e neutros de várias matrizes [70].	Estes cartuchos do tipo seringa foram desenhados para serem utilizados em coletores de vácuo e instrumentos SPE automatizados e pertencem à marca Oasis [33].	<u>Recuperações:</u> Milho: 20% - 98% Soja: 72% - 100% Cereais: 105% - 118% <u>Efeito Matriz:</u> Milho: -70% a -8% Soja: -83% a 26% Referência: [33, 70].
d-SPE - quitosano	O quitosano consiste num polímero hidrófilo e biodegradável, produzido através de fontes naturais renováveis, cujas propriedades têm sido alvo de estudo em aplicações industriais e tecnológicas desde há vários anos [21]. A adição do método de limpeza com o d-spe de quitosano provou ser uma boa opção pois para além de obter resultados satisfatórios, é mais barato do que outras opções [75].	Os d-SPE são uma alternativa relativamente aos cartuchos convencionais SPE. Na técnica de d-spe, o absorvente é despejado na amostra(dispersivo)[21]. A grande vantagem dos d-SPE é a versatilidade do método visto que é possível utilizar diferentes quantidades e/ou misturar vários absorventes [74, 75].	<u>Recuperação:</u> Cebola: 74% - 93% Batata: 80% - 81% Ervilha: 83% - 88% <u>Efeito Matriz:</u> Cebola: -22% a -12% Batata: -6% a 2% Ervilha: -6% a -4% Referência: [21]
d-SPE – MWCNT	Os <i>Multi walled carbon tubes</i> (MWCNT) consistem num nano material que tem sido utilizado durante as extrações de pesticidas presentes em matrizes complexas [11]. Recentemente, vários artigos apontam para a sua eficiência enquanto material com a função de absorver as substâncias que interferem nas análises de resíduos em matrizes de frutos e vegetais.	Os MWCNTs são utilizados como etapa de limpeza antes da derivatização dos analitos polares [11, 69].	<u>Recup:</u> 92% - 102% <u>Efeito Matriz:</u> 0 a 43% <u>LOQ:</u> 0,001 a 0,002 mg/kg Referência: [11, 69]

Cromatografia gasosa (GC), cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa (GC-MS), cromatografia líquida de elevada eficiência (HPLC) e cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massa (LC-MS) são as técnicas mais utilizadas nos métodos analíticos para a determinação e quantificação de pesticidas e resíduos em alimentos [1].

Como referido no subcapítulo 1.3, o AMPA e o glufosinato são herbicidas polares anfóteros, não voláteis com baixo peso molecular, solúveis em água e não possuem um grupo cromóforo, o que torna a deteção por UV ou fluorescência difícil [33, 34]. Apesar do GC-MS ser uma ferramenta analítica de elevada eficiência, esta é limitada apenas à análise de compostos voláteis e semivoláteis com baixa polaridade, logo não é a ferramenta indicada para a identificação dos herbicidas em estudo [79, 80].

O AMPA e o glufosinato são analitos polares facilmente ionizáveis, pelo que possuem as propriedades físico-químicas indicadas para a análise por espectrometria de massa em tandem com ionização por *electrospray* [34]. Vários trabalhos desenvolvidos por autores, como Piotr Kaczynski, Ozgur Golge e Víctor Cutillas, recomendam a utilização desta técnica associada à cromatografia líquida para determinação do AMPA e glufosinato em frutos e vegetais [14, 21, 65]. Esta é também recomendada pelo método QuPPE, como uma das ferramentas analíticas indicada para a identificação e quantificação de pesticidas polares [16].

O **sistema de cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massa em tandem** (LC-MS/MS) é uma ferramenta analítica ideal para o desenvolvimento de métodos em laboratório [81]. Este sistema é capaz de fragmentar o ião precursor, segmentando-o em iões mais pequenos para identificação e quantificação através do seu peso molecular. O fragmento é identificado por comparação com os padrões de fragmentação que se encontram nas bibliotecas dos laboratórios [81].

O LC-MS/MS caracteriza-se por uma elevada seletividade em comparação com a cromatografia "tradicional" ao determinar a razão massa/carga dos iões, sendo que os métodos analíticos que dependem desta ferramenta destacam-se pela sua complexidade [82]. Em várias análises, o composto de interesse faz parte de uma matriz complexa, onde o papel da cromatografia é separar os componentes da mistura, para permitir a identificação sem interferentes [83]. Os espectros de massa obtidos pelo MS são bastante específicos, o que permite a identificação do composto com um elevado grau de confiança [83].

A combinação entre a capacidade de separação da cromatografia, para facilitar a introdução de amostras mais "puras" no espectrómetro de massa, e a especificidade dos espectros de massa, permite a identificação dos compostos de interesse, mesmo quando aplicado a matrizes mais complexas [81]. Na Figura 2.3 encontra-se uma fotografia do equipamento LC-

MS/MS disponível no laboratório da SGS, onde é possível observar os vários constituintes do sistema.



Figura 2.3 - Equipamento LC-MS/MS disponível no laboratório da SGS Portugal

Em suma, o LC-MS/MS tornou-se numa ferramenta importante para a análise de resíduos de pesticidas numa variedade de matrizes complexas, devido à sua elevada sensibilidade e seletividade, à redução substancial das etapas de tratamento das amostras em comparação com outras metodologias, e pela sua quantificação e confirmação fiável mesmo para níveis de concentração baixas [80, 84].

2.2.1 Cromatografia Líquida

2.2.1.1 Princípios teóricos da cromatografia

A cromatografia é um método físico de separação, geralmente composto por duas fases: a **fase móvel** e a **fase estacionária** [85].

Em separações por cromatografia, a amostra encontra-se dissolvida na fase móvel, que poderá ser um gás, um líquido ou um fluido supercrítico [86]. A fase móvel é então forçada a atravessar a fase estacionária, que poderá estar numa superfície sólida ou numa coluna, como é o caso deste trabalho. Ambas as fases são escolhidas de forma que os compostos se distribuam entre as fases móvel e estacionária, de acordo com a sua afinidade [86]. Os dois compostos distribuem-se entre a fase móvel e a estacionária enquanto a fase móvel é continuamente adicionada, até que ambos os compostos sejam eluídos da coluna [86].

A separação ocorre porque os analitos criam diferentes interações com as fases [87]. Ou seja, os analitos que são fortemente retidos pela fase estacionária, movem-se lentamente ao longo da coluna. Em contraste, os analitos com menos ou nenhuma interação pela fase

estacionária, deslocam-se mais rapidamente pela coluna. Face a esta diferença de velocidades ao longo da coluna, os componentes separam-se e são eluídos em tempos diferentes [86, 88].

A Figura 2.4 demonstra como acontece a separação de uma mistura formada por dois componentes. No momento a), a amostra é introduzida no topo da coluna. Enquanto a fase móvel atravessa a coluna, a amostra começa a separar-se e forma duas bandas (b), c) e d)). Por fim, na etapa e) e f) recolhe-se cada soluto individualmente assim que vão sendo eluídos pela coluna [88].

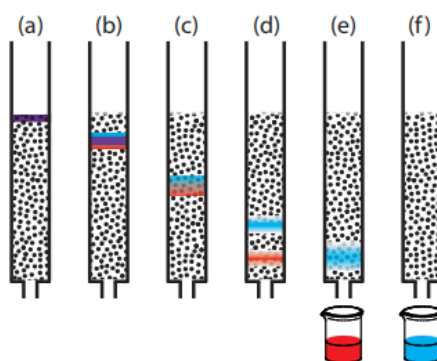


Figura 2.4 – Representação esquemática da separação de dois componentes numa mistura por cromatografia.

Adaptado de: [88].

É possível acompanhar o progresso da separação recolhendo amostras (que vão eluindo da coluna) ou colocando um detetor no final da coluna. Na Figura 2.5 observa-se a evolução dos picos, que deixam de estar sobrepostos, à medida que a amostra percorre a coluna (b) e c)). Se a afinidade dos analitos entre as fases for significativamente diferente, então é possível separar os solutos em bandas individuais (d)) [88].

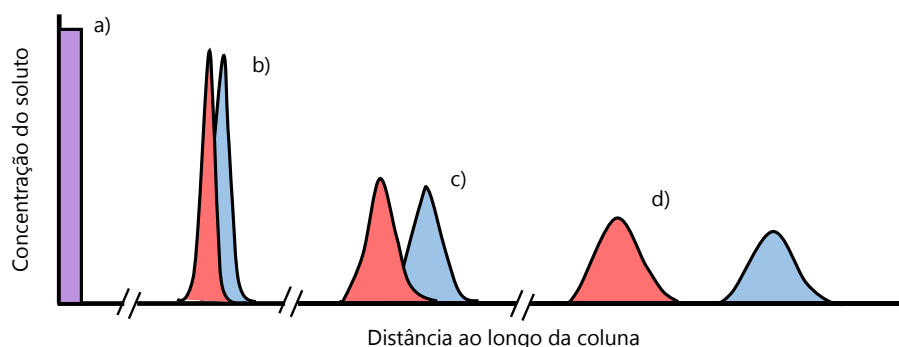


Figura 2.5 - Representação gráfica que exemplifica a concentração de cada analito à medida que vão atravessando a coluna. Adaptado de: [88]

O **cromatograma** relaciona a resposta do detetor com o tempo de eluição dos compostos [88]. Este é essencial tanto para a análise qualitativa como quantitativa, visto que a posição dos picos em relação ao eixo do tempo, pode identificar os componentes da amostra, e as áreas dos picos fornecem uma medida quantitativa para calcular a quantidade de cada analito [86].

A técnica da cromatografia funciona ao permitir que as moléculas presentes na mistura se distribuam entre uma fase estacionária e uma fase móvel [85]. A constante de equilíbrio, K_c , relaciona a distribuição da espécie entre as duas fases, pelo que se denomina de **constante de distribuição** [86]:

$$K_c = \frac{c_e}{c_m} \quad (2.1)$$

Onde, c_e é a concentração do analito na fase estacionária e c_m é a concentração do analito na fase móvel.

Apesar da constante de distribuição ser fundamental para as separações por cromatografia, não é um parâmetro facilmente medido. Por isso, pode-se utilizar como medida o tempo de retenção, que se relaciona com o K_c [88].

Existem vários parâmetros que caracterizam a performance cromatográfica, como: o tempo de retenção, o fator de retenção, o fator de seletividade e a resolução [86, 88].

O **tempo de retenção**, t_r , é o tempo entre a injeção da amostra e o aparecimento do pico do soluto no detetor, como se observa na Figura 2.6 [88]. Este expressa-se de acordo com a equação 2.2:

$$t_r = t_m + t_s \quad (2.2)$$

Onde, t_m corresponde ao tempo morto ou vazio e o t_s corresponde ao tempo que o analito passa pela fase estacionária.

Na Figura 2.6, o pico mais pequeno à esquerda é para as espécies não retidas pela coluna. Por vezes, a amostra ou a fase móvel contém analitos que não retêm, e estes movem-se pela coluna à mesma velocidade que a fase móvel. O tempo que demora a eluir os solutos não retidos denomina-se de **tempo morto** ou vazio, t_m [86]. A **largura da linha de base do pico cromatográfico**, w , determina-se através da extensão de linhas tangentes do ponto de inflexão a ambos os lados do pico na linha de base, como demonstrado na Figura 2.6 [86, 88].

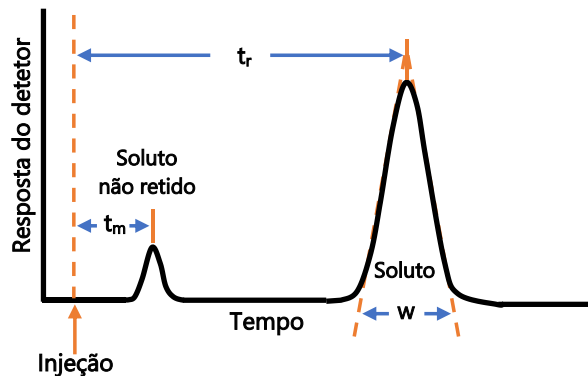


Figura 2.6 - Exemplo de um cromatograma onde se observa o tempo de retenção, a largura da linha de base e o tempo morto para solutos não retidos. Adaptado de: [88]

O **fator de retenção** relaciona o tempo despendido do soluto na fase estacionária em relação ao tempo na fase móvel. O **fator de seletividade** é uma medida relativa que avalia a capacidade dos sistemas em distinguirem dois analitos [86, 88].

A **resolução** entre dois picos cromatográficos, R_{AB} , é uma medida quantitativa para avaliar a separação, através da relação da distância entre os dois picos relativamente às suas larguras, como demonstrado pela equação 2.3 [88]:

$$R_{AB} = \frac{t_{r,B} - t_{r,A}}{0,5(w_B + w_A)} = \frac{2\Delta t_r}{w_B + w_A} \quad (2.3)$$

Onde, B é o soluto que elui mais tarde, w é a largura do pico e t_r é o tempo de retenção.

De forma a obter uma medida quantitativa para a **eficiência da coluna**, é necessário conhecer a altura do prato e o número de pratos teóricos. Estes termos relacionam-se através da equação 2.4 [86]:

$$N = \frac{L}{H} \quad (2.4)$$

Onde, N corresponde ao número de pratos teóricos, H corresponde à altura do prato e L ao comprimento da coluna.

Para qualquer coluna, a eficiência da coluna aumenta, e os picos cromatográficos tornam-se mais estreitos, quando o número de pratos teóricos aumenta e a altura do prato diminui [88].

Através da relação entre o desvio padrão associado ao perfil gaussiano e a largura da base do pico, ($w = 4\sigma$) é possível obter o número de pratos teóricos através da equação 2.5 [88].

$$N = 16 \left(\frac{t_r}{w} \right)^2 \quad (2.5)$$

2.2.1.2 Cromatografia Líquida

Uma das classificações para o tipo de cromatografia que se encontra na literatura baseia-se no tipo de fase móvel e estacionária, e no equilíbrio envolvido na transferência do soluto entre as fases. Existem então três categorias gerais: cromatografia gasosa, cromatografia líquida e cromatografia de fluido supercrítico [86].

A cromatografia líquida é uma técnica de separação em que os compostos a separar distribuem-se entre duas fases, uma fase é imóvel (fase estacionária), enquanto a outra é um líquido que se desloca numa direção definida (fase móvel) [87].

Os vários tipos de cromatografia líquida definidos na literatura são: a cromatografia de partição, cromatografia de adsorção, a cromatografia de permuta iônica, a cromatografia de exclusão molecular e a cromatografia de afinidade [86]. No presente trabalho destaca-se a cromatografia de partição, em que a fase estacionária é uma camada líquida fina que se forma num suporte sólido, imiscível com a fase móvel [86]. A separação ocorre devido à diferença de solubilidade entre a fase estacionária e a fase móvel [88].

Desde a descoberta da cromatografia líquida em 1950 até aos dias de hoje, tem vindo a ser desenvolvidas novas partículas para as fases estacionárias, de forma a obter colunas mais seletivas, eficientes e estáveis [89].

A **cromatografia líquida de elevada eficiência (HPLC)** é uma técnica importante na segregação de diferentes componentes de uma mistura, versátil e comumente utilizada para a identificação e quantificação de resíduos de pesticidas globalmente [80].

De forma a aumentar a resolução, velocidade e sensibilidade na análise por cromatografia líquida, têm sido feitos avanços significativos em instrumentação e na tecnologia da coluna, como no tamanho das partículas ou na dimensão da coluna [90]. Para além disso, a necessidade de obter resultados num curto espaço de tempo levou a que, em 2004, a empresa Waters lança-se um novo equipamento para uma performance mais avançada da cromatografia líquida: a **cromatografia líquida de ultra eficiência (UHPLC)**, que se baseia na utilização de colunas com partículas pequenas e porosas [84].

O UHPLC baseia-se nos mesmos princípios que o HPLC, porém a fase estacionária do UHPLC consiste em partículas menores do que 2 μm , enquanto as colunas para o HPLC possuem como enchimento partículas entre 3 e 5 μm [85]. Ora, isto implica que o UHPLC terá de operar a pressões mais altas do que a do HPLC, podendo atingir os 1000 bar [90]. Outra diferença é a utilização de colunas com um menor comprimento, que contribuem para a redução do tempo da corrida cromatográfica [90]. A utilização do UHPLC reduz o consumo de fase móvel em 80%, quando comparado com o HPLC, por tornar possível operar a fluxos mais baixos [90]. A injeção de volumes mais baixos de amostra é um requisito de forma a obter uma maior eficiência e um aumento na resolução [90].

O princípio subjacente à técnica de UHPLC baseia-se na equação de Van Deemter (equação 2.6), que estabelece uma correlação entre o caudal e a altura do prato, de forma a refletir sobre a eficiência. Ao diminuir a altura do prato, aumenta-se a eficiência da coluna [89].

$$H = A + \frac{B}{v} + Cv \quad (2.6)$$

Onde, H representa a altura do prato teórico, v representa a velocidade linear e A, B e C corresponde às constantes que têm em consideração a alteração do percurso, a difusão longitudinal e a transferência de massa.

Através das curvas de Van Deemter representadas na Figura 2.7, é possível confirmar que as partículas $\leq 2 \mu\text{m}$ podem ser utilizadas para as separações, visto que a eficiência se mantém com a utilização de colunas menos compridas e elevadas velocidades lineares [89]. A eficiência da separação é proporcional ao comprimento da coluna e inversamente proporcional à dimensão das partículas. Consequentemente, o comprimento da coluna pode ser reduzido pelo mesmo fator que o raio das partículas, sem afetar a resolução [90].

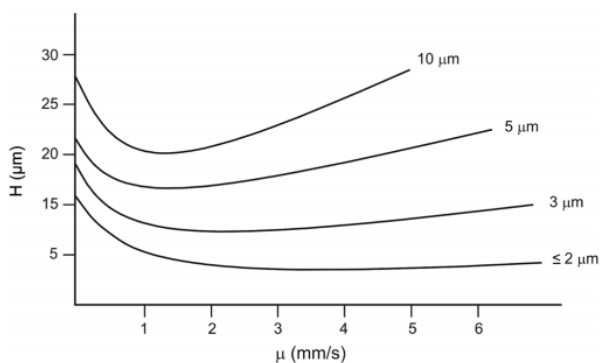


Figura 2.7 - Curva de Van Deemter para vários tamanhos de partículas, onde H corresponde à altura do prato e μ corresponde à velocidade linear da fase móvel. Retirado de: [89]

A maior desvantagem do sistema de UHPLC é a existência de maior contrapressão em comparação com o HPLC convencional, que contribui para a diminuição do tempo de vida útil das colunas. O aumento da temperatura da coluna poderá ajudar a reduzir a contrapressão no equipamento. Além disso, as partículas com tamanho inferior a 2 μm são difíceis de regenerar, o que leva a que tenham uma utilização mais restrita [89].

Ao longo dos últimos anos, o UHPLC tem se tornado um equipamento muito utilizado na análise de pesticidas em alimentos [84]. Contudo, a necessidade de otimizar o tempo de análise e a utilização de métodos de extração simples para a determinação de pesticidas em matrizes complexas, poderá criar novos desafios. Apesar de se atingir uma elevada resolução e separações eficientes através do UHPLC, poderá ocorrer efeito matriz [84].

2.2.1.3 Constituintes do sistema

O sistema de UHPLC é composto pelos componentes: a bomba, o injetor, a coluna cromatográfica, o detetor e o software para recolha de dados [81]. Este possui também um reservatório para as fases móveis.

O primeiro componente é o **sistema de bombeamento**. Este é responsável pela circulação do solvente desde o reservatório, passando pelo injetor até ao detetor, de forma assegurar a pressurização do solvente para que este circule pela coluna, sem interrupções e com o caudal desejado [81]. O sistema deve ser compatível com os solventes orgânicos mais comuns juntamente com os sais e aditivos [91]. Para o UHPLC, o fluxo típico de solvente é entre os 0,001 e 5 mL/min com uma pressão máxima entre 1000 e 1500 bar, sendo que para o HPLC o fluxo poderá ser superior, entre 0,01 e 10 mL/min, para uma pressão máxima de 500 bar [91].

O sistema de bombeamento mais utilizado é o mecanismo de *reciprocating pump*, que consistem numa pequena câmara preenchida por solvente, onde este é posteriormente bombeado pelo movimento do pistão [86].

Consequentemente, o sistema de distribuição de solvente pode operar utilizando dois modos diferentes de eluição: isocrático e gradiente de eluição [87]. No modo isocrático, a composição do solvente mantém-se constante durante toda a corrida cromatográfica [81]. A grande desvantagem deste método é que para uma mistura em que os compostos possuam uma polaridade semelhante com a fase móvel, não ocorre a separação entre os analitos. Este modo de eluição é também associado a tempos de corrida mais longos [87].

Por outro lado, no modo gradiente de eluição, a composição da fase móvel varia ao longo da corrida. A utilização deste mecanismo permite a separação de misturas complexas,

pois é possível aumentar a percentagem do solvente com maior poder de eluição [85], facilitando a eluição dos compostos no final [81].

A etapa da introdução da amostra no sistema é um fator determinante para se atingir a seletividade esperada. Atualmente, a grande parte dos equipamentos utilizam um **injetor automático** (*autosampler*), de forma a injetar uma quantidade precisa de volume da amostra [90]. O tipo de injetor mais utilizado atualmente é o sistema em loop (*integrated-loop*) [81]. Este é uma forma conveniente de introduzir uma amostra líquida num fluxo constante.

Na Figura 2.8 encontra-se uma representação esquemática de um injetor em loop, que apresenta duas posições: carga (a) e injeção (b). Na primeira posição, a amostra é injetada no loop através de uma seringa, ocupando 20% do seu volume [81]. Ao mesmo tempo, a fase móvel é bombeada ao fluxo desejado através da válvula até à coluna, de forma a mantê-la em equilíbrio [83]. De seguida, o injetor roda para a posição de injeção e a amostra é injetada no topo da coluna cromatográfica [83].

Para aumentar a sensibilidade do método e evitar o fenómeno de *carryover*, o volume de injeção deve ser reduzido, sendo que para sistemas de UHPLC recomenda-se a utilização de volumes de injeção entre 0,1 e 50 μL [86]. Por fim, os injetores automáticos estão programados para efetuar uma variedade de métodos de lavagem, de forma a prevenir a contaminação pelo transporte de amostras entre injeções [81].

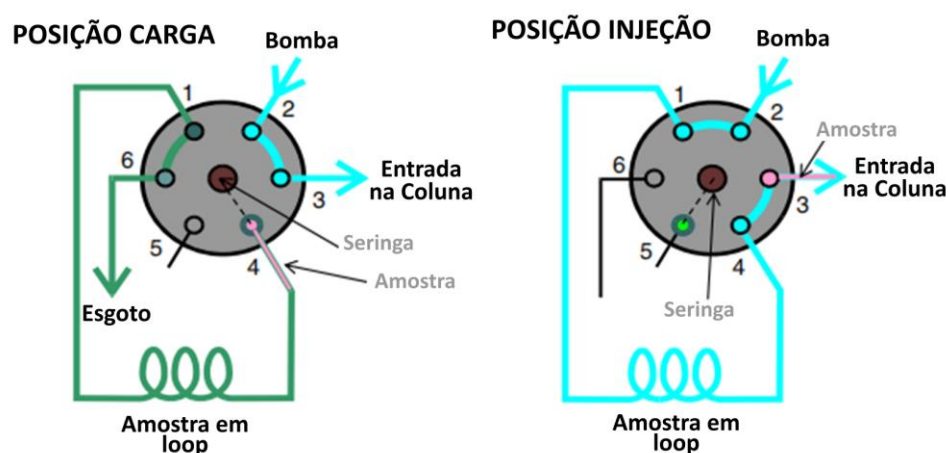


Figura 2.8 - Representação esquemática de um injetor automático. Adaptado de: [91].

A **coluna** é considerada, por vários autores como “o coração da cromatografia” [81], [85]. A fase estacionária da coluna separa os compostos de interesse através de várias características físico-químicas [85]. As colunas para HPLC são normalmente constituídas por tubos

de aço inoxidável [87]. De forma a melhorar a resolução dos picos e aumentar a sensibilidade, o diâmetro das colunas é entre 2 e 5 mm, com um comprimento entre 10 e 30 cm. Ao utilizar colunas de menores dimensões e com tamanhos de partículas reduzidos para o enchimento, a duração da corrida cromatográfica é menor e, conseqüentemente menores são os gastos com solventes [87]. Normalmente, é colocada uma pré-coluna antes da coluna analítica, de forma a proteger de possíveis contaminações e assim prolongar o tempo de vida útil da coluna [88].

O controlo da temperatura é assegurado pelo forno da coluna, que promove a estabilidade da coluna e garante a eficiência da separação [86]. Este controlo é bastante importante para os sistemas de UHPLC, pois ao operar a altas pressões pode-se criar um gradiente de temperatura na coluna que perturbar o seu equilíbrio. Temperaturas acima dos 100°C podem levar à degradação da coluna, por isso o intervalo de operação deve-se manter entre os 40 e 100°C, para o UHPLC [86].

O material do enchimento das colunas de HPLC pode ser agrupado conforme diferentes características: sólidos rígidos, géis suaves, forma esférica ou irregular, estrutura porosa no interior ou na superfície. As características do material para o enchimento variam dependendo do modo de operação [87].

Dois dos principais modos de operação distinguem-se através da polaridade da fase móvel e da fase estacionária, sendo estes: cromatografia em fase normal e cromatografia em fase reversa [86]. A **cromatografia em fase normal** é composta por uma fase estacionária polar e uma fase móvel apolar, o que permite eluir primeiro o composto menos polar, como demonstrado na Figura 2.9. Ao aumentar a polaridade da fase móvel, o tempo de eluição diminui [86].

Em oposição, a **cromatografia em fase reversa** é composta por uma fase estacionária apolar, normalmente um hidrocarboneto, e a fase móvel é um solvente bastante polar como a água, o metanol ou o acetonitrilo, entre outros [87]. Neste caso, o composto mais polar é o primeiro a eluir, como se observa na Figura 2.9 [86]. Conforme se aumenta a polaridade da fase móvel, verifica-se um aumento no tempo de eluição [86].

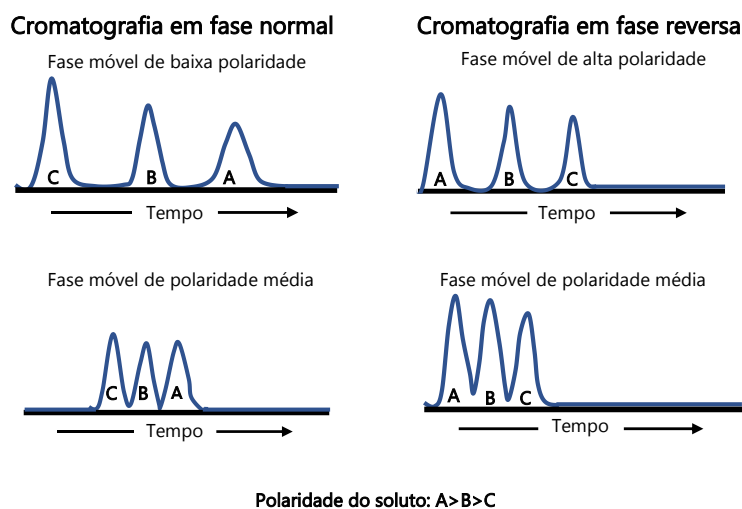


Figura 2.9 - Relação entre a polaridade da fase móvel e do soluto, e o tempo de retenção para cromatografia de fase normal e de fase reversa. Adaptado de: [86].

Estima-se que a maioria das análises em HPLC ocorrem em fase reversa [83]. Uma das grandes vantagens associadas à cromatografia em fase reversa é que se pode utilizar água como solvente para a fase móvel, sendo que esta uma alternativa mais sustentável e com um baixo custo associado quando comparada com os solventes orgânicos [86]. As colunas mais utilizadas contêm uma fase estacionária de sílica quimicamente modificada, sendo que esta modificação na extremidade determina a polaridade da coluna. Normalmente, o grupo R do siloxano é composto por uma cadeia de hidrocarbonetos C8 (n-octyl) ou C18 (n-octyldecyl) [83].

Os resíduos polares são compostos difíceis de reter nas colunas mais convencionais que operam em fase reversa, como a C18, devido ao seu comportamento *zwitterion* em soluções aquosas [33]. Surge assim a necessidade de encontrar novas fases estacionárias capazes de separar compostos com uma elevada polaridade.

A cromatografia iônica foi utilizada com sucesso em estudos para as matrizes alimentares de cereais, frutos e vegetais [92, 93]. Porém, a principal desvantagem desta abordagem é necessitar de instrumentação adicional no laboratório, para proteger o espectrômetro de massa dos sais [94]. Durante o estudo elaborado por Rajski *et al*, observaram-se diferenças significativas nos tempos de retenção entre matrizes, durante a determinação do AMPA, do glifosato e do glifosinato [92].

Para a determinação destes pesticidas polares, é apontada outra alternativa para a resolução dos problemas mencionados: a coluna Hypercarb da Thermo Scientific, em que a fase estacionária é constituída por carbono grafite poroso (PGC) [95]. O carbono grafite poroso

(PGC) é composto por partículas esféricas totalmente porosas, com uma superfície cristalina, sem a presença de microporos [96]. Este é um material cristalino condutor, composto por folhas planas de átomos de carbono dispostos hexagonalmente. Os átomos de carbono estão ligados através de ligações covalentes e as folhas mantêm-se juntas através de interações de Van der Waals [97].

Os compostos polares retêm através da interação com a superfície polarizável da grafite, que leva à indução de um dipolo, dependente da estrutura tridimensional da substância a analisar. Ainda não existe um consenso sobre o método de retenção por parte do PGC [97]. Os analitos polares apresentam uma alta afinidade com a superfície da grafite, o que permite obter uma boa retenção dos compostos polares, que não se verifica nas colunas tradicionais.

As principais vantagens da Hypercarb são: compatibilidade com a maioria dos sistemas de solvente, o que lhe permite separar vários analitos polares numa única corrida cromatográfica [98]; retém e separa compostos polares utilizando fases móveis que são compatíveis com o sistema de MS, como 0,1% ácido fórmico e baixas concentrações de soluções tampão [95]; os fluxos definidos são compatíveis com o MS e apresenta estabilidade para um pH de 0 a 14 [98]. Esta é uma das colunas recomendadas para a análise de resíduos polares pelo método QuPPE [16].

Porém vários estudos revelam alguns problemas de retenção com a coluna Hypercarb, pois nem sempre se consegue obter a separação completa dos analitos polares e, certas vezes, o tempo de retenção dos compostos é muito próximo do tempo morto [14, 99, 100]. Ora isto acresce a dificuldade da análise de resíduos polares por parte da Hypercarb.

No trabalho desenvolvido por Bapiro *et al*, afirmam que a perda de retenção na fase estacionária da Hypercarb tem como principal causa a alta suscetibilidade de contaminação da coluna, pelo que é aconselhável não passar à frente a etapa de lavagem e acondicionamento da coluna [100]. No artigo "*HPLC Determination of Glyphosate, Aminomethylphosphonic acid, and Glufosinate Using a Hypercarb Porous Graphite Adsorbent*" sugere-se a lavagem da coluna com água antes de se iniciar a análise, de forma a aumentar a retenção dos analitos polares à coluna [15].

Outros estudos sugerem que uma alternativa para a análise do AMPA e do glufosinato em matrizes alimentares seria através do método de **cromatografia líquida de interação hidrofílica** (HILIC), sendo que este também está incluído no método QuPPE [16, 94].

Nos últimos anos, a HILIC tornou-se uma solução importante para a análise de compostos que não obtém bons resultados através do modo da fase reversa [101, 102]. Este modo

de separação de HPLC caracteriza-se por utilizar uma fase estacionária normal (polar) e uma fase móvel reversa, composta por solventes orgânicos miscíveis com a água, geralmente o acetonitrilo, onde a percentagem do solvente orgânico em água é superior a 50% [101].

É uma variante da cromatografia em fase normal sem a desvantagem de utilizar solventes que não são miscíveis com a água. A técnica HILIC permite a separação das moléculas polares e apolares através da formação de uma camada rica em água na superfície da fase estacionária, que interage com os analitos polares [101]. Uma das vantagens da HILIC é que a utilização de fases móveis com um elevado teor orgânico contribuiu positivamente para a ionização no ESI no espectrómetro de massas, contribuindo para o aumento da sensibilidade do equipamento, em comparação com os outros modos de cromatografia [102, 103].

Segundo vários estudos realizados pelos autores Piotr Kaczynski, Dias *et al* e Anastasiades *et al*, o modo HILIC acoplado à espectrometria de massa em *tandem*, tornou-se numa ferramenta ideal na análise de herbicidas polares em frutos e vegetais, obtendo uma boa retenção na coluna, um pico cromatográfico sem interferências, com elevada sensibilidade e seletividade [16, 21, 101]. Durante o estudo realizado por Chen *et al*, para desenvolver um método analítico que determina a presença de glifosato e AMPA em matrizes alimentares, foram testadas várias colunas HILIC com fases estacionárias compostas por sílica pura ou sílica modificada com um grupo amina, amida, ou grupos funcionais *zwitterion* [67]. No estudo em questão optaram pela coluna com a fase estacionária composta por *polyamine-bonded polymer gel*, pois obteve uma resolução satisfatória [67].

De acordo com estudo desenvolvido por West *et. al*, ainda não existem estudos suficientes a comparar as duas fases estacionárias anteriormente referidas, pelo que ambas apresentam as suas vantagens e desvantagens [97]. Contando com o atual desenvolvimento de estudos sobre as fases estacionárias, vários autores estão expectantes para que apareçam mais comparações num futuro próximo [94, 101, 104].

Por fim, o **detetor** tem a função de identificar as moléculas individuais que são eluídas da coluna, sendo capaz de obter um resultado quantitativo, de forma a medir a quantidade de analito presente na amostra [85].

Atualmente, o sistema de HPLC é acoplado a diferentes sistemas de deteção como: espectroscopia ultravioleta-vísivel (UV-Vis), espectrometria de massa (MS), ressonância magnética nuclear (NMR) e espectroscopia com Raman (FTR), para analisar misturas complexas de compostos através da separação, identificação e quantificação [87].

Neste trabalho, o detetor utilizado é a espectrometria de massa, sendo este largamente utilizado na análise de controlo e qualidade dos alimentos [84].

2.2.2 Espectrometria de Massa em tandem (MS/MS)

A **espectrometria de massa (MS)** é uma técnica analítica comumente utilizada na detecção, identificação e quantificação das moléculas de interesse, através da ionização dos analitos e posterior separação, de acordo com a razão massa-carga (m/z) dos iões, provenientes da fonte de ionização [79]. O espectro de massa resultante é um gráfico da abundância relativa dos iões em função da m/z [85].

O equipamento de espectrometria de massa é composto por vários componentes que completam o processo de ionização, separação e detecção. Estes são: a fonte de ionização, onde os analitos são vaporizados e ionizados; o analisador de massas, que separa os iões de acordo com a sua m/z ; o detetor de iões, que deteta a intensidade dos iões previamente separados e determina a sua quantidade; o sistema de vácuo, para prevenir a perda de iões através das colisões com as paredes do analisador e por fim, o software que controla o equipamento e processa os dados obtidos [79, 81].

Por vezes, o tempo de retenção e o peso molecular obtido pelo espectrómetro de massa não são suficientes para identificar todas as moléculas presentes no efluente, que provém da cromatografia líquida. Algumas impurezas estão presentes em quantidades mínimas que criam a necessidade de utilizar equipamentos mais completos, como o sistema **de espectrometria de massa em *tandem* (MS/MS)** [81].

A espectrometria de massa em *tandem*, tal como o próprio nome indica, é composta por dois espectrómetros de massa. No primeiro, os componentes da amostra são separados de acordo com sua carga, e seguem para a câmara de colisão para serem fragmentados. De seguida, estes fragmentos deslocam-se até ao segundo espectrómetro, para serem analisados e identificados, de acordo com a razão massa/carga (m/z) [81].

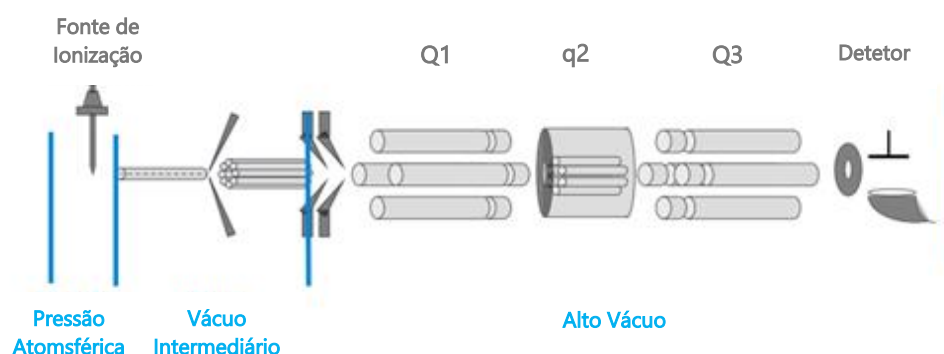


Figura 2.10 - Representação esquemática de um MS/MS com um analisador de massas triplo quadrupolo. Adaptado de: [91].

2.2.2.1 Método de ionização

A interface entre o espectrómetro de massa e o UHPLC deve ser capaz de remover o excesso de fase móvel sem remover o analito de interesse [83]. Além disso, é também responsável pela ionização dos analitos, visto que alguns dos compostos eluídos não tem carga [81].

O método de ionização mais referenciado na literatura para a análise de pesticidas e dos seus metabolitos é a **ionização por *electrospray*** (ESI) [105], sendo que é recomendada para compostos polares e facilmente ionizáveis, como é o caso do AMPA e do glufosinato [33].

A ionização por *electrospray* ocorre à pressão atmosférica, recebendo amostras em solução, o que permite o acoplamento com várias técnicas de separação e, caracteriza-se como uma técnica de ionização *soft*, por dar origem a poucos fragmentos [79, 81]. É considerada a técnica de ionização mais adequada para a análise de substâncias termolábeis e de peso molecular elevado [83].

A ionização por *electrospray* divide-se em duas etapas: a dispersão de gotas altamente carregadas e a evaporação do solvente. As gotículas formam-se através da passagem do eluente, no qual os analitos foram dissolvidos, por um capilar à pressão atmosférica, na presença de um campo elétrico altamente carregado, originando os iões que se encontram solvatados pelas moléculas de solvente [83]. O gás de dessolvatação, tipicamente azoto, provoca a evaporação do solvente, pelo que este processo reduz o tamanho das gotículas, aumentando a densidade da carga na superfície da gota. O campo elétrico formado entre o capilar e o eletrodo aumenta e, como consequência, provoca a deformação da gota, pelo que esta obtém a forma de um cone, denominado de cone de Taylor, como demonstrado na Figura 2.11 [106]. Quando a densidade da carga supera a tensão superficial, a gota solta-se do capilar e subdivide-se, ocorrendo o fenómeno da explosão de Coulomb [106].

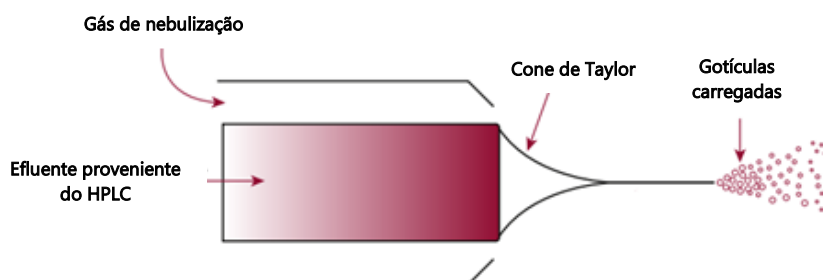


Figura 2.11 - Esquema simplificado da fonte de ionização por *electrospray* demonstrando o efeito do Cone de Taylor. Adaptado de: [107].

2.2.2.2 Analisador de massas

Atualmente encontra-se disponível uma grande variedade de **analisadores de massa** no mercado, pelo que cada um apresenta as suas vantagens e desvantagens. A resolução

define de forma analítica a capacidade do analisador de massas, sendo que os equipamentos com melhor resolução são os com maior custo associado [83].

Os analisadores de massa mais comuns são o quadrupolo (Q), o *ion-trap* (IT), o *time-of-flight* (TOF) e a combinação de triplo quadrupolo (QqQ) [105]. Estes são uma ferramenta importante da identificação, quantificação e confirmação dos pesticidas e dos seus resíduos [80].

O **quadrupolo** é o analisador de massa mais utilizado devido ao seu baixo custo, facilidade de manipulação e robustez [108]. Os analisadores do tipo quadrupolo são compostos por quatro barras metálicas que geram campos elétricos oscilantes [85]. As barras metálicas dispõem-se alternadamente pois dois polos são positivos e outros dois são negativos, como demonstrado na Figura 2.12.

O quadrupolo atua como um filtro, que diferencia os iões através dos valores de m/z antes de estes chegarem ao detetor. Este fenómeno deve-se aos potenciais de corrente aplicados que irão gerar um campo eletromagnético responsável por alterar a trajetória dos iões [81].

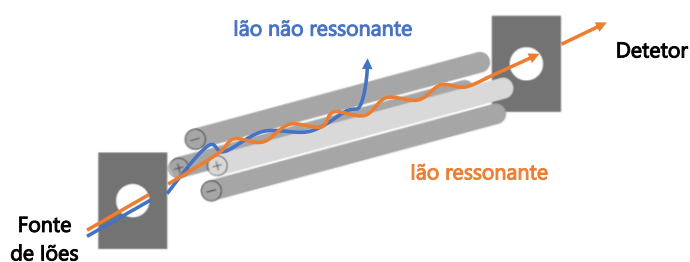


Figura 2.12 - Representação esquemática de um analisador quadrupolo. Adaptado de: [109]

O analisador **triplo quadrupolo** foi desenhado de forma a fragmentar o ião precursor formando o ião produto [81]. Este consiste em três quadrupolos em série, como demonstrado na Figura 2.10 que combinam uma corrente contínua com potenciais aplicados a uma dada frequência, selecionando assim os iões que seguem para a câmara de colisão. No primeiro quadrupolo seleciona-se o ião precursor, que será fragmentado na presença de um gás de colisão (azoto ou argón) no segundo quadrupolo, que funciona como uma câmara de colisão. O terceiro quadrupolo recebe os iões produto formados na câmara de colisão, e separa-os de acordo com a razão massa-carga [81].

A utilização de um analisador triplo quadrupolo combinada com a cromatografia líquida de ultra eficiência permite obter análises mais rápidas para um elevado número de pesticidas e dos seus resíduos, de forma a garantir a segurança alimentar [105].

2.2.3 Efeito Matriz

Vários estudos têm vindo a revelar que o efeito matriz é um dos principais inconvenientes na análise por LC-MS/MS [21, 59, 60]. Este é consequência da influência que os componentes co-extraídos da matriz têm na ionização dos analitos na interface por *electrospray* [56, 76]. No artigo elaborado por Ferrer *et al*, refere-se que este efeito não está apenas relacionado com a fonte de ionização, mas também com as condições do espectrómetro de massa [76]. De qualquer forma, esta é uma questão importante a ter em atenção durante a análise dos alimentos [76].

O efeito matriz resulta na perda de sensibilidade devido à supressão do sinal na ionização, que poderá alterar a quantificação dos analitos e afetar a reprodutibilidade do método [76]. Apesar de ser menos frequente, também poderá ocorrer enriquecimento iónico. Este efeito indesejável afeta a precisão, exatidão e sensibilidade do método analítico, que poderá resultar em dados incorretos e dificultar a identificação dos compostos [56].

Através da equação 2.7, é possível quantificar o efeito matriz, expresso como a percentagem de enriquecimento ou supressão iónica, através da comparação entre as áreas dos picos cromatográficos em solvente puro e em matriz [59].

$$EM(\%) = \left(\frac{m_{matriz}}{m_{solvente}} - 1 \right) \times 100 \quad (2.7)$$

Onde, m_{matriz} corresponde ao declive da reta de calibração em matriz e $m_{solvente}$ corresponde ao declive da reta de calibração em solvente

Caso o resultado da equação 2.7 seja negativo, conclui-se que há supressão do sinal. Se for positivo há um enriquecimento do sinal. Verificam-se fortes efeitos matriz quando $|EM| > 50\%$, e médios se os valores estiverem entre $20\% < |EM| \leq 50\%$. Se o valor do efeito matriz for inferior a 20%, consideram-se desprezáveis os efeitos matriz [59, 60].

Quando não é possível utilizar uma das estratégias de limpeza para minimizar o efeito matriz referidas no capítulo anterior, existem outras alternativas de forma a compensar estes efeitos como o **método de adição de padrão** ou os **padrões internos (IL-IS)**, sendo estes recomendados pelo Guia SANTE/11312/2021 [110].

Normalmente, a utilização de padrão interno é a alternativa preferencial para resolver o efeito matriz, porém é limitada devido à disponibilidade dos padrões de referência e ao seu elevado custo [56].

Em análises de multi-resíduos em matrizes de frutas e vegetais, a utilização de **reta de calibração em matriz** tem vindo a tornar-se uma opção viável, sendo que já existem vários estudos a adotarem esta estratégia como o de Piotr Kaczynski, Han et al e Chiarello et al [21, 60, 69], entre outros. É um método também recomendado pelo Guia SANTE/11312/2021 [110].

Amostras sem a presença do analito, previamente analisadas ou amostras provenientes de agricultura biológica podem ser utilizadas para a preparação dos padrões da matriz. Pode-se utilizar apenas uma matriz como representante de um grupo alimentar, na preparação da reta de calibração em matriz, caso se trate de uma grande variedade de amostras [56].

De acordo com o método QuPPE, na ausência de padrões internos, a compensação dos efeitos matriz tanto a reta de calibração em matriz como a adição de padrão são recomendadas [16]. O gráfico de calibração poderá ser descrito segundo a equação 2.8 [16].

$$A_{pico} = m \times c_{analito} + b \quad (2.8)$$

Onde, A_{pico} corresponde à área do pico do pesticida, m corresponde ao declive da reta de calibração, $c_{analito}$ corresponde à concentração do resíduo e b corresponde à ordenada na origem da reta de calibração.

Segundo o estudo desenvolvido por Anastassiades *et al*, a constante b na reta de calibração indica a massa de pesticida presente na alíquota não fortificada do extrato da amostra [16].

2.3 Validação do método Analítico

A validação é um procedimento que tem o objetivo de verificar se um método de ensaios analíticos é adequado ao seu propósito, e se tem a capacidade de fornecer resultados legítimos com a qualidade exigida [111].

Segundo a norma ISO/IEC 17025, o conceito de validação é definido como a confirmação de que está assegurado o cumprimento dos requisitos mínimos para a utilização específica do método, a partir da obtenção e avaliação de provas objetivas [112].

O procedimento técnico estabelecido para a realização do ensaio envolve operações suscetíveis à acumulação de erros que, em algumas situações podem alterar de forma significativa o resultado. É imperativo definir critérios objetivos, para que os Laboratórios possam demonstrar que com os métodos internos de ensaio aplicados obtêm resultados válidos e credíveis [113].

Em suma, a validação do método analítico é uma etapa importante tanto no desenvolvimento e estabelecimento de métodos de referência, como no âmbito da avaliação da competência de um laboratório em obter análises fiáveis [111].

Para a implementação e validação do método analítico em questão, teve-se em consideração os critérios de aceitação do Guia SANTE/11312/2021 [110]. Este documento tem como propósito assegurar o controlo de qualidade dos métodos analíticos para a quantificação de resíduos de pesticidas em alimentos. Serve também como apoio ao cumprimento e implementação da norma ISO/IEC 17025, responsável pela descrição dos requisitos gerais para obtenção de resultados de confiança e qualidade, promovendo a confiança nos métodos de ensaio implementados [110].

Na Figura 2.13, é possível observar o plano inicial de validação sugerido pelo Guia SANTE, dividido pelas várias etapas de ação.

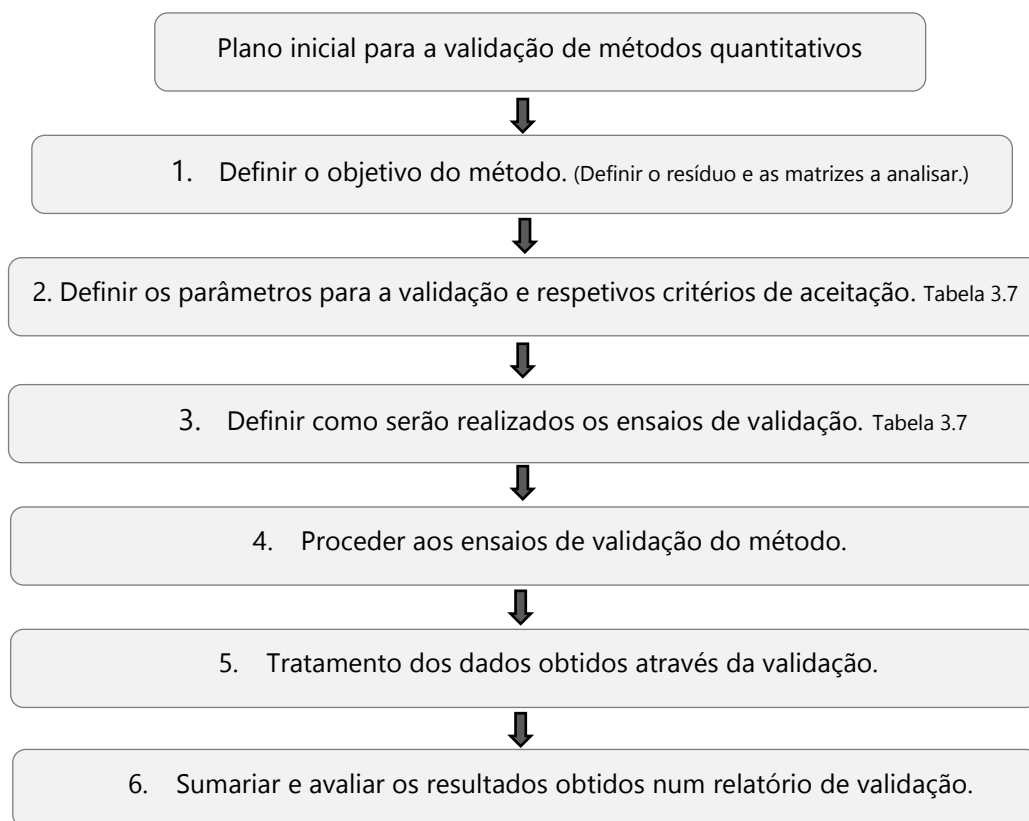


Figura 2.13 - Representação Esquemática das etapas para a validação do método analítico. Adaptado de: [110].

Através destes guias e regulamentos, é possível estabelecer critérios e procedimentos para a validação de métodos analíticos, de forma a garantir a qualidade e comparabilidade dos resultados analíticos obtidos por laboratórios de controlo oficiais, e ainda assegurar o cumprimento dos LMR's [82, 110].

De acordo com o Guia Relacre 13, o procedimento da validação do método analítico implica o estudo dos parâmetros por avaliação direta e indireta. A avaliação indireta envolve a análise da especificidade/seletividade, da quantificação e da precisão do método. A avaliação direta engloba a análise da exatidão do método, que para o estudo em questão foi efetuado através dos ensaios de recuperação [113].

2.3.1 Especificidade e Seletividade

A seletividade de um método analítico avalia a capacidade que o método possui para determinar o analito de interesse, sem interferências de outros componentes de comportamento semelhante que estejam presentes na matriz a analisar, como impurezas ou produtos de degradação [111, 112].

A especificidade do método permite garantir que a resposta analisada advém apenas do analito de interesse, sendo o método capaz de diferenciar este de outros compostos presentes na amostra [113]. Este parâmetro é bastante relevante visto que as matrizes a analisar na presente dissertação são matrizes complexas, contando com a presença de vários interferentes para a análise [110].

O método é considerado seletivo se for possível verificar uma elevada resolução do pico cromatográfico. Isto é, se não houver sobreposição entre o pico cromatográfico da interferência e o analito de interesse ou, então se na amostra do branco não se verificar a presença de picos cromatográficos nem distorções na linha de base perto do tempo de retenção do analito [114].

Estes parâmetros devem ser avaliados através da comparação entre o tempo de retenção (t_R) e razão iônica (RI) do pico cromatográfico da amostra e o dos padrões de calibração, sendo que estes não devem variar de forma significativa [110]. É importante referir que a RI calcula-se através do quociente entre a área do pico correspondente ao ião qualificador e a área do pico correspondente ao ião quantificador [114].

A realização de ensaios de recuperação em diferentes amostras da mesma matriz é também um critério para avaliar a especificidade e seletividade do método analítico [115]. Caso se verifique que taxas de recuperação se enquadram nos critérios de aceitação estipulados pelo Guia SANTE/11312/2021 [110], preferencialmente entre 70 e 120%, admite-se que o método analítico é específico e seletivo. O resultado ótimo seria obter taxas de recuperação próximas de 100% [110].

2.3.2 Quantificação

De forma a interpretar os resultados obtidos durante os ensaios, é necessário proceder ao estudo de parâmetros como curvas de calibração, limiares analíticos e sensibilidade.

2.3.2.1 Curvas de Calibração

Em análises quantitativas, as curvas de calibração relacionam a resposta de um sistema de medida com uma concentração ou quantidade de substância conhecida [113].

Para calibração analítica do equipamento preparam-se as soluções padrão, com uma concentração conhecida. De seguida, estas são analisadas no equipamento analítico, nas mesmas condições das amostras de interesse. Por fim, constrói-se um gráfico de calibração que estabelece uma relação entre a concentração (eixo x) e o sinal do equipamento (eixo y). A concentração do analito em questão na amostra determina-se então por interpolação [110].

A calibração deve ser efetuada aquando da realização da análise, devendo existir critérios internos para aceitação das curvas de calibração relativamente à linearidade e estabilidade dos pontos [113]. Para as curvas de calibração recomenda-se a análise da norma ISO 8466-1 como referência, para efetuar regressões lineares pelo método dos mínimos quadrados [113].

De acordo com o Guia Relacre 13, quando a curva de calibração corresponde a uma função polinomial de primeiro grau, e caso se utilize o método dos mínimos quadrados para as regressões lineares, pressupõe-se que os erros têm uma distribuição normal e que existe homoscedasticidade ao longo da reta.

Segundo o regulamento Guia SANTE/11312/2021, a curva de calibração deverá ser composta por, pelo menos 5 pontos, distribuídos homogeneamente ao longo da curva de calibração, sendo que a diferença entre dois pontos consecutivos não deverá ser superior a um fator de 10 [110].

Linearidade

A linearidade de um método analítico é a sua capacidade para obter proporcionalidade direta entre os sinais analíticos do equipamento e a concentração da substância a analisar na amostra, dentro da gama de trabalho definida [111].

No contexto da análise por LC-MS/MS, para o termo linearidade do sinal encontram-se dois significados estreitamente ligados: (1) relação linear entre o sinal do equipamento e a concentração dos analitos em soluções calibração em solvente e (2) relação linear entre o sinal

do equipamento e a concentração da substância de interesse em soluções de calibração em matriz [115].

Este último está a tornar-se cada vez mais utilizado, de forma a mitigar os efeitos matriz. Se o sinal do analito nas soluções de calibração em matriz for linear, então quase de certeza que é também é linear nas soluções de calibração em solvente, enquanto o oposto não é necessariamente verdade [115].

De acordo com o Guia Relacre e o Guia SANTE/11312/2021, encontram-se disponíveis vários testes estatísticos que permitem avaliar a linearidade da curva de calibração, como fator de correlação, análise de resíduos, Teste de Mandel e Teste de RIKILT [110, 113].

Gama de Trabalho

A gama de trabalho define-se como o intervalo entre a concentração mínima e máxima da substância em estudo, onde por aplicação de testes viáveis seja possível provar que o método analítico tem precisão, exatidão e linearidade adequados [111].

A gama de concentrações das curvas de calibração deve ter em consideração os LMR's do contaminante em estudo nas amostras, a capacidade de deteção do equipamento a utilizar e deve abranger toda a gama de trabalho da rotina diária do laboratório [112].

De acordo com a norma ISO 8466-2, o teste da homogeneidade de variâncias permite avaliar o ajuste da gama de trabalho para um método analítico que envolva a representação gráfica de uma curva de calibração [113].

2.3.2.2 Limiares Analíticos

Limite de Deteção

O limite de deteção (LOD) corresponde à concentração mínima a partir da qual é possível detetar a presença do analito de interesse, com um nível de significância de 95% [113]. Este limiar analítico corresponde ao teor mínimo medido, que é possível identificar o analito de interesse, diferenciando-se do ruído de fundo da análise [114].

Ao nível do limite de deteção deteta-se a presença do analito, no entanto, não é possível quantificar com precisão e rigor, sendo que este encontra-se abaixo da gama de trabalho [114]. Caso se obtenha uma leitura inferior ao LOD, não implica necessariamente que o analito não esteja presente na amostra, apenas será possível afirmar que a concentração do analito é inferior a um certo valor [3].

Em termos quantitativos, para métodos que envolvam a utilização de uma calibração linear, o LOD calcula-se através da equação 2.9 [3].

$$LOD = \frac{3,3 \times S_{y/x}}{b} \quad (2.9)$$

Em que, $S_{y/x}$ corresponde ao desvio padrão residual da curva de calibração e b ao declive da curva de calibração associada.

O limite de deteção pode também ser calculado através da equação 2.10, que advém da análise de várias leituras de amostras fortificadas com a concentração mais baixa da gama de trabalho [112].

$$LOD = 3 \times S_{x0} \quad (2.10)$$

Onde S_{x0} , corresponde o desvio padrão associado a várias leituras de padrão com a concentração mais baixa da gama de trabalho, normalmente com uma concentração vestigial

Limite de Quantificação

O limite de quantificação (LOQ) corresponde à menor concentração de analito, presente numa amostra, que pode ser determinado quantitativamente com precisão e exatidão [111]. Este valor é normalmente superior ou equivalente ao padrão de calibração de menor concentração [113].

Para os métodos que utilizem a reta de calibração para a quantificação, o limite de quantificação pode ser determinado através da equação 2.11 [113].

$$LOQ = \frac{10 \times S_{y/x}}{b} \quad (2.11)$$

Onde, $S_{y/x}$ corresponde ao desvio padrão residual da curva de calibração e b ao declive da curva de calibração associada.

Tal como para o limite de deteção, e segundo as recomendações da IUPAC, o LOQ pode ser determinado pela análise de amostras com concentrações conhecidas do analito, em condições de precisão intermédia. O coeficiente de Variação (CV%) para estes padrões não deve exceder os 10% [113].

$$LOQ = 10 \times S_{x0} \quad (2.12)$$

Onde S_{x0} , corresponde o desvio padrão associado a várias leituras de padrão com a concentração mais baixa da gama de trabalho, normalmente com uma concentração vestigial.

2.3.2.3 Sensibilidade

A sensibilidade avalia a aptidão do equipamento para distinguir pequenas diferenças de concentração de um analito, definindo-se como o quociente entre o acréscimo do sinal devolvido e a variação da concentração correspondente ao acréscimo, como se observa na equação 2.13 [113].

$$S = \frac{\Delta L}{\Delta C} \quad (2.13)$$

Onde ΔL corresponde ao acréscimo do valor lido e ΔC corresponde à variação da concentração correspondente ao acréscimo.

De acordo com o Guia Relacre 13, se o método for definido por um modelo linear, então a sensibilidade é constante ao longo de toda a gama de trabalho e é igual ao declive da reta de calibração [113].

O parâmetro da sensibilidade relaciona-se com o LOD e o LOQ através da relação sinal/ruído, pois quanto maior a sensibilidade, menores podem ser os valores do LOD e LOQ do método [115]. A sensibilidade está diretamente relacionada com a supressão da ionização da substância de interesse, devido à co-eluição de outros compostos, que diminuem a sensibilidade do método [115].

2.3.3 Precisão

A precisão de um método avalia o grau de proximidade dos valores obtidos pelo método analítico entre ensaios independentes, repetidos sobre uma mesma amostra, amostras semelhantes com a mesma matriz ou padrões, em condições estipuladas [113].

Em cromatografia, avalia-se a concordância entre os valores das áreas dos picos cromatográficos obtidos a partir de análises independentes sobre as mesmas condições [114]. A precisão é interpretada como a dispersão ou variabilidade do método e pode ser expressa de forma quantitativa pelo desvio padrão ou pelo coeficiente de variação.

O desvio padrão calcula-se através da expressão:

$$s = \sqrt{\frac{\sum(x_i - \bar{x})^2}{n - 1}} \quad (2.14)$$

Onde x_i é o valor individual de uma medição, \bar{x} é a média aritmética e n é o número total de medições.

E o coeficiente de variação é dado por:

$$CV(\%) = \frac{S}{\bar{x}} \times 100 \quad (2.15)$$

De acordo com as orientações do guia SANTE, o coeficiente de variação deve ser inferior a 20%, para que se possa afirmar que há precisão entre os resultados obtidos [110].

Para avaliar a precisão do método existem duas medidas extremas, a repetibilidade e reprodutibilidade, e uma situação intermédia entre ambas designada de precisão intermédia ou variabilidade intralaboratorial [113]. O estudo da reprodutibilidade não é relevante para a validação do método de quantificação dos herbicidas em questão, uma vez que a intenção é implementar o método apenas no laboratório em estudo [115].

2.3.3.1 Repetibilidade

A repetibilidade avalia a dispersão de um método de ensaio elaborado em condições semelhantes, ou seja, no mesmo Laboratório, pelo mesmo analista, no mesmo equipamento e em curtos intervalos de tempo [113]. Nos ensaios de repetibilidade, espera-se uma maior precisão entre os resultados obtidos em comparação com os ensaios de reprodutibilidade, onde as condições do método não são idênticas [112].

De acordo com o guia SANTE, devem ser efetuadas no mínimo cinco medições sobre a mesma amostra em pelo menos dois níveis de concentração, sendo estes ao nível do LOQ e a um nível duas ou dez vezes superior ao LOQ [110]. Sendo assim, avalia-se a repetibilidade através do estudo do desvio padrão de repetibilidade, do limite de repetibilidade e do coeficiente de variação de repetibilidade [110].

O limite de repetibilidade corresponde ao valor máximo admissível para a diferença absoluta entre dois resultados obtidos em condições de repetibilidade, através da equação 2.16 [113]

$$r = t_{0,05(n-1)} \times \sqrt{2} \times S_r \quad (2.16)$$

Em que, t é o valor da distribuição de *t-student* para um nível de confiança de 95% e $n-1$ graus de liberdade e S_r corresponde ao desvio padrão de repetibilidade.

2.3.3.2 Precisão Intermédia

A precisão intermédia avalia a capacidade do método em fornecer os mesmos resultados quando as análises são realizadas sobre a mesma amostra ou amostras idênticas, no mesmo laboratório, mas definindo condições específicas a variar, como: diferentes analistas, diferentes dias ou diferentes equipamentos [113].

Por retratar uma situação intermédia, a precisão intermédia é reconhecida como a mais representativa da dispersão dos resultados num laboratório, sendo esta medida de precisão a mais aconselhável de se usar [113].

A precisão intermédia pode ser determinada quantitativamente através do cálculo do desvio padrão associado à precisão intermédia, obtido através da equação 2.17 [113].

$$S_{PI} = \sqrt{\frac{1}{t(n-1)} \sum_{j=1}^t \sum_{k=1}^n (y_{jk} - \bar{y}_j)^2} \quad (2.17)$$

Onde, t é o número de amostras ensaiadas; n é o número de ensaios efetuados por amostra; j é o número da amostra, que vai de 1 a t amostras; k é número do resultado obtido para a amostra j , que vai de 1 a n ; y_{jk} é o resultado individual (k) para a amostra j de 1 a t ; e \bar{y}_j representa a média aritmética dos resultados da amostra j , que vai de 1 a t .

2.3.4 Exatidão

A exatidão de um método de ensaio refere-se à capacidade do método em fornecer resultados concordantes com o valor de referência aceite como verdadeiro [113]. O termo exatidão avalia a proximidade entre o resultado de um ensaio e o valor verdadeiro, sendo assim possível refletir sobre a influência de erros sistemáticos nos resultados [114].

De forma a avaliar a exatidão de uma metodologia, recorre-se normalmente à utilização de materiais de referência certificados (MRC), participação em ensaios interlaboratoriais ou através de testes comparativos [113]. Caso não seja possível a utilização das alternativas apresentadas anteriormente, aceita-se a avaliação da exatidão de um método de ensaio através dos ensaios de recuperação.

Os ensaios de recuperação consistem na adição de uma quantidade conhecida do analito em estudo numa amostra, de forma a verificar posteriormente a capacidade do método em recuperar essa quantidade [110]. Têm também como objetivo, verificar se existem efeitos sistemáticos introduzidos por causas desconhecidas, como o efeito da matriz.

De acordo com os critérios de aceitação do guia SANTE/11312/2021, para contaminantes e pesticidas, a percentagem de recuperação deve situar-se entre 70 e 120% [110]. A percentagem de recuperação, associada ao valor de exatidão do método, é calculada a partir da equação 2.18.

$$\text{Recuperação (\%)} = \frac{C_F - C_A}{C_P} \times 100 \quad (2.18)$$

Sendo que C_F corresponde à concentração da amostra fortificada; C_A corresponde à concentração da amostra sem fortificação e C_P corresponde à concentração teórica de padrão.

2.3.5 Estimativa de incertezas

A análise de replicados da mesma amostra, no próprio laboratório ou no contexto interlaboratorial, poderá gerar resultados diferentes. Surge assim a necessidade de conhecer a incerteza associada a qualquer resultado de um método analítico, de forma a poder atuar sobre os fatores que influenciam a análise e minimizá-los [116].

Apesar da análise de resíduos de pesticidas ser influenciada pelas incertezas da instrumentação, existem um número elevado de outros fatores que apresentam um maior impacto na análise [116]. Alguns destes fatores que influenciam a análise de resíduos de pesticidas são: a estabilidade do analito durante a preparação da amostra e extração; a utilização de solventes ineficientes; baixa recuperação em etapas de limpeza; perda de compostos polares através da adsorção a superfícies de vidro; supressão do sinal devido à presença de efeitos matriz, entre outros [116].

Para o cálculo das incertezas no presente relatório, optou-se pela abordagem baseada em dados de validação de métodos analíticos, de acordo com o guia Relacre 31 e o guia para a quantificação de incerteza em ensaios químicos da IPAC [117, 118].

A equação 2.19 é a expressão utilizada para o cálculo da **incerteza de precisão**, recorrendo à análise de amostras estáveis, através da associação com o desvio-padrão da precisão intermédia, $s_{\text{precisão}}$ [118]. Esta deve ser avaliada em condições de precisão intermédia, para que a incerteza associada à precisão seja representação da variabilidade dos resultados [117, 118].

$$u_{\text{precisão}} = s_{\text{precisão}} = \sqrt{\frac{\sum_{k=1}^n (y_k - \bar{y})^2}{n - 1}} \quad (2.19)$$

Onde, n corresponde ao número de replicados, y_k corresponde ao resultado do replicado de índice k , que varia de 1 a n , e \bar{y} corresponde à média aritmética dos resultados [118].

Como já foi referido, não foi possível utilizar os MRC para quantificar a exatidão do método, de modo que, optou-se por recorrer à análise de amostras fortificadas sem o analito nativo para o cálculo da **incerteza de exatidão**, através da equação 2.20 [117].

$$u_{\text{exatidão}} = \bar{R}_m \times \sqrt{\left(\frac{s_{\text{obs}}^2}{n \times \bar{c}_{\text{obs}}^2}\right) + \left(\frac{u(c_{\text{fortificada}})}{c_{\text{fortificada}}}\right)^2} = \bar{R}_m \times \sqrt{\frac{s_{\text{obs}}^2}{n}} \quad (2.20)$$

Onde, \bar{R}_m corresponde à recuperação média ($\bar{R}_m = \bar{c}_{\text{obs}}/c_{\text{fortificada}}$), \bar{c}_{obs} corresponde à concentração média das análises de amostras fortificadas, $c_{\text{fortificada}}$ corresponde à concentração da amostra fortificada, s_{obs} corresponde ao desvio-padrão e n ao número de amostras fortificadas [117].

Segundo o Guia Relacre 31, o cálculo da **incerteza combinada** baseia-se na Lei da Propagação das incertezas [118]. Visto que para este trabalho, o método é aplicável numa gama estreita de concentrações, as parcelas de incertezas para o cálculo da incerteza combinada são contabilizadas como incertezas absolutas, como demonstrado na equação 2.21 [118].

$$u_{\text{combinada}} = \sqrt{u_{(\text{precisão})}^2 + u_{(\text{exatidão})}^2} \quad (2.21)$$

Por fim, obtém-se a **incerteza expandida** através da equação 2.22, onde k , corresponde ao fator de expansão. Caso as incertezas associadas à precisão e à exatidão sejam calculadas através de um número significativo de resultados experimentais, assume-se um fator de expansão igual a 2, e assim se obtém a incerteza expandida para um nível de confiança de 95% [117, 118].

$$u_{\text{expandida}} = u_{\text{combinada}} \times k \quad (2.22)$$

De acordo com o guia SANTE, nestas condições, a incerteza expandida não pode ser superior a 50% [110].

2.4 Comparação de resultados na literatura

Na literatura existem estudos sobre várias metodologias que podem ser adotadas para a quantificação destes analitos polares, desde diferentes métodos de extração a diferentes técnicas de identificação, como referido nos capítulos anteriores.

Durante a pesquisa sobre as várias opções de método analítico para determinar estes resíduos polares, deu-se prioridade aos artigos com o mesmo tipo de matriz a ser analisada e que utilizam materiais e equipamentos disponíveis no laboratório da SGS.

Apesar disso, em alguns dos artigos consultados, o equipamento utilizado para a identificação destes analitos apresentava uma maior sensibilidade em comparação com o triplo-quadrupolo [15, 21]. A maioria dos artigos mencionam a identificação de mais resíduos polares sem ser apenas o AMPA e glufosinato, incluindo também o glifosato, fosetil-alumínio, ácido fosfónico, etefon, a hidrazida maleica e os cloratos e percloratos na sua análise [14, 59, 119].

Na Tabela 2.2 encontram-se os artigos considerados relevantes durante a pesquisa bibliográfica, pelo que a sua análise incidiu sobre o método de extração, o tipo de coluna e os principais resultados obtidos como o LOQ do método, as percentagens de recuperação, o coeficiente de variação e o efeito matriz.

Através de uma breve análise à Tabela 2.2, entende-se que a grande parte dos artigos segue a metodologia QuPPE e quando não o segue, optam por extrações simples com solventes comuns [21]. A maioria dos estudos não utiliza a derivatização por ser uma técnica dispendiosa que envolve várias etapas e aumenta a complexidade da extração [15].

Em relação à etapa de limpeza, a diluição dos extratos antes da injeção é uma abordagem utilizada em vários trabalhos. Outros optam por não acrescentar uma etapa de limpeza, como é o caso do artigo elaborado por Cutillas *et al*, que resultou no aumento do LOQ para 0,05 mg/kg em algumas matrizes [65].

No que diz respeito às fases estacionárias utilizadas, existem as mais variadas opções. A Hypercarb é uma das colunas mais referida na literatura para métodos que determinem os compostos em estudo. Alguns artigos reportam um LOQ mais baixo e uma gama de trabalho com o primeiro ponto mais baixo do que este trabalho pois utilizam sistemas mais avançados como Orbitrap [59] ou o QTRAP [94]. Por fim, os trabalhos que estudaram o efeito matriz do seu método reportam também valores significativos à exceção dos artigos com a extração em água acidificada e volume de injeção de 5 μ L [60], com a coluna Zorbax HILIC Plus [120] e com a utilização de cloreto de dansil como agente de derivatização [68].

Tabela 2.2 - Métodos analíticos dos artigos científicos estudados para a determinação de AMPA e glufosinato em matrizes alimentares por LC-MS/MS.

Ref	Matriz	Extração	Limpeza	Derivatização	Coluna	LOQ	Gama de Trabalho	% Recup	Resultados
[21]	Cebola, trigo, batata e ervilha	Solvente: 0,5% de ácido fórmico em metanol/água (1:1 v/v)	C18, Florisil, quitosano e grafeno	Não	Obelisc N column HILIC	0,01 mg/kg	-	70% a 97%	CV < 15%
[59]	Frutos e vegetais processados	QuPPE modificado - Não há etapa do frio	Diluição 1:2	Não	Hypercarb	AMPA: 0,003 mg/kg;	0,002 a 0,2 mg/kg	94% a 114%	R ² >0,995; CV<20%
[69]	Frutos, vegetais, chá verde e soja	QuPPE modificado -solvente metanol	MWCNT's e r-DSPE	Sim com FMOC-Cl	UltiMate XB-C18 column	0,001 mg/kg	0,002 a 2 mg/kg	80% a 108%	R ² ≥0,9991 CV<10%;
[119]	Mel	Método QuPPE	Não	Não	Hypercarb	AMPA: 0,01 mg/kg Gluf: 0,005 mg/kg	0,005 a 0,5 mg/kg	-	CV < 20%
[60]	Óleo alimentar	Extração com água acidificada (1% ácido fórmico)	Volume de injeção de 5µL	Não	Hypercarb	AMPA: 0,005 mg/kg; Gluf: 0,01 mg/kg	0,01 a 0,5 mg/kg	81,4% a 119,4%	R ² > 0,996; CV _R e CV _{PI} < 19%; EM(%) entre -13,5 e 5.
[14]	Cereja	Diluição com solução metanol: água (1:1 v/v) acidificada	Diluição 1:5	Não	Hypercarb	AMPA: 0,012 mg/kg Gluf: 0,004 mg/kg	0,01 a 0,2 mg/kg	70,2% a 105,1%	R ² > 0,99; Resíduos < 20%; CV < 20% e u _{expandida} < 50%
[121]	Maçã	Método QuPPE	Não	Não	Hypercarb	-	0,005 a 0,2 mg/kg	-	R ² =0,9993
[77]	Uvas	Método QuPPE	Diluição 1:10	Não	Thermo scientific Dionex IonPac	0,005 mg/kg	0,005 a 0,2 mg/kg	90% a 121%	AMPA CV < 22%; Gluf CV < 16%
[94]	Uva, laranja, alface	Pesar apenas 5g e adicionar água	Diluição 1:12,5	Não	Obelisc N column HILIC	0,005 mg/kg	0,01 a 5 mg/kg	94% a 114%	R ² ≥0,995; CV<20%; EM entre -76% e 82%
[67]	aipo, pepino, espinafre, tomate, batata, feijão, pera, laranja e maçã	Extração com água, AOAC Official Method 2000.05	Oasis MAX e MCX	Não	Asahipak NH2P-50 4E	AMPA: 0,050 mg/kg	0,005 a 1 mg/L	AMPA: 76,1% a 108%	AMPA: R ² ≥0,997; CV<12% EM entre -7,54% e 57,6%

Tabela 2.2 - Métodos analíticos dos artigos científicos estudados para a determinação de AMPA e glufosinato em matrizes alimentares por LC-MS/MS. (continuação)

Ref	Matriz	Extração	Limpeza	Derivatização	Coluna	LOQ	Gama de Trabalho	% Recup	Resultados
[65]	Tomate, laranja, cebola e marmelo	QuPPE modificado- solvente metanol e sem a etapa de frio.	Não	Não	Raptor Polar Column modo: HILIC	Entre 0,01 e 0,05 mg/kg*	0,01 a 0,5 mg/kg	-	CV<20%; EM entre -80% e -15%
[120]	Tomate, laranja, beringela e uva	Método QuPPE	Não	Não	Zorbax HILIC Plus	0,025 mg/kg	0,025 a 0,1 mg/kg*	70% a 110%	R ² = 0,999; CV<20% EM entre -20% e 20%
[101]	Farinha sementes de girassol, ervilhas e farelo de soja.	Método QuPPE	Diluição 1:20	Não	Waters Anionic Polar Pesticide	Entre 0,02 e 0,5 mg/kg*	0,02 a 0,5 mg/kg	70% a 120%	CV < 20% EM entre -90% e -35%
[122]	Espinafres	Método QuPPE	Não	Não	Torus DEA HILIC	0,01 mg/kg	-	102% a 115%	CV<10%; Resíduos < 15%;
[123]	Aveia	Extração com 10 mL de água/ACN (2:1 v/v) e utilização do ultra-som	Não	Não	Shodex NH2P-50 2D column	0,05 mg/kg	0,05 a 5 mg/kg	85% a 130%	R ² > 0,997; CV<13%; EM entre 87% e 108%
[111]	Milho	Extração com 10 mL de água e etapa de limpeza	MWCNT's	Sim, com FMOC-Cl	ACQUITY UPLC HSS T3 RP	0,005 mg/kg	0,010 a 0,5 µg/mL	90,3% a 95,4%	CV < 10%
[68]	Mel e pepino	Extração com água e EDTA	Não	Sim, com cloreto de dansil	Luna C18 column	0,01 mg/kg	0,01 a 0,25 mg/kg	99% a 106%	U _{expandida} entre 6% e 25%; EM entre -20% e 0%
[124]	Malte e milho	Extração com 10 mL água e etapa de limpeza	Cartuchos InertSep SAX e Oasis MCX	Não	DIONEX IonPac AS12A column	0,01 mg/kg	0,005 a 0,5 mg/kg	72,2% a 101,3%	R ² > 0,998; CV< 14,5%.
[125]	Morango, milho, pimentão e soja	Método QuPPE	Não	Não	HILICpak VT-50 2D	0,02 mg/kg	0,001 a 0,25 mg/kg	-	R ² > 0,975
[33]	Soja e milho	Extração com solução aquosa com ácido acético e Na ₂ EDTA	Oasis HLB	Não	Acclaim Trinity Q1 (WCX, WAX, RP)	Entre 0,042 e 0,075 mg/kg*	0,05 a 2,5 mg/kg *	75% a 113%	R ² > 0,995; CV < 12%; EM entre -10% e 83%.

- não disponível * varia consoante a matriz

MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Equipamento e material

Os equipamentos e materiais utilizados durante o desenvolvimento do presente trabalho foram os seguintes:

Equipamento:

- Cromatografia Líquida: Elute UHPLC, equipado com uma bomba HPG 1300, Elute *autosampler* e *software* Compass EDM 6.1, da Bruker;
- Espetrómetro de massa: EVOQ LC-TQ Elite, com ionização em *eletrospraye* analisador de massas do tipo triplo quadrupolo, da Bruker;
- Moinhos trituradores modelos GM 200 e GM 300 da Retsch;
- Balança analítica da Mettler toledo, com uma precisão de 0,1 mg;
- Agitador mecânico (*multi-reax*) da Heidolph;
- Centrífuga de mesa modelo Rotina 380 R da Hettich;
- Sistema de purificação para obter água Milli-Q, da marca Millipore.

Material:

- Coluna cromatográfica Hypercarb (100 x 2,1 mm; tamanho da partícula: 5 μm), da marca Thermo Fisher Scientific;
- Coluna cromatográfica: Ascentis Express 90 Å HILIC com a tecnologia *Fused-Core particle* (10 cm x 2,1 mm; tamanho da partícula: 2,7 μm), da marca Supelco;
- Tubos de *falcon* de 50ml;
- Seringas descartáveis de 5 ml da marca Henke Sass Wolf;
- *Vials* de vidro com volume de 1,5ml, com tampa azul da marca VWR;

- Filtros para seringas com poros de dimensão 0,45 µm, da marca VWR;
- Material de uso recorrente no laboratório, como micropipetas, pipetas volumétricas, balões volumétricos, funis, de marcas como VWR e Eppendorf.

3.2 Reagentes

- Ácido fórmico (CH₂O₂), grau *Analysis*, pureza 96% da marca Carlo Erba Reagents;
- Ácido fórmico (CH₂O₂), grau LC-MS, pureza 99%, da marca Carlo Erba Reagents;
- Água Milli-Q;
- Água ultrapura para HPLC da VWR Chemicals;
- Metanol (CH₃OH), grau HPLC PLUS Gradient, pureza 99,9%, da marca Carlo Erba Reagents;
- Padrão ácido aminometilfosfónico (AMPA) (CH₆NO₃P), pureza 91,1%, Dr. Ehrenstorfer;
- Padrão glufosinato-amónio (C₅H₁₅N₂O₄P) pureza 99,2%, Dr. Ehrenstorfer.

3.3 Preparação de soluções

Preparação das Soluções Stock de AMPA e glufosinato

A partir dos padrões comerciais de AMPA e glufosinato preparou-se as soluções stock de cada analito, com uma concentração de 1000 µg/ml. Estas foram preparadas em água pois, tanto o AMPA como o glufosinato são altamente solúveis em água.

Atendendo ao grau de pureza dos padrões, pesou-se na balança analítica a quantidade descrita na Tabela 3.1. O padrão foi, posteriormente, dissolvido em água Milli-Q, com auxílio do banho de ultrassons. Por fim, adicionou-se novamente água Milli-Q, até perfazer o balão volumétrico de 5 mL. As soluções stock possuem validade de 6 meses, pelo que devem ser conservadas num frigorífico a 6°C.

Tabela 3.1 - Concentração das soluções stock de AMPA e glufosinato para análise por LC-MS/MS

Analito	Pureza do padrão, %	Volume final, ml	Massa teórica, g	Massa de padrão pesada, g	Concentração da solução stock, µg/ml
AMPA	91,1%	5	0,005	0,0055	1000
Glufosinato	99,2%	5	0,005	0,0050	1000

Preparação das Soluções de Trabalho

Para a preparação das soluções de trabalho, procedeu-se a diluições sucessivas entre as soluções, tendo como ponto de partida a solução stock. Estas soluções apresentam uma maior instabilidade por serem menos concentradas, pelo que têm uma menor validade em comparação com a solução stock. Devem ser armazenadas no frigorífico, no mínimo a 6°C. Preparou-se então as três soluções de trabalho para cada analito.

A Solução de Trabalho 1 (ST1), com uma concentração de 100 ppm, preparou-se através da diluição de 500 µL da solução stock de 1000 µg/ml para um balão volumétrico de 5 mL, perfazendo-se o volume com água.

A Solução de Trabalho 2 (ST2) apresenta uma concentração de 10 ppm e resulta da diluição de 500 µL da solução de trabalho 1 de 100 µg/ml para um balão volumétrico de 5 mL, perfazendo-se o volume com água.

Por fim, a Solução de Trabalho 3 (ST3), com uma concentração de 1 ppm, preparou-se através da diluição de 500 µL da solução de trabalho 2 de 10 µg/ml para um balão volumétrico de 5 mL, perfazendo-se o volume com água.

Preparação da Solução de extração de Metanol com ácido fórmico a 1% (v/v)

Num balão volumétrico de 200 ml adicionou-se 2 mL de ácido fórmico com grau Analysis e metanol até perfazer o balão. O procedimento foi executado na hotte.

Preparação das Fases móveis A e B

Para a preparação da fase móvel A, água com 0,1% de ácido fórmico, dilui-se 1ml de ácido fórmico com o grau LC-MS em água ultrapura para análise em HPLC, num balão volumétrico de 1000 mL. Para a preparação da fase móvel B, metanol com 0,1% de ácido fórmico, adicionou-se 1 mL de ácido fórmico com o grau LC-MS para um balão volumétrico de 1000 mL, perfazendo-se o volume com metanol.

3.4 Amostras

O presente método analítico foi implementado e validado para matrizes de frutos e vegetais. De forma a selecionar-se corretamente as matrizes, teve-se como base o guia SANTE/11312/2021 [110], que refere que os métodos analíticos devem ser validados, no mínimo, para um produto de cada grupo alimentar. Para além disso, teve-se também em

consideração as amostras disponíveis no laboratório da SGS Portugal para a análise destes resíduos polares.

Posto isto, em representação do grupo dos frutos utilizou-se o mirtilo, que representa uma matriz mais ácida com elevado teor de pigmentos. E para o grupo dos vegetais, considerou-se o pimento vermelho por ser um alimento com elevado teor de água.

3.5 Procedimento experimental

3.5.1 Extração das amostras

O processo de extração do presente trabalho baseou-se no método QuPPE desenvolvido pelo EURL e no método de extração interno da SGS para a determinação do glifosato em frutos e vegetais. Na Figura 3.1 encontra-se uma representação esquemática simplificada do procedimento de extração.

Os Frutos e vegetais foram inicialmente triturados conforme o regulamento nº 752/2014 [62] e, posteriormente, armazenados em frascos coletores no frio até ao início da extração. Para frutos e vegetais pesou-se $10\text{g} \pm 0,1\text{g}$ de amostra para um tubo falcon de 50 mL. De seguida, adicionou-se 10 mL da solução de metanol acidificado (MeOH com 1% ácido fórmico), previamente preparada como descrito no capítulo 3.3. Após a adição do solvente de extração, os tubos foram agitados durante 15 minutos no agitador mecânico. Posteriormente, os tubos falcon foram colocados no congelador a -20°C durante 30 minutos. As amostras congeladas foram imediatamente centrifugadas durante 10 min a 5000 rpm.

De seguida, procedeu-se à etapa de filtração. Remove-se 1 mL do sobrenadante para uma seringa equipada com um filtro com poros de dimensão $0,45\ \mu\text{m}$. Para reduzir o efeito matriz, diluiu-se a amostra em água Milli-Q, com uma diluição de 1:10. Os extratos diluídos foram transferidos para os vials para serem analisados no UHPLC-MS/MS.

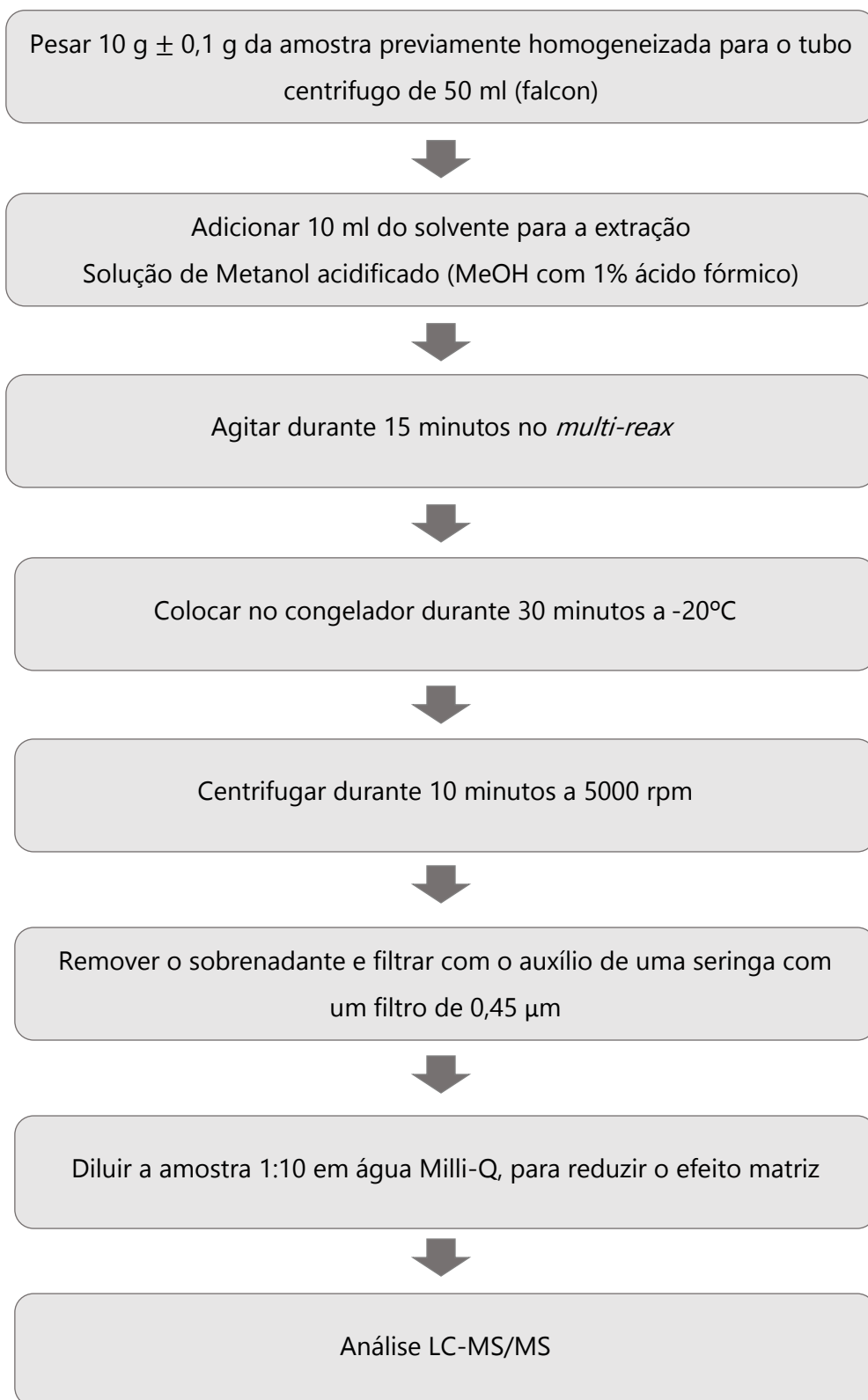


Figura 3.1 - Representação esquemática do método de extração QuPPE adaptado.

3.5.2 Ensaio de recuperação

Para os ensaios de recuperação, pesou-se $10g \pm 0,1g$ de amostra previamente homogeneizada para um tubo de falcon de 50 ml e adicionou-se o volume da solução de trabalho indicado na Tabela 3.2, para cada analito. As amostras foram fortificadas com os analitos em dois níveis, sendo o primeiro equivalente à gama de concentração mais baixa, 0,01 mg/kg que corresponde ao LOQ do método, e o segundo nível corresponde a um ponto intermédio da gama de trabalho, 0,05 mg/kg.

Tabela 3.2 - Volume a adicionar da Solução de Trabalho para os ensaios de fortificação da amostra

Matriz	Nível de fortificação	Volume a adicionar da Solução de Trabalho 2, μL	Concentração fortificada após diluição, $\mu\text{g/ml}$	Concentração fortificada após diluição, mg/kg
Frutos e Vegetais	1	100	0,005	0,01
	2	500	0,025	0,05

No fim agitou-se durante 1 min no agitador *multireax* e prosseguiu-se com o procedimento mencionado anteriormente.

Nos ensaios de fortificação utilizou-se a solução de trabalho 2, com uma concentração de 10 $\mu\text{g/ml}$, pois antes da injeção no equipamento LC-MS/MS, as amostras serão submetidas a uma diluição de 1:10, como mencionado anteriormente.

Para o cliente, os resultados expressam-se em mg/kg, pelo que para converter as unidades de $\mu\text{g/ml}$ para mg/kg utiliza-se o fator do método. Este calcula-se através da razão entre o volume total do extrato na amostra (20 ml) e a massa da amostra pesada inicialmente.

3.5.3 Reta de Calibração em Matriz

Para quantificar a concentração dos analitos na amostra elaborou-se uma reta de calibração em matriz, a partir da solução de trabalho 3 com uma concentração de 1 $\mu\text{g/ml}$. O objetivo deste método analítico é a determinação simultânea dos compostos em estudo. De forma a construir uma única reta de calibração em matriz que envolva ambos os analitos, consideraram-se os volumes descritos na Tabela 3.3, pois optou-se por fazer soluções de trabalho individuais.

Para a elaboração da reta de calibração em matriz, antes de se adicionar as soluções de trabalho indicadas, realizou-se uma diluição de 1:10 da matriz, tendo-se misturado 1 mL do extrato da amostra com 9 mL de água.

Tabela 3.3 - Reta de Calibração em Matriz com dois analitos. Onde, ST A representa a solução de trabalho do AMPA e ST G representa a solução de trabalho do glufosinato.

Ponto da reta de calibração	Volume a adicionar da ST A, μL	Volume a adicionar da ST G, μL	Volume a adicionar de extrato diluído, μL	Concentração do ponto, $\mu\text{g/ml}$	Concentração do ponto, mg/kg
1 - PC1	5	5	990	0,005	0,01
2	10	10	980	0,01	0,02
3	25	25	950	0,025	0,05
4	50	50	900	0,05	0,1
5	75	75	850	0,075	0,15
6 - PC2	100	100	800	0,1	0,2

3.5.4 Reta de Calibração em Solvente

No presente relatório, a elaboração da reta de calibração em solvente tem como objetivo a avaliação dos efeitos matriz, ao comparar os declives de ambas as retas. Posto isto, a reta de calibração em solvente foi efetuada de modo semelhante ao descrito anteriormente para a reta de calibração em matriz, na Tabela 3.3, substituindo apenas o volume de extrato diluído pelo mesmo volume, mas de água. Optou-se por utilizar esta como solvente para a reta de calibração, por ambos os compostos em estudo serem bastante solúveis em água.

3.6 Condições para a Análise LC-MS/MS

Para a determinação dos resíduos polares AMPA e glufosinato em amostras alimentares utilizou-se a técnica de cromatografia líquida de ultra eficiência acoplada à espectrometria de massa em tandem, UHPLC-MS/MS. As condições cromatográficas estão especificadas na Tabela 3.4, sendo que estas são as que já se utilizam em rotina na SGS, para a análise de contaminantes alimentares com a coluna Hypercarb.

Tabela 3.4 - Condições cromatográficas do método analítico para análise de AMPA e glufosinato

Parâmetros	Condições cromatográficas		
Coluna	Hypercarb (2,1 x 100 mm; 5 µm), nº 35005-102130 da Thermo Fisher Scientific		
Temperatura da coluna, ° C	40		
Fase móvel A	Água com 0,1% de ácido fórmico		
Fase móvel B	Metanol com 0,1% de ácido fórmico		
Gradiente	Tempo, min	A, %	B, %
	0,0	95	5
	3,0	95	5
	4,0	2	98
	6,0	2	98
	6,1	95	5
	7,5	95	5
Volume de injeção, µL	25		
Modo de injeção	Partial loop		
Fluxo, mL/min	0,500		
Tempo de corrida, min	7,5		
Modo de Separação	UHPLC de fase reversa		
Detetor	MS/MS		

As condições ótimas para o espectrômetro de massa encontram-se na Tabela 3.5, baseadas em artigos de determinação de pesticidas polares[21], [59] e no método interno para análise de glifosato, pertencendo este ao mesmo grupo de herbicidas que os analitos de interesse.

Tabela 3.5 - Condições definidas para o Espectrómetro de Massa

Espetrómetro de Massa	MS/MS, EVOQ LC-TQ Elite da Bruker
Método de ionização	<i>Electrospray</i> negativo
Analizador de massa	Triplo Quadrupolo (QqQ)
Modo de aquisição	MRM (monitorização de reações múltiplas)
Tensão no capilar positiva, V	3 500
Tensão no capilar negativa, V	4 000
Temperatura do cone, °C	350
Pressão de gás do cone, psi	20
Temperatura de dessolvatação, °C	400
Pressão de gás de dessolvatação, psi	20
Pressão de gás do nebulizador, psi	50
Modo de gás de exaustão	ON

Por fim, na Tabela 3.6 encontram-se definidas as transições de massa utilizadas na análise destes herbicidas. Estas transições foram obtidas através da otimização do método, pelo que se experimentaram várias transições mencionadas na literatura [21, 59], e no final avaliou-se quais seriam as ideais, como será explicado no capítulo seguinte.

Tabela 3.6 - Transições de massas e energias de colisão utilizadas na análise de AMPA e glufosinato

Composto	lão precursor, m/z	lões produto, m/z	Energia de colisão (eV)	Transição
AMPA	110	63	24	Quantificadora
		81	14	Qualificadora
Glufosinato	168	63	66	Quantificadora
		85	20	Qualificadora

3.7 Validação do método de ensaio

Procedeu-se então à validação do método de acordo com as orientações dos guias SANTE/11312/2021 [110] e Relacre 13 [113].

Os estudos da **linearidade** e **gama de trabalho** foram efetuados através da elaboração de uma curva de calibração para cada matriz, que relaciona os dados cromatográficos com os

pontos de calibração mencionados anteriormente. De forma a se obter um ajuste linear dos resultados, estes foram tratados através do Método dos Mínimos Quadrados, como descrito no Guia Relacre 13 [113].

A **gama de trabalho** foi avaliada através da homogeneidade de variâncias, de acordo com o procedimento no guia Relacre. Para isso procedeu-se à leitura de dez réplicas independentes do primeiro e do último ponto da reta de calibração de cada matriz, com uma concentração de 0,005 µg/ml e 0,1 µg/ml, respetivamente.

De forma a avaliar a **linearidade** da curva de calibração recorreu-se à análise dos testes estatísticos: coeficiente de correlação, análise de resíduos, Teste de Mandel e Teste de Rikilt.

O coeficiente de correlação de uma reta ρ , calculou-se através da equação 3.1, pelo que deve ser superior a 0,995 para a reta de calibração ser aceite, como descrito no Guia Relacre 13 [113].

$$\rho = \frac{\sum_{i=1}^N \{(x_i - \bar{x}) \cdot (y_i - \bar{y})\}}{\sqrt{[\sum_{i=1}^N (x_i - \bar{x})^2 \cdot \{\sum_{i=1}^N (y_i - \bar{y})^2\}]}} \quad (3.1)$$

Onde, N corresponde ao número de pontos da reta, i corresponde ao número do padrão, x_i corresponde aos valores individuais de concentração, \bar{x} corresponde à média de valores de x , y_i corresponde aos valores individuais de sinal instrumental, \bar{y} corresponde à média de valores de y e i corresponde ao número do padrão.

O teste da análise de resíduos foi aplicado conforme o procedimento descrito no Guia Relacre 13, pelo que o desvio entre os valores experimentais e os valores previstos deve ser igual ou inferior a 10% [113]. O desvio calculou-se através da equação 3.2, pelo que o valor da área de pico previsto, $A_{previsto}$, é calculado através da equação da reta obtida pelo método dos mínimos quadrados.

$$\%Desvio = \frac{A_{experimental} - A_{previsto}}{A_{previsto}} \times 100 \quad (3.2)$$

De acordo com a norma ISO 8466-1, com base num modelo estatístico do teste de Mandel pode-se provar a linearidade. Porém, este teste só é aplicado caso se comprove a homogeneidade de variâncias na gama de trabalho.

A partir deste método, calculou-se a diferença das variâncias, DS^2 , entre a função de calibração linear e a função de calibração polinomial do segundo grau, de acordo com a equação 3.3, conforme indicado no Guia Relacre 13 [113].

$$DS^2 = (N - 2) \cdot S^2_{y/x} - (N - 3) \cdot S^2_{y2} \quad (3.3)$$

O valor de teste, VT , determinou-se através da equação 3.4 e de seguida, comparou-se o VT com o valor da distribuição de Fisher-Snedecor para um intervalo de significância de 95% e $N-3$ graus de liberdade. Se $VT \leq F_{critic}$, a função de calibração é linear, caso contrário, a função de calibração é não linear, sendo necessário reduzir a gama de trabalho.

$$VT = \frac{DS^2}{S^2_{y2}} \quad (3.4)$$

Por último, com o teste de Rikilt analisou-se a linearidade de cada ponto na reta de calibração, através do desvio entre o fator de resposta para cada ponto e o fator de resposta médio, obtido através da equação 3.5. Definiu-se que, para admitir a existência de linearidade, o desvio não deve superior a 10%.

$$y_i/x_i (\%) = \frac{y_i/x_i}{\bar{y}/x} \times 100 \quad (3.5)$$

Os **limiares analíticos** de deteção e quantificação, LOD e LOQ foram determinados, em condições de precisão intermédia através da injeção de amostras de brancos de matrizes fortificados com o padrão de concentração mais baixo da gama de trabalho (PC1). Foram também calculados os limites através das equações descritas no subcapítulo 2.3.2.2.

A **precisão** e a **exatidão** do método foram avaliadas através da realização dos ensaios de fortificação, de acordo com as orientações do guia SANTE/11312/2021 [110]. A precisão foi avaliada em termos de repetibilidade do método, repetibilidade do equipamento e de precisão intermédia. Em condições de repetibilidade do método, foram realizados cinco ensaios para os dois níveis de fortificação no mesmo dia. Para a repetibilidade do equipamento, analisou-se dez vezes consecutivas o primeiro ponto e o último ponto de calibração. A precisão intermédia foi avaliada através da análise de cinco ensaios para ambos os níveis de fortificação, em diferentes dias de trabalho.

Por fim, a avaliação da **incerteza do método** e o **efeito matriz** procedeu-se conforme descrito nos capítulos 2.3.5 e 2.2.3, respetivamente. Na Tabela 3.7, encontra-se descritos os critérios de aceitação para os parâmetros mencionados.

Tabela 3.7 - Resumo dos parâmetros a validar com os respetivos critérios. Adaptado de: [110, 113]

Parâmetro:	Testes a aplicar / Procedimento experimental:	Critério:
Gama de trabalho	Teste de Homogeneidade de variâncias para verificação do ajuste da gama de trabalho. O PC1 e o PC2 são analisados através de dez réplicas independentes.	$PG \leq F_{critic}$
Linearidade	Estudo de cada ponto das retas de calibração. Análise de: Coeficiente de correlação, ρ , Análise de resíduos, Teste de Mandel, Teste de Rikilt.	$\rho > 0,995$ AR % < 10% VT < Fcritc $90\% < y_i/x_i (\%) < 110\%$
Limite de Quantificação	Através de cálculos associados às curvas de calibração, em condições de precisão intermédia e a partir das equações descritas no subcapítulo 2.3.2.2.	$LQ \leq LMR$
Repetibilidade do método	Mínimo de 5 ensaios para cada nível de fortificação (0,01 e 0,05 mg/kg)	$CV_r \% \leq 20\%$
Repetibilidade equipamento	Leitura de 10 réplicas do ensaio para o PC1 e para o PC2 (0,01 e 0,2 mg/kg).	$CV_r \% \leq 20\%$
Precisão intermédia	Mínimo de 5 ensaios para cada nível de Fortificação (0,01 e 0,05 mg/kg) Condição a variar: o dia.	$CV_{PI} \% \leq 20\%$
Especificidade/ Seletividade	Observação no equipamento. Através da comparação da razão iónica e tempo de retenção. Utiliza-se também os resultados obtidos nos Ensaio de recuperação.	$RI \leq +/- 30\%$ $T_R \leq +/- 0,1 \text{ min}$ Recup entre 70% a 120%
Exatidão	Ensaio de recuperação para avaliar a exatidão do método.	Recuperação entre 70 e 120 %, ou pior dos casos: 60% a 140% se o CV (%) $\leq 20\%$.
Incerteza	Avaliação da incerteza expandida do método com os resultados obtidos dos ensaios de recuperação.	$u_{combinada} \leq 50\%$
Efeito Matriz	Elaboração das retas de calibração em matriz e em solvente. Caso haja, deve-se procurar uma alternativa para considerar estes efeitos na calibração.	EM (%) > $\pm 20\%$, considera-se que há EM

APRESENTAÇÃO E DISCUSSÃO DOS RESULTADOS OBTIDOS

No laboratório da SGS está implementado um método para a determinação de resíduos polares, os *single-residue methods*, tendo como base o método QuPPE. Porém este necessita de ser revisto para os analitos AMPA e glufosinato, uma vez que os resultados obtidos são de difícil quantificação devido a fortes efeitos matriz, que tornam a identificação destes compostos uma tarefa complicada. Foram também reportados vários problemas associados à coluna cromatográfica utilizada para determinar estes resíduos polares, a Hypercarb, como a perda imprevisível de retenção, pelo que surgiu a necessidade de explorar outras fases estacionárias. Sendo assim, durante o desenvolvimento do método cromatográfico, foi possível testar uma coluna que opera no modo HILIC, de forma a analisar se esta era uma opção mais viável do que a coluna utilizada no método.

Após a conclusão de qual seria a melhor opção para a coluna cromatográfica, foram realizadas algumas alterações ao método de forma a otimizar as condições no equipamento UHPLC-MS/MS e as condições do método de extração.

Por fim, o método otimizado foi submetido aos testes de validação de acordo com os critérios mencionados nos capítulos 2.3 e 3.7.

4.1 Resultados do desenvolvimento do método cromatográfico

O glufosinato e o AMPA apresentam fraca retenção nas fases estacionárias tradicionais de fase reversa, diminuindo assim a sensibilidade da deteção pelo espectrómetro de massa, devido à interferência causada pelos componentes presentes nas matrizes a analisar [67]. Por isso, os pesticidas polares têm vindo a ser analisados pela fase estacionária composta por PGC,

denominada comercialmente por Hypercarb [94]. Porém esta apresenta a desvantagem de necessitar frequentemente de ser recondicionada durante a análise, o que consome tempo e aumenta o custo da análise [94]. Além de que é uma coluna com um elevado custo associado.

Como alternativa apresenta-se a cromatografia líquida de interação hidrofílica, HILIC, que tem vindo a demonstrar ser uma abordagem viável na análise de compostos polares [101]. A HILIC aparece como uma alternativa capaz de resolver os problemas de retenção mencionados anteriormente, proporcionando a retenção adequada dos compostos, permitindo que estes sejam analisados sem ser necessário aplicar técnicas dispendiosas como a derivatização [101].

4.1.1 Seleção da coluna cromatográfica

Durante a otimização do método, houve a possibilidade de estudar a coluna Ascentis Express HILIC da marca Supelco, de forma a perceber se esta seria uma opção mais viável do que a coluna Hypercarb.

O funcionamento da coluna Ascentis Express HILIC baseia-se na tecnologia *Fused-Core particle* caracterizada pela utilização de partículas que consistem num núcleo sólido com 1,7 μm de diâmetro e uma camada porosa de 0,5 μm à volta. A vantagem desta tecnologia é a difusão dar-se na camada porosa em comparação com as partículas totalmente porosas, sendo que um trajeto mais curto de difusão reduz os efeitos de dispersão axial dos solutos e minimiza o efeito de alargamento do pico [126].

O interesse em desenvolver um método com a coluna Ascentis Express não é apenas para o AMPA e glufosinato, mas sim para todos os resíduos incluídos no método já implementado na SGS com a coluna Hypercarb. Os resíduos que integram também este grupo são o glifosato, fosetil-alumínio, ácido fosfónico e os cloratos e percloratos.

Inicialmente optou-se por testar um protocolo interno da SGS que utilizava também uma coluna que opera em modo HILIC. As fases móveis testadas foram 1,1% ácido fórmico em água (A) e Acetonitrilo (B), sendo estas semelhantes a outros estudos. No início a injeção dos padrões de 1 ppm obtiveram resultados satisfatórios. Porém quando se injetaram as retas de calibração em matriz com ambos os analitos, a coluna não separava o analito AMPA dos interferentes da matriz, pelo que todos os picos apresentavam ou a mesma área ou uma área menor da esperada. Na Figura 4.1 é possível observar que com o aumento da concentração do analito, a área do pico cromatográfico da direita não aumentou em relação ao da esquerda, logo não é possível identificar a presença do analito.

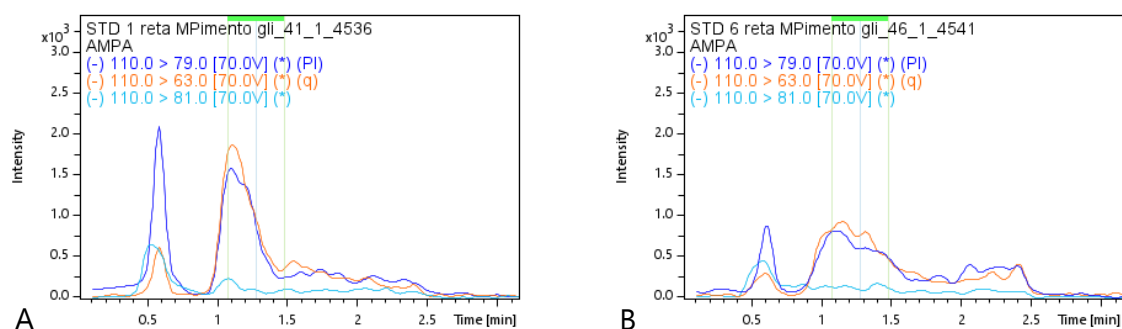


Figura 4.1 - Cromatogramas obtidos para o primeiro (A) e último ponto (B) da reta de calibração na matriz de pimento para análise na coluna Ascentis Express

Estas condições não terem resultado no laboratório da SGS podem ser consequência da utilização de um analisador triplo quadrupolo, em vez do *ion-trap* referido no protocolo utilizado, ou até por as colunas cromatográficas apresentarem diferentes propriedades. Existem outras variáveis para o método não ter tido sucesso. O ácido fórmico é utilizado como um aditivo à fase móvel para melhoramento dos picos cromatográficos e reforço do sinal. Porém, verificou-se que a fase móvel anteriormente referida apresentava uma elevada concentração de ácido fórmico, o que poderá acidificar a coluna ou até interferir com o processo de ionização dos compostos.

Durante o período de desenvolvimento do método cromatográfico foram testadas outras condições, nomeadamente diferentes fases móveis e diferentes gradientes de eluição, porém sempre sem sucesso em identificar os analitos nas matrizes escolhidas. Na Tabela 4.1 encontram-se alguns dos resultados obtidos durante o desenvolvimento do método na coluna Ascentis Express HILIC. No ensaio 11 foram também testadas as fases móveis utilizadas no método para a identificação dos pesticidas já implementado na SGS, pois é do interesse do laboratório que as fases móveis escolhidas sejam gerais, de forma a minimizar os custos com consumíveis. Porém não era possível identificar todos os analitos pretendidos. A esta altura começou-se a questionar o estado da coluna Ascentis Express e a sua capacidade para separar os analitos pretendidos. Para além das tentativas apresentadas na Tabela 4.1, houve outras que falharam devido a problemas com o equipamento.

Devido à falta de tempo e disponibilidade do equipamento para continuar a desenvolver um método que determina todos os resíduos de pesticidas pretendidos numa única corrida em modo HILIC, optou-se então por escolher a coluna Hypercarb apesar das desvantagens mencionadas inicialmente. Esta é uma escolha que resulta em menores custos para o laboratório, pois optar-se por um método genérico torna-se possível analisar vários compostos na mesma corrida, minimizando o tempo de análise.

Tabela 4.1 - Resultados dos principais testes de otimização do método cromatográfico para a coluna Ascentis Express HILIC

Nº do ensaio	Referências utilizadas	Analitos testados	Fases móveis	Observações	Alterações/Sugestões
1	Condições artigo de Piotr Kaczynski [21] e método para o glifosato da SGS	Injeção dos padrões de 1ppm de AMPA, glufosinato e glifosato	A: 20 mM Formato de Amónio + 1% HCOOH em H ₂ O B: Acetonitrilo	Análise do AMPA não demonstrou especificidade, sendo que não era possível identificar o pico do AMPA no meio das interferências; O glifosato apresentava um sinal baixo em comparação com a Hypercarb;	Experimental utilizar outras energias de colisão e alterar temperatura da probe e do cone.
2		Injeção dos padrões de 1ppm de AMPA, glufosinato e glifosato	A: 20 mM Formato de Amónio + 1% HCOOH em H ₂ O B: Acetonitrilo	Análise do AMPA com interferências, não é possível obter a especificidade requerida.	<u>Conclusão:</u> Método da coluna hypercarb não resulta nesta coluna HILIC, como era de se esperar
4	Condições artigo de Piotr Kaczynski [21], de Sara Savini <i>et al</i> [59], da Thermo Scientific [119] e método interno da SGS para uma coluna HILIC	Injeção dos padrões de 1ppm de AMPA, glufosinato, glifosato, fosetil, ácido fosfónico e cloratos e percloratos	A: 1,1% ácido fórmico em H ₂ O B: Acetonitrilo	Problema com o fosetil pois o equipamento leu apenas uma transição. Não é possível identificar os percloratos. Análise do AMPA sem interferências.	Sugestão: Aumentar a temperatura do cone, promovendo a ionização, e a temperatura da probe, que promove a dessolvação.
7		Injeção do padrão de 1ppm de AMPA, glufosinato, glifosato, fosetil, ácido fosfónico e cloratos e percloratos	A: 1,1% ácido fórmico em H ₂ O B: Acetonitrilo	Os picos cromatográficos para o AMPA e glufosinato apresentam um sinal mais intenso e menos interferências. Observa-se o pico do fosetil sem interferências. Não é possível identificar os percloratos.	Alterou-se a temperatura do cone para 300°C e a temperatura da probe para 400°C.
8		Injeção das retas de calibração em matriz de framboesa e pimento	A: 1,1% ácido fórmico em H ₂ O B: Acetonitrilo	AMPA não apresentou linearidade. O que se pensava ser o AMPA era um interferente. A utilização de um fluxo demasiado elevado resultou numa fuga no capilar do equipamento.	Sendo que o que se pensava ser o AMPA era um interferente, é necessário voltar a correr os padrões
11	Condições referidas anteriormente juntamente com método interno da SGS para identificação de pesticidas	Injeção do padrão de 1ppm e de 10 ppm de AMPA, glufosinato e glifosato.	A: 0,126 g formato de amónio + 500 µL ácido fórmico em água B: Acetonitrilo	Durante a leitura dos padrões aparece um interferente na análise que leva a questionar o estado da coluna. Procedeu-se à limpeza da coluna, mas sem sucesso.	Alterou-se a fase móvel A pois 1,1% de ácido fórmico é muito forte para o equipamento. Problemas com coluna.

4.1.2 Hypercarb

Durante o desenvolvimento deste trabalho foi possível observar um dos problemas associados à coluna Hypercarb, a alteração do tempo de retenção. Na Figura 4.2 é possível observar a alteração no tempo de retenção para o glufosinato. Para a transição 180>85, a coluna deixou de conseguir separar o glufosinato do interferente presente na matriz de mirtilo. A transição quantificadora passou então a ser a 180>63, pois foi a transição que apresentou maior reprodutibilidade ao longo dos ensaios.

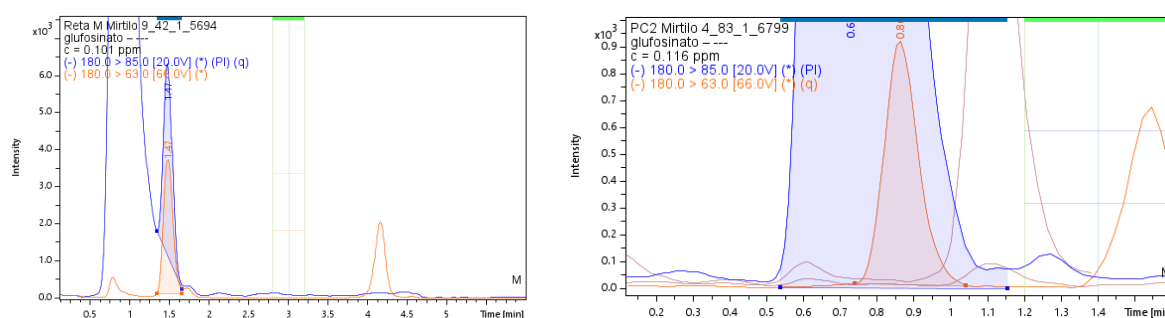


Figura 4.2 - Observação da perda de retenção do analito glufosinato na análise com a coluna Hypercarb.

Para o analito AMPA a alteração do tempo de retenção não foi tão significativa, pelo que não foi necessário realizar alterações no método. Tentou-se recondicionar a coluna com um procedimento recomendado no manual de utilização da Thermo Scientific [95], porém sem sucesso.

Pode-se apontar várias causas para a perda imprevisível do tempo de retenção como a contaminação da coluna por não se utilizar uma pré-coluna, ser necessário recorrer ao *priming* da coluna para ativar as partículas internas, o armazenamento da coluna não ser o recomendado, a degradação do enchimento da coluna, ou até mesmo o manuseamento incorreto da coluna durante a montagem no sistema. Apesar deste contratempo foi possível manter a Hypercarb como a escolha da coluna para o método analítico a implementar.

4.2 Otimização do UHPLC-MS/MS

Procedeu-se então à otimização das condições do equipamento UHPLC-MS/MS para a determinação dos resíduos polares AMPA e glufosinato em amostras de frutos e vegetais. Durante o desenvolvimento do método analítico, optou-se por manter algumas das condições

do espectrómetro de massa tendo como base o método já utilizado no laboratório da SGS, como a tensão no capilar, a voltagem e temperatura do cone que se encontram na Tabela 3.5.

A escolha da utilização da fonte de ionização *Electrospray* em modo negativo, deve-se à informação retirada da literatura, e ao facto deste modo apresentar os picos mais intensos, pelo que o ião precursor será um ião desprotonado (M-H⁻), como sugerem os estudos realizados por Chiarello *et al* [60], Piotr Kaczynski [21], Savini *et al* [59], entre outros.

O modo de operação escolhido para o triplo quadrupolo é o MRM, monitorização de reações múltiplas, pelo que ambos os quadrupolos estão programados para operar em modo SIM, sendo que ocorre a monitorização seletiva dos iões produto do respetivo ião precursor [107]. Este tipo de aquisição permite obter uma maior sensibilidade e seletividade durante a análise quantitativa dos compostos alvo [107]. Sendo assim, foi necessário selecionar as transições para o AMPA e para o glufosinato.

Inicialmente, as transições e energias de colisão para a identificação no espectrómetro de massa foram retiradas dos artigos: "*Clean-up and matrix effect in LC-MS/MS analysis of food of plant origin for high polar herbicides*", "*An Improved, Rapid, and Sensitive Ultra-High-Performance Liquid Chromatography-High-Resolution Orbitrap Mass Spectrometry Analysis for the Determination of Highly Polar Pesticides and Contaminants in Processed Fruits and Vegetables*" e "*HPLC Determination of Glyphosate, Aminomethylphosphonic Acid, and Glufosinate Using a Hypercarb Porous Graphite Adsorbent*" dos autores Piotr Kaczynski, Savini *et al* e Goncharova *et al*, respetivamente [15, 21, 59].

Procedeu-se então à injeção de padrões dos analitos com uma concentração de 1 ppm, para averiguar se com as condições escolhidas era possível visualizar os picos cromatográficos dos analitos em questão. Neste primeiro ensaio foi possível visualizar ambos os picos cromatográficos, porém, verificou-se que as energias de colisão escolhidas para as transições do AMPA, através do artigo desenvolvido por Savini *et al* [59], eram mais elevadas do que as mencionadas nos outros artigos [15, 21]. Posto isto, foi possível testar a diferença na área obtida para o analito AMPA, consoante a energia de colisão escolhida. O parâmetro da energia de colisão está relacionado com a formação de iões produto na célula de colisão do espectrómetro de massa em triplo quadrupolo.

Através da Figura 4.3, observa-se um aumento do sinal analítico quando são aplicadas energias de colisão mais baixas, entre 17 eV e 36 eV. Para o padrão de concentração 1 ppm a área do pico cromatográfico aumentou 10 vezes e para a concentração de 10 ppm houve um aumento aproximadamente de 7 vezes, em relação às áreas obtidas com a energia de colisão a 70 eV.

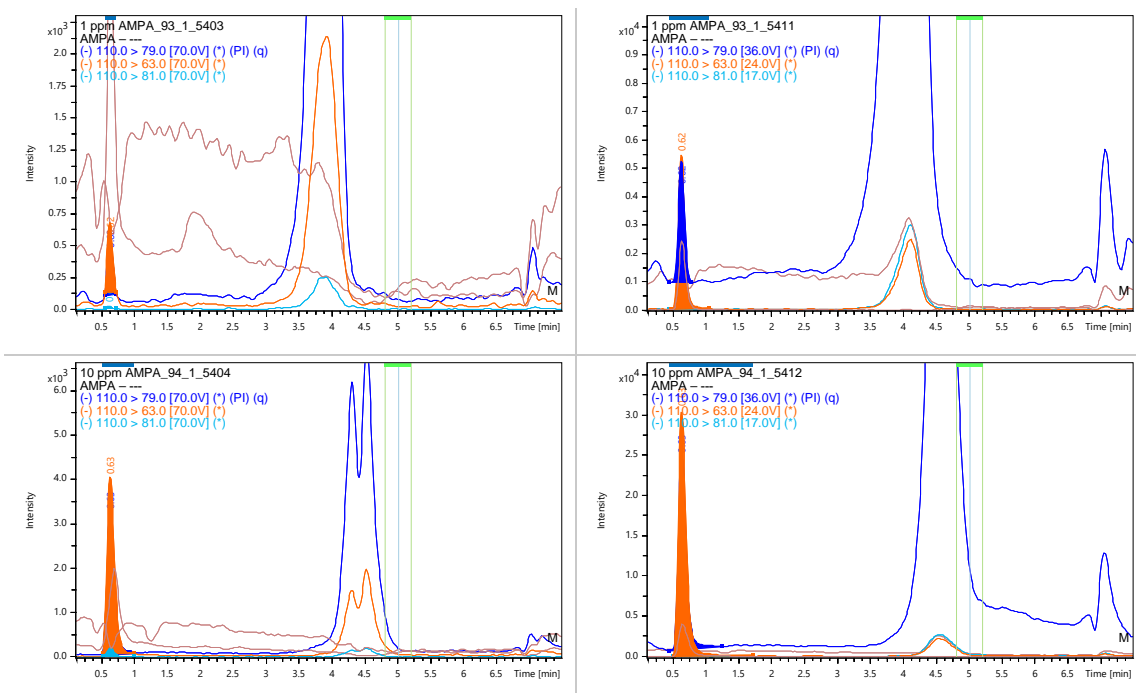


Figura 4.3 - Estudo da otimização das energias de colisão para o analito AMPA. Em cima encontram-se os picos cromatográficos que correspondem à concentração de 1 ppm e em baixo correspondem à concentração de 10 ppm. Do lado esquerdo encontram-se os picos cromatográficos com as energias de colisão elevadas e do lado direito encontra-se a proposta com as energias de colisão mais baixas.

Uma das explicações para este fenómeno encontrada na literatura, é que o aumento da energia de colisão poderá favorecer a fragmentação indesejada dos iões [127]. Ora, isto pode resultar na perda de sinal analítico quando a energia de colisão aplicada não se adequa ao perfil dos iões ressonantes [127]. Concluiu-se então que ao estabelecer energias de colisão mais baixas para o analito AMPA, possibilitam uma maior intensidade de sinal.

Por fim, na Figura 4.4 encontram-se os picos cromatográficos obtidos para ambos os analitos através da injeção do padrão à concentração de 0,1 ppm para as condições ótimas do equipamento, descritas no capítulo 3.6.

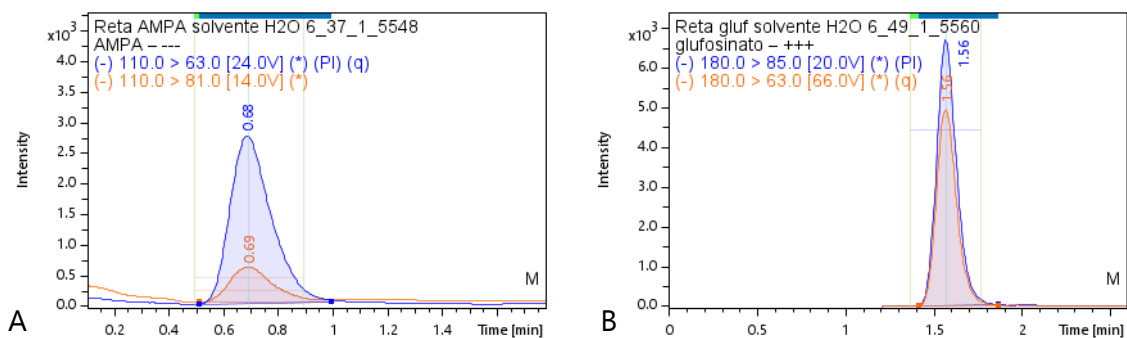


Figura 4.4 - Representação dos picos cromatográficos obtidos para o AMPA (esquerda) e para o glufosinato (direita) para uma concentração de 0,1 ppm (0,1µg/ml).

4.3 Otimização dos parâmetros da extração

4.3.1 Estabilidade das soluções de trabalho

Segundo o método QuPpe elaborado por Anastassiades *et al*, as soluções de trabalho apresentam uma validade de seis meses [16]. Porém, estudos previamente realizados no laboratório da SGS apontam que a validade destas soluções é bastante inferior, pois é possível observar sinais de degradação do padrão através da deterioração dos resultados.

Foram então realizados estudos de estabilidade das soluções de trabalho para confirmar se isto realmente se verifica. Optou-se por estudar apenas a solução de trabalho 3, pois é a que apresenta a menor concentração de padrão, 1 ppm, pelo que se considerou que esta seria a mais instável. No dia 27 de junho de 2022 preparou-se as soluções de trabalho como mencionado no capítulo 3.3, e procedeu-se à injeção da solução de trabalho 3 no equipamento. Após a análise a solução de trabalho, esta foi armazenada no frigorífico a 6°C. Passadas sensivelmente duas semanas, no dia 11 de julho de 2022 procedeu-se novamente à injeção da solução de trabalho 3, preparada no dia 26 de junho. Na Figura 4.5 encontra-se a representação dos picos cromatográficos obtidos durante o estudo de estabilidade, sendo que visualmente verifica-se uma diminuição no sinal analítico para ambos os analitos.

Na Tabela 4.2 encontram-se os resultados obtidos das áreas dos picos cromatográficas em ambos os dias da análise. Verificou-se então que existe uma diminuição do sinal analítico passado duas semanas da preparação da solução de trabalho, pelo que a degradação do padrão é mais significativa para o AMPA.

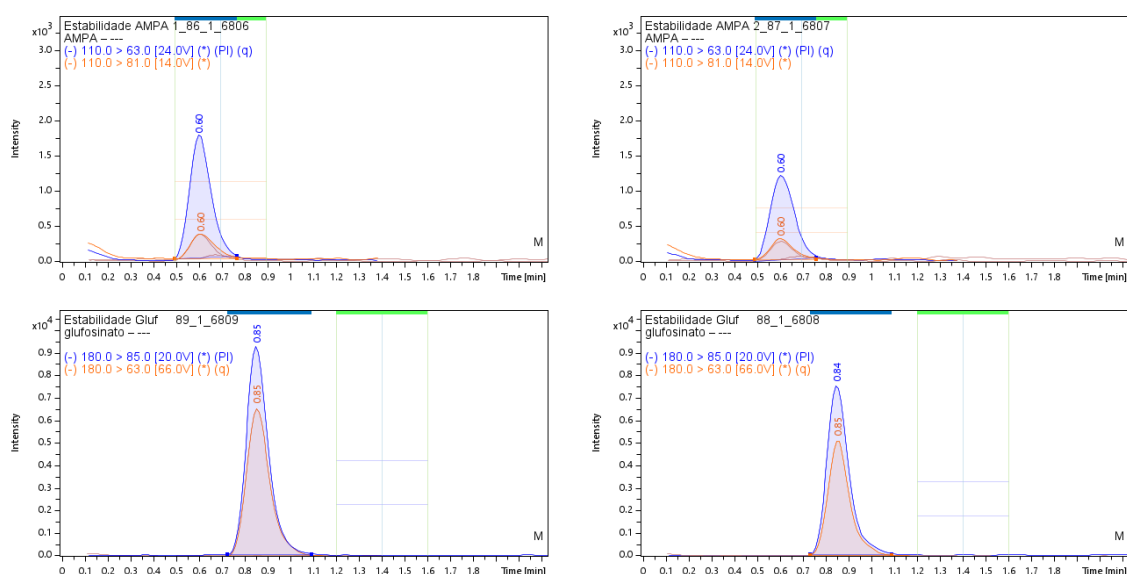


Figura 4.5 - Estudo da estabilidade da solução de trabalho 3, com a concentração de 1 ppm, para o AMPA (cima) e para o glufosinato (baixo). Do lado esquerdo encontra-se o resultado da análise no dia 27 de junho de 2022 e do lado direito no dia 11 de julho de 2022.

Tabela 4.2 - Resultados obtidos no estudo da estabilidade da solução de trabalho 3, com concentração de 1 ppm.

Analito	Área dos picos cromatográficos 27-06	Área dos picos cromatográficos 11-07	Diferença entre as áreas
AMPA	11 642	8 828	-24%
Glufosinato	62 671	50 716	-19%

Sendo que apenas houve possibilidade de avaliar a estabilidade nestes dois ensaios, é importante referir que estes resultados podem ser influenciados por mais fatores como, a variação da temperatura da coluna, o estado dos componentes do equipamento, a preparação das fases móveis, entre outros. No futuro, seria conveniente a realização de mais ensaios para se comparar mais dados e tirar conclusões. Apesar de não ser correto concluir que esta redução no sinal analítico advém apenas da estabilidade do padrão, optou-se por implementar a elaboração das soluções de trabalho sempre que se pretende realizar um ensaio, de forma a garantir a segurança e viabilidade dos resultados.

4.3.2 Estudo da etapa de redução da temperatura dos extratos

Em relação à etapa do método de extração em que se congelam os extratos antes da centrifugação, esta já se encontra implementada no método de extração de resíduos polares no laboratório da SGS, pelo que também aparece sugerida no método QuPpe [16]. Optou-se por manter esta etapa no método de extração, pois ao operar a temperaturas baixas promove-se a coagulação das proteínas, e posterior precipitação no fundo do tubo *falcon*, o que resulta na obtenção de extratos mais limpos. Esta etapa é bastante importante especialmente para matrizes que apresentam alguma dificuldade na etapa de filtração. Por consequência, ao injetar extratos limpos, promove-se a redução do efeito matriz e protege-se a coluna de impurezas das matrizes durante a análise.

Durante a realização do presente trabalho foram realizados três ensaios em que se variou a duração da etapa de congelação dos extratos, de forma a averiguar a sua influência no efeito matriz.

Pelo que se observa na Tabela 4.3, não é possível concluir uma relação direta para todas as matrizes e analitos. Com os resultados obtidos para a matriz de mirtilo com o AMPA e o glufosinato e para a matriz de pimento vermelho com o AMPA, não foi possível comprovar que mais tempo no congelador minimiza os efeitos matriz. A redução mais significativa do efeito matriz nota-se quando os extratos são colocados no congelador durante 5 horas, porém, implementar um tempo tão longo iria aumentar a duração da etapa de extração e aumentar os custos da análise. Tendo em conta que a diferença no efeito matriz entre a duração de 2 horas e a duração de apenas 30 minutos é mínima, optou-se por manter a duração desta etapa de apenas 30 minutos, de forma a minimizar o tempo da análise e os custos da análise.

Tabela 4.3 - Resultados do efeito matriz obtido durante o estudo da etapa de redução de temperatura dos extratos.

Matriz	Analito	5 horas	2 horas	30 min
Mirtilo	AMPA	-72%	-83%	-68%
	Glufosinato	-16%	-42%	-29%
Pimento	AMPA	-48%	-94%	-84%
	Glufosinato	-57%	-74%	-87%

Posto isto, não é possível afirmar que o tempo despendido no congelador é um fator determinante. O fundamental desta etapa é a redução de temperatura dos extratos,

promovendo a precipitação dos componentes da matriz que interferem com a análise, sendo que, não compensa despende mais do que 30 minutos nesta etapa.

4.3.3 Estudo da etapa de diluição

Como referido no final do capítulo 2.1, a etapa de diluição é um método fácil e de baixo custo para reduzir os componentes que interferem com a análise e assim minimizar os efeitos matriz, sem ser necessária uma etapa de limpeza. A etapa de diluição é sugerida no método QuPPE com a utilização do solvente de extração metanol acidificado.

O trabalho elaborado por Adams *et al*, sugere a utilização de água como solvente de diluição, sendo esta uma opção mais sustentável e com menores custos associada [77]. Por isso, no laboratório da SGS, testou-se a hipótese de utilizar água na etapa de diluição do extrato, pois os analitos em estudo apresentam uma elevada solubilidade com água, em comparação com solventes orgânicos.

Os resultados obtidos para a diluição em água com um fator de 10 foram satisfatórios, pois o sinal analítico manteve-se e os picos cromatográficos obtidos mantiveram a forma. Posto isto, optou-se por implementar no método analítico a diluição do extrato em água, em vez de metanol acidificado, pois apesar de os resultados serem semelhantes, esta é uma metodologia mais verde e com menor custo.

4.4 Validação do método

De seguida, serão apresentados os resultados obtidos durante a implementação e validação do método analítico para a determinação dos resíduos polares AMPA e glufosinato em frutos e vegetais por UHPLC-MS/MS, de acordo com os parâmetros de validação descritos nos capítulos 2.3 e 3.7.

A metodologia seguida para a validação do método teve como base o guia SANTE/11312/2021 [110], elaborado pela Comissão Europeia para a validação de metodologias na identificação de pesticidas e contaminantes, e os guias Relacre 13 [113] e Relacre 31 [118]. A implementação e validação do método realizou-se nas matrizes de mirtilo e pimento vermelho, pois segundo as orientações do guia SANTE/11312/2021 [110], basta validar os métodos para um alimento de cada grupo alimentar.

4.4.1 Gama de Trabalho e Linearidade

De forma a proceder à quantificação dos resíduos de pesticidas em estudo nas amostras alimentares, construíram-se curvas de calibração que relacionam a resposta do equipamento e a concentração do composto desejado.

Para o estabelecimento da gama de trabalho teve-se em consideração as recomendações do guia SANTE/11312/2021 [110] e os LMR estabelecidos para o AMPA e glufosinato nos regulamentos da Comissão Europeia 441/2012 [53] e 845/2015 [52]. Apesar do limite máximo de resíduos mais baixo destes dois analitos em alimentos ser de 0,1 mg/kg, como indicado na Tabela 1.2, optou-se por validar o método para uma concentração de 0,01 mg/kg, uma vez que este é o LMR assumido por defeito pela união europeia para resíduos de pesticidas, e é também o valor exigido na apresentação de resultados pelos clientes da SGS. O limite superior da gama de trabalho definiu-se como sendo 20 vezes o valor do limite inferior da gama de trabalho, 0,2 mg/kg, conforme o guia SANTE/11312/2021 [110].

Avaliou-se a linearidade do método através da construção das curvas de calibração em matriz, constituídas por seis pontos distribuídos ao longo da gama de concentrações referida anteriormente. Na Figura 4.6, apresentam-se as curvas de calibração, para ambos os compostos de interesse, nas matrizes estudadas. No Apêndice A, encontram-se os dados utilizados na elaboração das curvas de calibração.

A linearidade das curvas de calibração foi avaliada através do Método dos Mínimos Quadrados, pois é o método que melhor se ajusta aos pontos experimentais obtidos. Para a utilização deste método pressupõem-se que os erros têm uma distribuição normal e que existe homogeneidade de variâncias ao longo da gama. Através deste método, foi possível calcular o coeficiente de variação do método para cada uma das retas analisadas, sendo que este deve ser inferior a 10%.

Na Tabela 4.4. apresentam-se os coeficientes de correlação e de determinação para a gama de trabalho definida, assim como a sensibilidade das curvas de calibração e o coeficiente de variação do método.

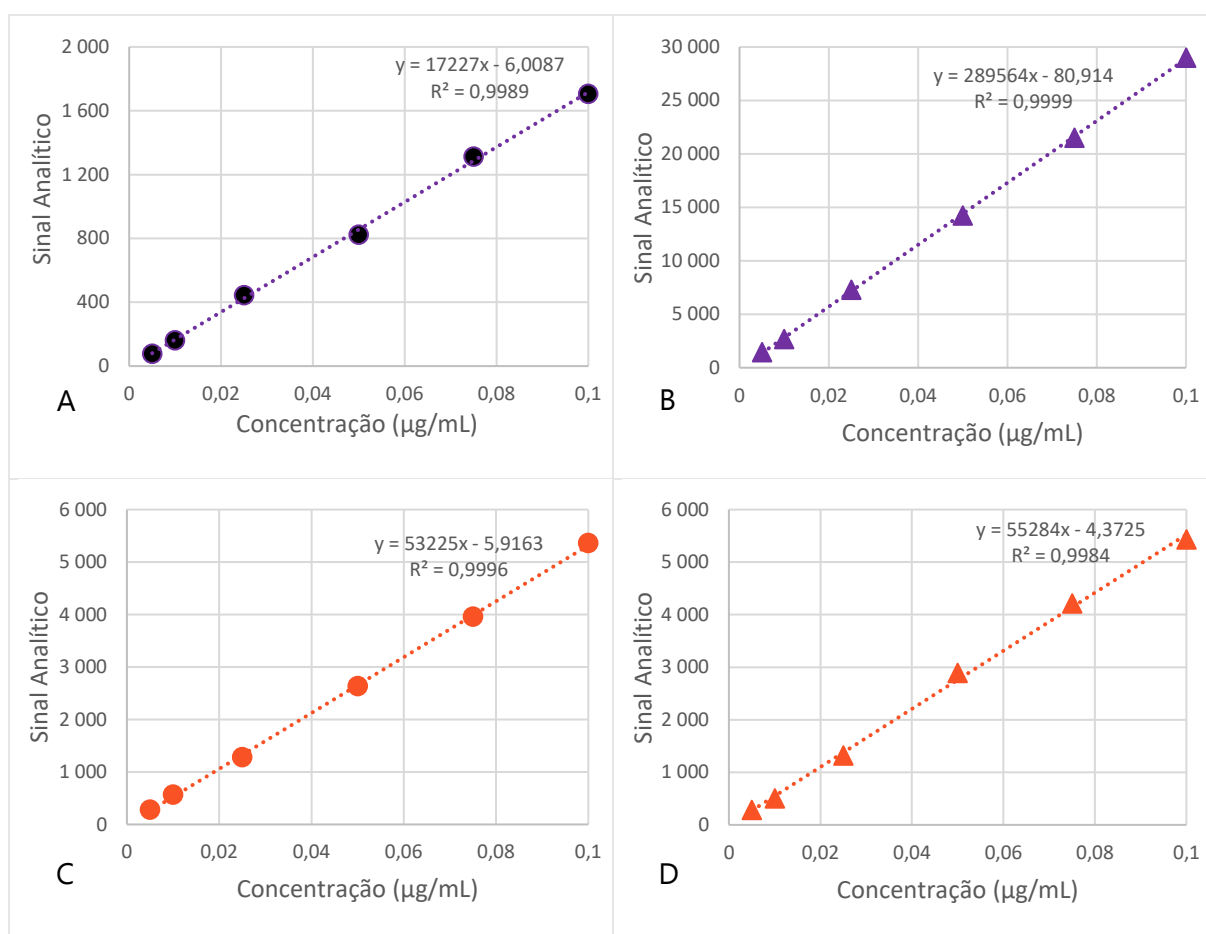


Figura 4.6 - Representação gráfica das retas de calibração de: AMPA na Matriz Mirtilo (A), Glufosinato na Matriz Mirtilo (B), AMPA na Matriz Pimento (C), Glufosinato na Matriz Pimento (D).

Tabela 4.4 - Coeficiente de correlação, Coeficiente de determinação, Sensibilidade, Gama de trabalho e Coeficiente de variação do método.

	AMPA		Glufosinato	
	Mirtilo	Pimento	Mirtilo	Pimento
Coeficiente de correlação (R)	0,9995	0,9998	0,9999	0,9992
Coeficiente de determinação (R ²)	0,9989	0,9996	0,9999	0,9984
Sensibilidade (e)	17 227	53 225	289 564	55 284
Gama de trabalho (µg/ml)	0,005 – 0,1			
Coeficiente de variação do método (CV _m) %	3,12	1,8	1,17	3,9

Com base na Tabela 4.4, é possível observar que os coeficientes de correlação são superiores ao critério estabelecido de 0,995, e que os coeficientes de variação do método são inferiores a 4%. Como a apreciação do coeficiente de correlação por si só não garante a existência de linearidade no método, sendo este apenas um bom indicador de correlação entre os dados, foi necessário recorrer a outros testes estatísticos referidos no guias Relacre 13 [113] e SANTE/11312/2021 [110].

Primeiramente, avaliou-se a escolha da gama de trabalho através do estudo da homogeneidade de variâncias. Os resultados encontram-se na Tabela 4.5. Uma vez que o valor de teste é inferior ao valor tabelado de Fischer-Snedecor para um nível de confiança de 99% e 9 graus de liberdade, comprova-se que não existem diferenças significativas entre as variâncias, pelo que pode-se afirmar que existe homogeneidade de variâncias na gama de trabalho estudada.

Tabela 4.5 - Teste de homogeneidade de variâncias para as retas de calibração em Mirtilo e Pimento.

	AMPA				Glufosinato			
	Mirtilo		Pimento		Mirtilo		Pimento	
Concentração (µg/mL)	0,005	0,1	0,005	0,1	0,005	0,1	0,005	0,1
Média	166	777	190	396	215	5 065	478	5 136
Variância	3 458	17 503	4 579	6 049	6 528	34 273	14 791	61 493
Valor de teste (VT)	5,06		1,35		5,25		4,15	
F (n1-1, n10-1, 99%)	5,35							
Critério de aceitação	VT < F							

Após a confirmação de que a gama de trabalho estava adequada, o primeiro teste estatístico aplicado foi a análise de resíduos, que permite avaliar se os resíduos são independentes ou não. Através da Figura 4.7, observa-se que as representações gráficas não apresentam uma tendência especial, pois os pontos obtidos estão dispostos de forma aleatória em torno do eixo do x. Os desvios entre os pontos experimentais e os pontos teóricos são inferiores ao critério de aceitação de 10%, o que indica a existência de linearidade. Na Tabela A.5 encontram-se os dados utilizados na construção da Figura 4.7.

De seguida, avaliou-se a aplicação de um modelo de regressão linear através do teste de Mandel. Na Tabela 4.6 encontram-se os valores de teste calculados e o valor tabelado da distribuição de Fischer-Snedecor, para um intervalo de confiança de 95%. Observa-se que para todas as curvas de calibração em estudo, o valor de teste é inferior ao valor tabelado, logo foi possível assumir uma função de calibração linear.

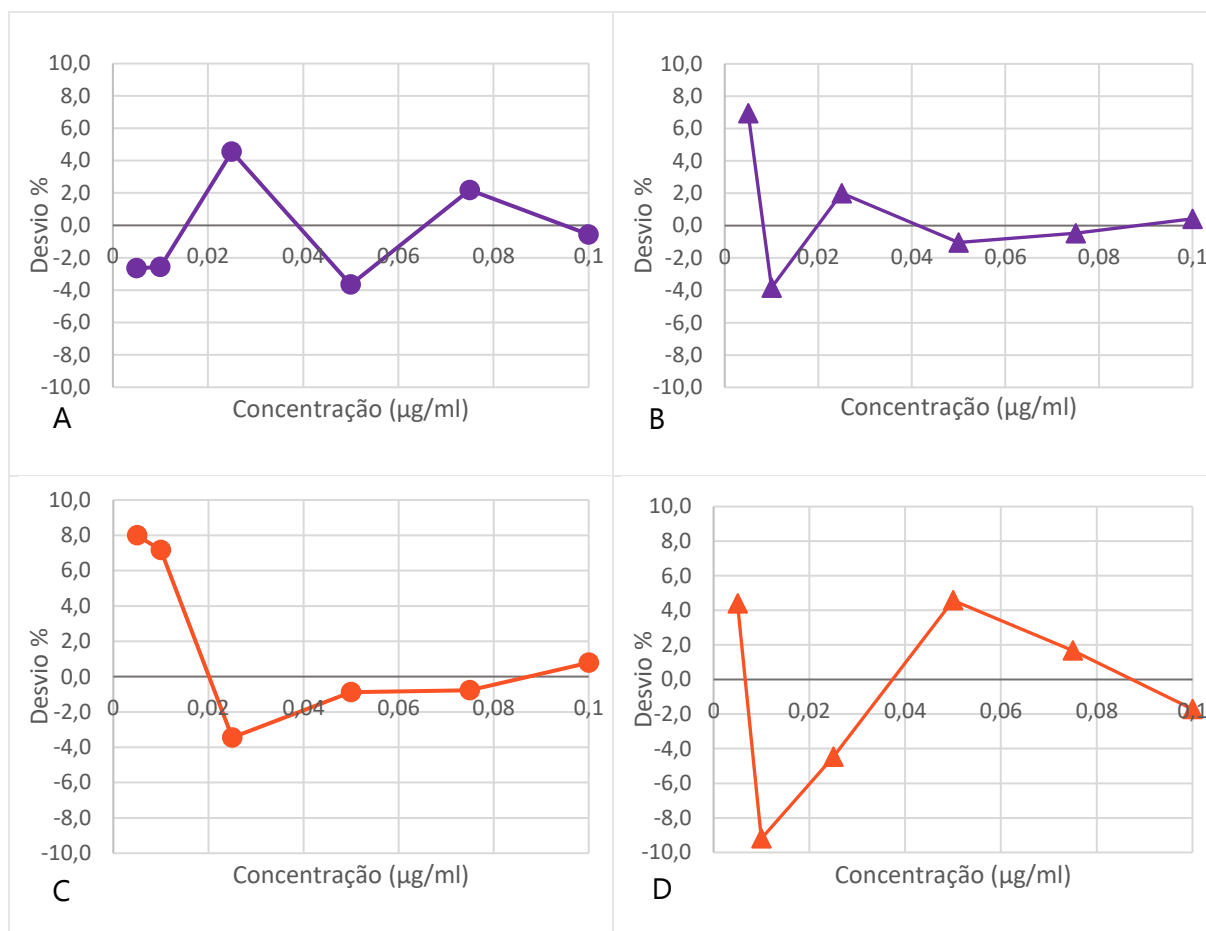


Figura 4.7 - Representação gráfica da análise de resíduos: AMPA na Matriz Mirtilo (A), Glufosinato na Matriz Mirtilo (B), AMPA na Matriz Pimento (C), Glufosinato na Matriz Pimento (D).

Tabela 4.6 - Resultados da aplicação do teste de Mandel.

	AMPA		Glufosinato	
	Mirtilo	Pimento	Mirtilo	Pimento
Desvio padrão ajuste linear, $S_{y/x}$	23,75	42,30	149,76	95,16
Desvio padrão ajuste polinomial, S_{y^2}	27,38	23,98	144,62	77,50
Diferença das variâncias (DS^2)	7	5 433	26 968	18 204
Valor de teste (VT)	0,01	9,45	1,29	3,03
F (1, N-3, 95%)	10,13			
Critério de aceitação	VT < F			

Por fim, aplicou-se também o teste de RIKILT, de forma a averiguar a aplicabilidade do modelo de linearidade. Neste teste assume-se a linearidade das curvas de calibração se os valores não diferirem mais de 10%, pelo que o intervalo de aceitação dos valores obtidos situa-se entre os 90 e 110%. Na Figura 4.8, apresentam-se os resultados obtidos, pelo que se verifica que todos os pontos das retas de calibração em estudo cumprem o critério de aceitação. Nas tabelas A.6 e A.7 encontram-se os dados utilizados na construção da Figura 4.8.

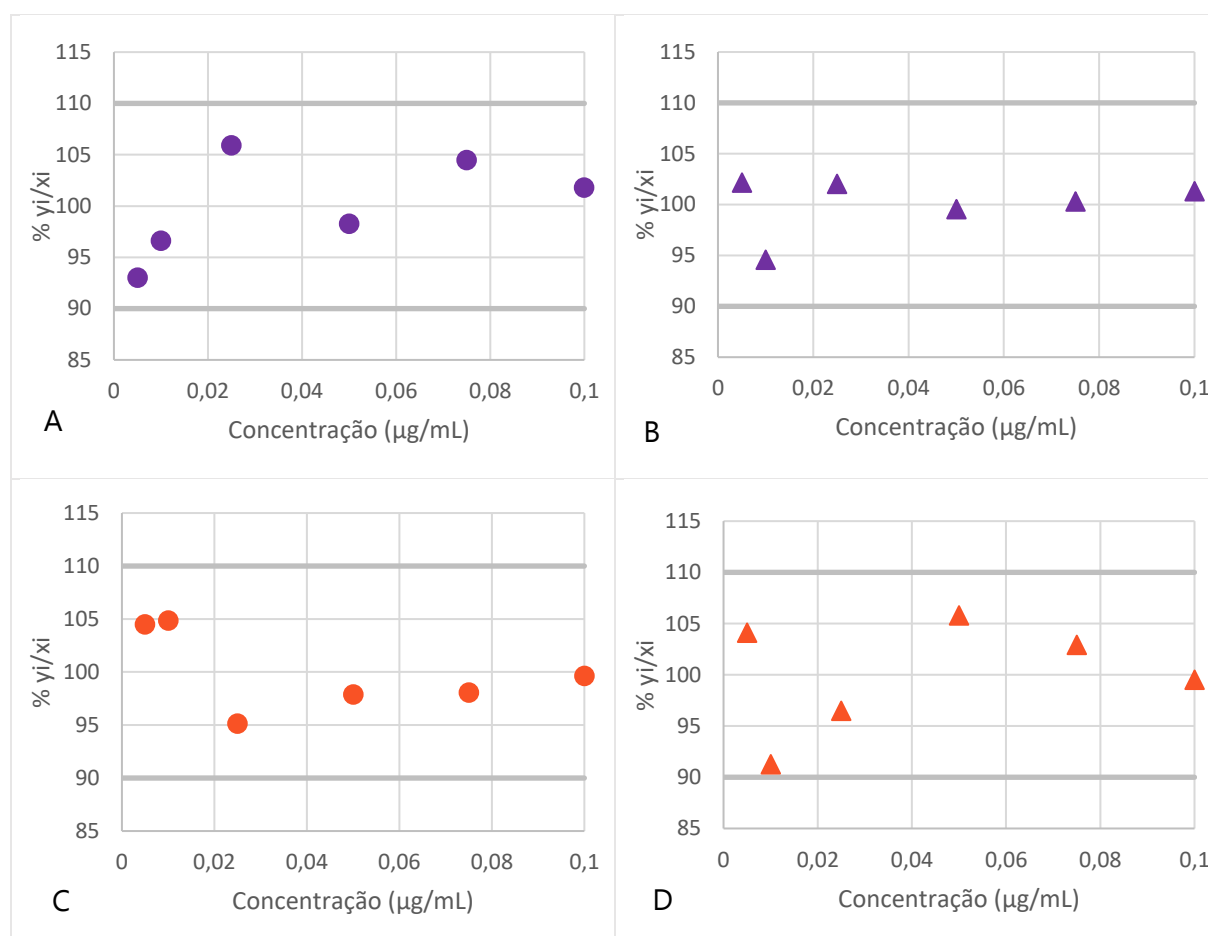


Figura 4.8 - Representação gráfica do teste de RIKILT: AMPA na Matriz Mirtilo (A), Glufosinato na Matriz Mirtilo (B), AMPA na Matriz Pimento (C), Glufosinato na Matriz Pimento (D).

Na Tabela 4.7, apresenta-se um resumo dos resultados obtidos através da validação da gama de trabalho e da linearidade das retas de calibração em matriz para ambos analitos em estudo. Após a confirmação do cumprimento dos vários critérios de aceitação, conclui-se que as quatro curvas de calibração obedecem aos requisitos de linearidade.

Tabela 4.7 - Resumo dos resultados obtidos através da aplicação dos testes estatísticos para a validação da gama de trabalho e linearidade do método

	AMPA		Glufosinato	
	Mirtilo	Pimento	Mirtilo	Pimento
Teste Homogeneidade de variâncias (PG < F _{99%})	5,06 < 5,35	1,35 < 5,35	5,25 < 5,36	4,15 < 5,37
Análise de Resíduos (%) [±10%]	[-3,66; 4,56]	[-3,45; 7,99]	[-3,83; 6,96]	[-9,20; 4,57]
Teste de Mandel (VT < F _(1, N-3, 95%))	0,01 < 10,13	9,45 < 10,13	1,29 < 10,13	3,03 < 10,13
Teste de Rikilt (%) [90-110 %]	[93; 110]	[95; 105]	[95; 102]	[91; 106]

4.4.2 Especificidade e Seletividade

De forma a avaliar se o método analítico é específico e seletivo confirmou-se primeiramente a inexistência de interferentes na amostra em branco apenas com a injeção de uma amostra de solvente.

Para identificar o composto, definiu-se duas transições específicas, uma transição quantificadora e uma transição qualificador, para ambos os analitos de interesse. Na Figura 4.9, a sobreposição dos picos cromatográficos dos iões quantificadores e qualificadores garante a especificidade do método, sendo que é possível confirmar que a resposta analisada advém apenas dos compostos de interesse, mesmo em matrizes complexas.

Foram também avaliados os tempos de retenção para cada composto de interesse. É importante referir que o tempo de retenção pode variar ligeiramente com o tipo de matriz, sendo este mais um fator de apoio à utilização de curvas de calibração para cada matriz. Os resultados que se encontram na Tabela 4.8 resultam do registo dos tempos de retenção da análise das amostras em condições de precisão intermédia ao nível do LOQ, sendo esta a abordagem considerada com maior variabilidade. Observa-se assim que o coeficiente de variação é inferior ao estabelecido, pelo que se comprova a seletividade e consistência do método analítico.

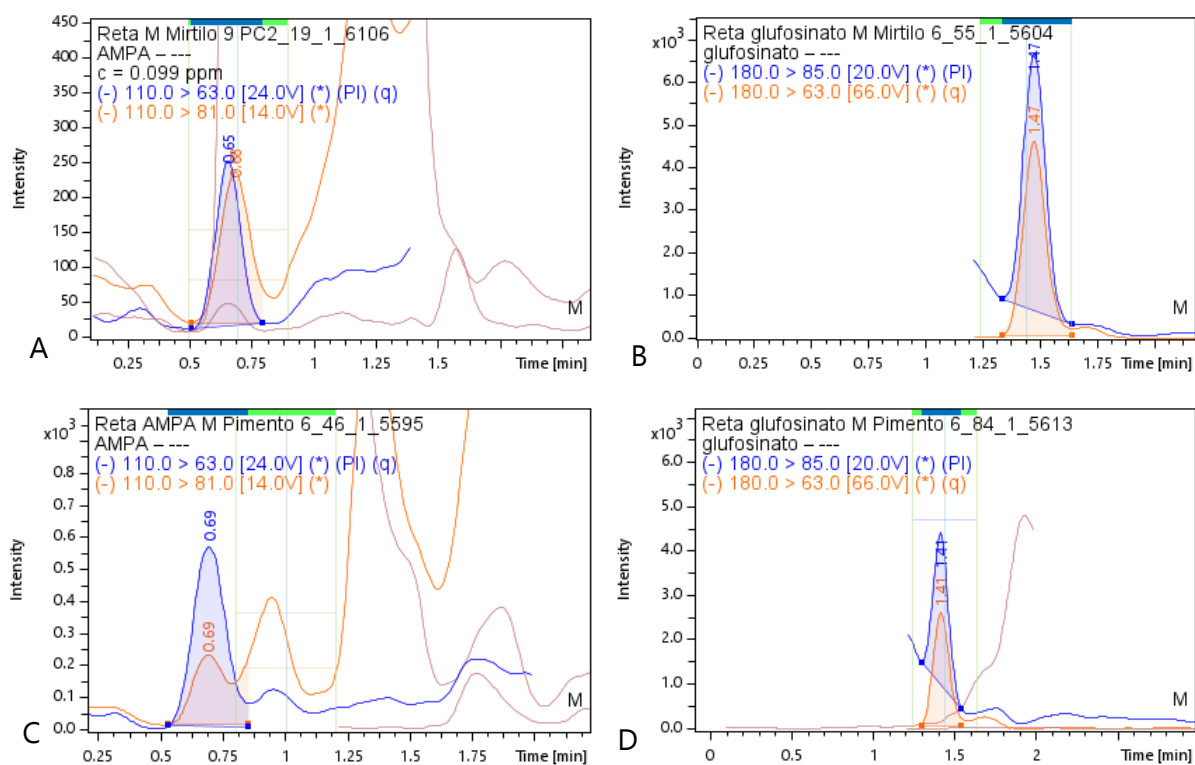


Figura 4.9 - Representação do cromatograma do ponto PC2, que corresponde a uma concentração de 0,1 $\mu\text{g/ml}$, da reta de calibração em matriz: AMPA na Matriz Mirtilo (A), Glufosinato na Matriz Mirtilo (B), AMPA na Matriz Pimento (C), Glufosinato na Matriz Pimento (D)

Tabela 4.8 - Tempo de retenção para 0,01 mg/kg

	AMPA		Glufosinato	
	Mirtilo	Pimento	Mirtilo	Pimento
Média	0,61	0,67	0,87	0,81
Desvio Padrão	0,03	0,06	0,02	0,04
CV_{TR} %	5,54	8,96	2,17	5,50

A especificidade e seletividade do método também pode ser avaliada através dos resultados dos ensaios de recuperação, pelo que se as percentagens de recuperação permanecerem entre o intervalo esperado e o coeficiente de variação for inferior a 20%, pode-se concluir que o método analítico é capaz de determinar o analito de interesse, sem interferências de outros componentes que estejam presentes na Matriz. Os resultados do ensaio de recuperação estão mencionados mais à frente na Tabela 4.15.

Por fim, avaliou-se também a razão iónica para ambos os compostos nas matrizes em estudo. Na Tabela 4.9 apresentam-se os resultados obtidos, sendo que estes apresentam

alguma variedade devido aos problemas com a deterioração da coluna Hypercarb. O efeito matriz também influencia fortemente a razão iónica. Contudo, concluiu-se que o método era específico e seletivo devido aos pontos apresentados anteriormente.

Tabela 4.9 - Resultados da Razão iónica

	AMPA		Glufosinato	
	Mirtilo	Pimento	Mirtilo	Pimento
Média RI	105,29	65,26	148,16	122,62
Desvio Padrão	16,81	11,06	23,43	18,90
CV_{RI} %	15,97	16,95	15,81	15,42

4.4.3 Limiares Analíticos

Os limiares analíticos de deteção e quantificação calculados através do desvio padrão residual das curvas de calibração, conforme explicado no capítulo 2.3.2.2, encontram-se na Tabela 4.10. Para a análise destes resultados, é importante lembrar que uma leitura inferior ao limite de deteção não permite afirmar a ausência do analito de interesse na amostra.

Tabela 4.10 - Cálculo dos Limiares analíticos pelo desvio padrão residual da curva de calibração

	AMPA		Glufosinato	
	Mirtilo	Pimento	Mirtilo	Pimento
LOD (mg/kg)	0,009	0,005	0,003	0,011
LOQ (mg/kg)	0,028	0,016	0,010	0,034

Através da análise da Tabela 4.10, observa-se que apenas a análise de glufosinato na matriz de mirtilo, não apresenta um LOD e um LOQ superior ao padrão de menor concentração da gama de trabalho, 0,01 mg/kg.

Os limiares analíticos calculados através desta abordagem, normalmente, não são inferiores ao primeiro ponto da reta de calibração, pelo que o critério não é cumprido. No entanto, não foi necessário proceder a alterações na gama de trabalho, pois é possível confirmar experimentalmente que o LOQ do método cumpre o critério de aceitação, através de ensaios de repetibilidade com amostras fortificadas com o padrão de menor concentração. Os resultados

desta análise encontram-se na Tabela 4.11. No Apêndice B, encontram-se os dados utilizados no cálculo dos limiares analíticos. O coeficiente de variação cumpre o critério de aceitação ao ser inferior a 10%. Posto isto, afirma-se que o limite de detecção e o limite de quantificação do método analítico correspondem a 0,003 e 0,010 mg/kg, respetivamente.

Tabela 4.11 - Cálculo dos Limiares analíticos pela análise de brancos de matriz fortificados

	AMPA		Glufosinato	
	Mirtilo	Pimento	Mirtilo	Pimento
LOD (mg/kg)	0,003	0,003	0,003	0,003
LOQ (mg/kg)	0,009	0,010	0,010	0,008
CV _r (%)	9,250	9,786	9,933	7,678

4.4.4 Precisão

A precisão do método foi avaliada em condições de repetibilidade e precisão intermédia, para as duas matrizes em estudo, mirtilo e pimento vermelho. A precisão do equipamento foi avaliada em condições de repetibilidade também para ambas as matrizes.

Repetibilidade do equipamento

A repetibilidade do equipamento foi determinada com base na análise de dez réplicas do ensaio para o primeiro ponto de calibração, 0,01 mg/kg e para o último ponto de calibração, 0,2 mg/kg. Na Tabela 4.12 encontram-se os resultados obtidos para a repetibilidade do equipamento para ambos os analitos nas matrizes em estudo. Os resultados completos encontram-se no apêndice C.

Tabela 4.12 - Resumo dos resultados obtidos no estudo da repetibilidade do equipamento.

	AMPA				Glufosinato			
	Mirtilo		Pimento		Mirtilo		Pimento	
Concentração, mg/kg	0,010	0,200	0,010	0,200	0,010	0,200	0,010	0,200
Desvio padrão, S _r	0,006	0,015	0,002	0,009	0,002	0,029	0,001	0,017
Média, \bar{x}	0,013	0,212	0,011	0,206	0,010	0,187	0,010	0,206
Limite de repetibilidade, r	0,004	0,041	0,004	0,026	0,004	0,082	0,004	0,046
CV _r , %	12,31	6,89	14,52	4,56	16,78	15,60	13,58	8,04
Critério de aceitação	CV _R < 20%							

Através da análise da Tabela 4.12, observa-se que o coeficiente de variação tanto para o AMPA como para o glufosinato é inferior ao critério de aceitação de 20%, pelo que é possível afirmar que a análise instrumental permite obter resultados precisos para ambas as matrizes. Como era de se esperar, o equipamento apresenta uma maior precisão a concentrações mais elevadas, contando com coeficientes de variação entre 4,56% e 15,60%. Nas tabelas presentes no apêndice C observa-se que o limite de repetibilidade é cumprido.

Repetibilidade do método

A repetibilidade do método foi analisada através da realização de cinco ensaios de recuperação para dois níveis de fortificação, 0,01 e 0,05 mg/kg de AMPA e glufosinato para ambas as matrizes em estudo, pelo que os resultados completos se encontram no apêndice C. Na Tabela 4.13 encontram-se os resultados obtidos para a repetibilidade do método para ambos os analitos nas matrizes em estudo, pelo que se verifica que os coeficientes de variação de repetibilidade são inferiores a 20%, permitindo assim, afirmar que o método analítico apresenta boa repetibilidade. Novamente, o limite de repetibilidade é cumprido.

Tabela 4.13 - Resumo dos resultados obtidos no estudo da repetibilidade do método analítico.

	AMPA				Glufosinato			
	Mirtilo		Pimento		Mirtilo		Pimento	
Concentração, mg/kg	0,01	0,05	0,01	0,05	0,01	0,05	0,01	0,05
Desvio padrão, S_r	0,001	0,002	0,001	0,002	0,001	0,004	0,001	0,003
Média, \bar{x}	0,010	0,052	0,010	0,049	0,011	0,049	0,011	0,044
Limite de Repetibilidade, r	0,003	0,005	0,004	0,006	0,003	0,012	0,001	0,009
CV _R , %	10,88	3,38	13,87	4,05	10,03	8,42	4,53	7,67
Critério de aceitação	CV _R < 20%							

Precisão intermédia

A precisão intermédia do método foi analisada através da realização de cinco ensaios de fortificação para dois níveis, 0,01 e 0,05 mg/kg para cada matriz em dias diferentes, sendo que o analista se manteve. Os resultados obtidos para a análise da precisão intermédia do método encontram-se resumidos na Tabela 4.14, pelo que se verifica que os coeficientes de variação da precisão intermédia são inferiores a 20%, permitindo assim, afirmar que em condições de precisão intermédia, o método permite obter resultados fiáveis. Como era esperado, os resultados obtidos em condições de precisão intermédia apresentam coeficientes de variação superiores aos obtidos em condições de repetibilidade.

Tabela 4.14 - Resumo dos resultados obtidos no estudo da precisão intermédia do método analítico.

	AMPA				Glufosinato			
	Mirtilo		Pimento		Mirtilo		Pimento	
Concentração, mg/kg	0,01	0,05	0,01	0,05	0,01	0,05	0,01	0,05
Média, \bar{x}	0,010	0,052	0,010	0,049	0,010	0,048	0,011	0,047
Desvio padrão da Precisão Intermédia, S_{PI}	0,001	0,003	0,001	0,002	0,001	0,004	0,001	0,005
Limite da precisão intermédia, PI	0,004	0,010	0,004	0,006	0,003	0,012	0,002	0,013
CV _{PI} , %	13,54	6,40	14,01	4,59	11,49	8,94	7,39	9,54
Critério de aceitação	CV _{PI} < 20%							

4.4.5 Exatidão

Como referido anteriormente, a exatidão do método foi avaliada através da realização de ensaios de recuperação com amostras fortificadas em dois níveis, 0,01 e 0,05 mg/kg, sendo que o primeiro valor corresponde ao nível do LOQ e o segundo corresponde a cinco vezes o valor do LOQ. A taxa de recuperação foi calculada através da equação 2.18. Na Tabela 4.15 apresenta-se o resumo dos resultados obtidos durante os ensaios de recuperação, pelo que os dados completos estão disponíveis no apêndice D.

Tabela 4.15 - Resumo dos resultados obtidos na realização dos ensaios de recuperação.

	AMPA		Glufosinato	
	Mirtilo	Pimento	Mirtilo	Pimento
Média, $\% \bar{R}$	100,2	98,3	98,4	102,2
Desvio padrão, S_{Recup}	10,8	10,0	10,1	11,6
$\% CV_{Recup}$	10,8	10,2	10,3	11,3
Taxa de Recuperação Mínima (%)	73	72	85	82
Taxa de Recuperação Máxima (%)	115	116	118	119
Critério de aceitação	Recuperação entre 70 e 120%			

Segundo o guia SANTE/11312/2021 [110], para aceitação dos resultados, as percentagens de recuperação devem estar compreendidas entre 70 e 120%. Através da Tabela 4.15, verifica-se que para o AMPA a percentagens de recuperação são entre 72 e 116% e, para o glufosinato são entre 82 e 119%, cumprindo assim o critério de aceitação imposto. Os coeficientes de variação dos resultados são também inferiores a 20%, o que comprova a baixa dispersão de resultados. Posto isto, fica então comprovada a capacidade do método em recuperar

estes analitos nas matrizes estudadas. De uma maneira geral os resultados para os compostos em análise foram relativamente satisfatórios, cumprido todos os critérios de aceitação para a validação.

4.4.6 Estimativa da Incerteza do Método

A estimativa da incerteza do método foi calculada através das equações descritas no capítulo 2.3.5, através da abordagem baseada em dados obtidos durante a validação do método analítico. Tendo por base os guias SANTE/11312/2021 [110] e Relacre 31 [118], o critério de aceitação definido foi que a incerteza expandida deve ser inferior a 50%.

Na Tabela 4.16, encontram-se os resultados obtidos para as incertezas associadas à precisão e exatidão, obtidas pelos ensaios de recuperação, assim como a incerteza combinada e a incerteza expandida. É importante referir que a incerteza do método foi apenas determinada para o nível do LOQ, tendo este sido considerado como o pior cenário.

Tabela 4.16 - Resultados obtidos na avaliação da incerteza expandida do método analítico.

	AMPA		Glufosinato	
	Mirtilo	Pimento	Mirtilo	Pimento
U_{precisão} (%)	13,06	13,79	11,54	8,14
U_{exatidão} (%)	3,98	4,29	3,66	2,83
U_{combinada} (%)	13,65	14,44	12,11	8,62
U_{expandida} (%)	27,31	28,87	24,21	17,23
Critério de aceitação	$U_{\text{expandida}} (\%) \leq 50 \%$			

Através da análise da Tabela 4.16, observa-se que para ambos os analitos nas matrizes em estudo, a incerteza expandida é inferior a 50%, pelo que cumprem o critério imposto. Verifica-se também uma maior incerteza no método na determinação do AMPA, com uma incerteza expandida de 28,87%, quando comparada com o glufosinato, com uma incerteza expandida de 24,21%. Uma das causas desta diferença poderá ter a ver com o AMPA ser um resíduo mais difícil de determinar devido ao seu tamanho reduzido, quando comparado ao do herbicida glufosinato.

4.4.7 Efeito Matriz

De forma a avaliar o efeito matriz, foram construídas as curvas de calibração em solvente e em extrato das matrizes em estudo, conforme explicado nos capítulos 3.5.3 e 3.5.4. Os dados obtidos para a elaboração da curva de calibração em solvente encontram-se no Apêndice A.

Na Figura 4.10 é possível observar a representação gráfica de ambas as curvas de calibração, pelo que se observa a supressão do sinal analítico da curva de calibração em matriz, quando comparado com a curva de calibração em solvente.

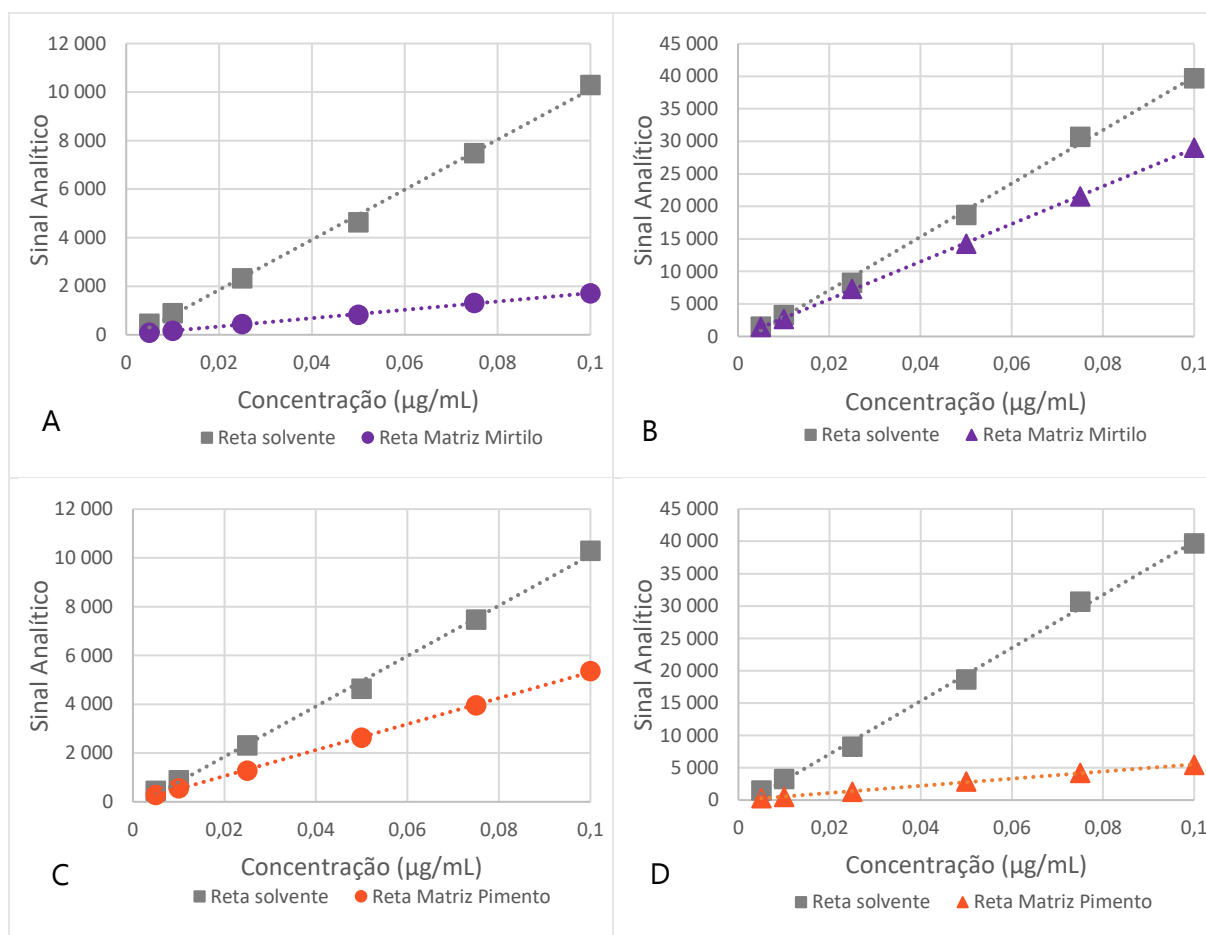


Figura 4.10 - Representação gráfica do efeito Matriz: AMPA na Matriz Mirtilo (A), Glufosinato na Matriz Mirtilo (B), AMPA na Matriz Pimento (C), Glufosinato na Matriz Pimento (D).

Posto isto, procedeu-se ao cálculo do efeito matriz através da equação 2.7. Através da análise da Tabela 4.17, confirma-se pelo sinal negativo do valor de efeito matriz que existe supressão do sinal em ambas as matrizes. Pode-se concluir que por os valores obtidos serem superiores a 20% têm impacto na análise, pelo que não podem ser desprezados. Para ambas

as matrizes na análise de AMPA e na matriz de pimento vermelho na análise de glufosinato verificam-se fortes efeitos matriz, segundo os resultados obtidos na Tabela 4.17.

Como referido no capítulo 2.2.3, e dada a indisponibilidade de utilizar IS-IL, de forma a minimizar os efeitos matriz na análise, as curvas de calibração devem ser realizadas em extratos da matriz em estudo.

Tabela 4.17 - Resultados do cálculo do Efeito Matriz.

	AMPA		Glufosinato	
	Mirtilo	Pimento	Mirtilo	Pimento
Declive reta solvente	$1,03 \times 10^5$		$4,10 \times 10^5$	
Declive reta extrato	$1,72 \times 10^4$	$5,32 \times 10^4$	$2,90 \times 10^5$	$5,53 \times 10^4$
Efeito Matriz (%)	-83,31	-48,45	-29,43	-86,53

Após a validação do método analítico, este poderá ser utilizado em rotina no laboratório da SGS. Procedeu-se assim à elaboração da Especificação Técnica de Serviço para determinação de pesticidas polares e contaminantes pelo método de extração QuPPE modificado em Frutos e Vegetais por LC-MS/MS, que se encontra no Apêndice E.

CONCLUSÕES E PROPOSTAS DE TRABALHO FUTURO

A análise de resíduos de pesticidas é realizada em vários laboratórios devido à necessidade de existir um controlo rigoroso destes compostos nos alimentos. A presença de resíduos de pesticidas em produtos alimentares apresenta impactos negativos na saúde dos seres humanos, sendo necessário desenvolver novas metodologias para promover a segurança alimentar e assegurar a confiança nos produtores.

A presente dissertação teve como principal objetivo a implementação e validação do método analítico para a determinação dos resíduos polares AMPA e glufosinato em matrizes alimentares de frutos e vegetais, por Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência acoplada à Espectrometria de Massa em *tandem* com ionização em *electrospray* (UHPLC-ESI-MS/MS), no laboratório da SGS em Portugal.

Durante o desenvolvimento do método cromatográfico, não foi possível encontrar as condições ótimas para utilizar a coluna que opera no modo HILIC, sendo que no final optou-se pela coluna Hypercarb. No estudo da otimização das energias de colisão, para introduzir no equipamento UHPLC-MS/MS, obtiveram-se resultados mais satisfatórios quando foram utilizadas energias de colisão mais baixas, entre 17 e 36 eV. Durante a etapa de otimização dos parâmetros da extração realizou-se um breve estudo da estabilidade das soluções de trabalho. Em duas semanas observou-se uma diminuição do sinal analítico de -25% para o AMPA e -19% para o glufosinato, sendo que se concluiu que as soluções de trabalho devem ser realizadas sempre que se inicia um ensaio de quantificação destes analitos.

Em relação ao estudo da redução de temperatura dos extratos, não foi possível concluir que o tempo despendido no congelador tem uma influência no efeito matriz, sendo apenas possível verificar que o fundamental é haver a redução da temperatura dos extratos e

consequente precipitação dos componentes da matriz que interferem na análise. Posto isto, optou-se pela duração de 30 minutos de forma a minimizar o tempo de análise. Por fim, no estudo da etapa de diluição implementou-se a diluição dos extratos em água pois, apesar de apresentar resultados semelhantes com o solvente de extração de metanol acidificado, esta é uma opção mais sustentável.

O método foi validado para duas matrizes representativas dos grupos alimentares referidos, o mirtilo e o pimento vermelho. As curvas de calibração foram elaboradas em matriz e são constituídas por seis pontos distribuídos uniformemente ao longo da gama de trabalho estipulada (0,01 - 0,2 mg/kg). A validade da gama de trabalho foi avaliada pelo estudo da homogeneidade de variâncias, pelo que se considerou válida. O método apresenta um coeficiente de correlação entre 0,9992 e 0,9999 e um coeficiente de variação do método de 3,9%. Juntamente com a aplicação dos testes estatísticos de resíduos, Mandel e Rikilt, comprovou-se a linearidade do método.

Os limites de deteção e quantificação foram determinados por duas metodologias: a partir da reta de calibração, obtendo-se um LOD de 0,011 mg/kg e LOQ de 0,034 mg/kg, e partir dos estudos de repetibilidade que se obteve um LOD de 0,003 mg/kg e um LOQ de 0,010 mg/kg. Considerou-se que a melhor estimativa para o cálculo dos limiares analíticos seria através do estudo de repetibilidade do padrão de menor calibração.

A precisão do método foi avaliada em condições de repetibilidade e de precisão intermédia. Os coeficientes de variação obtidos em condições de repetibilidade foram entre 3,38% e 13,87% para o AMPA e entre 4,53% e 10,03% para o glufosinato. Em condições de precisão intermédia os coeficientes de variação situam-se entre 4,59% e 14,01% para o AMPA e 7,39% e 11,49% para o glufosinato. Como era esperado, os coeficientes de variação em condições de precisão intermédia são superiores aos obtidos em condições de repetibilidade. A precisão do equipamento foi avaliada em condições de repetibilidade, e obtiveram-se coeficientes de variação entre 4,56% e 14,52% para o AMPA e entre 8,04% e 16,78% para o glufosinato. Conclui-se assim que a precisão do método pois todos os coeficientes de variação obtidos são inferiores ao critério de aceitação de 20%.

Em relação à exatidão do método, esta foi avaliada através dos ensaios de recuperação pelo que se obtiveram taxas de recuperação entre 72% e 116% para o analito AMPA e entre 82% e 119% para o glufosinato, cumprindo o critério de aceitação dos resultados. Provou-se a seletividade e especificidade do método analítico através da observação da sobreposição dos picos cromatográficos dos iões quantificadores e qualificadores, da análise da variação

dos tempos de retenção e da realização dos ensaios de recuperação. Por fim, a incerteza expandida do método foi de 29%, sendo inferior ao critério de aceitação de 50%.

Os efeitos de matriz obtidos foram entre -86,53% e -29,43%, pelo que o sinal negativo confirma que existe supressão do sinal em ambas as matrizes. Conclui-se que existem efeitos de matriz significativos, sendo que para minimizar os efeitos matriz na análise, as curvas de calibração devem ser realizadas em extratos da matriz em estudo.

Em suma, os critérios necessários para a validação do método desenvolvido foram cumpridos, pelo que se conclui que o objetivo principal foi bem-sucedido. A metodologia pode ser implementada em rotina no laboratório da SGS, visto que demonstrou ser seletiva e específica, pelo que permite obter resultados viáveis, exatos e precisos.

Como perspectiva futura, sugere-se a avaliação de outras alternativas para a etapa de limpeza, como os MIPs ou o SPE de quitosano para minimizar os efeitos de matriz significativos. Em relação aos problemas observados na coluna Hypercarb, a utilização de uma pré-coluna poderia evitar a degradação da mesma, prolongando o seu tempo de vida. A participação em ensaios interlaboratoriais e a utilização de MCR devem ser propostos para aprofundar a análise da exatidão do método. Sugere-se também a avaliação detalhada da robustez do método de forma a entender os fatores que detêm maior influência.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] M. Prodhan, N. Syed, and M. Uddin, "Analytical Methods in Measuring Pesticides in Foods," in *Pesticide Residue in Foods: Sources, Management, and Control*, M. Khan and M. Rahman, Eds. Springer International Publishing, 2017, pp. 135–146. doi: 10.1007/978-3-319-52683-6.
- [2] A. Kader, "Importance of Fruits, Nuts, and Vegetables in Human Nutrition and Health," *Perishables Handling Quarterly*, no. 106, pp. 4–6, Apr. 2001.
- [3] H. Silva, D. Bedor, A. Cunha, H. Rodrigues, D. Telles, A Araújo, D. Santana, "Ethepon and fosetyl residues in fruits from São Francisco Valley, Brazil," *Food Additives and Contaminants: Part B*, vol. 13, no. 1, pp. 16–24, 2019, doi: 10.1080/19393210.2019.1675779.
- [4] F. Teixeira, "Utilização de Pesticidas Agrícolas," Lisboa, Apr. 2014.
- [5] Food and Agriculture Organization, "Guidelines for the Registration of Pesticides," *International Code of Conduct on the Distribution and Use of Pesticides*, pp. 1–42, Apr. 2010, [Online]. Available: http://www.who.int/whopes/resources/resources_2010/en/
- [6] A. Zhang, P. Sutar, Q. Bian, X. Fang, J. Ni, and H. Xiao, "Pesticide residue elimination for fruits and vegetables: the mechanisms, applications, and future trends of thermal and non-thermal technologies," *Journal of Future Foods*, vol. 2, no. 3, pp. 223–240, Sep. 2022, doi: 10.1016/j.jfutfo.2022.06.004.
- [7] V. Silva, H. Mol, P. Zomer, M. Tienstra, C. Ritsema, and V. Geissen, "Pesticide residues in European agricultural soils – A hidden reality unfolded," *Science of the Total Environment*, vol. 653, pp. 1532–1545, 2019, doi: 10.1016/j.scitotenv.2018.10.441.

- [8] A. Pérez and N. Eugenio, "Status of local soil contamination in Europe: Revision of the indicator 'Progress in the management contaminated sites in Europe,'" Luxembourg, 2018. doi: 10.2760/093804.
- [9] S. Mir, B. Dar, M. Mir, S. Sofi, M. Shah, T. Sidiq, K. Sunooj, A. Hamdani, A. Khaneghah, "Current strategies for the reduction of pesticide residues in food products," *Journal of Food Composition and Analysis*, vol. 106, Mar. 2022, doi: 10.1016/J.JFCA.2021.104274.
- [10] M. Sarwar, "The Dangers of Pesticides Associated with Public Health and Preventing of the Risks," *International Journal of Bioinformatics and Biomedical Engineering*, vol. 1, no. 2, pp. 130–136, 2015, [Online]. Available: <http://www.aiscience.org/journal/ijbbe>
- [11] Y. Zhang, Y. Dang, X. Lin, K. An, J. Li, and M. Zhang, "Determination of glyphosate and glufosinate in corn using multi-walled carbon nanotubes followed by ultra-high performance liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry," *Journal of Chromatography A*, vol. 1619, 2020, doi: 10.1016/j.chroma.2020.460939.
- [12] L. Cabrera and P. Pastor, "The 2019 European Union report on pesticide residues in food," *EFSA Journal*, vol. 19, no. 4, pp. 1–89, Apr. 2021, doi: 10.2903/j.efsa.2021.6491.
- [13] E. Verdini and I. Pecorelli, "The Current Status of Analytical Methods Applied to the Determination of Polar Pesticides in Food of Animal Origin: A Brief Review," *Foods*, vol. 11, no. 10, pp. 1527–1541, May 2022, doi: 10.3390/foods11101527.
- [14] O. Golge, "Validation of Quick Polar Pesticides (QuPPE) Method for Determination of Eight Polar Pesticides in Cherries by LC-MS/MS," *Food Analytical Methods*, vol. 14, pp. 1432–1437, 2021, doi: 10.1007/s12161-021-01966-w.
- [15] E. Goncharova, M. Statkus, G. Tsizin, and R. Selimov, "HPLC Determination of Glyphosate, Aminomethylphosphonic Acid, and Glufosinate Using a Hypercarb Porous Graphite Adsorbent," *Vestnik Moskovskogo Universiteta*, vol. 73, no. 6, pp. 265–271, Nov. 2018, doi: 10.3103/S0027131418060056.
- [16] M. Anastassiades, A. Wachtler, D. Kolberg, E. Eichhorn, H. Marks, A. Benkenstein, S. Zechmann, D. Mack, C. Wildgrube, A. Barth, I. Sigalov, S. Gorlich, D. Dork, G. Cerchia, "Quick Method for the Analysis of Numerous Highly Polar Pesticides in Food Involving Extraction with Acidified Methanol and LC-MS/MS Measurement," *EURL-SRM*, ver. 12, pp. 1–86, 2020, [Online]. Available: www.eurl-pesticides.eu;
- [17] SGS Portugal S.A., "História do Grupo," 2020.
- [18] SGS, "SGS Group Profile," *Documento informativo do Grupo SGS*, 2020.
- [19] SGS Portugal S.A., "Análise a resíduos de pesticidas em frutas e legumes," 2017.

- [20] SGS Portugal, "Testes de contaminantes em alimentos." <https://www.sgs.pt/pt-pt/agriculture-food/food/food-contaminant-testing> (accessed Jul. 31, 2022).
- [21] P. Kaczyński, "Clean-up and matrix effect in LC-MS/MS analysis of food of plant origin for high polar herbicides," *Food Chemistry*, vol. 230, pp. 524–531, 2017, doi: 10.1016/j.foodchem.2017.03.091.
- [22] A. Schreiber and O. G. Cabrices, "Automated Derivatization, SPE Cleanup and LC-MS/MS Determination of Glyphosate and Other Polar Pesticides," Ontario, 2013.
- [23] European Food Safety Authority, "Conclusion on the peer review of the pesticide risk assessment of confirmatory data submitted for the active substance glufosinate," *EFSA Journal*, vol. 10, no. 3, Mar. 2012, doi: 10.2903/j.efsa.2012.2609.
- [24] L. Carvalho, *Herbicidas*, 1^o. Lages - SC, 2013.
- [25] Bayer CropScience Limited, "Harvest Safety Precautions," 2012.
- [26] K. Lewis, J. Tzilivakis, D. Warner, and A. Green, "An international database for pesticide risk assessments and management," *Human and Ecological Risk Assessment*, vol. 22, no. 4, pp. 1050–1064, May 2016, doi: 10.1080/10807039.2015.1133242.
- [27] S. Duke and F. Dayan, "Bioactivity of Herbicides," in *Comprehensive Biotechnology*, Second., vol. 4, M. Moo-Young, Ed. Elsevier Inc., 2011, pp. 23–35. doi: 10.1016/B978-0-08-088504-9.00273-7.
- [28] L. Costa and M. Aschner, "Toxicology of Pesticides," in *Reference Module in Biomedical Sciences*, Elsevier, 2014. doi: 10.1016/B978-0-12-801238-3.00208-7.
- [29] C. Cao, F. Cheng, Y. Xue, and Y. Zheng, "Efficient synthesis of L-phosphinothricin using a novel aminoacylase mined from *Stenotrophomonas maltophilia*," *Enzyme Microb Technology*, vol. 135, Apr. 2020, doi: 10.1016/j.enzmictec.2019.109493.
- [30] R. Shinde, N. Halim, and K. Banerjee, "Direct Analysis of Glyphosate, Glufosinate, and their Metabolites in Palm Oil Using Liquid Chromatography with Tandem Mass Spectrometry," *Journal of AOAC International*, vol. 103, no. 6, pp. 1528–1533, May 2020, doi: 10.1093/jaoacint/qsaa066/5836823.
- [31] Y. Zhang, K. Wang, J. Wu, and H. Zhang, "Field dissipation and storage stability of glufosinate ammonium and its metabolites in soil," *International Journal of Analytical Chemistry*, Oct. 2014, doi: 10.1155/2014/256091.
- [32] S. Singh, V. Kumar, J. Gill, S. Datta, S. Singh, V. Dhaka, D. Kapoor, A. Wani, D. Dhanjal, M. Kumar, S. Harikumar, J. Singh, "Herbicide glyphosate: Toxicity and microbial degradation," *International Journal of Environmental Research and Public Health*, vol. 17, no. 20, pp. 1–18, Oct. 2020, doi: 10.3390/ijerph17207519.

- [33] N. Chamkasem and T. Harmon, "Direct determination of glyphosate, glufosinate, and AMPA in soybean and corn by liquid chromatography/tandem mass spectrometry," *Analytical Bioanalytical Chemistry*, vol. 408, no. 18, pp. 4995–5004, Jul. 2016, doi: 10.1007/s00216-016-9597-6.
- [34] H. Martins-Júnior, D. Lebre, A. Wang, M. Pires, and O. Bustillos, "Residue Analysis of Glyphosate and Aminomethylphosphonic Acid (AMPA) in Soybean Using Liquid Chromatography Coupled with Tandem Mass Spectrometry," in *Soybean - Biochemistry, Chemistry and Physiology*, no. 7, N. Tzi-Bun, Ed. 2011, pp. 495–506. doi: 10.1002/rcm.3960.
- [35] G. Mérey, P. Manson, A. Mehrsheikh, P. Sutton, and S. Levine, "Glyphosate and aminomethylphosphonic acid chronic risk assessment for soil biota," *Environmental Toxicology and Chemistry*, vol. 35, no. 11, pp. 2742–2752, Nov. 2016, doi: 10.1002/etc.3438.
- [36] O. Junior, T. Santos, N. Brito, and M. Ribeiro, "Glifosato: Propriedades, Toxicidade, Usos e Legislação," *Química Nova*, vol. 25, no. 4, pp. 589–593, 2002.
- [37] F. Botta, G. Lavison, G. Couturier, F. Alliot, E. Moreau-Guigon, N. Fauchon, B. Guery, M. Chevreuil, H. Blanchoud, "Transfer of glyphosate and its degradate AMPA to surface waters through urban sewerage systems," *Chemosphere*, vol. 77, no. 1, pp. 133–139, 2009, doi: 10.1016/j.chemosphere.2009.05.008.
- [38] R. Vida and J. Portugal, "A fitossanidade da videira," in *Modos de ação dos Herbicidas*, Bayer CropScience, 2010, pp. 211–228. Accessed: Aug. 06, 2022. [Online]. Available: <http://hdl.handle.net/20.500.12207/5464>
- [39] "Glufosinate C₅H₁₂NO₄P - PubChem." <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Glufosinate#section=Solubility> (accessed Aug. 06, 2022).
- [40] "(Aminomethyl)phosphonic acid CH₆NO₃P - PubChem." https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Aminomethyl_phosphonic-acid (accessed Aug. 06, 2022).
- [41] H. Takano and F. Dayan, "Glufosinate-ammonium: a review of the current state of knowledge," *Pest Manag Sci*, vol. 76, no. 12, pp. 3911–3925, Dec. 2020, doi: 10.1002/ps.5965.
- [42] "AMPA CH₆NO₃P - ChemSpider." <http://www.chemspider.com/Chemical-Structure.13399.html> (accessed Aug. 06, 2022).
- [43] R. Bonansea, I. Filippi, D. Wunderlin, D. Marino, and M. Amé, "The fate of glyphosate and AMPA in a freshwater endorheic basin: An ecotoxicological risk assessment," *Toxics*, vol. 6, no. 1, Jan. 2018, doi: 10.3390/toxics6010003.

- [44] European Food Safety Authority, "Reasoned opinion on the review of the existing maximum residue levels (MRLs) for for glufosinate according to Article 12 of Regulation (EC) No 396/2005," *EFSA Journal*, vol. 13, no. 1, Jan. 2015, doi: 10.2903/j.efsa.2015.3950.
- [45] R. Vidal and J. Portugal, "A fitossanidade das pomóideas," in *Modos de ação dos herbicidas*, Bayer CropScience, 2013, pp. 269–288. Accessed: Aug. 06, 2022. [Online]. Available: <http://hdl.handle.net/20.500.12207/5462>
- [46] O. Júnior, T. Santos, and N. Ribeiro, "Métodos de extração e determinação do herbicida glifosato: breve revisão," *Química Nova*, vol. 25, no. 3, pp. 420–428, Sep. 2002.
- [47] A. Araújo, R. Monteiro, R. Abakerli, and L. Souza, "Biodegradação de glifosato em dois solos brasileiros," *Pesticidas: Revista de Ecotoxicologia e Meio Ambiente*, vol. 13, pp. 157–164, 2003.
- [48] International Agency for Research on Cancer, "Monograph on Glyphosate," 2016.
- [49] C. Bento, "Glyphosate and aminomethylphosphonic acid (AMPA) behavior in loess soils and off-site transport risk assessment," Research School for Socio Economic and Natural Sciences of the Environment (SENSE), Wageningen, 2018.
- [50] A. Roustan, M. Aye, M. Meo, and C. Giorgio, "Genotoxicity of mixtures of glyphosate and atrazine and their environmental transformation products before and after photoactivation," *Chemosphere*, vol. 108, pp. 93–100, 2014, doi: 10.1016/J.CHEMOSPHERE.2014.02.079.
- [51] S. Nitzko, E. Bahrs, and A. Spiller, "Pesticide residues in food and drinking water from the consumer's perspective: The relevance of maximum residue levels and product-specific differences," *Sustainable Production and Consumption*, vol. 30, pp. 787–798, Mar. 2022, doi: 10.1016/J.SPC.2022.01.016.
- [52] Parlamento Europeu, "Regulamento (UE) N° 845/2015 da Comissão de 27 de maio de 2017," *Jornal Oficial da União Europeia*, vol. 12, no. 7, May 2015.
- [53] Parlamento Europeu, "Regulamento (UE) N° 441/2012 da Comissão de 24 de maio de 2012," *Jornal Oficial da União Europeia*, vol. 10, no. 1, Jan. 2012.
- [54] European Food Safety Authority, "Review of the existing maximum residue levels for glyphosate according to Article 12 of Regulation (EC) No 396/2005 – revised version to take into account omitted data," *EFSA Journal*, vol. 17, no. 10, Oct. 2019, doi: 10.2903/j.efsa.2019.5862.
- [55] Parlamento Europeu, "Regulamento de Execução (UE) 2020/585 da Comissão de 27 de abril de 2020," *Jornal Oficial da União Europeia*, 2020, [Online]. Available:

https://ec.europa.eu/food/sites/food/files/plant/docs/pesticides_mrl_guidelines_wrk-doc_2019-12682.pdf

- [56] M. Ibáñez, "Multiresidue methods for pesticides and related contaminants in food," in *Liquid Chromatography: Applications*, Second Edition., S. Fanali, P. Haddad, C. Poole, and M.-L. Riekkola, Eds. Elsevier Inc., 2017, pp. 381–400. doi: 10.1016/B978-0-12-805392-8.00013-X.
- [57] R. Fussell and H. Hempstead, "Analytical Challenges for Pesticide Residue Analysis in Food: Sample Preparation, Processing, Extraction, and Cleanup," 2016. Accessed: Aug. 04, 2022. [Online]. Available: www.thermofisher.com/foodandbeverage
- [58] H. Guo, L. Riter, C. Wujcik, and D. Armstrong, "Direct and sensitive determination of glyphosate and aminomethylphosphonic acid in environmental water samples by high performance liquid chromatography coupled to electrospray tandem mass spectrometry," *Journal of Chromatography A*, vol. 1443, pp. 93–100, Apr. 2016, doi: 10.1016/j.chroma.2016.03.020.
- [59] S. Savini, M. Bandini, and A. Sannino, "An Improved, Rapid, and Sensitive Ultra-High-Performance Liquid Chromatography-High-Resolution Orbitrap Mass Spectrometry Analysis for the Determination of Highly Polar Pesticides and Contaminants in Processed Fruits and Vegetables.," *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 67, no. 9, pp. 2716–2722, Mar. 2019, doi: 10.1021/acs.jafc.8b06483.
- [60] M. Chiarello, M. Jiménez-Medina, J. Saéz, S. Moura, A. Frenich, and R. Romero-González, "Fast analysis of glufosinate, glyphosate and its main metabolite, aminomethylphosphonic acid, in edible oils, by liquid chromatography coupled with electrospray tandem mass spectrometry," *Food Additives and Contaminants - Part A*, vol. 36, no. 9, pp. 1376–1384, 2019, doi: 10.1080/19440049.2019.1631493.
- [61] J. Tadeo, Ed., *Analysis of Pesticides in Food and Environmental Samples*. Taylor & Francis, 2008.
- [62] Parlamento Europeu, "Regulamento (UE) n° 752/2014 da Comissão de 24 de junho de 2014," *Jornal Oficial da União Europeia*, vol. 15, no. 7, 2014.
- [63] E. Turiel and A. Martín-Esteban, "Sample Handling of Pesticides in Food and Environmental Samples," in *Analysis of Pesticides in Food and Environmental Samples*, J. Tadeo, Ed. Taylor & Francis, 2008, pp. 35–59.
- [64] A. Michelangelo, S. Lehotay, D. Štajnbaher, and F. Schenck, "Fast and Easy Multiresidue Method Employing Acetonitrile Extraction/Partitioning and 'Dispersive Solid-Phase Extraction' for the Determination of Pesticide Residues in Produce," *Journal of AOAC*

- International*, vol. 86, no. 2, pp. 412–431, 2003, [Online]. Available: <https://academic.oup.com/jaoac/article-abstract/86/2/412/5656996>
- [65] V. Cutillas and A. R. Fernández-Alba, "Analysis by LC-MS/MS of polar pesticides in fruits and vegetables using new hybrid stationary phase," *MethodsX*, vol. 8, 2021, doi: 10.1016/j.mex.2021.101306.
- [66] T. Arkan and I. Molnár-Perl, "The role of derivatization techniques in the analysis of glyphosate and aminomethyl-phosphonic acid by chromatography," *Microchemical Journal*, vol. 121, pp. 99–106, Jul. 2015, doi: 10.1016/J.MICROC.2015.02.007.
- [67] M. X. Chen, Z. Y. Cao, Y. Jiang, and Z. W. Zhu, "Direct determination of glyphosate and its major metabolite, aminomethylphosphonic acid, in fruits and vegetables by mixed-mode hydrophilic interaction/weak anion-exchange liquid chromatography coupled with electrospray tandem mass spectrometry," *Journal of Chromatography A*, vol. 1272, pp. 90–99, Jan. 2013, doi: 10.1016/j.chroma.2012.11.069.
- [68] M. Jansons, I. Pugajeva, V. Bartkevics, and H. Karkee, "LC-MS/MS characterisation and determination of dansyl chloride derivatised glyphosate, aminomethylphosphonic acid (AMPA), and glufosinate in foods of plant and animal origin," *Journal of Chromatography B*, vol. 1177, Jul. 2021, doi: 10.1016/j.jchromb.2021.122779.
- [69] Y. Han L. Song, P. Zhao, Y. Li, N. Zou, Y. Qin, X. Li, C. Pan, "Residue determination of glufosinate in plant origin foods using modified Quick Polar Pesticides (QuPPE) method and liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry," *Food Chemistry*, vol. 197, pp. 730–736, Apr. 2016, doi: 10.1016/j.foodchem.2015.11.021.
- [70] O. Shimelis, "LC-MS/MS Method for Determination of Glyphosate, AMPA, and Glufosinate in Cereals Sample Preparation for Beer," *Chromatography Today*, no. May-June, pp. 34–39, 2019.
- [71] K. Puzio, B. Claude, L. Amalric, C. Berho, E. Grellier, S. Bayouhd, R. Nehmé, P. Morin, "Molecularly imprinted polymer dedicated to the extraction of glyphosate in natural waters," *Journal of Chromatography A*, vol. 1361, pp. 1–8, Sep. 2014, doi: 10.1016/J.CHROMA.2014.07.043.
- [72] S. Farooq, J. Nie, Y. Cheng, Z. Yan, J. Li, S. Bacha, A. Mushtaq, H. Zhang, "Molecularly imprinted polymers' application in pesticide residue detection," *Analyst*, vol. 143, no. 17, pp. 3971–3989, 2018, doi: 10.1039/c8an00907d.
- [73] O. Núñez, H. Gallart-Ayala, C. Martins, and P. Lucci, "New trends in fast liquid chromatography for food and environmental analysis," *Journal of Chromatography A*, vol. 1228, pp. 298–323, Mar. 2012, doi: 10.1016/j.chroma.2011.10.091.

- [74] L. Cabrera, S. Caldas, O. Prestes, E. Primel, and R. Zanella, "Evaluation of alternative sorbents for dispersive solid-phase extraction clean-up in the QuEChERS method for the determination of pesticide residues in rice by liquid chromatography with tandem mass spectrometry," *Journal of Separation Science*, vol. 39, no. 10, pp. 1945–1954, 2016, doi: 10.1002/jssc.201501204.
- [75] J. Arias, C. Rombaldi, S. Caldas, and E. Primel, "Alternative sorbents for the dispersive solid-phase extraction step in quick, easy, cheap, effective, rugged and safe method for extraction of pesticides from rice paddy soils with determination by liquid chromatography tandem mass spectrometry," *Journal of Chromatography A*, vol. 1360, pp. 66–75, 2014, doi: 10.1016/j.chroma.2014.07.082.
- [76] C. Ferrer, A. Lozano, A. Agüera, A. Girón, and A. Fernández-Alba, "Overcoming matrix effects using the dilution approach in multiresidue methods for fruits and vegetables," *Journal of Chromatography A*, vol. 1218, no. 42, pp. 7634–7639, Oct. 2011, doi: 10.1016/j.chroma.2011.07.033.
- [77] S. Adams, J. Guest, M. Dickinson, R. Fussell, J. Beck, and F. Schoutsen, "Development and Validation of Ion Chromatography-Tandem Mass Spectrometry-Based Method for the Multiresidue Determination of Polar Ionic Pesticides in Food," *Journal Agricultural and Food Chemistry*, vol. 65, no. 34, pp. 7294–7304, Aug. 2017, doi: 10.1021/acs.jafc.7b00476.
- [78] AFFINISEP, "AFFINIMIP SPE Glyphosate and AMPA Analysis," 2020. [Online]. Available: www.affinisep.com
- [79] F. Lanças, "A cromatografia líquida moderna e a espectrometria de massas: Finalmente 'compatíveis'?", *Scientia Chromatographica*, vol. 1, no. 2, pp. 27–46, 2009, [Online]. Available: <http://doi.editoracubo.com.br/10.4322/sc.2013.005>
- [80] S. Hird, "Analysis of Pesticides by Chromatographic Techniques Coupled with Mass Spectrometry," in *Analysis of Pesticides in Food and Environmental Samples*, J. Tadeo, Ed. Taylor & Francis Group, LLC, 2008, pp. 59–94.
- [81] M. McMaster, *LC/MS: A Practical User's Guide*. Hoboken, Nova Jersey, USA: John Wiley & Sons, Inc., 2005.
- [82] A. Krueve *et al.*, "Tutorial review on validation of liquid chromatography-mass spectrometry methods: Part I," *Analytica Chimica Acta*, vol. 870, pp. 29–44, 2015, doi: 10.1016/j.aca.2015.02.017.
- [83] R. E. Ardrey, *Liquid chromatography-mass spectrometry: an introduction*. J. Wiley, 2003.

- [84] P. Lucci, R. Busquets, and O. Núñez, "UHPLC–MS(/MS) Analysis of Pesticides in Food," in *Ultra Performance Liquid Chromatography Mass Spectrometry*, Mu. Naushad and M. R. Khan, Eds. Boca Raton: CRC Press, 2014, pp. 33–66. doi: 10.1201/b16670-7.
- [85] M. Khan, M. Naushad, and Z. Alothman, "History and Introduction of UPLC/MS," in *Ultra Performance Liquid Chromatography Mass Spectrometry*, M. Naushad and M. Khan, Eds. Taylor & Francis Group, 2014, pp. 1–17. doi: 10.1201/b16670.
- [86] D. Skoog, J. Holler, and S. Crouch, *Principles of Instrumental Analysis*, Seventh Edition., no. 3. Cengage Learning, 2016.
- [87] J. Lozano-Sánchez, I. Borrás-Linares, A. Sass-Kiss, and A. Segura-Carretero, "Chromatographic Technique: High-Performance Liquid Chromatography (HPLC)," in *Modern Techniques for Food Authentication*, D.-W. Sun, Ed. Elsevier, 2018, pp. 459–526. doi: 10.1016/b978-0-12-814264-6.00013-x.
- [88] D. Harvey, *Modern Analytical Chemistry*. McGraw-Hill, 2000.
- [89] L. Maldaner and I. Jardim, "O estado da arte da cromatografia líquida de ultra eficiência," *Química Nova*, vol. 32, no. 1, pp. 214–222, 2009.
- [90] G. Chawla and C. Ranjan, "Principle, Instrumentation, and Applications of UPLC: A Novel Technique of Liquid Chromatography," *Open Chemistry Journal*, vol. 3, no. 1, pp. 1–16, May 2016, doi: 10.2174/1874842201603010001.
- [91] M. W. Dong, *HPLC and UHPLC for Practicing Scientists*, Second Edition. John Wiley & Sons, Inc, 2019. [Online]. Available: www.wiley.com.
- [92] Ł. Rajski, F. Galiano, V. Cutillas, and A. Fernández-Alba, "Coupling ion chromatography to Q-orbitrap for the fast and robust analysis of anionic pesticides in fruits and vegetables," *Journal of AOAC International*, vol. 101, no. 2, pp. 352–360, 2018, doi: 10.5740/jaoacint.17-0410.
- [93] K. Granby, S. Johannesen, and M. Vahl, "Analysis of glyphosate residues in cereals using liquid chromatography-mass spectrometry (LC-MS/MS)," *Food Additives and Contaminants*, vol. 20, no. 8, pp. 692–698, Aug. 2003, doi: 10.1080/0265203031000109477.
- [94] S. Herrera López, J. Scholten, B. Kiedrowska, and A. de Kok, "Method validation and application of a selective multiresidue analysis of highly polar pesticides in food matrices using hydrophilic interaction liquid chromatography and mass spectrometry," *Journal Chromatography A*, vol. 1594, pp. 93–104, 2019, doi: 10.1016/j.chroma.2019.02.024.
- [95] Thermo Scientific, "LC Columns and Accessories - Hypercarb HPLC Columns," 2014. Accessed: Aug. 20, 2022. [Online]. Available: www.thermoscientific.com/chromatography

- [96] L. Pereira, "Porous graphitic carbon as a stationary phase in HPLC: Theory and applications," *Journal of Liquid Chromatography Related Technologies*, vol. 31, no. 11, pp. 1687–1731, Jan. 2008, doi: 10.1080/10826070802126429.
- [97] C. West, C. Elfakir, and M. Lafosse, "Porous graphitic carbon: A versatile stationary phase for liquid chromatography," *Journal of Chromatography A*, vol. 1217, no. 19, pp. 3201–3216, May 2010, doi: 10.1016/j.chroma.2009.09.052.
- [98] Thermo Scientific, "Thermo Scientific Hypercarb Columns Applications," 2009.
- [99] W. Broer, U. Chiuminato, J. Stahl-Zeng, D. Mcmillan, and P. Taylor, "A Robust and Sensitive Method for the Direct Analysis of Polar Pesticides in Food and Environmental Samples Without Derivatization the Challenge of Polar Pesticides," 2018.
- [100] T. E. Bapiro, F. M. Richards, and D. I. Jodrell, "Understanding the Complexity of Porous Graphitic Carbon (PGC) Chromatography: Modulation of Mobile-Stationary Phase Interactions Overcomes Loss of Retention and Reduces Variability," *Analytical Chemistry*, vol. 88, no. 12, pp. 6190–6194, Jun. 2016, doi: 10.1021/acs.analchem.6b01167.
- [101] J. Dias, S. López, H. Mol, and A. Kok, "Influence of different hydrophilic interaction liquid chromatography stationary phases on method performance for the determination of highly polar anionic pesticides in complex feed matrices," *Journal of Separation Science*, vol. 44, no. 11, pp. 2165–2176, 2021, doi: 10.1002/jssc.202001134.
- [102] E. Grumbach, D. Diehl, B. Alden, P. Iraneta, U. Neue, and J. Mazzeo, "Hydrophilic Interaction Chromatography (HILIC) for small molecules: retaining very polar analytes," *Chemistry Applied Technologies*. Waters Corporation, Nice, Jun. 2003.
- [103] P. Jandera, "Stationary and mobile phases in hydrophilic interaction chromatography: A review," *Analytica Chimica Acta*, vol. 692, no. 1–2, pp. 1–25, 2011, doi: 10.1016/j.aca.2011.02.047.
- [104] F. M. Lanças, "Cromatografia Líquida com Interação Hidrofílica (HILIC)," *Scientia Chromatographica*, vol. 2, no. 1, pp. 49–57, 2010.
- [105] X. Zhang, "Mass spectrometry for food quality and safety evaluation," in *Evaluation Technologies for Food Quality*, J. Zhong and X. Wang, Eds. Elsevier, 2019, pp. 405–438. doi: 10.1016/B978-0-12-814217-2.00016-0.
- [106] N. B. Cech and C. G. Enke, "Practical implications of some recent studies in electrospray ionization fundamentals," *Mass Spectrometry Reviews*, vol. 20, no. 6, pp. 362–387, 2001, doi: 10.1002/MAS.10008.
- [107] A. L. Rockwood, M. M. Kushnir, and N. J. Clarke, "Mass spectrometry," in *Principles and Applications of Clinical Mass Spectrometry: Small Molecules, Peptides, and Pathogens*,

- N. Rifai, A. Horvath, and C. Wittwer, Eds. Elsevier, 2018, pp. 33–65. doi: 10.1016/B978-0-12-816063-3.00002-5.
- [108] F. M. Lanças, “A cromatografia líquida moderna e a espectrometria de massas: Finalmente ‘compatíveis’? II. A escolha do analisador de massas,” *Scientia Chromatographica*, vol. 5, no. 1, pp. 27–46, 2013, doi: 10.4322/sc.2013.005.
- [109] A. Siteo, “Identificação e Caracterização por Espectrometria de Massa com Ionização por Electrospray de Antimaláricos que atuam na Cadeia Mitocondrial de transporte de eletrões,” Doutoramento em Farmácia, Universidade de Lisboa - Faculdade de Farmácia, 2015.
- [110] T. Pihlstrom, A. Fernández-Alba, M. Gamón, C. Amate, M. Poulsen, R. Lippold, M. Anastasiades, “Analytical quality control and method validation procedures for pesticide residues analysis in food and feed SANTE 11312/2021,” 2021. Accessed: Apr. 28, 2022. [Online]. Available: https://food.ec.europa.eu/system/files/2022-02/pesticides_mrl_guidelines_wrkdoc_2021-11312.pdf
- [111] T. N. Rao, “Validation of analytical methods,” in *Calibration and Validation of Analytical Methods - A Sampling of Current Approches*, M. Stauffer, Ed. 2018. doi: 10.5772/intechopen.72087.
- [112] B. Magnusson and U. Örnemark, *Eurachem Guide: The fitness for purpose of analytical methods: a laboratory guide to method validation and related topics*, Second edition. 2014. Accessed: Jun. 20, 2022. [Online]. Available: www.eurachem.org
- [113] RELACRE, “Guia RELACRE 13 - Validação de métodos internos de ensaio em análise química,” 2000. [Online]. Available: <https://www.relacre.pt/assets/relacreassets/files/commissionsandpublications/Guia>
- [114] J. Peris-Vicente, J. Esteve-Romero, and S. Carda-Broch, “Validation of Analytical Methods Based on Chromatographic Techniques: An Overview,” in *Analytical Separation Science*, First Edition., J. Anderson, A. Berthod, V. Estévez, and A. Stalcup, Eds. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2015.
- [115] A. Krueve, R. Rebane, K. Kipper, M. Oldekop, H. Evard, K. Herodes, P. Ravio, I. Leito, “Tutorial review on validation of liquid chromatography-mass spectrometry methods: Part II,” *Analytica Chimica Acta*, vol. 870, no. 1. Elsevier, pp. 8–28, 2015. doi: 10.1016/j.aca.2015.02.016.
- [116] L. Alder, A. Patey, H. Schee, and S. Schoeneweiss, “Estimation of Measurement Uncertainty in Pesticide Residue Analysis,” *J AOAC Int*, vol. 84, no. 5, pp. 1569–1579, 2001,

- [Online]. Available: <https://academic.oup.com/jaoac/article-abstract/84/5/1569/5656798>
- [117] Instituto Português de Acreditação (IPAC), "Guia para a quantificação de incerteza em ensaios químicos," 2007. [Online]. Available: www.ipac.pt
- [118] RELACRE, "Guia RELACRE 31 - Quantificação incerteza de medição em ensaios químicos e físico-químicos," 2018.
- [119] C. Martins and M. Godula, "LC-MS / MS analysis of polar pesticides in honey with QuPpe extraction," *Thermo Scientific Technical Note*, no. 664, 2017.
- [120] L. Manzano-Sánchez, J. Martínez-Martínez, I. Domínguez, J. Vidal, A. Frenich, and R. Romero-González, "Development and application of a novel pluri-residue method to determine polar pesticides in fruits and vegetables through liquid chromatography high resolution mass spectrometry," *Foods*, vol. 9, no. 5, pp. 553–566, 2020, doi: 10.3390/foods9050553.
- [121] D. Baker, E. Capodanno, and M. Levi, "Highly Polar Pesticide Multi-Residue Analysis in Food Safety by LC-MS / MS," *Shimadzu Application News*, pp. 1–6, 2015, Accessed: Jul. 08, 2022. [Online]. Available: https://www.shimadzu.com/an/sites/shimadzu.com.an/files/pim/pim_document_file/applications/application_note/12240/ego115089.pdf
- [122] B. Wuyts, E. Ross, E. McCall, S. Hird, D. Shah, and G. Cleland, "Determination of anionic polar pesticides in spinach using a novel HILIC column chemistry by LC-MS/MS," Milford, 2016.
- [123] L.-Z. Yang, Z. Man, X. Zhou, and F. Qin, "Direct Analysis of Glyphosate and Similar Polar Pesticides in Oatmeal by UHPLC-MS/MS," Shanghai, 2016.
- [124] Y. Nagatomi, T. Yoshioka, M. Yanagisawa, A. Uyama, and N. Mochizuki, "Simultaneous LC-MS/MS Analysis of Glyphosate, Glufosinate, and Their Metabolic Products in Beer, Barley Tea, and Their Ingredients," *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, vol. 77, no. 11, pp. 2218–2221, 2013. doi: 10.1271/bbb.130433.
- [125] B. Wuyts, D. Shah, E. Ross, S. Hird, G. Cleland, and G. Fujimoto, "Direct Analysis of Glyphosate, AMPA, and other Polar Pesticides in Food," Milford, 2019.
- [126] Thermo Fisher Scientific, "HILIC Separations: A Practical Guide to HILIC Mechanisms, Method Development and Troubleshooting," 2014.
- [127] M. Gomes, "Espectrometria de massa aplicada ao estudo da reacção de Maillard," Doutoramento em Química, Universidade de Lisboa - Faculdade de Ciências, 2007.

APÊNDICE: RETAS DE CALIBRAÇÃO

As retas de calibração em matriz foram elaboradas a partir de seis pontos distribuídos uniformemente ao longo da gama de trabalho estipulada. Na Tabela A.1 e na Tabela A.2 encontram-se os valores utilizados na construção das curvas de calibração para as matrizes de mirtilo e pimento vermelho.

Tabela A.1 - Retas de Calibração para o AMPA para as matrizes de Mirtilo e Pimento.

Pontos de calibração	Concentração		Sinal do Analito	
	µg/mL	mg/kg	Matriz Mirtilo	Matriz Pimento
1	0,005	0,01	78	281
2	0,01	0,02	162	564
3	0,025	0,05	444	1 279
4	0,05	0,1	824	2 632
5	0,075	0,15	1 314	3 955
6	0,1	0,2	1 707	5 358

Tabela A.2 - Retas de Calibração para o glufosinato para as matrizes de Mirtilo e Pimento.

Pontos de calibração	Concentração		Sinal do Analito	
	µg/mL	mg/kg	Matriz Mirtilo	Matriz Pimento
1	0,005	0,01	1 462	284
2	0,01	0,02	2 707	498
3	0,025	0,05	7 302	1 316
4	0,05	0,1	14 246	2 886
5	0,075	0,15	21 534	4 211
6	0,1	0,2	28 998	5 429

Tabela A.3 - Resultados obtidos pela aplicação do método mínimo dos quadrados para ambos os analitos.

	AMPA		Glufosinato	
	Mirtilo	Pimento	Mirtilo	Pimento
Coefficiente de correlação (R)	0,9995	0,9998	0,9999	0,9992
Coefficiente de determinação (R²)	0,9989	0,9996	0,9999	0,9984
Sensibilidade (e)	17 227	53 225	289 564	55 284
Desvio padrão residual da Reta (Sy/x)	24	42	150	95
Desvio padrão do declive (S_b)	280	500	1 769	1 124
Desvio padrão da ordenada na origem (S_a)	16	28	99	63
Desvio padrão do método (S_m)	0,0014	0,0008	0,0005	0,0017
Coefficiente de variação do método (CV_m) %	3,12	1,8	1,17	3,9

Apesar da quantificação realizar-se através das curvas de calibração em matriz, foi necessário elaborar as curvas de calibração em solvente para averiguar o efeito matriz. Na Tabela A.4 encontram-se os resultados das áreas dos picos cromatográficos obtidos.

Tabela A.4 - Curvas de calibração em solvente para o AMPA e glufosinato.

Pontos de calibração	Concentração		Áreas obtidas	
	µg/mL	mg/kg	AMPA	Glufosinato
1	0,005	0,01	449	1 509
2	0,01	0,02	882	3 283
3	0,025	0,05	2 320	8 256
4	0,05	0,1	4 635	18 668
5	0,075	0,15	7 479	30 690
6	0,1	0,2	10 297	39 699

Durante a validação da linearidade do método aplicaram-se os testes de resíduos e de Rikilt. Nas tabelas A.5, A.6 e A.7 encontram-se os valores obtidos que foram utilizados para a obtenção das figuras 4.7 e 4.8.

Tabela A.5 - Resultados obtidos na análise de resíduos para o analito AMPA e glufosinato

Análise de Resíduos	Concentração (µg/mL)	AMPA		Glufosinato	
		Mirtilo	Pimento	Mirtilo	Pimento
1	0,005	-2,65	7,99	6,96	4,39
2	0,010	-2,56	7,16	-3,83	-9,20
3	0,025	4,56	-3,45	2,01	-4,48
4	0,050	-3,66	-0,88	-1,05	4,57
5	0,075	2,18	-0,78	-0,47	1,67
6	0,100	-0,56	-0,78	0,42	-1,72

Tabela A.6 - Resultados obtidos pelo Teste de Rikilt para o analito AMPA

AMPA					
Teste de Rikilt	Concentração (µg/mL)	Mirtilo		Pimento	
		yi/xi	% yi/xi	yi/xi	% yi/xi
1	0,005	15 600	93	56 200	104
2	0,010	16 200	97	56 400	105
3	0,025	17 760	106	51 160	95
4	0,050	16 480	98	52 640	98
5	0,075	17 520	104	52 733	98
6	0,100	17 070	102	53 580	100
Fator de resposta (FR) médio		16 772		53 786	
Desvio Padrão do FR		826		2 099	
CV_{FR} (%)		4,92		3,90	

Tabela A.7 - Resultados obtidos pelo Teste de Rikilt para o analito glufosinato

Glufosinato					
Teste de Rikilt	Concentração (µg/mL)	Mirtilo		Pimento	
		yi/xi	% yi/xi	yi/xi	% yi/xi
1	0,005	292 400	102	56 800	104
2	0,010	270 700	95	49 800	91
3	0,025	292 080	102	52 640	96
4	0,050	284 920	100	57 720	106
5	0,075	287 120	100	56 147	103
6	0,100	289 980	101	54 290	99
Fator de resposta (FR) médio		286 200		54 566	
Desvio Padrão do FR		8 125		2 964	
CV_{FR} (%)		2,84		5,43	

APÊNDICE: LIMIARES ANALÍTICOS

Os limiares analíticos de detecção e quantificação calculados através da análise de 9 amostras fortificadas com o padrão de menor concentração, que corresponde a 0,01 mg/kg, conforme explicado no subcapítulo 2.3.2.2.

Tabela B.1 - Dados obtidos durante os ensaios de recuperação para determinar os limiares analíticos de detecção e quantificação experimentais.

Análise da Fortificada nível 1	Concentração estimada, mg/kg			
	AMPA		Glufosinato	
	Mirtilo	Pimento	Mirtilo	Pimento
1	0,009	0,011	0,010	0,011
2	0,011	0,011	0,011	0,011
3	0,010	0,011	0,011	0,010
4	0,010	0,011	0,009	0,011
5	0,010	0,010	0,011	0,011
6	0,009	0,008	0,010	0,009
7	0,011	0,011	0,009	0,012
8	0,009	0,010	0,010	0,012
9	0,010	0,008	0,009	0,011
Média	0,010	0,010	0,010	0,011
Desvio Padrão	0,0009	0,0010	0,001	0,001
CV (%)	9,250	9,786	9,933	7,678
LOD, mg/kg	0,003	0,003	0,003	0,003
LOQ, mg/kg	0,009	0,010	0,010	0,008

APÊNDICE: PRECISÃO

Tabela C.1- Resultados obtidos durante o estudo da repetibilidade do equipamento para o analito AMPA na matriz de Mirtilo

Matriz e Analito	Concentração teórica (mg/kg)	Concentração obtida, x_i (mg/kg)	$(x_i - \bar{x})$	Desvio padrão	Média, \bar{x}	Limite de Repetibilidade, r	CV%
Mirtilo - AMPA	0,010	0,012	0,000	0,002	0,013	0,004	12,31
		0,011	0,002				
		0,013	0,001				
		0,011	0,001				
		0,011	0,002				
		0,014	0,001				
		0,013	0,001				
		0,012	0,000				
		0,012	0,000				
	0,200	0,205	0,007	0,015	0,212	0,041	6,89
		0,222	0,010				
		0,216	0,003				
		0,230	0,018				
		0,196	0,016				
		0,211	0,001				
		0,181	0,031				
		0,224	0,012				
		0,218	0,006				
		0,217	0,005				

Tabela C.2 - Resultados obtidos durante o estudo da repetibilidade do equipamento para o analito AMPA na matriz de Pimento vermelho

Matriz e Analito	Concentração teórica (mg/kg)	Concentração obtida, x_i (mg/kg)	$(x_i - \bar{x})$	Desvio padrão	Média, \bar{x}	Limite de Repetibilidade, r	CV%
Pimento - AMPA	0,010	0,010	0,0005	0,0015	0,011	0,004	14,52
		0,010	0,0005				
		0,012	0,0011				
		0,012	0,0011				
		0,012	0,0011				
		0,010	0,0005				
		0,013	0,0027				
		0,008	0,0021				
		0,010	0,0005				
	0,008	0,0021					
	0,200	0,202	0,0047	0,0094	0,206	0,026	4,56
		0,216	0,0098				
		0,193	0,0127				
		0,208	0,0018				
		0,219	0,0130				
		0,198	0,0079				
		0,211	0,0050				
		0,198	0,0079				
		0,198	0,0079				
0,218		0,0114					

Tabela C.3 - Resultados obtidos durante o estudo da repetibilidade do equipamento para o analito Glufosinato na matriz de Mirtilo

Matriz e Analito	Concentração teórica (mg/kg)	Concentração obtida, x_i (mg/kg)	$(x_i - \bar{x})$	Desvio padrão	Média, \bar{x}	Limite de Repetibilidade, r	CV%
Mirtilo - Glufosinato	0,010	0,008	0,002	0,0016	0,010	0,004	16,78
		0,011	0,001				
		0,010	0,001				
		0,009	0,0003				

Tabela C.3 - Resultados obtidos durante o estudo da repetibilidade do equipamento para o analito Glufosinato na matriz de Mirtilo (continuação)

Matriz e Analito	Concentração teórica (mg/kg)	Concentração obtida, x_i (mg/kg)	$(x_i - \bar{x})$	Desvio padrão	Média, \bar{x}	Limite de Repetibilidade, r	CV%
Mirtilo - Glufosinato	0,010	0,009	0,0002	0,0016	0,010	0,004	16,78
		0,013	0,004				
		0,009	0,001				
		0,009	0,001				
		0,009	0,0004				
		0,008	0,002				
	0,200	0,217	0,030	0,0292	0,187	0,082	15,60
		0,180	0,007				
		0,160	0,027				
		0,214	0,027				
		0,225	0,038				
		0,175	0,012				
		0,183	0,004				
		0,215	0,028				
		0,148	0,039				
		0,151	0,036				

Tabela C.4 - Resultados obtidos durante o estudo da repetibilidade do equipamento para o analito Glufosinato na matriz de Pimento vermelho.

Matriz e Analito	Concentração teórica (mg/kg)	Concentração obtida, x_i (mg/kg)	$(x_i - \bar{x})$	Desvio padrão	Média, \bar{x}	Limite de Repetibilidade, r	CV%
Pimento - Glufosinato	0,010	0,012	0,0018	0,0013	0,010	0,004	13,58
		0,009	0,0005				
		0,010	0,0000				
		0,007	0,0025				
		0,011	0,0011				
		0,010	0,0003				
		0,008	0,0018				
		0,011	0,0008				
		0,011	0,0010				
		0,010	0,0002				

Tabela C.4 - Resultados obtidos durante o estudo da repetibilidade do equipamento para o analito Glufosinato na matriz de Pimento vermelho (continuação)

Matriz e Analito	Concentração teórica (mg/kg)	Concentração obtida, x_i (mg/kg)	$(x_i - \bar{x})$	Desvio padrão	Média, \bar{x}	Limite de Repetibilidade, r	CV%
Pimento - Glufosinato	0,200	0,200	0,0065	0,0166	0,206	0,046	8,04
		0,201	0,0054				
		0,240	0,0337				
		0,194	0,0121				
		0,196	0,0100				
		0,234	0,0274				
		0,203	0,0027				
		0,197	0,0092				
		0,193	0,0131				
		0,204	0,0020				

Tabela C.5 - Resultados obtidos durante o estudo da repetibilidade do método para o analito AMPA nas matrizes em estudo.

Matriz e Analito	Concentração teórica (mg/kg)	Concentração obtida, x_i (mg/kg)	$(x_i - \bar{x})$	Desvio padrão	Média, \bar{x}	Limite de Repetibilidade, r	CV%
Mirtilo - AMPA	0,010	0,009	0,0010	0,0011	0,010	0,003	10,88
		0,011	0,0011				
		0,010	0,0003				
		0,009	0,0010				
		0,011	0,0011				
	0,050	0,049	0,0030	0,0018	0,052	0,005	3,38
		0,053	0,0013				
		0,052	0,0001				
		0,053	0,0013				
		0,053	0,0006				
Pimento - AMPA	0,010	0,010	0,0003	0,0013	0,010	0,004	13,87
		0,008	0,0013				
		0,012	0,0019				
		0,010	0,0003				
		0,008	0,0013				
	0,050	0,049	0,0000	0,0018	0,052	0,005	3,38
		0,045	0,0032				
		0,050	0,0016				
		0,049	0,0000				
		0,050	0,0016				

Tabela C.6 - Resultados obtidos durante o estudo da repetibilidade do método para o analito Glufosinato nas matrizes em estudo.

Matriz e Analito	Concentração teórica (mg/kg)	Concentração obtida, x_i (mg/kg)	$(x_i - \bar{x})$	Desvio padrão	Média, \bar{x}	Limite de Repetibilidade, r	CV%
Mirtilo - Glufosinato	0,010	0,010	0,0006	0,0011	0,011	0,003	10,03
		0,011	0,0001				
		0,011	0,0007				
		0,009	0,0015				
		0,012	0,0012				
	0,050	0,052	0,0024	0,0041	0,049	0,012	8,42
		0,044	0,0052				
		0,051	0,0015				
		0,046	0,0034				
		0,054	0,0047				
Pimento - Glufosinato	0,010	0,011	0,0004	0,0005	0,011	0,001	4,53
		0,011	0,0001				
		0,010	0,0007				
		0,011	0,0005				
		0,011	0,0003				
	0,050	0,042	0,0017	0,0034	0,044	0,009	7,67
		0,048	0,0038				
		0,042	0,0023				
		0,041	0,0033				
		0,048	0,0035				

Tabela C.7 - Resultados obtidos durante o estudo da precisão intermédia através de ensaios de repetibilidade realizados em dois dias diferentes para o AMPA na matriz de mirtilo

Matriz - Analito	Dia	Conc obtida (mg/kg)	Conc teórica (mg/kg)	Média	Desvio padrão, S_{PI}	Limite da precisão intermédia, Pi	CV _{PI} (%)
Mirtilo - AMPA	Dia 1	0,009	0,010	0,010	0,001	0,004	13,54
		0,011					
		0,010					
		0,009					
		0,011					
	Dia 2	0,009					
		0,011					
		0,009					
		0,007					
		0,010					

Tabela C.7 - Resultados obtidos durante o estudo da precisão intermédia através de ensaios de repetibilidade realizados em dois dias diferentes para o AMPA na matriz de mirtilo (continuação)

Matriz - Analito	Dia	Conc obtida (mg/kg)	Conc teórica (mg/kg)	Média	Desvio padrão, S_{PI}	Limite da precisão intermédia, Pi	CV_{PI} (%)
Mirtilo - AMPA	Dia 1	0,049	0,050	0,052	0,003	0,010	6,40
		0,053					
		0,052					
		0,053					
		0,053					
	Dia 2	0,056					
		0,049					
		0,056					
		0,053					
		0,045					

Tabela C.8 - Resultados obtidos durante o estudo da precisão intermédia através de ensaios de repetibilidade realizados em dois dias diferentes para o AMPA na matriz de pimento vermelho.

Matriz - Analito	Dia	Conc obtida (mg/kg)	Conc teórica (mg/kg)	Média	Desvio padrão, S_{PI}	Limite da precisão intermédia, Pi	CV_{PI} (%)					
Pi-mento - AMPA	Dia 1	0,011	0,010	0,010	0,001	0,004	14,01					
		0,007										
		0,011										
		0,011										
		0,011										
	Dia 2	0,010										
		0,008										
		0,012										
		0,010										
		0,008										
	Dia 1	0,052						0,050	0,049	0,002	0,006	4,59
		0,049										
		0,052										
		0,047										
		0,047										
Dia 2	0,047											
	0,045											
	0,050											
	0,049											
	0,050											

Tabela C.9 - Resultados obtidos durante o estudo da precisão intermédia através de ensaios de repetibilidade realizados em dois dias diferentes para o Glufosinato na matriz de mirtilo.

Matriz - Analito	Dia	Conc obtida (mg/kg)	Conc teórica (mg/kg)	Média	Desvio padrão, S _{PI}	Limite da precisão intermédia, P _i	CV _{PI} (%)					
Mirtilo - Glufosinato	Dia 1	0,010	0,010	0,010	0,001	0,003	11,49					
		0,011										
		0,011										
		0,009										
		0,012										
	Dia 2	0,011										
		0,010										
		0,009										
		0,010										
		0,008										
	Dia 1	0,052						0,050	0,048	0,004	0,012	8,94
		0,044										
		0,051										
		0,046										
0,054												
Dia 2		0,043										
		0,054										
		0,045										
		0,044										
	0,051											

Tabela C.10 - Resultados obtidos durante o estudo da precisão intermédia através de ensaios de repetibilidade realizados em dois dias diferentes para o glufosinato na matriz de pimento vermelho.

Matriz - Analito	Dia	Conc obtida (mg/kg)	Conc teórica (mg/kg)	Média	Desvio padrão, S _{PI}	Limite da precisão intermédia, P _i	CV _{PI} (%)
Pimento - Glufosinato	Dia 1	0,011	0,010	0,011	0,001	0,002	7,39
		0,011					
		0,010					
		0,011					
		0,011					
	Dia 2	0,011					
		0,009					
		0,012					
		0,012					
		0,011					

Tabela C.10 - Resultados obtidos durante o estudo da precisão intermédia através de ensaios de repetibilidade realizados em dois dias diferentes para o glufosinato na matriz de pimento vermelho. (continuação)

Matriz - Analito	Dia	Conc obtida (mg/kg)	Conc teórica (mg/kg)	Média	Desvio padrão, S_{PI}	Limite da precisão intermédia, P_i	CV_{PI} (%)
Pimento - Glufosinato	Dia 1	0,042	0,050	0,047	0,005	0,013	9,54
		0,048					
		0,042					
		0,041					
		0,048					
	Dia 2	0,045					
		0,052					
		0,053					
		0,050					
		0,052					

APÊNDICE: ENSAIOS DE RECUPERAÇÃO

Os ensaios de recuperação confirmam a exatidão e a seletividade e especificidade do método analítico. Nas tabelas seguintes encontram-se os resultados obtidos para ambos os analitos nas matrizes em estudo.

Tabela D.1 - Resultados dos ensaios de recuperação para o AMPA na matriz mirtilo.

Matriz	Concentração esperada, mg/kg	Concentração obtida, mg/kg	Porcentagem de recuperação, %
Mirtilo	0,01	0,0090	90
		0,0111	111
		0,0097	97
		0,0090	90
		0,0111	111
		0,0089	89
		0,0115	115
		0,0089	89
		0,0073	73
	0,0098	98	
	0,05	0,0492	98
		0,0534	107
		0,0520	104
		0,0534	107
		0,0527	105
0,0564		113	

Tabela D.1 - Resultados dos ensaios de recuperação para o AMPA na matriz mirtilo (continuação)

Matriz	Concentração esperada, mg/kg	Concentração obtida, mg/kg	Percentagem de recuperação, %
Mirtilo	0,05	0,0488	98
		0,0555	111
		0,0530	106
		0,0454	91
	Média	100,2	
	Desvio padrão	10,8	
	CV%	10,78	

Tabela D.2 - Resultados dos ensaios de recuperação para o AMPA na matriz pimento vermelho.

Matriz	Concentração esperada, mg/kg	Concentração obtida, mg/kg	Percentagem de recuperação, %
Pimento	0,01	0,0107	107
		0,0072	72
		0,0107	107
		0,0107	107
		0,0107	107
		0,0100	100
		0,0084	84
		0,0116	116
		0,0100	100
	0,05	0,0084	84
		0,0524	105
		0,0489	98
		0,0524	105
		0,0472	94
		0,0472	94
		0,0486	97
		0,0454	91
		0,0503	101
		0,0486	97
0,0503	101		

Tabela D.2 - Resultados dos ensaios de recuperação para o AMPA na matriz pimento vermelho (continuação)

Matriz	Concentração esperada, mg/kg	Concentração obtida, mg/kg	Porcentagem de recuperação, %
		Média	98,3
		Desvio padrão	10,0
		CV%	10,2

Tabela D.3 - Resultados dos ensaios de recuperação do glufosinato para a matriz mirtilo.

Matriz	Concentração esperada, mg/kg	Concentração obtida, mg/kg	Porcentagem de recuperação, %	
Mirtilo	0,01	0,010	99,4	
		0,011	106,9	
		0,011	112,4	
		0,009	90,9	
		0,012	117,7	
		0,011	113,0	
		0,010	96,8	
		0,009	86,7	
		0,010	95,4	
		0,008	84,9	
	0,05	0,052	103,1	
		0,044	87,9	
		0,051	101,4	
		0,046	91,5	
		0,054	107,6	
		0,043	85,7	
		0,054	107,6	
		0,045	90,1	
		0,044	88,1	
		0,051	101,7	
			Média	98,4
			Desvio padrão	10,1
			CV%	10,28

Tabela D.4 - Resultados dos ensaios de recuperação para o glufosinato na matriz pimento vermelho.

Matriz	Concentração esperada, mg/kg	Concentração obtida, mg/kg	Porcentagem de recuperação, %
Pimento	0,01	0,011	113,3
		0,011	109,9
		0,010	102,4
		0,011	114,0
		0,011	105,8
		0,011	114,4
		0,009	91,7
		0,012	116,5
		0,012	119,2
		0,011	113,3
	0,05	0,042	84,8
		0,048	95,7
		0,042	83,5
		0,041	81,6
		0,048	95,2
		0,045	90,1
		0,052	103,3
		0,053	105,1
		0,050	100,9
		0,052	104,3
	Média	102,2	
	Desvio padrão	11,6	
	CV%	11,31	

APÊNDICE: ESPECIFICAÇÃO TÉCNICA DE SERVIÇO

Neste apêndice encontra-se a Especificação Técnica de Serviço, elaborada no laboratório da SGS, para determinação de pesticidas polares e contaminantes pelo método de extração QuPPE modificado em Frutos e Vegetais por LC-MS/MS.

Impressos/Documents	Metodologia	Avisos e Precauções de segurança/Particularidades
<p>Quick Method for the Analysis of Numerous Highly Polar Pesticides in Food Involving Extraction with Acidified Methanol and LC-MS/MS Measurement, Food of Plant Origin (QuPPE-PO-Method) Versão 12, 2021</p> <p>S. Savini, M. Bandini, and A. Sannino, "An Improved, Rapid, and Sensitive Ultra-High-Performance Liquid Chromatography-High-Resolution Orbitrap Mass Spectrometry Analysis for the Determination of Highly Polar Pesticides and Contaminants in Processed Fruits and Vegetables.," J Agric Food Chem, vol. 67, no. 9, pp. 2716–2722, Mar. 2019</p> <p>Regulamento (EU) Nº 752/2014</p> <p>SANTE/11312/2021 - Guidance document on analytical quality control and method validation procedures for pesticide residues and analysis in food and feed.</p>	<p><u>PROCEDIMENTO</u></p> <p>Método de extração – Contaminantes extraídos pelo método de EURL, em amostras com teor de água > 80% (ou entre 40-80%), e baixo teor de gordura (eg. Frutos e Vegetais)</p> <ul style="list-style-type: none"> • Triturar a parte do produto adequada (consultar Reg. (EU) Nº 752/2014). • Pesas 10 ± 0,1 g de amostra para um tubo de centrífuga de 50 mL. • Adicionar à amostra 10 mL de solvente de extração metanol acidificado. • Agitar 15 minutos no agitador rotativo. • Colocar os tubos de centrífuga no congelador a -20°C durante 30 minutos. • Centrifugar durante 10 minutos a 5000 rpm. • Remover 1 mL do sobrenadante para uma seringa. • Filtrar a amostra utilizando um filtro de 0,45 µm. • Diluir em 1:10 a amostra em água. • Analisar por LC-MS/MS 	<p>Usar luvas no manuseamento de todos os reagentes, principalmente nos padrões, de modo a não haver contaminações direta no operador nem contaminações cruzadas. O mesmo princípio se aplica ao manuseamento das amostras.</p> <p>Consultar as fichas de segurança de soluções de padrões de pesticidas, outros padrões e de solventes onde se encontram as medidas corretas de ação.</p> <p>Sempre que uma amostra esteja superior ao limite de lei, critério definido pelo cliente, ou houver um resultado suspeito, a amostra deve ser repetida com uma nova toma analítica diferente. Se os resultados não forem concordantes, dever-se-á reanalisar a amostra, se possível com nova trituração, de forma a garantir uma maior homogeneidade da mesma.</p> <p>Sempre que os pontos de controlo ou outro tipo controlo de qualidade utilizado não cumpram os critérios de aceitação, o RT deverá ser alertado de modo a tomar as ações adequadas. Poder-se-á aceitar os resultados das amostras do <i>batch</i> analisado desde que devidamente justificado.</p>

Equipamento/Material		Notas Procedimento:																												
<p>Reagentes/Soluções</p> <ul style="list-style-type: none"> - Água ultrapura para HPLC e MilliQ - Metanol (LC-MS) - Ácido fórmico (grau: LC-MS, pureza 99%) - Ácido fórmico (grau: <i>Analysis</i>, pureza 96%) <p>Equipamento/Material</p> <ul style="list-style-type: none"> - Moinho triturador - Balança analítica - Agitador rotativo - Tubos de centrifuga de 50 mL - Centrifuga de mesa - Seringas descartáveis - Filtros de 0,45 µm - LC-MS/MS (e.g. Elute UHPLC, bomba HPG 1300, EVOQ LC-TQ Elite, com ionização em eletrospray e analisar de massas do tipo triplo quadrupolo) - Coluna cromatográfica (e.g. Hypercarb 5 µm, 2,1x100 mm) <p>Padrões</p> <ul style="list-style-type: none"> - Padrão de ácido aminometilfosfónico (AMPA) (grau de pureza adequado) - Padrão de glufosinato (grau de pureza adequado) - Padrão de glifosato (grau de pureza adequado) - Padrões dos analitos a analisar com a pureza adequada. 	<p><u>CONDIÇÕES CROMATOGRÁFICAS</u></p> <p>- LC</p> <ul style="list-style-type: none"> • Temperatura da coluna – 40°C • Fase móvel –Água ultra-pura com 0,1% ácido fórmico (A) e Metanol com 0,1% ácido fórmico (B) (Ver informação complementar – Fase móvel LC-MS/MS) • Volume de injeção - 25µL • Método – glifosato 03-06-2022 <table border="1" style="margin-left: auto; margin-right: auto;"> <thead> <tr> <th>Tempo (min)</th> <th>Fluxo (mL/min)</th> <th>A (%)</th> <th>B (%)</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>0,0</td> <td>0,50</td> <td>95</td> <td>5</td> </tr> <tr> <td>3,0</td> <td>0,50</td> <td>95</td> <td>5</td> </tr> <tr> <td>4,0</td> <td>0,50</td> <td>2</td> <td>98</td> </tr> <tr> <td>6,0</td> <td>0,50</td> <td>2</td> <td>98</td> </tr> <tr> <td>6,1</td> <td>0,50</td> <td>95</td> <td>5</td> </tr> <tr> <td>7,5</td> <td>0,50</td> <td>95</td> <td>5</td> </tr> </tbody> </table>	Tempo (min)	Fluxo (mL/min)	A (%)	B (%)	0,0	0,50	95	5	3,0	0,50	95	5	4,0	0,50	2	98	6,0	0,50	2	98	6,1	0,50	95	5	7,5	0,50	95	5	<p>Notas Procedimento:</p> <ul style="list-style-type: none"> • A ordem de injeção deverá ser a seguinte: <ul style="list-style-type: none"> ○ Solvente de extração ○ Reta calibração ○ Padrões de controlo (PC1 e PC2) ○ Branco ○ Recuperadas ○ Amostras (da matriz da amostra) ○ ... ○ Amostras <ul style="list-style-type: none"> ▪ Entre cada 20 amostras (máximo), efetuar Controlo sensibilidade, com padrões de controlo (PC1 e PC2). ▪ Injetar recuperadas e amostras da mesma matriz sequencialmente. ○ Padrões de controlo (PC1 e PC2)
Tempo (min)	Fluxo (mL/min)	A (%)	B (%)																											
0,0	0,50	95	5																											
3,0	0,50	95	5																											
4,0	0,50	2	98																											
6,0	0,50	2	98																											
6,1	0,50	95	5																											
7,5	0,50	95	5																											

Qualquer impressão / cópia deste documento é considerada **não controlada**, devendo ser confirmada a sua atualização. Confidencial. Todos os direitos reservados. Não é permitida a entrega deste documento ou comunicação do seu conteúdo a terceiros, sem autorização da SGS. Tenha sempre presente os princípios do nosso [Código de Integridade e Conduta Profissional](#)



Especificação Técnica de Serviço

DETERMINAÇÃO DE PESTICIDAS POLARES E CONTAMINANTES PELO MÉTODO DE EXTRAÇÃO QUPPE EM FRUTOS E VEGETAIS POR LC-MS/MS

Código:
Versão:
Data:
Elaborado por:
Aprovado por:

Particularidades	- MS/MS	Controlo de Qualidade
<p>- Preparação da reta:</p> <p>Em extrato da matriz da amostra diluída.</p> <p>- Quantificações de amostras:</p> <p>As amostras deverão ser quantificadas em retas da mesma matriz que a amostra a ser analisada.</p> <p>Se a amostra for quantificável/detetável e a recuperada não cumprir os critérios na reta em matriz igual à amostra, dever-se-á quantificar a amostra pelo método de adição padrão.</p> <p>Independentemente da forma de quantificação, se a concentração da amostra for superior à gama de trabalho, dever-se-á diluir a amostra em matriz adequada, de forma a quantificar a mesma na reta de calibração.</p> <p>Poder-se-á recorrer à quantificação a <i>single-level</i> para uma determinação mais exata. Esta quantificação deve ser o mais correta possível.</p> <p>Sempre que justificável dever-se-á corrigir o resultado à recuperação.</p>	<ul style="list-style-type: none">• Técnica de ionização – ESI negativo• Modo de aquisição MRM (as transições podem ser consultadas na versão em vigor do método de aquisição);• Os seguintes parâmetros foram mantidos constantes durante toda a aquisição:<ul style="list-style-type: none">o Temperatura do cone: 350°C;o Fluxo do gás do cone: 20 psi;o Temperatura da sonda: 400°C;o Fluxo do gás da sonda: 20 psi;o Fluxo do gás nebulizador: 50 psi;o Modo gás de exaustão: On;o IS (polaridade negativa): 4000V;o IS (polaridade positiva): 3500V.	<p>Análise de Brancos – Será efetuada uma corrida em branco de solvente diariamente.</p> <p>Análise de Brancos de Extração – Deverá ser efetuada uma análise de brancos de extração diariamente.</p> <p>Análise de Duplicados - Fazer uma amostra em duplicado por cada lote de amostras. A amostra duplicada poderá ser uma fortificada.</p> <p>Ensaio de Recuperação – Fazer um ensaio de recuperação por cada matriz diferente (diferentes tipos de amostras) no lote de amostras (preferencialmente e sempre que possível sobre uma amostra do mesmo tipo, sem analito nativo).</p> <p>Reta de calibração – Fazer uma reta de calibração diariamente. Preparar a reta e padrões de controlo como descrito na informação complementar ou respetiva folha de cálculo.</p>

Qualquer impressão / cópia deste documento é considerada **não controlada**, devendo ser confirmada a sua atualização.
Confidencial. Todos os direitos reservados.
Não é permitida a entrega deste documento ou comunicação do seu conteúdo a terceiros, sem autorização da SGS.
Tenha sempre presente os princípios do nosso [Código de Integridade e Conduta Profissional](#).

Pág. 3 / 7



Especificação Técnica de Serviço

DETERMINAÇÃO DE PESTICIDAS POLARES E CONTAMINANTES PELO MÉTODO DE EXTRAÇÃO QUPPE EM FRUTOS E VEGETAIS POR LC-MS/MS

Código:
Versão:
Data:
Elaborado por:
Aprovado por:

<p>- Limites de quantificação e analitos:</p> <p>Limite Máximo de Resíduos assumido por defeito pela união europeia para resíduos de pesticidas: 0,01 mg/kg (0,005 µg/mL)</p> <p>Limite Máximo de Resíduos segundo os regulamentos da Comissão Europeia 441/2012 e 845/2015, para o AMPA, glifosato e glufosinato: 0,1 mg/kg (0,05 µg/mL)</p>		<p>Adicionalmente, poder-se-á ainda quantificar a amostra através do método de adição padrão.</p> <p>Sempre que necessário, dever-se-á corrigir o resultado à recuperação para obter um resultado mais correto e exato.</p> <p>Controlo de qualidade – Os resultados destes controlos serão registados na respetiva folha de controlo de qualidade.</p> <p>Padrões de Controlo - Deverá em cada corrida analisar 1 ou 2 pontos de controlo (inicial e final da gama de trabalho). Os padrões de controlo devem ser preparados separadamente da reta de calibração.</p>
<p>Objetivo/Campo de Aplicação</p>	<p>Expressão de resultados</p>	
<p>Determinação de Pesticidas Polares e outros contaminantes pelo método de extração QuPPE (<i>Single-methods</i>), por cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massa (Triplo Quadrupolo LC-MS/MS) em frutos e vegetais.</p>	<p>Cálculos: A concentração obtida na análise deve ser multiplicada pelo respetivo fator do método. Tem de se ter em atenção o fator de diluição utilizado durante a extração. Caso seja de 1:10 é necessário multiplicar a concentração obtida por 10. Os cálculos são efetuados automaticamente na respetiva folha de controlo de qualidade ou FCM.</p> <p>Expressão dos resultados: µg/mL. Para o cliente expressa-se em mg/kg. O número de algarismos significativos deve estar de acordo com a incerteza do método.</p> <p>Fator do método: 2</p>	

Qualquer impressão / cópia deste documento é considerada **não controlada**, devendo ser confirmada a sua atualização.
Confidencial. Todos os direitos reservados.
Não é permitida a entrega deste documento ou comunicação do seu conteúdo a terceiros, sem autorização da SGS.
Tenha sempre presente os princípios do nosso [Código de Integridade e Conduta Profissional](#).

Pág. 4 / 7



Especificação Técnica de Serviço

DETERMINAÇÃO DE PESTICIDAS POLARES E CONTAMINANTES PELO MÉTODO DE EXTRAÇÃO QUPPE EM FRUTOS E VEGETAIS POR LC-MS/MS

Código:
Versão:
Data:
Elaborado por:
Aprovado por:

Informação Complementar

Fase móvel LC-MS/MS

Fase A – Água ultra-pura +0,1% de ácido fórmico – para 1L de água ultra-pura dissolver 1000 µL de ácido fórmico (grau: LC-MS, pureza 99%).

Fase B – Metanol LC-MS +0,1% de ácido fórmico – para 1L de metanol dissolver 1000 µL de ácido fórmico (grau: LC-MS, pureza 99%).

Solvente de extração: metanol acidificado

Num balão volumétrico de 200 ml adiciona-se 2 mL de ácido fórmico (grau: Analysis, pureza 96%) e metanol LC-MS até perfazer o balão. Poder-se-á dimensionar a quantidade de solução preparada desde que sejam mantidas proporções. O procedimento foi executado na hotte.

Soluções padrão (stock e trabalho):

Solução stock de Contaminantes/Compostos individuais em Água (1000 ppm): Preparar a solução de acordo com o descrito na folha de preparação de padrões. O solvente utilizado deve ser água. A solução deve ser armazenada a 4°C. A solução deve ser preparada, corrigindo à pureza e à forma do composto na substância ativa. Consultar ficheiro de excel: "Preparação de Soluções Stock individuais Pesticidas – Single Methods".

Solução trabalho (1) em Água (100 ppm): Para um balão volumétrico de 5 mL adicionar 500 µL da solução stock a 1000 ppm, e perfazer o volume com água. Agitar vigorosamente. Poder-se-á dimensionar a solução segundo o volume que se for utilizar. Preparar sempre que se for efetuar o método de ensaio.

Solução trabalho (2) em Água (10 ppm): Para um balão volumétrico de 5 mL adicionar 500 µL da solução de trabalho (1) a 100 ppm, e perfazer o volume com água. Agitar vigorosamente. Poder-se-á dimensionar a solução segundo o volume que se for utilizar. Preparar sempre que se for efetuar o método de ensaio.

Solução trabalho (3) em Água (1 ppm): Para um balão volumétrico de 5 mL adicionar 500 µL da solução de trabalho (2) a 10 ppm, e perfazer o volume com água. Agitar vigorosamente. Poder-se-á dimensionar a solução segundo o volume que se for utilizar. Preparar sempre que se for efetuar o método de ensaio.

Qualquer impressão / cópia deste documento é considerada **não controlada**, devendo ser confirmada a sua atualização.

Confidencial. Todos os direitos reservados.

Não é permitida a entrega deste documento ou comunicação do seu conteúdo a terceiros, sem autorização da SGS.

Tenha sempre presente os princípios do nosso [Código de Integridade e Conduta Profissional](#).

Pág. 5 / 7

Reta de Calibração: Preparar as soluções padrão no próprio dia de análise.

As retas de calibração devem ser preparadas no extrato de matriz previamente diluído em água, com o fator de diluição 1:10. (Ou seja, 1 mL de extrato de matriz diluído em 9 mL de água).

Reta de calibração – 1 Mistura (solução A):

- 0,005 µg/mL: pipetar 5 µL solução de trabalho (3) + 995 µL de Matriz diluída. - PC1
- 0,010 µg/mL: pipetar 10 µL solução de trabalho (3) + 990 µL de Matriz diluída.
- 0,025 µg/mL: pipetar 25 µL solução de trabalho (3) + 975 µL de Matriz diluída.
- 0,050 µg/mL: pipetar 50 µL solução de trabalho (3) + 950 µL de Matriz diluída.
- 0,075 µg/mL: pipetar 70 µL solução de trabalho (3) + 925 µL de Matriz diluída.
- 0,100 µg/mL: pipetar 100 µL solução de trabalho (3) + 900 µL de Matriz diluída. – PC2

Reta de calibração – 2 Misturas (solução A e solução B):

- 0,005 µg/mL: pipetar 5 µL ST (3) A + 5 µL ST (3) B + 990 µL de Matriz diluída. - PC1
- 0,010 µg/mL: pipetar 10 µL ST (3) A + 10 µL ST (3) B + 980 µL de Matriz diluída.
- 0,025 µg/mL: pipetar 25 µL ST (3) A + 25 µL ST (3) B + 950 µL de Matriz diluída.
- 0,050 µg/mL: pipetar 50 µL ST (3) A + 50 µL ST (3) B + 900 µL de Matriz diluída.
- 0,075 µg/mL: pipetar 75 µL ST (3) A + 75 µL ST (3) B + 850 µL de Matriz diluída.
- 0,100 µg/mL: pipetar 100 µL ST (3) A + 100 µL ST (3) B + 800 µL de Matriz diluída. - PC2

Ensaio de recuperação

1. Pesar cerca de 10 g \pm 0,1 g de amostra para um tubo de centrífuga de 50 mL.
2. Pipetar 100 µL da solução de trabalho (2) de 100 µg/mL para o tubo de centrífuga com a amostra no caso de recuperadas de 0,01 mg/kg (0,005 µg/mL).
3. Pipetar 500 µL da solução de trabalho (2) de 100 µg/mL para o tubo de centrífuga com a amostra no caso de recuperadas de 0,05 mg/kg (0,025 µg/mL).
4. Deixar a solução padrão secar. Agitar bem a amostra (exemplo: 1 minuto no *multireax*). Prosseguir como descrito no procedimento.
5. **Importante!** Não esquecer de diluir com o mesmo fator de diluição da amostra, antes de injetar no equipamento LC-MS/MS.

