



MARIANA PAIXÃO VARELA RIBEIRO

Licenciada em Bioquímica

DETERMINAÇÃO DE GLIFOSATO EM AMOSTRAS ALIMENTARES (FRUTOS E VEGETAIS)

MESTRADO EM TECNOLOGIA E SEGURANÇA ALIMENTAR

Universidade NOVA de Lisboa
novembro, 2021

DETERMINAÇÃO DE GLIFOSATO EM AMOSTRAS ALIMENTARES (FRUTOS E VEGETAIS)

MARIANA PAIXÃO VARELA RIBEIRO

Licenciada em Bioquímica

Orientador: Ana Lúcia Monteiro Durão Leitão,

Professora Auxiliar, Universidade NOVA de Lisboa,

Coorientadores: Vera Cristina Calção Canelas,

Responsável Técnica do Laboratório de Química, SGS Portugal

Júri:

Presidente: Ana Luísa Almaça da Cruz Fernando,
Professora Associada, FCT-NOVA

Arguentes: Carla Alexandra da Conceição Teles Martins,
Assistente de Investigação, ENSPNOVA

Vogais: Ana Lúcia Monteiro Durão Leitão,
Professora Auxiliar, FCT-NOVA

MESTRADO EM TECNOLOGIA E SEGURANÇA ALIMENTAR

Universidade NOVA de Lisboa
novembro, 2021

Determinação de glifosato em amostras alimentares (frutos e vegetais)

Copyright © Mariana Paixão Varela Ribeiro, Faculdade de Ciências e Tecnologia, Universidade NOVA de Lisboa.

A Faculdade de Ciências e Tecnologia 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.

AGRADECIMENTOS

A conclusão desta dissertação define uma etapa importante da minha vida, onde reuni importantes ensinamentos que não só me fizeram crescer em saber, mas também perceber a importância de estudar os assuntos dos quais se gostam. A todos os que comigo percorreram este caminho, os meus mais sinceros agradecimentos. Em especial quero agradecer:

À Professora Doutora Ana Lúcia Leitão, que desde o primeiro dia em que surgiu a oportunidade de desenvolvermos este projeto, se mostrou sempre disponível para me apoiar e aconselhar, valorizando sempre o meu potencial e acreditando em mim. Por me ter dado o privilégio de ser sua orientada, por todos os conselhos, ajudas e motivação, um grande obrigada! Não poderia também deixar de agradecer por todos os conhecimentos que me transmitiu ao longo do curso, que me fizeram crescer mais crítica e que pautam a minha vida, definindo o meu modo de trabalho.

À Mestre Vera Canelas, responsável técnica do laboratório de Química da SGS Portugal, que me deu a oportunidade de estagiar num dos laboratórios de referência a nível de Segurança Alimentar e que com grande hospitalidade me acolheu no primeiro dia. O que aprendi sobre validação de métodos analíticos só foi possível por contar com o seu conhecimento e grande experiência científica. Por todo apoio, profissionalismo, disponibilidade e partilha de conhecimentos o meu grande obrigada!

À Mestre Ana Rita Marques, técnica do laboratório dos Massas da SGS Portugal, que percorreu todo este caminho comigo, apoiando-me, ensinando-me, aconselhando-me, incentivando-me, sem nunca deixar de sorrir e pacientemente me orientar nas minhas incertezas.

À Mestre Marta Loureiro, técnica do laboratório dos Massas da SGS Portugal, que tendo entrado para a equipa da SGS já numa fase final do meu mestrado, ainda assim partilhou comigo conhecimentos, demonstrando uma confiança e amizade que muito agradeço.

A toda a equipa do laboratório de Química da SGS, à Alice, à Célia, à Cloé, ao Gonçalo, à Inês, à Lurdes e à Rita, que tão bem me receberam, agradeço-vos pelo vosso apoio, boa disposição e constante preocupação. Agradeço também aos meus colegas estagiários, Diana, João, Lisandra e Mariana com quem partilhei a experiência de estagiária.

Aos meus colegas e amigos de mestrado, em especial à Andreia e Rita, pela boa amizade, risos e pelas intensivas sessões de estudo e noitadas de relatórios.

A todos os meus amigos e colegas, em especial, à Cátia, por ser uma amiga que mesmo a quilómetros de distância está sempre presente e ao Francisco um amigo excepcional que tive o prazer de conhecer durante a licenciatura e que me incentivou para este mestrado.

Aos meus pais, por me terem encorajado nesta “aventura” tornando-a possível, incentivando-me sempre e mostrando vontade de aprender e participar comigo. E claro, ao meu “maninho”, por todos os nossos jantares a ouvir os meus devaneios e por cuidar sempre de mim.

A todos, ficar-vos-ei sempre grata.

"O que hoje não sabemos amanhã saberemos."
(Garcia da Orta, 1563)

RESUMO

O glifosato é o herbicida sistémico mais utilizado. Inicialmente considerado inofensivo, a sua inocuidade tem sido questionada à medida que surgem estudos científicos que relatam efeitos negativos associados à sua exposição. Atualmente a toxicidade do glifosato é controversa na comunidade científica e entre entidades reguladoras. Submetido para reavaliação pela EFSA, só em 2022 será conhecida a decisão final, prevendo-se medidas mais restritas. O desenvolvimento de métodos com elevada sensibilidade e reprodutibilidade é essencial para se obterem resultados consistentes e fiáveis que fundamentem decisões que transmitam segurança. Com efeito, neste trabalho, foi desenvolvida e otimizada uma metodologia para quantificação de glifosato em matrizes vegetais por Cromatografia Líquida de Ultra Elevada Eficiência acoplada à Espectrometria de Massa em *Tandem* (UHPLC-MS/MS). O desenvolvimento de um processo de extração simples em combinação com a diluição de 1:10 e congelamento dos extratos das amostras, permitiu alcançar bons resultados cromatográficos. Simultaneamente, o *priming* da coluna *Hypercarb* com extrato de espinafres reduz o tempo de retenção, e melhora a forma dos picos cromatográficos. O método foi validado para morango e curgete, de acordo com o guia SANTE/12682/2019 para a: linearidade, gama de trabalho, repetibilidade, precisão intermédia e exatidão. O método apresenta boa linearidade ($R < 0,9995$), abrangendo uma gama de trabalho de 0,00500 µg/mL a 0,100 µg/mL, tendo limite de deteção (LD) de 0,00330 mg/kg e limite de quantificação (LQ) de 0,0100 mg/kg. As matrizes avaliadas apresentam uma taxa de recuperação média de 93,1%, para o morango, e 86,6% para a curgete. A repetibilidade e precisão intermédia do método variaram entre 5,97 e 12,2% e entre 10,2 e 15,7%, respetivamente. A incerteza do método foi inferior a 50%. Comprovou-se que o método é aplicável para análises de rotina, visto ter sido possível quantificar o glifosato para valores inferiores ao LQ, com taxas de recuperação aceitáveis.

Palavras-chave: Glifosato, UHPLC-MS/MS, Validação de Métodos, Alimentos de origem vegetal

ABSTRACT

Glyphosate is the most used systemic herbicide. Initially considered inoffensive, its harmlessness has been questioned as scientific studies report negative effects associated with its exposure appear. Currently the toxicity of glyphosate is controversial in the scientific community and among regulators. Submitted for reassessment by EFSA only on 2022 the final decision will be known, with more restricted measures being expected. The development of methods with high sensitivity and reproducibility is essential to achieve consistent and reliable results that support decisions that convey safety. Moreover, in this work, a method for quantification of glyphosate in plant matrices was developed and optimized by Ultra High Performance Liquid Chromatography coupled to Tandem Mass Spectrometry (UHPLC-MS/MS). The development of a simple extraction process in combination with dilution of 1:10 and freezing of the samples extracts, allowed good chromatographic results. Simultaneously, priming the Hypercarb column with spinach extract reduced the retention time and improved the shape of chromatographic peaks. The method was validated for strawberry and courgette, according to the Guide SANTE/12682/2019 for: linearity, working range, repeatability, intermediate precision, and accuracy. The method has a good linearity ($R < 0.9995$), covering a working range from 0.00500 $\mu\text{g/mL}$ to 0.100 $\mu\text{g/mL}$, with a detection limit (LD) of 0.00330 mg/kg and quantification limit (LQ) of 0.0100 mg/kg . The evaluated matrices presented an average recovery rate of 93.1% for strawberry, and 86.6% for courgette. Method repeatability and intermediate precision ranged from 5.97 to 12.2% and between 10.2 and 15.7%, respectively. The uncertainty of the method was less than 50%. It has been proved that the method is applicable to routine analysis, as it was possible to quantify glyphosate for values lower than the LQ, with an acceptable recoveries rate.

Keywords: Glyphosate, UHPLC-MS/MS, Method validation, Foods of plant origin

ÍNDICE

1	ENQUADRAMENTO.....	1
1.1	CONTEXTO E MOTIVAÇÃO	1
1.2	OBJETIVOS.....	5
1.3	ORGANIZAÇÃO DO DOCUMENTO	6
2	INTRODUÇÃO	7
2.1	A EMPRESA	7
2.1.1	A História.....	7
2.1.2	A SGS em Portugal	9
2.1.3	Valores da Empresa.....	9
2.1.4	Área Agroalimentar	9
2.2	GLIFOSATO	11
2.2.1	A História do Glifosato.....	11
2.2.2	Composição e Ação do Herbicida Glifosato e seus Derivados.....	11
2.2.3	Utilização	13
2.2.4	Metabolismo	14
2.2.5	Glifosato em Produtos Alimentares	17
2.2.6	Controvérsia e Legislação	19
2.3	MÉTODO DE EXTRAÇÃO	22
2.3.1	Preparação dos padrões de calibração.....	23
2.4	LC-MS/MS.....	25
2.4.1	Cromatografia Líquida de Elevada Eficiência	25

2.4.2	Espectrometria de Massa em <i>Tandem</i> (MS/MS).....	30
2.5	VALIDAÇÃO	35
2.5.1	Gama de trabalho	35
2.5.2	Linearidade	36
2.5.3	Especificidade e Seletividade.....	38
2.5.4	Limites Analíticos: Limite de detecção e Limite de Quantificação	39
2.5.5	Precisão.....	40
2.5.6	Exatidão	42
2.5.7	Incerteza	43
3	PARTE EXPERIMENTAL	47
3.1	MATERIAL E REAGENTES	47
3.1.1	Material e Equipamento	47
3.1.2	Amostras.....	47
3.1.3	Reagentes	48
3.2	METODOLOGIA.....	50
3.2.1	Extração das Amostras.....	50
3.2.2	Ensaio de Recuperação	50
3.2.3	Retas de Calibração em Matriz	51
3.2.4	Reta de Calibração em Solvente	51
3.2.5	Análise LC-MS/MS	51
3.2.6	Validação	53
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	55
4.1	OTIMIZAÇÃO DO MÉTODO	55
4.1.1	Otimização das Condições de LC-MS/MS.....	55
4.1.2	Otimização do Método de Extração	58
4.2	VALIDAÇÃO DO MÉTODO ANALÍTICO	64
4.2.1	Gama de Trabalho e Linearidade.....	64
4.2.2	Especificidade e Seletividade.....	68

4.2.3	Limiares Analíticos	70
4.2.4	Precisão.....	71
4.2.5	Exatidão	73
4.2.6	Estimativa da Incerteza do Método	74
4.3	APLICAÇÃO À ANÁLISE DE ROTINA.....	75
4.4	PERSPETIVAS FUTURAS	77
5	CONCLUSÃO	79
	BIBLIOGRAFIA.....	81
A.	APÊNDICE: RETA EM SOLVENTE.....	97
B.	APÊNDICE: CURVAS DE CALIBRAÇÃO.....	101
C.	APÊNDICE: RAZÃO IÓNICA.....	103
D.	APÊNDICE: REPETIBILIDADE DO MÉTODO.....	105
E.	APÊNDICE: REPETIBILIDADE DO EQUIPAMENTO.....	109
F.	APÊNDICE: PRECISÃO INTERMÉDIA.....	113
G.	APÊNDICE: EXATIDÃO	117

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 2.1 - Logótipo da empresa SGS (SGS, 2020a).	7
Figura 2.2 - Cronograma de eventos na história da SGS (adaptado SGS, 2020d).	8
Figura 2.3 - Estrutura química do glifosato em 2D (A) e em 3D (B) (Obtido de PubChem, 2021).	12
Figura 2.4 - Via do Shiquimato. O glifosato inibe o EPSP sintase interferindo na síntese de triptofano, fenilalanina e tirosina, necessárias à síntese de proteínas e de outras biomoléculas. PEP – Fosfoenolpiruvato; DAHP – 3-Deoxi-D-Arabin-Heptulosano 7-Fosfato; DHQ – 3-Dehidroquinato; DHD – 3-Dehidroquinato Desidratase; SDH – Shiquimato Desidrogenase (adaptado de Maeda & Dudareva, 2012).	13
Figura 2.5 - Mapa com a distribuição geográfica e estimativa do uso de glifosato em terrenos agrícolas dos EUA, em lb/mi ² entre 1994 (A) e 2014 (B). (adaptado de Duke, 2018).	14
Figura 2.6 - Sumário dos efeitos tóxicos do glifosato e herbicidas derivados na saúde, que têm vindo a ser reportados por diversos estudos (adaptado de Peillex & Pelletier, 2020).	16
Figura 2.7 - Fluxograma resumido do método de extração QuPPE (adaptado de Anastassiades <i>et al</i> , 2020).	23
Figura 2.8 - Representação esquemática de um sistema LC-MS/MS com um triplo quadrupolo como analisador de massa (adaptado de Östman, 2018).	25
Figura 2.9 – Injetor em <i>loop</i> . A – O <i>loop</i> é carregado pela amostra, saindo o excesso pela porta do desperdício. Nesta posição o eluente atravessa a coluna. B – A rotação da válvula de injeção num ângulo de 60°, em sentido contrário ao dos ponteiros do relógio, faz com que a amostra seja injetada na coluna com alta pressão (adaptado de Harris, 2010).	28
Figura 2.10 – Representação esquemática de uma fonte de ionização <i>Electrospray</i> , numa interface com LC-MS. A amostra é encaminhada para a agulha do <i>electrospray</i> , aquecida, na qual é aplicada uma diferença de potencial que leva à evaporação do líquido em spray. Durante este processo observa o fenómeno de cone de <i>Taylor</i> que consiste na deformação do líquido numa forma elíptica, formando gotículas carregadas.	32
Figura 2.11 - Representação esquemática de um quadrupolo. A verde estão representados os iões precursores que entram no quadrupolo para seleção de um ião precursor com m/z específico. A seleção dos iões é realizada através da definição de determinados potenciais de CC e de RF. Os	

iões com trajetória instável chocam contra as hastes metálicas não sendo analisados pelo detetor.....	33
Figura 2.12 - Representação esquemática de um triplo quadrupolo. A verde estão representados os iões precursores que entram no primeiro quadrupolo, Q_1 , onde há seleção de um ião precursor específico. O ião precursor segue para a célula de colisão, q_2 , onde se dá a fragmentação por colisão com um gás inerte, estando os fragmentos representados a amarelo, azul, roxo e vermelho. Por fim, no terceiro quadrupolo, Q_3 , há seleção dos iões produtos específicos.....	34
Figura 3.1 - Representação esquemática do método de extração desenvolvido.	50
Figura 4.1 - Representação gráfica exemplificativa dos efeitos da extração de uma amostra para determinação de glifosato, segundo um passo de limpeza com PSA+C18 (A) e PSA+GCB (B). 1 e 3 correspondem aos cromatogramas das transições dos iões quantificadores e qualificadores, respetivamente.....	60
Figura 4.2 - Representação gráfica das retas de calibração em morango (A) e em curgete (B), com respetivas equações e coeficientes de determinação (R^2), na gama de concentrações de 0,00500 a 0,100 $\mu\text{g/mL}$	66
Figura 4.3 - Representação gráfica de um cromatograma obtido por análise do padrão de controlo 2 (PC2) do glifosato numa amostra. O cromatograma superior corresponde ao sinal do analito obtido segundo a transição de 168,0→63,0, ião quantificador. O cromatograma inferior corresponde ao cromatograma do ião qualificador com transição 168,0→81,0.....	69
Figura A. 1 - Retas de calibração em solvente, com respetiva equação e coeficiente de determinação (R^2), na gama de concentrações de 0,00500 a 0,100 $\mu\text{g/mL}$	98

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 2.1 - Limites máximos de resíduos de glifosato, em mg/kg, para frutas, vegetais e cereais, na UE e em Portugal, de acordo com o Regulamento (UE) N.º 293/2013 (2013) e com o Decreto-Lei N.º 233/2006 (2006), respetivamente.	18
Tabela 3.1 – Ensaio de Recuperação: Níveis das amostras fortificadas, com concentração em µg/mL e em mg/kg, e respetivo volume da solução de trabalho 3 adicionado, em µL, para as amostras de frutos e vegetais.	51
Tabela 3.2 – Reta de calibração em extrato para matrizes de frutos e vegetais: Volumes, em µL, da solução de trabalho 3 (1,00 µg/mL) e de extrato a adicionar ao <i>via</i> / para construção da reta de calibração nas matrizes de frutos e vegetais. Está também indicada a concentração de glifosato em cada ponto.	51
Tabela 3.3 - Condições de LC-MS/MS para a análise de Glifosato.	53
Tabela 3.4 - Critérios de aceitação utilizados durante a validação do método analítico para os parâmetros de linearidade, gama de trabalho, limite de quantificação, limite de deteção, precisão intermédia, repetibilidade, exatidão e incerteza. Os critérios de aceitação utilizados tiveram como base o Guia RELACRE 13 (2000) e o Guia SANTE/12682/2019 (2019).	54
Tabela 4.1 - Resumo dos estudos de otimização das condições de LC-MS/MS. Estão identificados os problemas, os estudos realizados, os resultados dos estudos de otimização e a conclusão face à implementação ou não, dos pontos otimizados.	58
Tabela 4.2 - Resumo dos estudos de otimização do método de extração. Estão identificados os problemas, os estudos realizados, os resultados dos estudos de otimização e a conclusão face à implementação ou não, dos pontos otimizados.	62
Tabela 4.3 - Panorama dos métodos disponíveis na literatura para a determinação do glifosato em matrizes alimentares por LC-MS/MS, e respetivos parâmetros analíticos relevantes: matriz, solvente de extração, utilização de passo de limpeza, utilização de derivatização, limite de quantificação (LQ) e percentagem de recuperação (%R).	63
Tabela 4.4 - Percentagem de efeito matriz (%ME) na matriz morango e na matriz curgete. Estão também apresentados os declives das retas de calibração.	65
Tabela 4.5 – Estudo da homogeneidade de variâncias para as retas de calibração em matriz de morango e curgete. Estão apresentados os dados referentes à concentração do primeiro e último	

padrão de calibração, 0,00500 µg/mL e 0,100 µg/mL, respetivamente, bem como a média e as variâncias das áreas dos picos para cada amostra. Na última coluna está apresentado o valor de teste calculado (VT).	66
Tabela 4.6 – Estudo da linearidade das retas de calibração nas matrizes morango e curgete, e respetivas equações das retas de calibração. Estão apresentados os valores obtidos para o coeficiente de correlação (R), e para os parâmetros avaliados no teste de <i>Mandel</i> : desvio-padrão residual da reta de regressão linear ($S_{y/x}$), desvio-padrão residual da regressão não-linear ($S(y/x)^2$), diferença de variâncias (DS^2) e valor de teste (VT).....	67
Tabela 4.7 – Análise dos residuais e para o teste de <i>R/K/LT</i> em cada ponto da gama de trabalho para as matrizes morango e curgete.	67
Tabela 4.8 - Sumário dos resultados obtidos na validação da gama de trabalho e da linearidade para as matrizes morango e curgete.	68
Tabela 4.9 - Razão iónica média (<i>RI</i>), obtidos na análise de glifosato para as matrizes morango e curgete, ao longo dos dois dias de análise. Estão também apresentados o respetivo desvios-padrão (S_{RI}) e coeficiente de variação (CV_{RI}).	70
Tabela 4.10 – Estudo dos limiares analíticos para as matrizes morango e curgete, e respetivas equações das retas de calibração. Estão apresentados os declives da reta de calibração e desvios-padrão residuais ($S_{y/x}$), assim como o limite de quantificação (LQ), em µg/mL, e o limite de deteção (LD), em µg/mL.	70
Tabela 4.11 – Resumo dos resultados obtidos para o estudo da repetibilidade do método, ao longo dos dois dias de análise, para as amostras morango e curgete, fortificadas com 0,00500 e 0,0250 µg/mL de glifosato. Apresenta-se também a concentração média obtida ($\bar{x}$), o desvio padrão de repetibilidade (S_r), limite de repetibilidade (r), a percentagem de repetibilidade (% r) e o coeficiente de variação de repetibilidade (CV_r).	71
Tabela 4.12 - Resultados obtidos para o estudo da repetibilidade do equipamento para as matrizes morango e curgete, fortificadas com 0,00500 e 0,0100 µg/mL de glifosato. Apresenta-se também a concentração média obtida ($\bar{x}$), o desvio padrão de repetibilidade (S_r), limite de repetibilidade (r), a percentagem de repetibilidade (% r) e o coeficiente de variação de repetibilidade (CV_r).	72
Tabela 4.13 - Resumo dos resultados obtidos para o estudo da precisão intermédia nas matrizes morango e curgete, fortificadas com 0,00500 e 0,0250 µg/mL de glifosato. Apresenta-se também a média ($\bar{x}$) das concentrações obtidas experimentalmente, o desvio-padrão (S_{PI}), a precisão intermédia (PI), a percentagem de precisão intermédia (%PI) e o coeficiente de variação da precisão intermédia (CV_{PI}).	73
Tabela 4.14 – Concentração média obtida (µg/mL) e percentagem média de recuperação (%R) dos ensaios de fortificação com 0,00500 e 0,0250 µg/mL de glifosato, para as matrizes morango e curgete. Está também apresentando o desvio-padrão (S_R) e o coeficiente de variação (CV_R).	73
Tabela 4.15 - Componentes individuais das incertezas associadas à precisão, $u_{precisão}$, e exatidão, u_{ver} , do método analítico, obtidas pelos ensaios de recuperação nas matrizes em estudo, morango e curgete. Apresenta-se também a incerteza combinada, u_c , e a incerteza expandida, U	74

Tabela 4.16 - Concentração de glifosato em $\mu\text{g/mL}$ e mg/kg para as matrizes uvas e milho fresco, enviadas pelos clientes da SGS para análise de rotina.	75
Tabela 4.17 - Concentração obtida ($\mu\text{g/mL}$) e percentagem de recuperação (%R) do ensaio de fortificação com 0,00500 $\mu\text{g/mL}$ de glifosato, para as matrizes uvas e milho fresco. Está também apresentando concentração na amostra nativa ($\mu\text{g/mL}$).	76
Tabela A. 1 - Curva de calibração: Valores do sinal de analito obtidos ao longo da gama de concentrações (em $\mu\text{g/mL}$ e mg/kg) estipulada, para o solvente.	97
Tabela A. 2 - Estudo da linearidade da reta de calibração em solvente, e respetiva equação das. Estão apresentados os valores obtidos para o coeficiente de correlação (R), e para os parâmetros avaliados no teste de <i>Mandel</i> : desvio-padrão residual da reta de regressão linear ($S_{y/x}$), desvio-padrão residual da regressão não-linear ($S(y/x)^2$), diferença de variâncias (DS^2) e valor de teste (PG).	98
Tabela A. 3 - Análise dos residuais e para o teste de <i>R/K/LT</i> em cada ponto da gama de trabalho para a reta em solvente.	98
Tabela B. 1 - Curva de calibração: Valores do sinal de analito obtidos ao longo da gama de concentrações (em $\mu\text{g/mL}$ e mg/kg) estipulada, para o morango.....	101
Tabela B. 2 - Curva de calibração: Valores do sinal de analito obtidos ao longo da gama de concentrações (em $\mu\text{g/mL}$ e mg/kg) estipulada, para a curgete.	101
Tabela C. 1 - Razões iónicas (RI) dos padrões de calibração na matriz morango, com respetiva média, RI, desvio-padrão, S_{RI} , e coeficiente de variação, CV_{RI}	103
Tabela C. 2 - Razões iónicas (RI) dos padrões de calibração na matriz curgete, com respetiva média, RI, desvio-padrão, S_{RI} , e coeficiente de variação, CV_{RI}	103
Tabela C. 3 - Razão iónica para as amostras fortificadas de morango e de curgete, analisadas no primeiro dia.	104
Tabela C. 4 - Razão iónica para as amostras fortificadas de morango e de curgete, analisadas no segundo dia.	104
Tabela D. 1 - Repetibilidade do método para as matrizes morango e curgete, fortificadas com 0,00500 e 0,0250 $\mu\text{g/mL}$ de glifosato no dia 1. Está também apresentada a concentração média obtida ($\bar{x}$), o desvio padrão de repetibilidade (S_r), limite de repetibilidade (r), a percentagem de repetibilidade (% r) e para o coeficiente de variação de repetibilidade (CV_r).	106
Tabela D. 2 - Repetibilidade do método de extração para as matrizes morango e curgete, fortificadas com 0,0050 e 0,025 $\mu\text{g/mL}$ de glifosato no dia 2. Está também apresentada a concentração média obtida ($\bar{x}$), o desvio padrão de repetibilidade (S_r), limite de repetibilidade (r), a percentagem de repetibilidade (% r) e para o coeficiente de variação de repetibilidade (CV_r).	107
Tabela E. 1 - Estudo da repetibilidade do equipamento para a matriz morango, ao nível do PC1, 0,00500 $\mu\text{g/mL}$, e do PC2, 0,100 $\mu\text{g/mL}$, de glifosato. Está também apresentada a concentração média obtida ($\bar{x}$), o desvio padrão de repetibilidade (S_r), limite de repetibilidade (r), a percentagem de repetibilidade (% r) e para o coeficiente de variação de repetibilidade (CV_r).	110

Tabela E. 2 - Estudo da repetibilidade do equipamento para a matriz curgete, ao nível do PC1, 0,00500 µg/mL, e do PC2, 0,100 µg/mL, de glifosato. Está também apresentada a concentração média obtida ($\bar{x}$), o desvio padrão de repetibilidade (S_r), limite de repetibilidade (r), a percentagem de repetibilidade ($\%r$) e para o coeficiente de variação de repetibilidade (CV_r).....	111
Tabela F. 1 - Estudo da precisão intermédia nos ensaios de fortificação com 0,00500 e 0,0250 µg/mL de glifosato, na matriz morango. Está também apresentada a média ($\bar{x}$) das concentrações obtidas experimentalmente, o desvio-padrão (S_{PI}), a precisão intermédia (PI), a percentagem de precisão intermédia ($\%PI$) e o coeficiente de variação da precisão intermédia (CV_{PI}).	114
Tabela F. 2 - Estudo da precisão intermédia nos ensaios de fortificação com 0,00500 e 0,0250 µg/mL de glifosato, na matriz curgete. Está também apresentada a média ($\bar{x}$) das concentrações obtidas experimentalmente, o desvio-padrão (S_{PI}), a precisão intermédia (PI), a percentagem de precisão intermédia ($\%PI$) e o coeficiente de variação da precisão intermédia (CV_{PI}).....	115
Tabela G. 1 - Concentração obtida (µg/mL) e percentagem de recuperação ($\%R$) dos ensaios de fortificação com 0,00500 e 0,0250 µg/mL de glifosato, para a matriz morango. Está também apresentada a taxa de recuperação média ($\%R$), desvio-padrão (S_R) e coeficiente de variação (CV_R).....	118
Tabela G. 2 - Concentração obtida (µg/mL) e percentagem de recuperação ($\%R$) dos ensaios de fortificação com 0,00500 e 0,0250 µg/mL de glifosato, para a matriz curgete. Está também apresentada a taxa de recuperação média ($\%R$), desvio-padrão (S_R) e coeficiente de variação (CV_R).....	119

ÍNDICE DE EQUAÇÕES

Equação 2.1 - Cálculo da fração de massa, w_R , em mg kg^{-1} , sendo que: A_{pico} corresponde à área do pico do pesticida; b corresponde à ordenada na origem da reta de calibração; m corresponde ao declive da reta de calibração; m_a corresponde à massa da amostra pesada inicialmente; V_t corresponde ao volume total do extrato da amostra; e $F_{\text{método}}$ corresponde ao fator do método que é o quociente entre V_t e m_a	24
Equação 2.2 - Reta de calibração em matriz, em que: A_{pico} corresponde do pico do pesticida m corresponde ao declive da reta de calibração; b corresponde à ordenada na origem da reta de calibração; e $C_{\text{pesticida}}$ corresponde à contração do pesticida.	24
Equação 2.3 – Equação de <i>van Deemter</i> para a altura de um prato teórico, H , em que u corresponde à velocidade de fluxo linear da fase móvel (cm s^{-1}); e A , B e C correspondem as constantes para uma dada coluna e fase estacionária para os efeitos de percursos múltiplos, difusão longitudinal e transferência de massa, respetivamente.	27
Equação 2.4 – Forma algébrica da equação de uma curva de calibração, em que: y representa ao sinal do analito (área do pico do analito); m representa o declive da reta; x representa à concentração de analito; e b representa a ordenada na origem.	36
Equação 2.5 - Diferença de variâncias DS^2 em que, N é o número de padrões de calibração; S_{y1}^2 é o desvio-padrão residual da função de calibração linear; e S_{y2}^2 é o desvio-padrão residual da função de calibração não linear.	37
Equação 2.6 - Valor da distribuição de <i>Fisher-Snedecor</i> para um nível de significância de 1% e $N-3$ graus de liberdade, VT	37
Equação 2.7 - Coeficiente de correlação, R , de uma reta em que 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 ; i corresponde ao número do padrão; N corresponde ao número de pontos marcados na reta.	37
Equação 2.8 - Percentagem do desvio das concentrações experimentais, % Desvio, dado pela diferença entre a concentração experimental ($C_{\text{teórica}}$) e a concentração calculada a partir da curva de calibração (C_{cal}), sobre a concentração calculada.	38

Equação 2.9 - Fator de resposta $FR_{(y/x)_i}$, em que i corresponde ao número do padrão; y_i corresponde ao valor individual do sinal instrumental para i ; e x_i corresponde ao valor individual da concentração para i	38
Equação 2.10 - Limite de detecção segundo uma calibração linear, em que Sy/x corresponde ao desvio padrão da curva de calibração; e m corresponde ao declive da reta.	40
Equação 2.11 - Limite de quantificação segundo uma calibração linear, em que Sy/x corresponde ao desvio padrão da curva de calibração; e m corresponde ao declive da reta.	40
Equação 2.12 - Limite de repetibilidade, r , em que, t é o valor da distribuição de <i>t-student</i> para um nível de confiança de 95% para $n-1$ graus de liberdade e Sr é o desvio padrão de repetibilidade associada aos resultados.....	41
Equação 2.13 - Desvio padrão de precisão intermédia Sp_i em que t é o número de amostras ensaiadas, n é o número de ensaios efetuados por amostra, j é o número da amostra, k o número do resultado obtido para a amostra j , y_{jk} é o resultado individual para a amostra j de 1 a t , e y_j é a média dos resultados a amostra j de 1 a t	42
Equação 2.14 - Percentagem de recuperação, %R, em que CF corresponde à concentração da amostra fortificada; CA corresponde à concentração da amostra; e CP corresponde à concentração teórica de padrão.	43
Equação 2.15 - Incerteza associada à precisão, $uprecisão$, em que CA é o valor do limite do critério de aceitação associado à precisão do método.	44
Equação 2.16 – Incerteza associada à exatidão com base em dados de ensaios de recuperação $u_{ver}(R)$ em que R é a recuperação média das amostras fortificadas; S_{obs} é o desvio-padrão das amostras fortificadas; n é o número de ensaios realizados; c_{obs} é a concentração média dos fortificadas; $u(c_{fort})$ é a incerteza associada à concentração do analito adicionado à amostras; e c_{fort} é a concentração de fortificação da amostra. Esta equação só é válida quando $u_{(fort)}/c_{fort} \ll 1$	44
Equação 2.17 – Incerteza combinada uc associada a um valor y , em que up e uq , correspondem às incertezas associadas aos parâmetros para os quais é determinada a incerteza.	44
Equação 2.18 – Incerteza Expandida, U , em que uc é a incerteza combinada e K é o fator ou coeficiente de expansão.	45
Equação 4.1 - Percentagem de efeito matriz (%ME), em que m_{matriz} corresponde ao declive da reta de calibração em matriz; $m_{solvente}$ corresponde ao declive da reta de calibração em solvente; e F corresponde à razão $m_{matriz}/m_{solvente}$	64

SIGLAS E ABREVIATURAS

ACN	Acetonitrilo
ADI	Dose Diária Aceitável do inglês <i>Acceptable Daily Intake</i>
AMPA	Ácido Aminometilfosfónico
AOEL	Nível Aceitável de Exposição do Operador do inglês <i>Acceptable Operator Exposure Level</i>
APCI	Ionização à Pressão Atmosférica do inglês <i>Atmosferic Pressure Chemical Ionization</i>
APPI	Fotoionização à Pressão Atmosférica do inglês <i>Atmosferic Pressure Photoionization</i>
ARfD	Dose Aguda de Referência do inglês <i>Acute Reference Dose</i>
CAD	Dissociação Ativada por Colisão do inglês <i>Collisionally Activated Dissociation</i>
CC	Corrente Contínua
CE	Comissão europeia
CGP	Carbono Grafítico Poroso
CRG	Culturas Resistentes ao Glifosato
DAHP	3-Deoxi-D-Arabino-Heptulosano 7-Fosfato
DHD	3-Dehidroquinato Desidratase
DHQ	3-Dehidroquinato
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
dSPE	Extração em Fase Sólida Dispersiva do inglês <i>Dispersive Solid-Phase Extration</i>
DRAP	Direção Regional de Agricultura e Pescas
EDTA	Ácido Etilenodiamino Tetra-Acético
ECHA	Agência Europeia das Substâncias Químicas do inglês <i>European Chemicals Agency</i>

EFSA	Autoridade europeia para a Segurança Alimentar do inglês <i>European Food Safety Authority</i>
EPSP	5-Enolpiruvilshiquimato-3-Fosfato Sintase
ESI	<i>Electrospray</i>
EUA	Estados Unidos da América
EURL-SRM	Laboratórios de Referência da UE para pesticidas que requerem Métodos de Resíduo Único
FAO	Organização das Nações Unidas para a Alimentação e a Agricultura do inglês <i>Food and Agriculture Organization</i>
FMOC-Cl	Cloreto de Fluorenilmetiloxycarbonil
GC-MS	Cromatografia Gasosa acoplada à Espetrometria de Massa do inglês <i>Gas Chromatography-Mass Spectrometry</i>
GC-MS/MS	Cromatografia Gasosa acoplada à Espetrometria de Massa em <i>Tandem</i> do inglês <i>Gas Chromatography-tandem Mass Spectrometry</i>
GOX	Glifosato Oxidoredutase
HDG	Herbicidas Derivados de Glifosato
HILIC	Cromatografia Líquida de Interação Hidrofílica do inglês <i>Hidrophilic Interaction Chromatography</i>
HPLC	Cromatografia Líquida de Elevada Eficiência do inglês <i>High Performance Liquid Chromatography</i>
IARC	Agência Internacional de Pesquisa em Cancro do inglês <i>International Agency for Research on Cancer</i>
IL-IS	Padrão Interno de Isótopos Análogos do inglês <i>Isotope-Labeled Internal Standard</i>
IUPAC	União Internacional de Química Pura e Aplicada do inglês <i>International Union of Pure and Applied Chemistry</i>
K	Fator de expansão
LC-ESI-MS/MS	Cromatografia Líquida acoplada à Espectrometria de Massa em <i>Tandem</i> com Ionização por <i>Electrospray</i> do inglês <i>Reversed phase Liquid Chromatography-tandem Mass Spectrometry via electrospray</i>
LC-MS	Cromatografia Líquida acoplada à Espectrometria de Massa do inglês <i>Liquid Chromatography-Mass Spectrometry</i>
LC-MS/MS	Cromatografia Líquida acoplada à Espectrometria de Massa em <i>Tandem</i> do inglês <i>Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry</i>
LD	Limite de Detecção
LMR	Limite Máximo de Resíduos
LNH	Linfoma Não Hodgkin

LQ	Limite de Quantificação
m/z	Razão Massa/Carga
MS/MS	Espetrometria de Massa em <i>Tandem</i>
MRC	Materiais de Referência Certificados
MRM	Monitorização de Reações Múltiplas
ONG	Organizações Não Governamentais
PC	Ponto de Controlo
PEP	Fosfoenolpiruvato
PI	Padrão Interno
POEA	Polioxietilenamida
Q1	Primeiro quadrupolo
q2	Célula de colisão
Q3	Segundo quadrupolo
QuEChERS	<i>Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe</i>
QuPPe	<i>Quick Polar Pesticide Method</i>
R	Coeficiente de correlação
RF	Radiofrequência
RI	Razão Iónica
S3P	Shiquimato-3-Fosfato
SDH	Shiquimato Desidrogenase
SGS	<i>Société Générale de Surveillance</i>
SPE	Extração em fase sólida do inglês <i>Solid-Phase Extration</i>
SRM	Monitorização de Reação Seleccionada do inglês <i>Selective Reaction Monitoring</i>
ST	Solução de Trabalho
TMDI	Ingestão Diária Máxima Teórica do inglês <i>Theoretical Maximum Daily Intake</i>
TQ	Tripló Quadrupolo
TR	Tempo de Retenção
UE	União Europeia
UHPLC	Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência do inglês <i>Ultra High Performance Liquid Chromatography</i>
U	Incerteza expandida
uc	Incerteza combinada

uprecisão	Incerteza associada à precisão
USA EPA	Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos da América do inglês <i>United States of America Environmental Protection Agency</i>
uver	Incerteza associada à exatidão
VT	Valor de Teste
wR	Fração de Massa

ENQUADRAMENTO

1.1 Contexto e Motivação

Os cereais, frutos e vegetais são alimentos fundamentais para uma dieta completa, variada e equilibrada, representando 71% do total de alimentos a ingerir diariamente (Cordeiro, 2011). Os cereais são considerados alimentos básicos, uma vez que, para a maior parte da população representam a maior fonte de energia, sendo que em 2018, segundo uma publicação recente da Organização das Nações Unidas para a Alimentação e Agricultura (FAO), o consumo anual foi de 174,19 kg per capita, já relativamente, aos vegetais e frutos, o consumo anual foi de 140,83 kg per capita e 76,89 kg per capita, respetivamente, sendo de salientar que a nível europeu Portugal tem um consumo de vegetais e fruta acima da média, sendo o país da União Europeia (UE) com maior consumo de fruta (FAO, 2021).

Além da dieta humana, estes alimentos também fazem parte da alimentação animal, estando a qualidade das forragens e rações intrinsecamente ligada com a qualidade dos produtos de origem animal e, consequentemente, tendo impactos na saúde humana (Sapkota *et al.*, 2007). Aliás, o Regulamento (CE) N.º178/2002 (2002), reflete sobre a necessidade de haver um acompanhamento de todos os processos desde a produção até ao consumo, determinando os princípios da legislação alimentar. Atualmente, no âmbito do Pacto Ecológico Europeu, foi adotada a Estratégia do Prado ao Prato (*Farm to Fork Strategy*) com vista à necessidade de haver um sistema alimentar robusto e resiliente, capaz de corresponder aos desafios de sistemas alimentares sustentáveis, justos, saudáveis e ecológicos (ASAE, 2020; CE, 2020).

Os cereais são compostos essencialmente por glúcidos (75%), proteínas (6% a 15%) e lípidos (1% a 10%), sendo também fontes de vitaminas E, do complexo B e ácido fólico, e de minerais, como o potássio, enxofre, magnésio, fósforo, entre outros (Kearney, 2010; Lorenz *et al.*, 1977; McKeivith, 2004; Thielecke *et al.*, 2020). Por outro lado, os frutos e vegetais, são principalmente reconhecidos pela sua riqueza em vitaminas, minerais, fibras e vários componentes bioativos, tais como carotenoides, compostos fenólicos, alcaloides e compostos azotados e organossulfurados, que possuem um efeito benéfico para a saúde (Wallace *et al.*, 2020; Yahia

et al., 2019). Embora não lhe seja dado tanto ênfase, também os cereais possuem componentes bioativos, como compostos fenólicos, β -glucanos, carotenoides, entre outros (Gani *et al.*, 2012; McKeivith, 2004).

Segundo Cassidy *et al.* (2013), prevê-se que haja um aumento global de 60 a 120% das exigências de cultivo agrícola, não só devido ao aumento da população mundial, mas também à alteração dos hábitos alimentares como consequência do aumento dos rendimentos. Por estas razões verifica-se um maior consumo de produtos de origem animal o que, consequentemente, leva à necessidade de utilização de maiores áreas dedicadas não só à plantação de culturas para alimentação animal, mas também para pastagens (Gerbens-Leenes & Nonhebel, 2002; Wirsenius *et al.*, 2010). De acordo com Foley *et al.* (2011), 75% dos terrenos agrícolas (cultivo e de pastagem) são usados para a produção animal, sendo que, segundo Capstaff & Miller (2018), o terreno usado para a plantação de forragens representa cerca de 70% da área agrícola.

Deste modo, atendendo à relevância dos cereais, frutos e vegetais na alimentação humana e animal e também à necessidade de assegurar a disponibilidade, segurança e qualidade destes produtos, é importante garantir que não existam perdas agrícolas, uma vez que podem representar não só escassez de alimentos, desequilíbrios nutricionais e fisiológicos, fome e morte, como também perdas económicas importantes para o país (Capstaff & Miller, 2018; Cassidy *et al.*, 2013; Naylor, 2002; Sapkota *et al.*, 2007).

As principais barreiras à germinação e crescimento das plantas são os perigos físicos como a dessecação, a predação das sementes e seres herbívoros. Além disso, segundo Patterson (1995), cerca de 12% das perdas em colheitas são devidas a ervas daninhas, visto que estas competem com as outras plantas, restringindo-lhes o acesso aos recursos necessários para o seu crescimento: luz, água e nutrientes (Fenner, 1985). Segundo Naylor (2002), algumas das causas que levam à classificação das ervas daninhas como tal são: a redução do rendimento; a redução da qualidade; o atraso das colheitas; a inibição da alimentação animal; a redução da fitossanidade; e o aumento dos perigos de segurança. De forma a promover um ambiente ótimo de crescimento para as plantas é necessário o controlo de fatores bióticos e abióticos havendo, por norma, uma otimização da disponibilidade de nutrientes de acordo com o tipo de plantação, bem como uma minimização da competição entre plantas através da gestão da sementeira, e controlo das ervas daninhas pelo uso de herbicidas e tipo de lavoura (Helander *et al.*, 2019).

Os herbicidas são fundamentais para o combate às ervas daninhas, especialmente em campos de agricultura convencional, onde, devido a uma fraca gestão da componente biológica, se verifica maior incidência de doenças e pragas, diminuição de matéria orgânica e alteração da atividade biológica do solo (Yamada *et al.*, 2009).

A nível mundial, os herbicidas derivados de glifosato (HDG) são os mais usados devido à sua não-seletividade, sendo utilizados não só para o controlo das ervas daninhas, mas

também como agentes dessecantes e auxiliares de colheita (Xu *et al.*, 2019; Yamada *et al.*, 2009). Quando foi pela primeira vez introduzido no mercado, o glifosato foi anunciado como um herbicida inovador, inclusive Duke & Powles (2008) afirmam que é o herbicida mais importante desta Era, referindo-se ao mesmo como o herbicida com maior sucesso da história, “*a once-in-a-century herbicide*” (Richmond, 2018).

Inicialmente, o glifosato foi admitido como *environmentally friendly*, uma vez que se pensava que o herbicida inibe apenas um enzima da via do shiquimato, exclusiva das plantas e de alguns fungos e bactérias (Yamada *et al.*, 2009). Todavia, a sua inocuidade tem sido questionada, à medida que estudos mais recentes têm revelado efeitos nefastos não só para com o meio ambiente, mas também para a saúde animal e humana.

Em 2015, a Agência Internacional de Pesquisa em Cancro (IARC) classificou o glifosato no grupo 2A como “provavelmente carcinogénico para os humanos”, gerando uma enorme controvérsia (Guyton *et al.*, 2015). Contrariamente, a Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos da América (USA EPA), a Autoridade Europeia para a Segurança Alimentar (EFSA) e a Agência Europeia das Substâncias Químicas (ECHA) concluíram que o glifosato não representa um risco significativo para a população atendendo aos níveis de exposição normais (Benbrook, 2019; Richmond, 2018). Apesar de não existir consenso sobre a toxicidade do glifosato a EFSA determinou que a Dose Diária Aceitável (ADI) estimada para o glifosato é de 0,5 mg/kg peso corporal/dia e que o Nível Aceitável de Exposição do Operador (AOEL) é de 0,1 mg/kg peso corporal/dia (EFSA, 2015).

Contudo, apesar da controvérsia, vários países já implementaram medidas de restrição e proibição do uso do glifosato, tais como a Áustria, França, Alemanha e Vietname (Beckie *et al.*, 2020; Kudsk & Mathiassen, 2020). Em Portugal, apesar das várias restrições impostas (Decreto-Lei N.º 101/2009, 2009; Lei N.º 26/2013, 2013) o uso de glifosato continua a ser permitido, exceto na Região Autónoma do Açores, onde o uso dos herbicidas cuja substância ativa seja o glifosato está interdito no espaço público (Decreto Legislativo Regional N.º 28/2020/A, 2020 regulamentado pelo Decreto Regulamentar Regional N.º 5/2021/A, de 26 de abril de 2021). A legislação portuguesa tem já definidos limites máximos de resíduos para o glifosato, estando em curso a preparação de legislação com vista à implementação de um programa de análise ao glifosato em águas superficiais por recomendação do Assembleia da República (Resolução da Assembleia da República N.º 88/2016, 2016).

Do exposto, resulta claro que a toxicidade do glifosato é um tema controverso e não consensual devido, em parte, à falta de investigação com foco na exposição real aos herbicidas derivados de glifosato e aos efeitos desta exposição a longo prazo. Desta forma é imperativo que não só sejam realizados mais estudos que procurem clarificar o tema, mas também que haja um controlo mais atento através da obtenção de dados consistentes, fiáveis e precisos, permitindo a tomada de melhores decisões, sempre na salvaguarda da saúde do consumidor

(Agostini *et al.*, 2020; Benbrook, 2019; Bruggen *et al.*, 2018; Cesar *et al.*, 2018; Huhn, 2018; Nova *et al.*, 2020; Xu *et al.*, 2019).

A emergência do tema na atualidade, enquadrado no âmbito da Estratégia do Prado ao Prato do Pacto Ecológico Europeu, o tabu estabelecido pela comunidade científica versus o perigo que pode representar para o ambiente e saúde humana e animal, foram elementos suficientes para despertar o meu interesse e levar-me a procurar contribuir com o meu conhecimento para o principal objetivo da Estratégia: promover *um sistema alimentar robusto e resiliente, capaz de corresponder aos desafios de sistemas alimentares sustentáveis, justos, saudáveis e ecológicos*.

Com efeito, com esta dissertação, propõe-se o desenvolvimento e validação de uma metodologia para a análise de resíduos de glifosato de matrizes de origem vegetal, no laboratório da SGS Portugal, empresa internacionalmente reconhecida pelos seus serviços de inspeção, verificação, testagem e certificação, nomeadamente, no controlo de resíduos de pesticidas em alimentos. A metodologia desenvolvida apresentar-se-á vantajosa e essencial na medida em que permitirá detetar e quantificar com maior precisão e exatidão, a presença de resíduos de glifosato nas amostras, garantido que as decisões de rejeição ou aceitação dos produtos analisados são baseadas em dados confiáveis e concisos, salvaguardando a entrada de perigos na cadeia alimentar.

1.2 Objetivos

O principal objetivo do presente trabalho é o desenvolvimento de uma metodologia analítica para a determinação do glifosato em amostras alimentares de frutos e vegetais. Para além disso, este trabalho visa também a otimização do método de extração com base no método QuPPE (*Quick Polar Pesticide Method*), para posterior análise por cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massa em *tandem* com ionização por *electrospray* em modo Monitorização de Reações Múltiplas (MRM), e a validação do método analítico, com base no estudo da: curva de calibração/linearidade; gama de trabalho; repetibilidade; precisão intermédia; e exatidão.

1.3 Organização do documento

Esta dissertação encontra-se estruturada em cinco capítulos, nos quais se inclui o atual capítulo, capítulo I, referente ao enquadramento. No capítulo II realizou-se uma introdução ao tema onde é elaborada uma breve caracterização da empresa e onde são abordados alguns conceitos teóricos alusivos ao tema. No capítulo III encontra-se os materiais e métodos utilizados para a concretização deste trabalho. No capítulo IV são apresentados e discutidos os resultados e observações experimentais, comparando e sustentando com a literatura científica. No capítulo V apresentam-se as conclusões finais do trabalho. Por fim, são apresentadas as referências bibliográficas e a lista dos apêndices que sustentam o trabalho realizado.

INTRODUÇÃO

2.1 A Empresa

A *Société Générale de Surveillance*, SGS, é uma companhia multinacional, sediada em Genebra (Suíça), reconhecida mundialmente pela sua qualidade e integridade na realização de serviços de inspeção, verificação, testagem e certificação (SGS, 2020a).

Com os seus serviços, a SGS inspeciona e verifica os produtos comercializados atendendo aos requisitos de conformidade, acondicionamento, peso, quantidade e qualidade. Testa a qualidade, segurança e desempenho dos produtos face às normas regulamentares de saúde e segurança, e certifica-se que os produtos, processos e sistemas ou serviços, atendem às normas e padrões definidos internacionalmente, nacionalmente ou pelos clientes (SGS, 2020a).

A SGS tem uma ampla área de operação trabalhando com indústrias desde o setor da agricultura e alimentação, ao setor do ambiente, dos bens de consumo e retalho, das ciências da vida, do comércio internacional, da construção, da energia, da gestão de risco, industrial, logístico, mineral, do petróleo e gás, químico, da saúde e segurança, dos serviços de formação, setor público, da sustentabilidade e do transporte (SGS, 2020b). Atualmente, opera numa rede com mais de 2 600 escritórios e laboratórios, dispersos por todo o mundo, contando com um número superior a 89 000 funcionários.



Figura 2.1 - Logótipo da empresa SGS (SGS, 2020a).

2.1.1 A História

A história da SGS começa em 1878, quando Henri Goldstück, um jovem lituano em Rouen, França, transformou o comércio de grãos na Europa com um serviço inovador de

inspeção agrícola (SGS, 2020e). O jovem Goldstück percebeu que os exportadores precisavam de representação na defesa dos seus direitos, pois à data, os importadores de grãos apenas pagavam a quantidade de grão que recebiam e não aquela que era exportada na realidade, o que se traduzia em perdas para os exportadores. Assim, a ideia na base da SGS era defender os direitos dos exportadores, inspecionando e verificando a quantidade e qualidade do grão na receção (SGS, 2020d). A empresa foi fundada a 12 de dezembro de 1878, por Henri Goldstück juntamente com o seu amigo Maxwell Shafftington (SGS, 2020c).

Os tempos de guerra foram momentos conturbados para a empresa, pelo que, em 1915, durante a Primeira Grande Guerra (1914-1918), devido à participação da França no conflito, a empresa mudou a sua sede de Paris para Genebra na Suíça, devido à sua neutralidade na guerra. A 19 de julho de 1919 a empresa adotou o nome que a identifica até hoje, *Société Générale de Surveillance*. Na Segunda Guerra Mundial (1939-1945), a SGS teve um papel preponderante na inspeção dos bens de consumo destinados aos soldados (SGS, 2020d).

Na década de 50, a gestão de topo concluiu que, apesar do grande crescimento da empresa, era necessário diversificar e expandir o negócio, abrangendo áreas para além dos serviços agrícolas. Já no final dos anos 80 foram criados os serviços de Ciências da Vida e Certificação de Sistemas e Serviços (SGS, 2020d). Após a passagem do milénio, a SGS sofreu uma reestruturação corporativa que resultou nas 11 áreas de negócio atuais: agricultura e alimentação; química; construção; bens de consumo e retalho; energia; industrial; ciências da vida; indústria mineira; petróleo e gás; setor público; e transporte (SGS, 2020d, 2020e). Atualmente, a SGS continua a crescer e a procurar exceder as expectativas dos clientes e da sociedade, tendo como foco formas inovadoras de fornecer benefícios comerciais. O sucesso da SGS é apenas possível devido à contínua melhoria e inovação, reduzindo o risco e melhorando a produtividade e eficácia das operações dos clientes (SGS, 2020d).

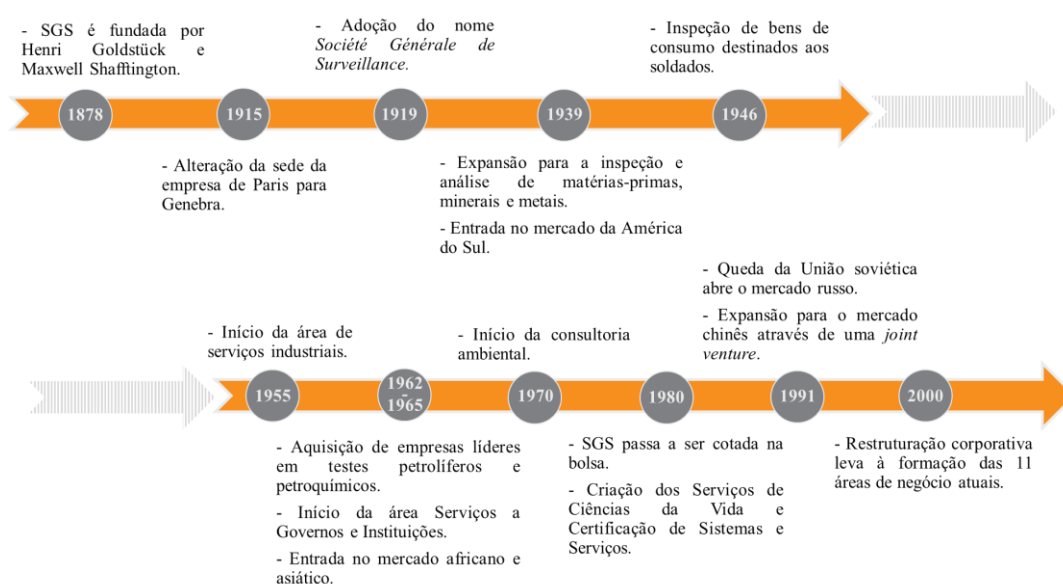


Figura 2.2 - Cronograma de eventos na história da SGS (adaptado SGS, 2020d).

2.1.2 A SGS em Portugal

A SGS Portugal foi fundada em 1922, tendo por base os mesmos princípios e valores do Grupo que, juntamente com a cultura e *know-how* foram determinantes para o sucesso da empresa. Atualmente, a SGS Portugal conta com mais de 300 colaboradores diretos (e cerca de 200 indiretos), estando dispersa por toda a área geográfica nacional, continente e ilhas (SGS, 2021b).

Inicialmente, a SGS Portugal estava apenas dedicada ao controlo das operações de carga e descarga de cereais a granel, tendo alargado a sua atividade de modo sustentável a outros setores, correspondendo às mudanças e exigências de mercado. Com uma ampla gama de serviços, a SGS está presente nas áreas de inspeção, verificação, ensaios e testes laboratoriais, consultoria e certificação nos mais diversos referenciais, possuindo laboratórios acreditados nas áreas: alimentar; agrícola e mineral; ambiental; cosméticos, detergentes e produtos de higiene e dispositivos médicos; produtos químicos e petrolíferos (SGS, 2021b).

2.1.3 Valores da Empresa

A SGS é caracterizada pela sua paixão, integridade, espírito empreendedor e inovação, que estão na génese do seu sucesso, guiando tudo o que a empresa faz e sendo os alicerces da sua organização. Além disto, a SGS é uma empresa que procura constantemente exceder as expectativas dos seus clientes e da sociedade, o que lhe proporciona liderança de mercado, que se traduz num aumento de qualidade, segurança e produtividade dos seus clientes e, por outro lado, na redução do risco. É ainda de salientar que os serviços da SGS fomentam a sustentabilidade corporativa, com a promoção da gestão de um negócio lucrativo a longo prazo, atendendo aos efeitos ambientais, sociais e económicos positivos e negativos (SGS, 2020e, 2020a). Em suma, a SGS presta serviços caracterizados por qualidade, segurança, produtividade, confiança, eficiência, sustentabilidade, redução de risco e rapidez de mercado (SGS, 2020e).

2.1.4 Área Agroalimentar

A empresa reconhece a importância do setor agroalimentar a nível do mercado mundial e a necessidade dos consumidores em assegurar a segurança e qualidade ao longo de todos os processos produtivos (SGS, 2020e, 2021a). Ademais, a SGS oferece um vasto leque de serviços com vista: à gestão de risco, à proteção do consumidor, ao cumprimento da legislação, a assegurar que os processos são bem feitos, e a garantir a qualidade e segurança entre diversas cadeias alimentares e agrícolas (SGS, 2021a).

Aos seus clientes, a SGS oferece soluções independentes ou integradas, com serviços tradicionais e digitais que visam acrescentar valor aos vários setores: agroquímicos, sementes,

biocombustíveis, fertilizantes, maquinaria agrícola e indústria alimentar e florestal (SGS, 2020e, 2021a).

2.2 Glifosato

2.2.1 A História do Glifosato

Durante o século XX a agricultura sofreu bastantes alterações, especialmente após a Segunda Guerra Mundial (1939-1945). De forma a evitar a escassez de alimentos verificada nesse período, e com vista a aumentar a produção, houve incentivos governamentais para a industrialização da agricultura, com a introdução de maquinaria agrícola e com o desenvolvimento de produtos químicos, tendo-se observado um incremento na utilização de produtos sintéticos (fertilizantes e pesticidas) para maior rendimento das produções (Goulson, 2020).

Em 1950, um químico da farmacêutica *Cilag*, Henri Martin, sintetizou pela primeira vez o glifosato. Contudo, uma vez que à época, não se identificou uso farmacêutico para a molécula, as amostras foram descartadas e vendidas a outras empresas que estudaram a sua aplicação indescritivelmente (Benbrook, 2016; Dill *et al.*, 2010).

A molécula do glifosato chegou até à Monsanto no âmbito de uma investigação para o desenvolvimento de agentes amaciadores de água, onde estavam a ser testados mais de 100 compostos relacionados com o ácido aminometilfosfónico (AMPA), tendo, mais tarde, o estudo destes compostos sido estendido à testagem como herbicidas contra ervas daninhas (Szekacs & Darvas, 2012). Efetivamente, em 1970, John Franz, um químico da *Monsanto*, identificou pela primeira vez o uso do glifosato como herbicida (Xu *et al.*, 2019). Após resultados promissores nos testes em estufa e em campo, o glifosato foi introduzido no mercado em 1974 como princípio ativo do herbicida *Roundup*[®] (Dill *et al.*, 2010; Xu *et al.*, 2019). Inicialmente, o novo herbicida foi bem recebido pelo mercado, estimando-se que nos Estados Unidos da América (EUA) terão sido aplicados cerca de 0,36 milhões de kg de herbicida no primeiro ano de mercado (Benbrook, 2016; Richmond, 2018; Xu *et al.*, 2019).

Em 1964, o glifosato já tinha sido patenteado pela *Stauffer Chemical* (Patente EUA N.º 3160632), como agente quelante de metais, como o cálcio, magnésio, manganês, cobre e zinco (Richmond, 2018; Toy & Uhing, 1964). Porém, foi em 1971 que o glifosato foi patenteado pela primeira vez como herbicida (Patente EUA N.º 3799758), tendo a patente expirado no ano 1991, na maioria dos países, e em 2000 nos EUA (Franz, 1971; Mesnage & Antoniou, 2017; Woodburn, 2000). Após esta data, não só se verificou um grande impacto no preço, mas também tornou acessível a produção de herbicidas de glifosato a outros produtores, como a *Bayer*, *CuPont*, *Sygenta*, *BASF*, *Crop Science*, *Dow* e várias empresas chinesas (Szekacs & Darvas, 2012; Woodburn, 2000; Xu *et al.*, 2019).

2.2.2 Composição e Ação do Herbicida Glifosato e seus Derivados

O glifosato ($C_3H_8NO_5P$), com o nome IUPAC N-(fosfonometil) glicina (**Figura 2.3**), é um ácido fosfónico polar, com baixa volatilidade e solúvel em água, principalmente conhecido

pela sua função como herbicida sistêmico (Baer & Marcel, 2014; Xu *et al.*, 2019). Além disso apresenta também uma ação quelante, ligando-se e formando complexos estáveis com catiões divalentes, como por exemplo cálcio, magnésio, manganês, zinco, alumínio e ferro (Mertens *et al.*, 2018; Toy & Uhing, 1964).

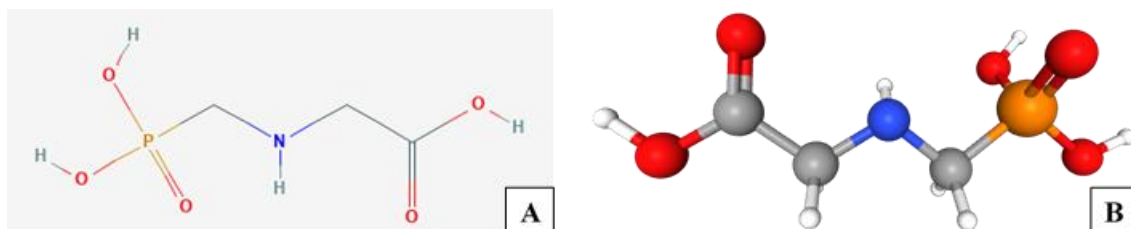


Figura 2.3 - Estrutura química do glifosato em 2D (A) e em 3D (B) (Obtido de PubChem, 2021).

O efeito tóxico do glifosato deve-se à inibição do enzima 5-enolpiruvilshiquimato-3-fosfato sintase (EPSP) (EC 2.5.1.19) (Xu *et al.*, 2019). Este enzima pertence a uma via exclusiva das plantas e de alguns fungos e bactérias, a via do shiquimato (**Figura 2.4**), sendo o responsável por catalisar a transformação do fosfoenolpiruvato (PEP) em shiquimato 3-fosfato (S3P) (Duke & Dayan, 2011; Szekacs & Darvas, 2012).

A inibição do EPSP sintase resulta de um mecanismo de inibição competitiva, uma vez que o glifosato é estruturalmente semelhante ao PEP, o substrato do enzima, competindo com este para o centro ativo (Mertens *et al.*, 2018; Schönbrunn *et al.*, 2001). A interrupção desta via leva a que haja acumulação do shiquimato, e a que não seja sintetizado o corismato (precursor da fenilalanina, triptofano e tirosina) bloqueando a síntese de proteínas e de outras moléculas das quais os aminoácidos aromáticos e o corismato são precursores, onde se incluem hormonas de crescimento e de defesa, fitoalexinas (compostos com atividade antimicrobiana), quinonas e compostos antioxidantes, como compostos fenólicos e tocoferóis (Fedtke & Duke, 2004; Maeda & Dudareva, 2012; Mertens *et al.*, 2018). É de mencionar que a desregulação desta via causa depleção de carbono e fosfato de outras vias (Duke & Dayan, 2011; Fedtke & Duke, 2004).

O glifosato é o princípio ativo dos HDG, onde está presente sob a forma de isopropilamina, sais de amónio, potássio, sódio ou de trimetilsulfónio, ou em grânulos (Agostini *et al.*, 2020; Duke & Dayan, 2011). Além disto, os HDG possuem coadjuvantes, como por exemplo os surfactantes, cuja função é promover a internalização e translocação do herbicida, sendo a polioxietilenamida (POEA) e os ácidos sulfúrico e fosfónico, alguns dos surfactantes mais utilizados (Agostini *et al.*, 2020; Bruggen *et al.*, 2018; J. Li *et al.*, 2005). Saliente-se ainda que vários autores como Bruggen *et al.* (2018), Faniband *et al.* (2021), Li *et al.* (2005) e Nerozzi *et al.* (2020), indicam os surfactantes como os principais contribuidores para a toxicidade dos herbicidas, afirmando que chegam a ser mais tóxicos que o herbicida em si.

Algumas das formulações mais conhecidas do herbicida são: *Abundit Extra*, *Credit* (Nufarm); *Xtreme*, *Glifonox* (Crystal Chem. Inter-America); *Glyphogan* (Makhteshim-Agan);

Ground-Up, *Rodeo* (Dow AgroSciences); *RoundUp*[®] (Monsanto); *Touchdown* (Sygenta AG); *Tragli*, *Wipe Out* e *Yerbimat*, entre outros (Agostini *et al.*, 2020; Szekacs & Darvas, 2012).

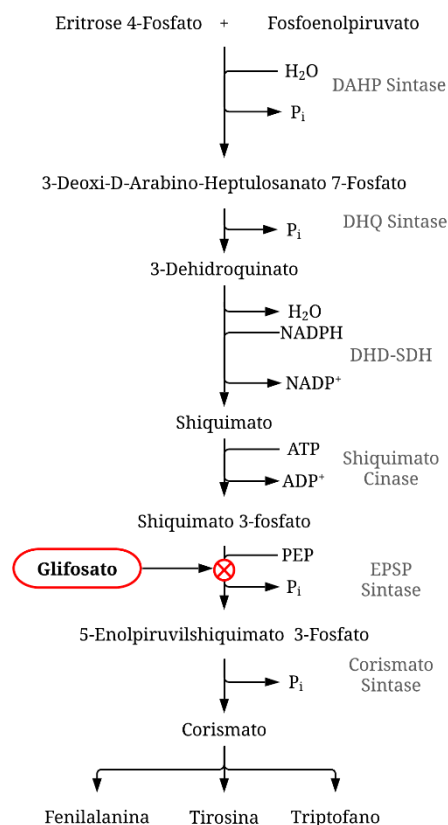


Figura 2.4 - Via do Shiquimato. O glifosato inibe o EPSP sintase interferindo na síntese de triptofano, fenilalanina e tirosina, necessárias à síntese de proteínas e de outras biomoléculas. PEP – Fosfoenolpiruvato; DAHP – 3-Deoxi-D-Arabino-Heptulosano 7-Fosfato; DHQ – 3-Deidroquinato; DHD – 3-Deidroquinato Desidratase; SDH – Shiquimato Desidrogenase (adaptado de Maeda & Dudareva, 2012).

2.2.3 Utilização

Inicialmente, devido à sua ação global não específica, o glifosato destinava-se apenas ao controlo de ervas daninhas em terrenos agrícolas, como pomares e campos de cultivo, durante a pré-germinação ou a pós-colheita, e em terrenos não agrícolas, como bosques, caminhos de ferro, linhas de alta tensão e passeios e estradas (Agostini *et al.*, 2020; Duke, 2018). Para além disto, em doses pequenas, o glifosato pode ser usado como dissecante e como regulador de crescimento, acelerando o amadurecimento (IARC, 2017).

Contudo, ao longo dos anos, verificou-se um aumento do volume e área de aplicação do glifosato, devido não só ao desenvolvimento de novas práticas agrícolas, como a semeadura direta e conservacionista, mas também devido à introdução de culturas geneticamente resistentes ao glifosato (CRG) em 1996 (Benbrook, 2016; Duke, 2018; Myers *et al.*, 2016; Yamada *et al.*, 2009). Desde a introdução das CRG, o uso de glifosato exponenciou significativamente, tendo-se verificado um aumento de cerca de 12 vezes entre 1995 e 2014 (Benbrook, 2016; Richmond, 2018). De forma a mostrar ilustrativamente o boom verificado após a

introdução das CRG, na **Figura 2.5** encontra-se um mapa dos EUA que mostra a quantidade de glifosato aplicado em terrenos agrícolas nos anos 1994 e 2014, sendo de notar que o uso do glifosato predomina na zona do médio-oeste, devido à grande produção de milho, soja e trigo, na Flórida e na Califórnia (Xu *et al.*, 2019). Atualmente, a nível internacional o maior uso de glifosato verifica-se no Brasil e na Argentina, sendo de referir que existe um uso significativo para fins não agrícolas principalmente na América do Norte, Europa Ocidental e no Japão (Woodburn, 2000).

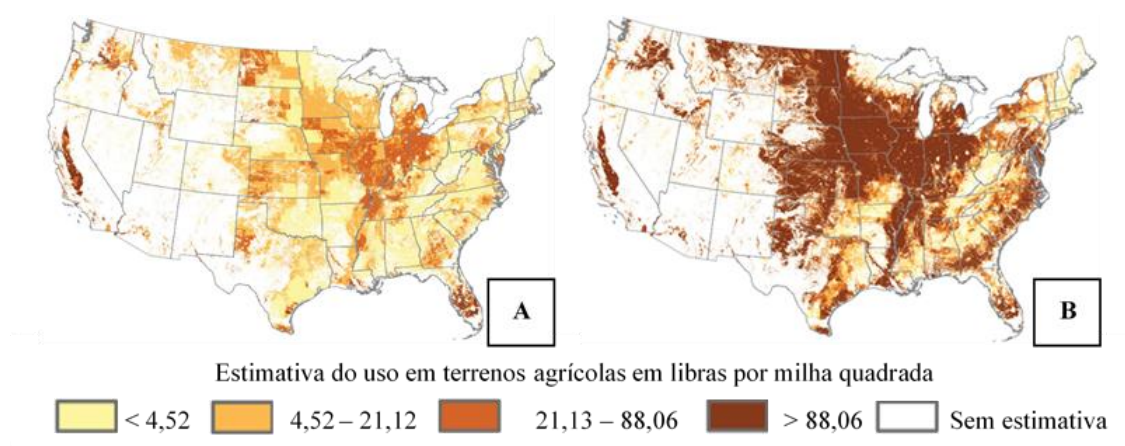


Figura 2.5 - Mapa com a distribuição geográfica e estimativa do uso de glifosato em terrenos agrícolas dos EUA, em lb/mi² entre 1994 (A) e 2014 (B). (adaptado de Duke, 2018).

Segundo Benbrook (2016), desde 1974 a 2014, o uso de glifosato aumentou de 56 para 826 toneladas, sendo que na última década a quantidade aplicada foi cerca de 71,65% do total de glifosato usado entre 1974 e 2014. Prevê-se que o seu uso irá continuar a aumentar sendo que, de acordo com Landrigan & Belpoggi (2018), esperava-se atingir um milhão de toneladas de glifosato aplicado por ano em 2020.

2.2.4 Metabolismo

2.2.4.1 Nas Plantas

Na agricultura, o glifosato é aplicado via *spray* sobre as folhas das plantas, onde há absorção e transporte pelo floema (Gomes *et al.*, 2014; J. Li *et al.*, 2005). Após a internalização o herbicida acumula-se nos tecidos com maior taxa de crescimento e atividade metabólica, ou seja, em meristemas apicais e raízes (Gomes *et al.*, 2014; Helander *et al.*, 2012). Alguns dos efeitos mais comuns observados da fitotoxicidade do glifosato incluem clorose (coloração verde pálido ou amarelada das folhas devido a produção insuficiente de clorofila), normalmente seguida de necrose, podendo também ser observadas deformações morfológicas nas folhas e dano nas raízes e rizoma (Szekacs & Darvas, 2012).

Posteriormente, é lançado para a rizosfera, onde entra em contacto com o solo e com os microrganismos (Bruggen *et al.*, 2018; Yamada *et al.*, 2009). Aqui, o glifosato liga-se fortemente às partículas inorgânicas, ficando imobilizado, e sendo rapidamente degradado pelos

microrganismos (Duke, 2020). A degradação biológica do glifosato pode ocorrer através da quebra da ligação carbono-fosfato por uma liase, produzindo sarcosina e fosfato inorgânico, ou através da oxidação da ligação carbono-azoto pelo glifosato oxidorreductase (GOX), produzindo glioxalato e o AMPA, o componente maioritário da degradação do glifosato, fitotóxico para as plantas (Blake & Pallett, 2018; Reddy *et al.*, 2008). Existe também uma metabolização minoritária pelas plantas, através de um modo semelhante ao dos microrganismos, predominando a via mediada pelo GOX (Duke & Dayan, 2011).

Alguns autores como Eker *et al.* (2006), Gomes *et al.* (2014) e Mertens *et al.* (2018), salientam que a propriedade quelante do glifosato pode ser relevante para o efeito tóxico, uma vez que pode causar carências minerais que irão influenciar a atividade enzimática e a síntese de algumas moléculas onde os minerais são bioconstituintes, afetando processos como a fotossíntese e a biossíntese de clorofila. Por outro lado, Duke (2020) afirma que se o glifosato afetasse a nutrição mineral das plantas, estes efeitos seriam notórios em doses mais baixas do que aquelas que podem causar danos nas culturas resistentes ao glifosato.

2.2.4.2 Nos Animais e Humanos

Dado que a via do shiquimato não está presente nos animais e humanos, estes não metabolizam o glifosato, sendo o herbicida eliminado através das fezes (90%) e da urina (Myers *et al.*, 2016; Williams *et al.*, 2000). Ainda assim, verifica-se uma tendência para a acumulação nos rins, no fígado, no cólon e no intestino delgado (Peillex & Pelletier, 2020).

As vias de exposição para humanos e animais podem ser orais (através da alimentação), inalatórias ou cutâneas, sendo a última uma via minoritária, mas predominante nos agricultores (Peillex & Pelletier, 2020). Devido à grande utilização e ubiquidade do glifosato no ambiente, nos últimos anos a sua inocuidade tem vindo a ser questionada, sendo a sua segurança um foco de preocupação, verificando-se a existência de um conjunto crescente de literatura sobre os riscos na saúde humana e animal, quer dos HDG e de glifosato (Mesnage *et al.*, 2017).

Apesar, de como já supramencionado, o glifosato não representar riscos para a saúde humana e animal, efeitos tóxicos têm vindo a ser reportados, estando estes sumarizados na **Figura 2.6**. É de referir que, dado que alguns microrganismos possuem a via do shiquimato, postula-se que poderá existir ação do glifosato sobre o microbiota intestinal, uma vez que foram detetados níveis baixos de AMPA no cólon, após ingestão (Brewster *et al.*, 1991; Hu *et al.*, 2021; Peillex & Pelletier, 2020).

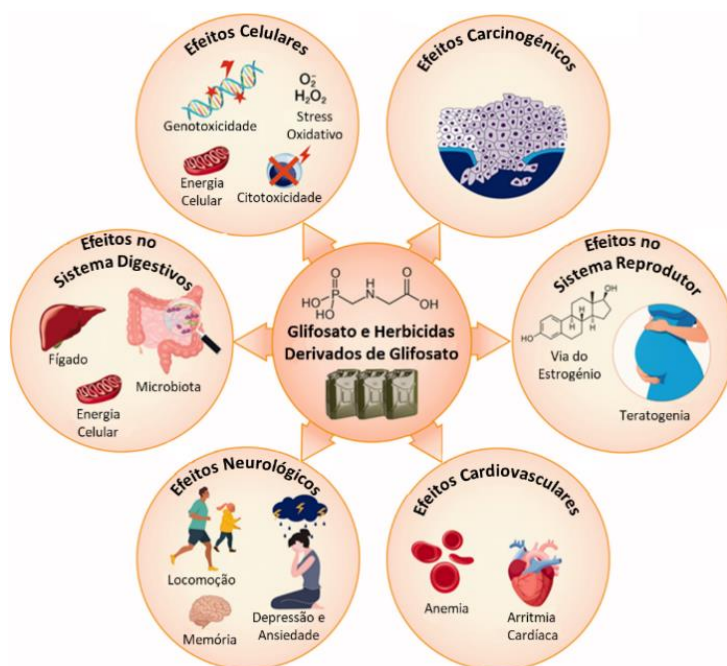


Figura 2.6 - Sumário dos efeitos tóxicos do glifosato e herbicidas derivados na saúde, que têm vindo a ser reportados por diversos estudos (adaptado de Peillex & Pelletier, 2020).

A toxicidade do glifosato é, para além da dose, influenciada pelo tipo de células e pelos componentes na formulação do herbicida (Agostini *et al.*, 2020; Peillex & Pelletier, 2020). Consequentemente, verificam-se efeitos de citotoxicidade, genotoxicidade, aumento do stress oxidativo e desemparelhamento da atividade mitocondrial, interferindo com o complexo II (Agostini *et al.*, 2020; Mesnage *et al.*, 2017; Peillex & Pelletier, 2020).

Existe também uma grande preocupação sobre o impacto a nível do sistema reprodutor dado que alguns estudos indicam a existência de disrupção endócrina, com interferências na via do estrogénio e diminuição da produção de testosterona (Agostini *et al.*, 2020; Peillex & Pelletier, 2020). Nos seus estudos, Campaña *et al.* (2010), observaram uma correlação positiva entre a exposição a HDG e más formações nos fetos, propondo a existência de um possível efeito teratogénico.

Em casos de exposição aguda, a toxicidade do glifosato é principalmente observada a nível cardiovascular e neurológico, dado que este perturba a via da dopamina e a atividade da acetilcolinesterase (Bruggen *et al.*, 2018; Peillex & Pelletier, 2020). Segundo Chang & Chang (2009) e Zouaoui *et al.* (2013), os efeitos mais comuns associados à intoxicação com HDG são a ulceração orofaríngea, náuseas e vômitos, dificuldades respiratórias, arritmias cardíacas, falha da função renal e estado alterado de consciência, sendo também verificada hipotensão, hipercalemia, paragem cardiorrespiratória e choque cardiovascular.

O efeito carcinogénico do glifosato e dos seus herbicidas é ainda um tema controverso. Porém, postula-se que o glifosato tenha um efeito promotor de tumores, estando correlacionado com alguns tipos de cancro (Peillex & Pelletier, 2020). Relativamente ao linfoma não Hodgkin (LNH), alguns estudos mostram uma correlação com o herbicida enquanto outros

não, contudo, na sua meta-análise Zhang *et al.* (2019) mostra que há um aumento de 41% do risco do desenvolvimento do LNH em indivíduos expostos a HDG.

Os efeitos do glifosato e dos herbicidas dele derivados na saúde humana e animal é um assunto controverso e sobre o qual a comunidade científica não tem uma opinião consensual. De fato existem estudos que revelam dados interessantes sobre as consequências da exposição a estes herbicidas, todavia, ao mesmo tempo, existem outras observações que continuam a mostrar que o glifosato é seguro. Vários autores, afirmam que a disparidade de opiniões na comunidade científica se deve, entre outros motivos, a diferenças na realização dos estudos, fomentando a necessidade de investigar as consequências a longo prazo de uma exposição real ao glifosato e HDG (Agostini *et al.*, 2020; Benbrook, 2019; Bruggen *et al.*, 2018; Cesar *et al.*, 2018; Huhn, 2018; Nova *et al.*, 2020; Xu *et al.*, 2019).

2.2.5 Glifosato em Produtos Alimentares

Tanto o glifosato como o seu metabolito de degradação AMPA podem ser relativamente persistentes no ambiente, o que pode resultar numa ampla gama de riscos ecológicos (Bai & Ogbourne, 2016). Consequentemente, têm sido observados vestígios de glifosato em produtos de origem vegetal e animal, o que sugere a exposição de humanos e animais aos resíduos presentes nas diferentes fontes alimentares (Agostini *et al.*, 2020; Granby *et al.*, 2003; Zoller *et al.*, 2018).

De forma a não se verificarem potenciais efeitos tóxicos do glifosato, a quantidade de resíduos do herbicida nos alimentos deve também ser inferior ao limite máximo de resíduos (LMR) (Agostini *et al.*, 2020; Bai & Ogbourne, 2016). Os LMR são limites estabelecidos com base em boas práticas agrícolas e com vista à proteção dos indivíduos mais vulneráveis (grávidas, lactantes, crianças e recém-nascidos e idosos) (EFSA, 2012). Na **Tabela 2.1** estão sumarizados alguns dos LMR estabelecidos pelo Regulamento (UE) N.º 293/2013 e pelo Decreto-Lei N.º 233/2006 (2006) para alguns alimentos, podendo-se constatar que, de uma forma geral, os valores variam bastante entre os alimentos. É, porém, de referir que tipicamente os LMR são determinados de acordo com a sensibilidade dos métodos analíticos validados, podendo o limite de quantificação do método para o glifosato variar entre 0,01 e 0,05 mg/kg (Bai & Ogbourne, 2016).

Tabela 2.1 - Limites máximos de resíduos de glifosato, em mg/kg, para frutas, vegetais e cereais, na UE e em Portugal, de acordo com o Regulamento (UE) N.º 293/2013 (2013) e com o Decreto-Lei N.º 233/2006 (2006), respetivamente.

<i>Alimentos</i>		LMR na UE (mg/kg)	LMR em Portugal (mg/kg)
Frutas	<i>Azeitonas</i>	1	1
	<i>Laranjas, clementinas e uvas</i>	0,5	0,5
	<i>Outros</i>	0,1	0,1
Vegetais	<i>Milho doce</i>	3	0,1
	<i>Batatas</i>	0,5	0,5
	<i>Outros</i>	0,1	0,1
Cereais	<i>Cevada, aveia e sorgo</i>	20	20
	<i>Trigo e centeio</i>	10	10
	<i>Milho</i>	1	1
	<i>Outros</i>	0,1	0,1

A EFSA (2015) define que o ADI para o glifosato é de 0,5 mg/kg corporal/dia e o AOEL de 0,1 mg/kg peso corporal/dia, sendo a Dose Aguda de Referência (ARfD) de 0,5 mg/kg peso corporal. Já para a FAO (2016), o ADI é de 0 a 1 mg/kg peso corporal/dia. De acordo com Williams *et al.* (2000), a Ingestão Diária Máxima Teórica (TMDI) para o glifosato é de 23,8 µg/kg/dia para adultos, pelo que, segundo Bai & Ogbourne (2016), atendendo aos LMR e à concentração de resíduos nos alimentos, a probabilidade de se verificarem efeitos de toxicidade crónica resultantes da ingestão de alimentos contaminados com glifosato varia de possível a improvável.

Todavia, o tipo de agricultura influencia bastante quantidade de resíduos de herbicidas nos alimentos, uma vez que numa agricultura orgânica a produção segue uma perspetiva ecológica, com recurso a um conjunto restrito de agroquímicos (Gomiero, 2018). Simultaneamente é preciso ter em consideração que a aplicação do glifosato em culturas transgénicas aumenta a possibilidade de contaminação uma vez que, não só há aplicação de um maior volume de herbicida, como também as CRG absorvem e acumulam o glifosato e os seus produtos de degradação (Bai & Ogbourne, 2016; Gomiero, 2018).

O relatório de 2014 da EFSA, sobre a presença de resíduos de 778 pesticidas diferentes (incluindo o glifosato) em alimentos, compara a presença de resíduos de pesticidas em alimentos orgânicos e em alimentos convencionais na UE, mostrando que apenas 13,6% das amostras orgânicas apresentam resíduos acima do limite que quantificação, em oposição aos 48,4% das amostras convencionais (EFSA, 2016; Gomiero, 2018). De outro modo, a avaliação da presença de resíduos de glifosato em alimentos de mercados suíços realizada por Granby *et al.* (2003) e por Zoller *et al.* (2018), mostrou não existirem perigos para a saúde humana, visto observarem-se concentrações muito inferiores aos limites estabelecidos pela EFSA.

A avaliação da exposição da população ao glifosato é efetuada através de análises à urina, uma vez que, como já referido o glifosato é solúvel em água e fracamente metabolizado (Niemann *et al.*, 2015; Zoller *et al.*, 2018). Recentemente, estudos têm demonstrado um aumento da exposição alimentar do glifosato, visto que se tem registado um aumento dos seus níveis em amostras de urina (Bai & Ogbourne, 2016). Em Portugal, com vista a avaliar esta exposição em adultos, Nova *et al.* (2020) pesquisaram a presença de resíduos de glifosato na urina, tendo concluindo que apesar de se observarem valores superiores aos obtidos noutros estudos europeus, estes eram, ainda assim, inferiores ao ADI e AOEL. De igual modo, mais recentemente, Faniband *et al.* (2021) realizou um estudo semelhante em jovens adultos suíços, tendo também verificado baixas concentrações de glifosato na urina. É de notar que ambos os estudos foram realizados na Europa, onde o uso de HDG é maioritariamente destinado ao controlo de ervas-daninhas nos passeios e estradas (Woodburn, 2000).

De forma a averiguar a influencia do tipo de alimentação, Fagan *et al.* (2020) estudaram o efeito das alterações da dieta (de convencional para orgânica) na redução dos níveis de glifosato na urina, tendo concluído que indivíduos com uma dieta orgânica apresentam níveis mais reduzidos do herbicida. Curiosamente, foram observados níveis superiores de glifosato e AMPA em crianças, reiterando a necessidade de proteger os indivíduos mais sensíveis.

Embora se possa afirmar que o nível de resíduos de glifosato nos alimentos não represente um perigo, é evidente que estão presentes e que são consumidos por humanos e animais, podendo, a longo prazo, representar um risco para a saúde. Portanto, apesar de não ser possível tirar conclusões sobre a toxicidade do glifosato, será prudente considerar novas alternativas à sua aplicação e, como já várias vezes mencionado, realizar mais investigação.

2.2.6 Controvérsia e Legislação

Relativamente à legislação, na UE a regulamentação dos pesticidas tem como base legal o Regulamento (CE) N.º 1107/2009 (2009), que prevê a harmonização das normas para aprovação dos ingredientes ativos dos pesticidas, e o Regulamento (CE) N.º 395/2006 (2005), que define os limites máximos de resíduos nos alimentos e rações. Além destes, a Diretiva 2009/128/CE (2009), complementa os regulamentos na medida em que oferece uma plataforma de trabalho com vista a um uso mais sustentável e que promove uma agricultura com baixo uso de pesticidas.

Na UE, o glifosato foi pela primeira vez aprovado em 2002, para um período de 10 anos, estando a sua utilização restrita a aplicações não agrícolas e agrícolas pré- e pós-colheita, não estando permitido o cultivo de CRG (Kudsk & Mathiassen, 2020). A aprovação do glifosato viria a ser novamente alvo de avaliação em 2010.

Em 2015, após uma exaustiva avaliação de risco realizada pela IARC, o glifosato e HDG foram classificados no grupo 2A como “provavelmente cancerígenos para humanos” (IARC, 2017). Como consequência da avaliação da IARC, iniciou-se um grande debate, que envolveu

entidades científicas e reguladoras, a entidade detentora da patente original (Monsanto) e vários especialistas na área (Benbrook, 2019). Em oposição, a USA EPA, EFSA e a ECHA concluíram que o glifosato não representa um risco significativo de cancro para o público em geral, classificando-o como “provavelmente não cancerígeno para humanos”, advertindo porém para as formulações contendo POEA (EFSA, 2015; EPA, 2016; Kudsk & Mathiassen, 2020). Aliás, mais se salienta que, até ao momento, a IARC foi a única entidade reguladora que classificou o glifosato como cancerígeno (Kudsk & Mathiassen, 2020).

Com vista a compreender as divergências entre a conclusão da IARC e a resposta da USA EPA, Benbrook (2019) analisou comparativamente os dois estudos tendo concluído que estes divergiam em três aspetos: (1) tipo de estudos – enquanto a IARC se baseia em estudos revistos por pares, a USA EPA utiliza estudos não publicados e financiados pela Monsanto; (2) formulação do glifosato – ao passo que a IARC se baseia em estudos sobre glifosato e HDG, a EPA apenas se baseia no glifosato puro; (3) tipo de exposição – a avaliação da USA EPA apenas se foca na exposição alimentar da população geral não contando com os riscos de uma exposição ocupacional mais elevada. De igual modo, Portier *et al.* (2016) avaliaram comparativamente os estudos da IARC e da EFSA, evidenciando a falta de transparência na avaliação da EFSA ao basear-se em estudos não publicados, financiados pelas empresas, dando pouco ênfase aos estudos disponíveis na literatura e revistos por pares. De referir que Christopher J. Portier foi consultor de litígios contra a Monsanto, tendo sido contratado para classificar o glifosato como cancerígeno, revelando a existência de conflitos de interesses na classificação da IARC (American Council on Science and Health, 2018; Webster, 2017).

A nível europeu, o debate sobre a segurança do glifosato traduziu-se em atrasos na reaprovação do uso do herbicida e na divisão de opiniões entre os países do Norte e Sul da Europa, com os países do Norte a favor da renovação da aprovação do glifosato e os países do Sul contra (Kudsk & Mathiassen, 2020). Juntamente com a aprovação do glifosato, foi solicitado aos Estados-Membros da UE que desenvolvessem programas para a proteção das águas subterrâneas, nomeadamente no que se refere às utilizações não agrícolas, à proteção dos operadores e aos utilizadores não profissionais, aos riscos para os vertebrados terrestres e às plantas não-alvo, ao risco para a biodiversidade e do cumprimento de utilizações pré-colheita com boas práticas agrícolas (Kudsk & Mathiassen, 2020). Em Portugal, está ainda em curso a preparação de legislação com vista à implementação de um programa de análise ao glifosato em águas superficiais por recomendação na Resolução da Assembleia da República N.º 88/2016 (2016).

Como resultado da reaprovação do glifosato vários países implementaram já medidas de restrição e proibição do seu uso (Beckie *et al.*, 2020; Kudsk & Mathiassen, 2020). Em Portugal a aplicação do glifosato continua a ser permitida apesar de, dependendo do tipo de uso, profissional ou não, ser necessário formação específica obrigatória para aplicação de fitofármacos e licenças de aplicador emitidas pelas Direções Regionais de Agricultura e Pescas

(Decreto-Lei N.º 101/2009, 2009; Lei N.º 26/2013, 2013). Excecionalmente, na Região Autónoma dos Açores, o uso dos herbicidas cuja substância ativa seja o glifosato está interdito no espaço público, de acordo com o Decreto Legislativo Regional N.º 28/2020/A (2020), regulamentado pelo Decreto Regulamentar Regional N.º 5/2021/A (2021). Os limites máximos de resíduos definidos para o glifosato são definidos de acordo com as diretivas da Comissão Europeia, posteriormente transpostas para a lei portuguesa. O Decreto-Lei N.º 233/2006 (2006) é o mais recente diploma publicado que fixa os limites máximos de resíduos de substâncias ativas de produtos fitofarmacêuticos permitidos nos produtos agrícolas de origem vegetal, tendo sido retificado pela Declaração de Retificação N.º 8/2007 (2007).

É de mencionar que Organizações Não Governamentais (ONG) e ativistas ambientalistas têm vindo a exercer pressões para a tomada de decisões políticas, que consequentemente preveem a introdução de medidas para a retirada faseada do glifosato, com vista ao abandono das práticas agrícolas com recurso a este herbicida e seus derivados.

Assim, estando prevista para 2022 a reavaliação da aprovação do uso de glifosato na UE, prevê-se, segundo o artigo de 15 de junho da *newsletter* da EFSA (2021), a introdução de medidas mais ambientalistas que levarão à aprovação de restrições nesta matéria, mas não à alteração da classificação do glifosato. Efetivamente, já estão documentados alguns estudos como por exemplo Beckie *et al.* (2020), onde se propõe alternativas à agricultura com recurso a agroquímicos.

2.3 Método de Extração

Cada método analítico compreende um determinado conjunto de procedimentos que inclui: a preparação das amostras, extração, purificação e determinação dos analitos de interesse (Chawla *et al.*, 2018; Prodhan *et al.*, 2017). Para a análise de resíduos de pesticidas em matrizes alimentares, a preparação das amostras é fundamental para se obterem bons resultados não só pela complexidade das matrizes que contêm outros componentes que interferem com a análise (proteínas, glúcidos, lípidos e pigmentos), mas também porque os analitos estão normalmente presentes em baixas concentrações (Chawla *et al.*, 2018; Lucci *et al.*, 2014; Nez *et al.*, 2012). Com efeito, os principais objetivos da preparação das amostras são a extração e purificação dos analitos de interesse, removendo as substâncias interferentes, sem que haja perda de analitos e sem que os resultados da análise sejam afetados adversamente (Wilkowska & Biziuk, 2011).

A escolha do método de extração depende de vários aspetos, tais como a composição e complexidade da matriz e das propriedades físico-químicas dos pesticidas (como por exemplo, a volatilidade e polaridade) (Lucci *et al.*, 2014). A extração líquido-líquido ou extração por solventes é das técnicas mais importantes para a extração de pesticidas em matrizes alimentares, baseando-se na imiscibilidade de dois líquidos com componentes de diferentes graus de solubilidade (Prodhan *et al.*, 2017). Porém, pode também existir co-extração de outros componentes da matriz, o que irá resultar em efeitos de matriz que interferem com a análise (Nez *et al.*, 2012). Este fenómeno é observado em matrizes de frutos, vegetais e cereais uma vez que estas contêm pigmentos, açúcares, lípidos, proteínas, antioxidantes e compostos sulfurados, pelo que, de forma a minimizar possíveis interferências, após extração é realizado um passo de limpeza (Kaczyński, 2017). Uma das técnicas de limpeza mais utilizada é extração em fase sólida dispersa (dSPE), tendo já sido avaliados os seguintes sorbentes: C18, SAX, Florosil, PSA, GCB, Z-Sep+, MWCN e quitosano (Kaczyński, 2017; Nez *et al.*, 2012).

O método de extração designado por QuEChERS (*Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe*) é, atualmente, o método mais utilizado para a análise multi-resíduos e multi-classe de diferentes pesticidas (Nez *et al.*, 2012). Esta técnica envolve a extração com solventes orgânicos (acetoneitrilo, acetato de etilo ou outros) e com sais (sulfato de magnésio), seguido de um passo de limpeza com extração de fase-sólida dispersiva (CVUA Stuttgart, 2011; Payá *et al.*, 2007). O QuEChERS é aplicável a uma ampla classe de pesticidas, com exceção dos pesticidas ou contaminantes altamente polares não compatíveis com QuEChERS (Attallah *et al.*, 2017).

Deste modo, em 2006 o Laboratório de Referência da União Europeia para pesticidas que requerem Métodos de Resíduo Único (EURL-SRM) desenvolveu o método *Quick Polar Pesticide*, um método rápido para a análise de vários pesticidas altamente polares em matrizes de origem vegetal, através da extração com metanol acidificado e análise por cromatografia

líquida acoplada à espectrometria de massa em *tandem* (LC-MS/MS) (Anastassiades *et al.*, 2020; Attallah *et al.*, 2017; Golge, 2021). Neste método, os resíduos de pesticidas e os seus metabolitos são extraídos da matriz, previamente homogeneizada, através do ajuste do teor de água, no caso dos produtos com teor de água inferior a 80%, e da adição de metanol acidificado com ácido fórmico, e consequentemente, a mistura é congelada, centrifugada, filtrada e diretamente analisada por LC-MS/MS (Anastassiades *et al.*, 2020). Na **Figura 2.7** encontra-se um resumo do procedimento do método de extração.

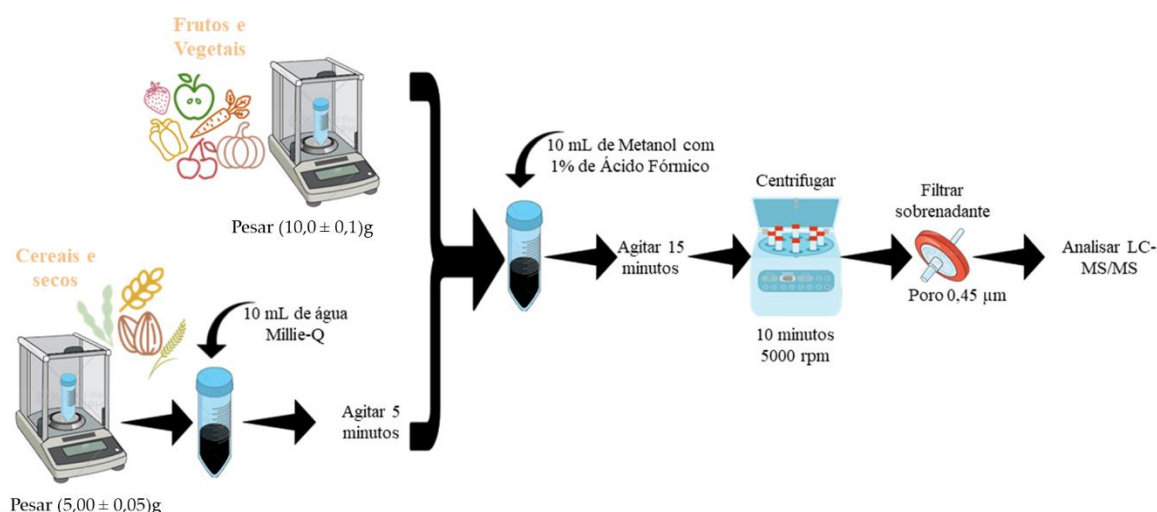


Figura 2.7 - Fluxograma resumido do método de extração QuPPE (adaptado de Anastassiades *et al.*, 2020).

É de notar que no método anteriormente mencionado não existem passos de limpeza, pelo que verificam fortes efeitos de matriz. Com efeito, de modo a desenvolver um método simples para a análise de herbicidas altamente polares em matrizes de origem vegetal, Kaczyński (Kaczyński, 2017) otimizou o método de extração QuPPE, realizando modificações ao método (alteração do solvente de extração) e introdução e seleção de uma limpeza em dPSE.

2.3.1 Preparação dos padrões de calibração

De forma a quantificar os pesticidas na maioria dos casos são usados isótopos análogos dos analitos em estudo como padrões internos (IL-IS), adicionados diretamente na amostra no início do procedimento de forma a compensar desvios de volume, perdas de analitos e efeitos de matriz (Anastassiades *et al.*, 2020). Com efeito, se não forem utilizados padrões internos (PI) é necessário compensar os efeitos de matriz através de calibrações em matriz ou através da adição de padrões (SANTE/12682/2019, 2019). Em ambos os casos, assume-se que o volume total do extrato da amostra é de 20 mL.

A compensação do efeito de matriz em cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massa (LC-MS) é mais complicada (SANTE/12682/2019, 2019). No caso das calibrações em matriz, a fração de massa (w_R) de um determinado pesticida numa dada amostra pode ser

calculada através da área do pico do pesticida, fator de correção e da massa da amostra pesada inicialmente, como demonstrado na **Equação 2.1** (Anastassiades *et al.*, 2020).

$$w_R = \frac{(A_{\text{pico}} - b)}{m} \times \frac{1}{m_a} \times V_t = \frac{(A_{\text{pico}} - b)}{m} \times F_{\text{método}}$$

Equação 2.1 - Cálculo da fração de massa, w_R , em mg kg^{-1} , sendo que: A_{pico} corresponde à área do pico do pesticida; b corresponde à ordenada na origem da reta de calibração; m corresponde ao declive da reta de calibração; m_a corresponde à massa da amostra pesada inicialmente; V_t corresponde ao volume total do extrato da amostra; e $F_{\text{método}}$ corresponde ao fator do método que é o quociente entre V_t e m_a .

Por outro lado, as calibrações através de padrão são as mais indicadas quando não são usados IS, uma vez que não só compensa os efeitos de matriz mais eficazmente, mas também as perdas de recuperação (Anastassiades *et al.*, 2020; SANTE/12682/2019, 2019). Neste método a concentração do analito na amostra a analisar é determinada por extrapolação, pelo que é imperativo que haja uma relação de linearidade entre as concentrações dos pesticidas e os sinais detetados em toda a gama de linearidade (Anastassiades *et al.*, 2020; SANTE/12682/2019, 2019). A **Equação 2.2** descreve o gráfico de calibração. A constante b da equação do gráfico de calibração indica a massa de pesticida presente na alíquota do extrato da amostra (Anastassiades *et al.*, 2020).

$$A_{\text{pico}} = m \times c_{\text{pesticida}} + b$$

Equação 2.2 - Reta de calibração em matriz, em que: A_{pico} corresponde do pico do pesticida m corresponde ao declive da reta de calibração; b corresponde à ordenada na origem da reta de calibração; e $c_{\text{pesticida}}$ corresponde à concentração do pesticida.

2.4 LC-MS/MS

A cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massa fornece uma potente ferramenta analítica (McMaster, 2005). Relativamente aos métodos cromatográficos convencionais, a técnica de LC-MS permite obter uma seletividade e confirmação adicional do analito em estudo, através da determinação da razão massa/carga dos iões (Kruve *et al.*, 2015a).

A cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massa em *tandem*, LC-MS/MS, permite obter mais informação uma vez que, para além de medir o peso molecular, fragmenta o ião precursor, segmentando-o em iões mais pequenos e medindo o seu peso molecular, através de um *scan* de produto de massa (McMaster, 2005). Na **Figura 2.8** encontra-se uma representação esquemática de um sistema LC-MS/MS. Estes sistemas são complexos, consistindo num sistema de cromatografia líquida de elevada eficiência (HPLC) acoplado a um espectrómetro de massa (McMaster, 2005). Uma vez que esta técnica envolve um vasto leque de parâmetros para que se obtenha a performance desejada, os parâmetros devem ser ou estar perto dos valores ótimos (Kruve *et al.*, 2015a).

A elevada sensibilidade desta técnica em conjunto com a sua versatilidade faz com que, atualmente, a técnica de LC-MS esteja na vanguarda das técnicas analíticas cobrindo uma vasta área de aplicações das quais se destacam: a descoberta e identificação de novos compostos para a indústria farmacêutica; a proteómica; e os estudos de vestígios de metabolitos e contaminantes (DelaTour *et al.*, 2018; S. Li *et al.*, 2021; McMaster, 2005; Steiner *et al.*, 2021).

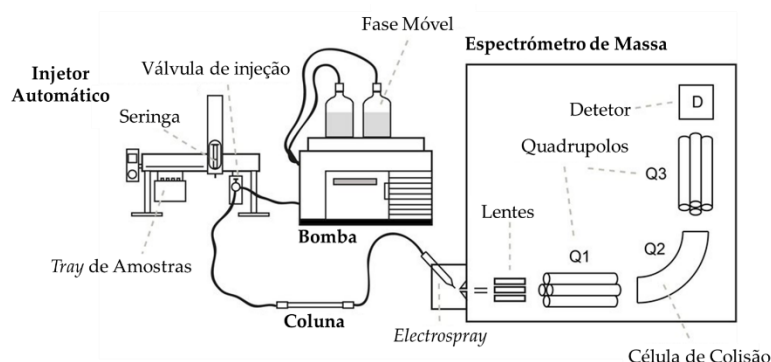


Figura 2.8 - Representação esquemática de um sistema LC-MS/MS com um triplo quadrupolo como analisador de massa (adaptado de Östman, 2018).

2.4.1 Cromatografia Líquida de Elevada Eficiência

A cromatografia é um método analítico inventado pelo botânico *Mikhail Tswett*, em 1903, sendo uma técnica crucial na separação, identificação e purificação dos componentes químicos de uma mistura complexa (Harris, 2010). O princípio de qualquer método cromatográfico é a forma como um componente de uma mistura complexa se distribui entre duas fases imiscíveis.

Os sistemas cromatográficos consistem numa fase estacionária, e numa fase móvel, que se movimenta sobre ou pela fase estacionária (Wilson, 2010). À medida que os compostos são eluídos, um detetor irá determinar a concentração do analito de interesse em função do tempo ou volume de eluição, originando um gráfico denominado de cromatograma (Harris, 2010). A afinidade dos componentes de uma mistura para cada uma das fases vai depender não só do tipo e propriedades das fases, mas também da temperatura, do tipo de interações estabelecidas entre o analito e cada uma das fases e das características moleculares do analito (tamanho e polaridade) (Harris, 2010; Skoog *et al.*, 2014; Wilson, 2010).

A cromatografia é uma técnica ampla, englobando diversas técnicas de separação que podem ser categorizadas de acordo com o mecanismo de separação, estado físico da fase móvel, suporte do leito cromatográfico (em coluna ou planar) ou com a escala da separação (analítica ou preparativa) (Harris, 2010; Skoog *et al.*, 2014). A cromatografia líquida de alta eficiência, é das técnicas cromatográficas mais versáteis e utilizadas (Skoog *et al.*, 2014). Desenvolvida na década de 60, baseia-se na utilização de altas pressões para forçar a passagem do solvente em colunas empacotadas com partículas de pequenas dimensões, permitindo obter elevadas resoluções (Harris, 2010).

A performance cromatográfica é caracterizada por vários parâmetros dos quais: o tempo de retenção, que é o tempo que decorre desde a injeção; fator de retenção ou capacidade, que consiste no tempo despendido pelo analito na fase estacionária relativamente ao despendido na fase móvel; fator de seletividade, isto é, a capacidade dos sistemas de discriminarem dois analitos; e resolução, ou seja, o sucesso de uma separação cromatográfica atendendo à distância entre dois picos cromatográficos relativamente às suas larguras (Harris, 2010; Skoog *et al.*, 2014; Wilson, 2010).

Na técnica de HPLC, um dos parâmetros mais importantes é a eficiência da coluna, uma vez que permite avaliar capacidade de uma coluna em separar os componentes de uma mistura. Este parâmetro assenta no conceito de "prato teórico", que é o espaço suficiente numa coluna para que haja um equilíbrio do analito entre as duas fases, sendo que quanto maior for o número de equilíbrios e menor a altura do prato teórico, mais estreitos serão os picos cromatográficos, pelo que maior será a eficiência da separação (Harris, 2010; Wilson, 2010).

Existem vários fatores que levam ao alargamento dos picos cromatográficos sendo estes: a aplicação da amostra na coluna; a difusão longitudinal; os percursos múltiplos que as partículas podem tomar; e o tempo de equilíbrio entre as duas fases (Skoog *et al.*, 2014; Wilson, 2010). A relação entre estes fatores e a altura de um prato teórico é dada pela Equação de *van Deemter* (**Equação 2.3**) (Skoog *et al.*, 2014).

$$H = A + \frac{B}{u} + C \times u$$

Equação 2.3 – Equação de *van Deemter* para a altura de um prato teórico, H, em que u corresponde à velocidade de fluxo linear da fase móvel (cm s⁻¹); e A, B e C correspondem as constantes para uma dada coluna e fase estacionária para os efeitos de percursos múltiplos, difusão longitudinal e transferência de massa, respetivamente.

Deste modo, a base teórica da técnica HPLC centra-se no facto de que a área superficial da fase estacionária influencia o número de pratos teóricos, aumentando-o quanto menores forem as partículas que constituem a fase estacionária (Harris, 2010). Não obstante, quanto menor o tamanho das partículas, maior será a resistência ao fluxo, criando-se uma pressão de resistência na coluna, diretamente proporcional ao fluxo e tamanho da coluna (Wilson, 2010). Com o desenvolvimento de fases estacionárias com partículas de diâmetro de 3 a 10 µm que suportam pressões na ordem do 400 bar, foi possível aumentar o número de pratos teóricos, e consequentemente a resolução, ultrapassando a resistência criada devido ao tamanho das partículas (Harris, 2010; Wilson, 2010).

A técnica de HPLC assume-se vantajosa, ainda que com eficiência inferior à cromatografia gasosa, dado que é altamente seletiva, permite uma ampla gama de aplicação e é aplicável a substâncias não voláteis e/ou termicamente instáveis (Harris, 2010; Skoog *et al.*, 2014).

Mais recentemente, com o mesmo princípio que o HPLC, surgiu a técnica cromatografia líquida de ultra eficiência (UHPLC), que se distingue por possuir uma fase estacionária com partículas de dimensões inferiores a 2 µm e utiliza pressões na ordem dos 50 a 1300 bar (Agilent Technologies, 2016). O sistema UHPLC opera dez vezes mais rápido que um HPLC convencional, obtendo-se cromatogramas completos em cerca de 5 minutos (Skoog *et al.*, 2014).

Na área alimentar estas técnicas têm vindo a crescer cada vez mais, tornando-se mais relevantes, uma vez que permitem a análise de resíduos de açúcares, ácidos orgânicos, lípidos, aminoácidos, toxinas, vitaminas e resíduos de pesticidas em frutos e vegetais (Nielsen, 2010).

Os componentes principais de um sistema HPLC são a bomba, o injetor, a coluna, o detetor e o *software* de recolha de dados (Nielsen, 2010). Além disso são também importantes a fase móvel e a fase estacionária. De uma forma resumida, a amostra é injetada para a fase móvel que corre na coluna, sendo os analitos de interesse separados de acordo com o tipo de coluna.

2.4.1.1 Injetor

A correta aplicação das amostras é um fator determinante para se alcançar o sucesso numa separação cromatográfica (Wilson, 2010). Atualmente, os injetores manuais têm sido substituídos por injetores automáticos (*autosamplers*), devido à sua capacidade em realizar várias injeções com elevada precisão e exatidão de volumes entre 0,1 µL e 100 µL (Agilent Technologies, 2016; Skoog *et al.*, 2014).

O tipo de injetores automáticos mais utilizado é o *loop* integrado (*integrated-loop*) uma vez que, para além da sua elevada precisão, inibe de fenómenos de transporte (*carryover*) (Dong, 2019). Na **Figura 2.9** encontra-se esquematizado um diagrama de um injetor em *loop*. O injetor tem duas posições: carga (*load*) e injeção. Na posição de carga, a amostra é injetada, com uma agulha de pontas rombas, para o *loop*, preenchendo cerca de 20% do seu volume (Harris, 2010; McMaster, 2005). Seguidamente, o injetor roda rapidamente 60° no sentido contrário ao dos ponteiros do relógio para a posição de injeção, sendo a amostra injetada na coluna a alta pressão (McMaster, 2005).

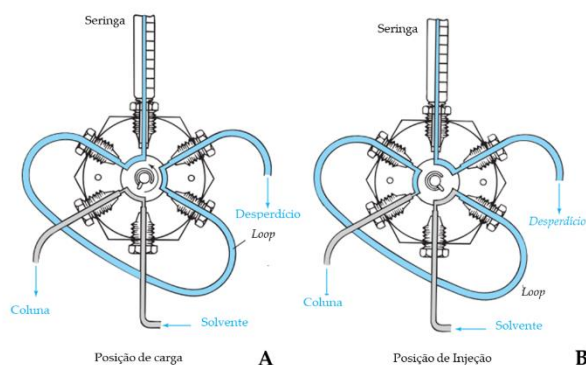


Figura 2.9 – Injetor em *loop*. A – O *loop* é carregado pela amostra, saindo o excesso pela porta do desperdício. Nesta posição o eluente atravessa a coluna. B – A rotação da válvula de injeção num ângulo de 60°, em sentido contrário ao dos ponteiros do relógio, faz com que a amostra seja injetada na coluna com alta pressão (adaptado de Harris, 2010).

2.4.1.2 Bomba

Os sistemas de bombeamento devem manter a circulação de um fluxo contante e contínuo de eluente através da coluna e do detetor (Harris, 2010; Wilson, 2010). Tipicamente, os fluxos devem ser precisos e livres de pulsos, com velocidades abrangendo os 0,01 a 10 mL/min, para HPLC, e 0,001 a 2 ou 5 mL/min, para UHPLC e limites de pressão de 400 bar, para HPLC, ou de 1000 a 1500 bar, para UHPLC (Agilent Technologies, 2016; Dong, 2019).

O tipo de bomba mais utilizado em HPLC são as bombas de movimento alternado, *reciprocating pump*, que consistem numa pequena câmara cilíndrica que é preenchida com solvente e posteriormente esvaziada devido ao movimento de um pistão (Skoog *et al.*, 2014).

Antes da entrada da fase móvel no sistema, há mistura dos solventes, que pode ocorrer em proporção constante, modo isocrático, ou em proporção variável, modo gradiente (Agilent Technologies, 2016). Apesar da separação isocrática ser preferida para a separação de misturas simples, porque não implica reequilibrar a coluna, existem misturas cuja separação implica fases móveis mais complexas e portanto requerem uma separação em modo gradiente (McMaster, 2005). Na separação em modo gradiente, dois ou mais solventes com diferente poder de eluição são utilizados, havendo uma variação gradual da composição da fase móvel por alteração da proporção dos componentes desta, através do aumento da percentagem do

eluente do componente com maior poder de eluição (Agilent Technologies, 2016; Skoog *et al.*, 2014).

Atendendo à forma como os solventes são misturados na separação em modo gradiente podemos distinguir dois tipos de bombas: binárias e quaternárias (Dong, 2019). As bombas quaternárias misturam os solventes em baixa pressão, existindo apenas uma única bomba que puxa a fase móvel de uma válvula proporcional de quatro portas, que combina e mistura os diferentes solventes em proporções predefinidas, podendo-se criar gradientes binários, terciários e quaternários (Agilent Technologies, 2016; Dong, 2019). Neste tipo de bombas é fundamental a desgaseificação dos solventes para remover o gás dissolvido, evitando variações na resolução da coluna e interferências com o detetor (Dong, 2019). A desgaseificação pode ser realizada de várias formas: aquecimento, agitação magnética, aplicação de vácuo, ultrasonificação ou adição de um gás inerte, hélio, aos eluente (Wilson, 2010).

Por sua vez, nos sistemas binários a mistura dos solventes é realizada em alta pressão, sendo utilizadas, duas ou, ocasionalmente três, bombas para a produção de gradientes binários, através da alteração do fluxo de cada bomba (Dong, 2019). Com efeito, dado a que a mistura dos solventes ocorre num misturador externo à saída de cada bomba, isto é, após a pressurização, a desgaseificação dos solventes não é fundamental (Agilent Technologies, 2016). Relativamente ao atraso de volume de gradiente (volume entre a o ponto de mistura e a coluna), os sistemas binários possuem um atraso menor, face aos sistemas quaternários, permitindo utilizar colunas com diâmetros menores e análises mais curtas e rápidas (Agilent Technologies, 2016; Dong, 2019).

2.4.1.3 Coluna

A coluna é o cerne da técnica de HPLC, uma vez que é o suporte da fase estacionária, cujas características são essenciais para a retenção diferencial dos compostos de uma mistura e, consequentemente, para performance e sucesso das separações cromatográficas (Dong, 2019).

As colunas cromatográficas consistem num cilindro de aço inoxidável, plástico ou, mais raramente, vidro, com um comprimento variável entre 2 e 30 cm e diâmetro interno de 2,1 a 4,6 mm (Dong, 2019; Harris, 2010; Skoog *et al.*, 2014). As colunas são revestidas pela fase estacionária que consiste em pequenas partículas esféricas e porosas, com dimensões de 2 a 5 μm (Dong, 2019; Harris, 2010).

Em UHPLC, dado às altas pressões utilizadas, as colunas são de aço inoxidável, possuindo um comprimento de 50 a 100 mm e um diâmetro interno de 1,0 a 2,1 mm (Agilent Technologies, 2016; Maldaner & Jardim, 2012; Turner & Jenkins, 2018). Além disso, estas colunas caracterizam-se por possuírem partículas de dimensões inferiores a 2 μm (Wilson, 2010). Com efeito, não só há uma redução da transferência de massa e dos percursos múltiplos que os solutos podem tomar, permite melhor eficiência e resolução da coluna, como também há

uma diminuição dos gradientes de temperatura formados pela fricção causada pelo fluxo da fase móvel, devido à maior relação área/volume que permite uma melhor dissipação de calor (Turner & Jenkins, 2018).

As partículas devem ser quimicamente estáveis, altamente resistentes, de tamanho uniforme, seletivas e garantir boa performance (Maldaner & Jardim, 2009; Nielsen, 2010). Os materiais mais utilizados como fases estacionárias em cromatografia líquida, são partículas porosas de sílica e de sílica híbrida, e resinas orgânicas sintéticas (Dong, 2019; Nielsen, 2010). As partículas híbridas de sílica apresentam-se vantajosas por diminuírem efeitos de *tailing* dos picos cromatográficos e por terem um pH de operação de 2 a 12 (Dong, 2019). É de mencionar que as inovações na síntese de partículas híbridas ou à base de sílica tem permitido o desenvolvimento de partículas capazes de tolerar as condições exigentes de pressão em UHPLC (Turner & Jenkins, 2018).

Recentemente foram desenvolvidas colunas empacotadas com partículas de carbono gráfico poroso (CGP), de superfície cristalina, estáveis numa gama de pH de 1 a 14, estéreo-específicas e compatíveis com vários sistemas de solventes, permitindo a separação de vários compostos durante uma única corrida (Thermo Fisher Scientific, 2007). As partículas CGP possuem características cromatográficas únicas que as tornam numa alternativa ideal às fases estacionárias convencionais para a separação de compostos altamente polares e ionizáveis (Ali *et al.*, 2013).

O mecanismo de separação por CGP é ainda pouco conhecido, uma vez que estas partículas apresentam um comportamento cromatográfico completamente distinto do convencional (West *et al.*, 2010). De um modo geral, o mecanismo de retenção deve-se a fenómenos de interações dispersivas entre o analito e a superfície plana das partículas, aumentando a retenção com a hidrofobicidade da molécula, e a fenómenos de retenção polar da grafite, ou seja, à interação dos compostos polares com a superfície polarizável da grafite, que leva à indução de um dipolo, dependente da estrutura tridimensional da substância a analisar (Thermo Fisher Scientific, 2007; West *et al.*, 2010).

2.4.2 Espectrometria de Massa em *Tandem* (MS/MS)

A espectrometria de massa é uma técnica microanalítica, poderosa e versátil que deteta, determina e quantifica seletivamente um analito, baseando-se na deteção da razão massa sobre carga (m/z) de iões provenientes de uma fonte de ionização (Skoog *et al.*, 2014; Watson & Sparkman, 2007).

As moléculas na amostra em análise são ionizadas na fase móvel, sendo posteriormente separadas de acordo com a sua razão m/z e detetadas consoante a sua abundância (Nielsen, 2010; Wilson, 2010). A separação tira proveito do movimento dos iões num espaço sob o efeito de um campo elétrico ou magnético, ocorrendo em vácuo, de forma a evitar colisões que alterem ou deteriore o ião (Watson & Sparkman, 2007).

Os sinais detetados pelo espectrómetro de massa dão origem a um espectro de massas, que é um gráfico que ilustra a relação entre a abundância relativa e a razão m/z dos iões (Watson & Sparkman, 2007). Nos espectros de massa, a abundância dos outros iões é calculada relativamente ao fragmento com maior intensidade, ao qual se assume uma abundância de 100% e se dá o nome de pico de base (Nielsen, 2010). É também de destacar o pico correspondente ao ião molecular que é o pico que representa a molécula intacta, distinguindo-se por ter maior razão m/z (Watson & Sparkman, 2007).

A singularidade do processo de ionização fragmentação e deteção faz com que esta técnica permita detetar e identificar compostos desconhecidos fornecendo informações sobre a massa molecular, composição elementar, estrutura química (Nielsen, 2010; Skoog *et al.*, 2014).

A espetrometria de massa em *tandem*, MS/MS consiste na consequente (ou diferente) fragmentação dos iões provenientes de espectrómetro de massa primário, que irão ser analisados num segundo espectrómetro de massa (Watson & Sparkman, 2007). A técnica MS/MS combina dois espectrómetros de massa e uma célula de colisão, sendo o triplo quadrupolo o analisador mais utilizado em MS/MS (McMaster, 2005; Watson & Sparkman, 2007). De uma forma simplista, a técnica de MS/MS consiste numa forma de obter um espectro de massa a partir de um espectro de massa (Watson & Sparkman, 2007).

Os principais componentes de um MS são a bomba de vácuo, o injetor de amostra, a fonte de iões, o analisador de massas e o detetor (Wilson, 2010). A introdução da amostra na fonte de ionização pode ocorrer de forma estática, através de sondas de inserção diretas, ou de forma dinâmica, que envolve a interface com métodos cromatográficos (Nielsen, 2010).

2.4.2.1 Interface com LC: *Electrospray* (ESI)

O primeiro passo para uma análise por MS é a introdução da amostra na câmara da fonte de ionização. Para amostras complexas a introdução é realizada segundo um método dinâmico, isto é, a amostra é separada segundo os seus componentes individuais e posteriormente analisada por MS, segundo uma interface (Nielsen, 2010).

A interface deve ser capaz de remover o excesso de solvente e os seus aditivos (sem remover os compostos de interesse), de forma a prevenir a colisão dos iões produzidos na interface com as moléculas de ar (McMaster, 2005). Além disso, a interface deve também ionizar os compostos de interesse, através de um processo de dessolvatação na presença de um campo elétrico altamente carregado à pressão atmosférica (Nielsen, 2010).

Os sistemas de interface mais utilizados são o *electrospray*, a ionização à pressão atmosférica (APCI) e, mais recentemente, a fotoionização à pressão atmosférica (APPI) (McMaster, 2005; Watson & Sparkman, 2007).

A técnica de *electrospray* é uma das técnicas de ionização mais utilizadas na interface de HPLC com o MS uma vez que permite a ionização em solução, possibilitando a análise de compostos termolábeis e com baixas pressões de vapor (Watson & Sparkman, 2007). Além disto, esta técnica é capaz de produzir iões multiplamente carregados e é dependente da concentração, sendo compatível com sistemas de HPLC de microfluxo (McMaster, 2005; Watson & Sparkman, 2007)

O *electrospray*, **Figura 2.10**, é uma técnica de *soft ionization*, baseando-se na dessorção dos iões da superfície do líquido (Wilson, 2010). A ionização ocorre através da passagem do eluente proveniente do HPLC por um tubo capilar aquecido (agulha ESI), sobre o qual é aplicada uma diferença de potencial de 3 a 5 kV (McMaster, 2005; Watson & Sparkman, 2007). A aplicação de alta voltagem a um líquido leva a um fenómeno denominado de cone de *Taylor*, que consiste na deformação do líquido numa forma elíptica (Watson & Sparkman, 2007). As gotículas carregadas deformam-se, diminuindo rapidamente de tamanho, aumentando a carga por unidade de volume, levando a uma explosão Coulombica/repulsão eletrostática, saindo o líquido evaporado em spray pelo final do tubo (McMaster, 2005). De forma a facilitar a evaporação dos solventes pode ser utilizada uma cortina de gás inerte nebulizante, tipicamente azoto, à volta da agulha do ESI, podendo este processo apresentar-se vantajoso para os compostos termolábeis (Wilson, 2010).

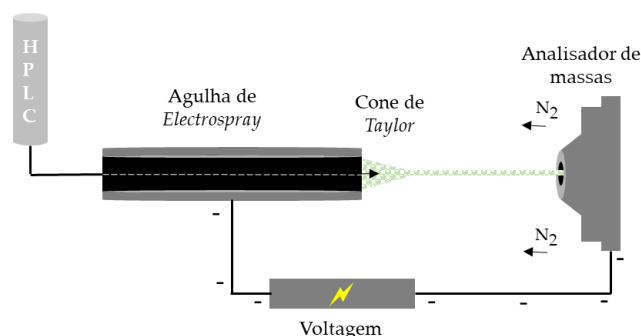


Figura 2.10 – Representação esquemática de uma fonte de ionização *Electrospray*, numa interface com LC-MS. A amostra é encaminhada para a agulha do *electrospray*, aquecida, na qual é aplicada uma diferença de potencial que leva à evaporação do líquido em spray. Durante este processo observa o fenómeno de cone de *Taylor* que consiste na deformação do líquido numa forma elíptica, formando gotículas carregadas.

Esta técnica é recomendada para a análise de compostos altamente polares e ionizáveis, sendo particularmente útil para a análise de grande polímeros como proteínas e DNA (McMaster, 2005; Wilson, 2010).

2.4.2.2 Analisador de Massa: Triplo quadrupolo (TQ)

Após ionização, os iões são enviados para um analisador de massa que irá separar os iões consoante a sua razão m/z , atendendo aos seus comportamentos característicos segundo um campo magnético ou elétrico (Watson & Sparkman, 2007; Wilson, 2010).

No analisador é selecionada uma razão m/z específica, sendo apenas medida a abundância dos íons dentro da gama m/z selecionada (Wilson, 2010). Os íons com um m/z fora da gama escolhida têm uma trajetória instável, não sendo analisados (Dong, 2019).

Existem vários tipos de analisadores assim como quadrupolo, armadilha de íons, tempo de voo, transformadas de *Fourrier*, *Orbitrap* (McMaster, 2005). Contudo, a maioria dos instrumentos tem um determinado tipo de ionização acoplado a um determinado analisador que atua segundo um princípio específico, como por exemplo o ESI que está acoplado ao quadrupolo (Wilson, 2010).

Na **Figura 2.11** está representado um quadrupolo consistindo em quatro hastes cilíndricas metálicas paralelas (Wilson, 2010). A cada haste é aplicada uma corrente contínua (CC) à qual é sobreposta uma voltagem de rádio frequência (RF), criando um campo elétrico hiperbólico ao longo das hastes (Watson & Sparkman, 2007; Wilson, 2010). Após a saída da fonte de ionização, os íons são acelerados (5 a 15 V) para o espaço central do quadrupolo em direção ao detetor (Watson & Sparkman, 2007). A variação da magnitude da amplitude de RF e dos potenciais da CC, de forma controlada e precisa, permite variar o campo elétrico, selecionando íons com razões m/z específicas (Wilson, 2010). Para um determinado conjunto de potenciais de CC e RF, só os íons com razão m/z são capazes de atravessar o eixo horizontal do quadrupolo evitando colisões com as hastes, chegando ao detetor (Dong, 2019; Watson & Sparkman, 2007).

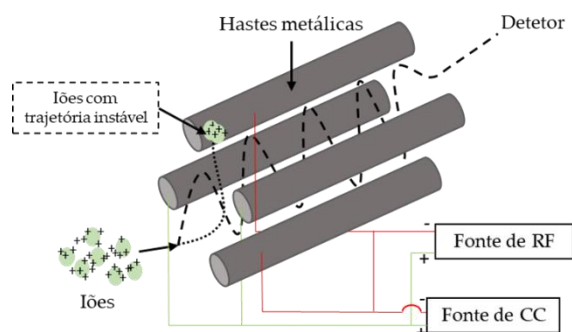


Figura 2.11 - Representação esquemática de um quadrupolo. A verde estão representados os íons precursores que entram no quadrupolo para seleção de um íon precursor com m/z específico. A seleção dos íons é realizada através da definição de determinados potenciais de CC e de RF. Os íons com trajetória instável chocam contra as hastes metálicas não sendo analisados pelo detetor.

A ligação entre três quadrupolos em sucessão denomina-se de triplo quadrupolo (TQ), funcionando o primeiro (Q_1) e terceiro (Q_3) quadrupolo como filtros de massa e o segundo quadrupolo (q_2) é um quadrupolo apenas com potencial RF, onde ocorre fragmentação por interação com um gás de colisão (normalmente azoto ou argon) (Dong, 2019). Na **Figura 2.12** pode-se observar uma representação esquemática de um triplo quadrupolo. Os íons precursores são selecionados no primeiro analisador, sendo fragmentados através da colisão com moléculas de um gás de colisão e, os fragmentos dos íons, são encaminhados para o segundo espectrômetro de massa para separação e análise (McMaster, 2005). O processo dissociativo mais utilizado é a dissociação ativada por colisão (CAD), que consiste na indução da

decomposição do íon selecionado, íon precursor, através da colisão com um gás inerte (árgon ou hélio), produzindo íões produto. (Watson & Sparkman, 2007; Wilson, 2010).

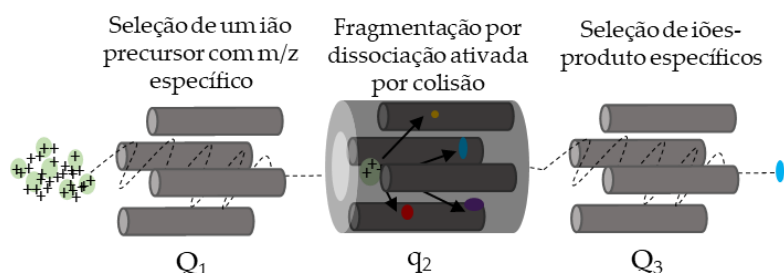


Figura 2.12 - Representação esquemática de um triplo quadrupolo. A verde estão representados os íões precursores que entram no primeiro quadrupolo, Q_1 , onde há seleção de um íon precursor específico. O íon precursor segue para a célula de colisão, Q_2 , onde se dá a fragmentação por colisão com um gás inerte, estando os fragmentos representados a amarelo, azul, roxo e vermelho. Por fim, no terceiro quadrupolo, Q_3 , há seleção dos íões produtos específicos.

O método de análise quantitativa mais utilizado com um triplo quadrupolo é a monitorização de reação selecionada (SRM) também conhecido como o método de monitorização de reações múltiplas (Dong, 2019). Esta técnica, altamente específica e seletiva, permite quantificar seletivamente compostos presentes em misturas complexas (Proteomics International, 2021). Com efeito, há monitorização de uma ou mais transições de m/z de um íon precursor com específico num ou mais fragmentos de íões produto específicos (Watson & Sparkman, 2007).

2.5 Validação

O objetivo de qualquer método analítico é fornecer dados consistentes, confiáveis e precisos, sendo que, dado que um método envolve manipulações suscetíveis à acumulação de erros sistemáticos e/ou aleatórios que, em determinadas situações, podem originar desvios significativos no valor do resultado final, é necessário determinar à priori as limitações do método (Guia RELACRE 13, 2000; Peris-Vicente *et al.*, 2015).

Os resultados de um método analítico são importantes para a tomada de decisões como, por exemplo, a aceitação ou rejeição de um lote, pelo que, resultados não fiáveis poderão conduzir a uma decisão errada colocando em causa não só o método, mas também, por vezes, a saúde do consumidor (Peris-Vicente *et al.*, 2015).

É imperativo que os laboratórios disponham de meios e critérios que permitam demonstrar, através da validação, que os métodos que executam produzem resultados credíveis e adequados à qualidade pretendida (Guia RELACRE 13, 2000). Posto isto, a validação surge como o ato de provar através de vários procedimentos que para um determinado método a quantificação de analitos específicos numa determinada matriz, é confiável e reprodutível (IAS, 2015).

O processo de validação deve ser realizado sempre que um laboratório praticar métodos internos de ensaio, devendo-se realizar estudos de validação ao método: antes de o colocar em rotina; durante a sua implementação; ou sempre que se verifiquem modificações ao mesmo. Os requisitos mínimos para a validação de métodos internos de ensaio dependem do tipo de método em causa e compreendem o estudo e conhecimento dos parâmetros seguintes: a exatidão, precisão (como repetibilidade e reprodutibilidade), linearidade, limites de deteção (LD) e limite de quantificação (LQ) (Guia RELACRE 13, 2000).

Durante a implementação do método para a determinação de glifosato em amostras vegetais, foram seguidos os critérios de aceitação descritos pelo Guia SANTE/12682/2019 (2019), para os parâmetros acima mencionados.

2.5.1 Gama de trabalho

A gama de trabalho pode ser definida como o intervalo entre a concentração mais alta e mais baixa de analito numa amostra, para o qual já tenha sido demonstrado que, através de um método analítico, é possível obter resultados com um nível de precisão, exatidão e linearidade adequados (IAS, 2015).

A gama de trabalho pode ser avaliada pelo teste da homogeneidade das variâncias. Este teste, também conhecido como teste F (*Snedecor/Fisher*) averigua se as variâncias de duas populações são iguais, ou seja, avalia a existência de diferenças significativas entre as variâncias associadas aos limites da gama de trabalho (Guia RELACRE 13, 2000). O valor de teste, VT,

é depois comparado com os valores tabelados do teste F (para n-1 graus de liberdade) (ISO 8466-1, 1990). Caso o valor de teste seja igual ou menor que o valor tabelado, pode-se afirmar que não existem diferenças significativas, estando a gama de trabalho bem ajustada (Guia RELACRE 13, 2000).

É de referir que a gama de trabalho deve ter em conta os limites legais do analito em estudo para as amostras analisadas e a capacidade de deteção do instrumento (Magnusson & Örnemark, 2014).

2.5.2 Linearidade

A linearidade é definida como a capacidade de, através de um método, se obterem sinais analíticos (variável dependente) diretamente proporcionais à concentração do analito numa determinada amostra (variável independente), dentro da gama de trabalho definida (IAS, 2015).

A calibração indica um processo pelo qual a resposta dum sistema de medida se relaciona com uma concentração ou quantidade de uma substância conhecida (Guia RELACRE 13, 2000). Nos métodos cromatográficos, assume-se que a curva de calibração se traduz numa equação polinomial de primeiro grau, **Equação 2.4**, que relaciona o sinal do analito (área do pico do analito) e a sua concentração (Peris-Vicente *et al.*, 2015). É de referir que quando a curva de calibração corresponde a uma reta, e caso se utilize o método dos mínimos quadrados para a regressão linear, pressupõe-se uma distribuição normal dos erros e que há homoscedasticidade (homogeneidade de variâncias) ao longo da reta (Guia RELACRE 13, 2000).

$$y = mx + b$$

Equação 2.4 – Forma algébrica da equação de uma curva de calibração, em que: y representa o sinal do analito (área do pico do analito); m representa o declive da reta; x representa a concentração de analito; e b representa a ordenada na origem.

É de mencionar que, de acordo com a metodologia escolhida, as curvas de calibração podem ser construídas de diferentes modos, isto é, através do método de adição de padrões em solvente (curva de calibração em solvente), do método de adição de padrões em extrato de matriz (curva de calibração em matriz), ou do método de adição de padrões, em que há adição dos padrões em matriz, seguindo-se posteriormente o protocolo de extração (Anastassiades *et al.*, 2020; EMA, 2015; SANTE/12682/2019, 2019). Deste modo, recomenda-se que a curva de calibração seja construída com base num mínimo de 5 pontos de concentração analito, distribuído equitativamente pela gama de trabalho definida (IAS, 2015; SANTE/12682/2019, 2019).

Existem diversos testes que permitem averiguar a linearidade associada a uma curva de calibração. Neste trabalho, a linearidade foi avaliada através dos residuais, teste de *Mandel*, fator de correlação e teste de *RIKILT*.

2.5.2.1 Teste de *Mandel*

A linearidade deve ser descrita por um modelo de regressão que se adeque, isto é, por um modelo de regressão linear ou por um modelo de regressão não linear (por exemplo, um modelo polinomial) (EMA, 2015; Guia RELACRE 13, 2000).

O teste de *Mandel* permite a comparação do ajuste de dois modelos de regressão (linear e não linear), de forma a averiguar qual descreve melhor a linearidade. Deste modo, a partir de um conjunto de pares ordenados, são determinadas as funções de calibração linear e de calibração não linear, bem como os respetivos desvios padrões residuais.

Posteriormente, é avaliada a diferença das variâncias, **Equação 2.5**, e determinado o valor de teste, isto é, o valor da distribuição de *Fisher-Snedecor* para um nível de significância de 1% e N-3 graus de liberdade, **Equação 2.6** (Guia RELACRE 13, 2000).

$$DS^2 = (N - 2) \times S_{y_1}^2 - (N - 3) \times S_{y_2}^2$$

Equação 2.5 - Diferença de variâncias DS^2 em que, N é o número de padrões de calibração; $S_{y_1}^2$ é o desvio-padrão residual da função de calibração linear; e $S_{y_2}^2$ é o desvio-padrão residual da função de calibração não linear.

$$VT = \frac{DS^2}{S_{y_2}^2}$$

Equação 2.6 - Valor da distribuição de *Fisher-Snedecor* para um nível de significância de 1% e N-3 graus de liberdade, VT.

Se o valor de teste for igual ou inferior ao valor tabelado, a função de calibração linear é a que melhor se ajusta aos pontos experimentais, caso contrário, ou seja, quando $VT > F_{\text{tabelado}}$, sugere-se que a gama de trabalho seja reduzida, com vista a obter-se uma função de calibração linear (ISO 8466-1, 1990).

2.5.2.2 Fator de Correlação

Se se verificar que existe uma relação linear, os resultados devem ser avaliados segundo uma regressão linear, que permitirá o cálculo das constantes da curva de calibração, assim como o coeficiente de correlação (Peris-Vicente *et al.*, 2015). O coeficiente de correlação (R), calculado de acordo com a **Equação 2.7**, permite a avaliação da calibração analítica podendo este tomar valores entre -1 e +1. De forma a serem aceitáveis, as curvas de calibração, geralmente, devem apresentar um coeficiente de correlação superior a 0,995 (Guia RELACRE 13, 2000). É de referir, no entanto, que este parâmetro, apesar de um bom indicador de correlação, não indica necessariamente que se verifique linearidade.

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

Equação 2.7 - Coeficiente de correlação, R, de uma reta em que 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; i corresponde ao número do padrão; N corresponde ao número de pontos marcados na reta.

2.5.2.3 Análise de Resíduos

Numa primeira instância a linearidade pode ser avaliada visualmente através do traçar de uma curva de calibração como já supra descrito (Peris-Vicente *et al.*, 2015). O cálculo dos residuais (teste dos residuais) pode ser útil para demonstrar a aplicabilidade de um modelo linear (Kruve *et al.*, 2015b). Este teste consiste no cálculo da percentagem de desvio entre as concentrações experimentais e a concentração calculada a partir da curva de calibração, como demonstrado na **Equação 2.8**. De acordo com o Guia SANTE/12682/2019 a percentagem de desvio deve ser inferior a 20%.

$$\% \text{ Desvio} = \frac{C_{\text{teórica}} - C_{\text{cal}}}{C_{\text{cal}}} \times 100$$

Equação 2.8 - Percentagem do desvio das concentrações experimentais, % Desvio, dado pela diferença entre a concentração experimental ($C_{\text{teórica}}$) e a concentração calculada a partir da curva de calibração (C_{cal}), sobre a concentração calculada.

2.5.2.4 Teste de RIKILT

O teste de *RIKILT* permite a análise da linearidade em cada ponto da reta de calibração, avaliando o desvio entre o fator de resposta para cada ponto e o fator de resposta médio (Duarte, 2019; Henriques, 2008).

O fator de resposta para cada par ordenado da curva de calibração é calculado através do quociente entre o sinal obtido e a respetiva concentração, como demonstrado na **Equação 2.9** (Reis, 2015). Por sua vez, o fator de resposta médio é calculado como o quociente entre o somatório dos fatores de resposta e o número de padrões de calibração.

$$FR_{(y/x)} = \frac{y_i}{x_i}$$

Equação 2.9 - Fator de resposta $FR_{(y/x)}$, em que i corresponde ao número do padrão; y_i corresponde ao valor individual do sinal instrumental para i ; e x_i corresponde ao valor individual da concentração para i .

Numa situação de linearidade perfeita, o fator de resposta de cada ponto seria igual ao fator de resposta médio, pelo que a razão percentual seria igual a 100% (Reis, 2015). De modo a admitir linearidade para uma determinada gama de trabalho, estabeleceu-se como critério de aceitação que a razão percentual não deve apresentar desvios superiores a 10%, devendo situar-se no intervalo de 90 a 110% (Henriques, 2008). Os valores que não se encontrem dentro deste intervalo devem ser rejeitados, aplicando-se o novamente o teste de *RIKILT*.

2.5.3 Especificidade e Seletividade

A especificidade e seletividade são termos intermutáveis uma vez que se referem à capacidade de um método em produzir um sinal devido inequivocamente ao analito, sob as condições instrumentais do método e na presença de outros componentes de uma matriz complexa (Peris-Vicente *et al.*, 2015).

A IUPAC define seletividade como o grau no qual um método consegue quantificar uma substância com exatidão, perante a presença de compostos interferentes (Thompson *et al.*, 2002). Por sua vez, o termo especificidade é utilizado quando se refere a capacidade de um método em discriminar a presença do analito de interesse dos restantes componentes da matriz, (Guia RELACRE 13, 2000). Por outras palavras, um método específico é aquele que apenas identifica a substância de interesse, enquanto um método seletivo é aquele que, dentro de uma amostra complexa, apresenta um grau de preferência para o analito (Kruve *et al.*, 2015a).

Deste modo, a seletividade de um método depende dos interferentes, tornando-se importante avaliar as interferências (Guia RELACRE 13, 2000; Peris-Vicente *et al.*, 2015). Um método pode ser considerado seletivo e aplicável se se verificar uma elevada resolução do pico cromatográfico, isto é, quando não se verificam sinais na amostra branca, nem distorções na linha de base perto do tempo de retenção do analito, nem sobreposição dos cromatogramas do analito e compostos interferentes (Peris-Vicente *et al.*, 2015).

Como já referido neste trabalho, a técnica LC-MS/MS é altamente seletiva e específica, devendo o pico cromatográfico ter um tempo de retenção (TR) e razão iónica (RI) semelhante à dos padrões de calibração (SANTE/12682/2019, 2019). Note-se que a razão iónica é o quociente entre o pico correspondente ao ião menos intenso (qualificador), e o pico correspondente ao ião mais intenso (quantificador) (Kruve *et al.*, 2015a).

Posto isto, é de notar que este parâmetro é fundamental quer para fins qualitativos, quer para fins quantitativos (Peris-Vicente *et al.*, 2015). Assim, é importante que o método garanta que os interferentes não apresentem efeitos significativos (Kruve *et al.*, 2015a).

2.5.4 Limiares Analíticos: Limite de deteção e Limite de Quantificação

Em cromatografia, é importante decidir se um sinal perto do ruído de fundo corresponde a sinais provocados pelo analito ou se são sinais aleatórios provocados pelo branco da amostra, definindo-se como ruído a oscilação na linha de base do cromatograma no tempo de retenção do analito (Peris-Vicente *et al.*, 2015). É neste âmbito que surge o limite de deteção, correspondente à concentração mínima de analito à qual o sinal instrumental pode ser, com um nível de confiança de 95%, distinguido do ruído de fundo (IPAC, 2011). É de notar que leituras inferiores ao LD não significam necessariamente a ausência do analito, mas sim este está presente numa concentração inferior a um determinado valor (Guia RELACRE 13, 2000).

Por outro lado, os limites de quantificação são característicos dos métodos, avaliando a capacidade que um método analítico tem em quantificar adequadamente a substância de interesse (IUPAC, 1997). Assim, o LQ corresponde à menor concentração de analito que é possível determinar, de acordo com uma determinada exatidão e precisão, segundo as condições experimentais estabelecidas (Guia RELACRE 13, 2000). Por outras palavras, o LQ é o início da gama onde o coeficiente de variação de sinal e a incerteza relativa estão reduzidos a valores razoáveis, que possibilitam uma avaliação quantitativa (IPAC, 2011).

A IUPAC (1997) afirma que o LD deve situar-se acima do sinal médio da amostra em branco, cerca de 3 vezes o desvio-padrão da amostra em branco. Já o LQ deve situar-se acima do sinal médio da amostra em branco, cerca de 10 vezes (IUPAC, 1997).

Com efeito, quando o método envolve uma calibração linear o LD e LQ podem ser determinados segundo os mínimos quadráticos da reta de calibração, pelo que os limiares analíticos são obtidos através do quociente entre o desvio padrão residual da curva de calibração e o declive da reta, como mostram a **Equação 2.10** e **Equação 2.11**, respetivamente (IPAC, 2011). Experimentalmente, o LQ corresponde ao primeiro padrão de calibração e ao início da zona a partir da qual se reportam valores numéricos (IPAC, 2011; Peris-Vicente *et al.*, 2015).

$$LD = \frac{3,3 \times S_{y/x}}{m}$$

Equação 2.10 - Limite de deteção segundo uma calibração linear, em que $S_{y/x}$ corresponde ao desvio padrão da curva de calibração; e m corresponde ao declive da reta.

$$LQ = \frac{10 \times S_{y/x}}{m}$$

Equação 2.11 - Limite de quantificação segundo uma calibração linear, em que $S_{y/x}$ corresponde ao desvio padrão da curva de calibração; e m corresponde ao declive da reta.

Na maioria das abordagens, o LQ é determinado a partir dos mesmos dados que o LD pelo que se verificam erros, todavia, dado que o LQ é superior ao LD, os resultados na gama LQ têm uma menor incerteza relativa associada, tornando o LQ mais fiável (Kruve *et al.*, 2015a).

É aconselhado que, ao longo de um período de 5 meses, sejam efetuadas 5 determinações do LD e do LQ, de forma a obter um valor suficientemente significativo, devendo o resultado mais conservador ser indicado como o nível de performance do método, com vista a garantir a sua fiabilidade (Kruve *et al.*, 2015a).

Caso um resultado se encontre no intervalo entre o LD e LQ, pode-se afirmar que o analito está presente na amostra, mas numa concentração inferior ao LQ (Kruve *et al.*, 2015a). É de mencionar que a quantificação do analito neste intervalo seria possível, porém esta determinação teria uma grande incerteza associada (Peris-Vicente *et al.*, 2015).

2.5.5 Precisão

A precisão refere-se ao grau de concordância entre os resultados de ensaios independentes obtidos por aplicação de um método, segundo condições específicas estabelecidas à priori (Decisão 2002/657/CE, 2002). Por outras palavras, avalia a dispersão dos resultados entre ensaios independentes, repetidos sobre a mesma amostra, amostras semelhantes ou padrões, em condições definidas (Guia RELACRE 13, 2000).

Este conceito está associado a erros aleatórios, sendo que quanto menores forem os erros aleatórios que afetam os resultados, mais preciso será o procedimento

(SANTE/12682/2019, 2019). A precisão é geralmente expressa através da incerteza, pelo desvio padrão, variância e coeficiente de variação (Kruve *et al.*, 2015b).

A avaliação da precisão pode ser efetuada através de duas medidas extremas, a repetibilidade e reprodutibilidade, para além de uma situação intermédia designada por precisão intermédia ou variabilidade intralaboratorial (Guia RELACRE 13, 2000). De referir que geralmente não há necessidade de determinar a reprodutibilidade na validação de uma metodologia num único laboratório (EMA, 2015; Kruve *et al.*, 2015b).

2.5.5.1 Repetibilidade

A repetibilidade exprime a precisão de um método de ensaios efetuado em condições em que ensaios independentes são realizados sobre material idêntico, no mesmo laboratório, pelo mesmo operador e utilizando o mesmo equipamento (Decisão 2002/657/CE, 2002).

Experimentalmente, quando se pretende avaliar a repetibilidade são realizadas, sobre a mesma amostra, uma série de medições em diferentes níveis de concentração, cobrindo a gama de trabalho (Guia RELACRE 13, 2000). Segundo o guia SANTE/12682/2019 (2019), no mínimo devem ser efetuadas cinco medições sobre a mesma amostra em pelo menos dois níveis de concentração, ao nível do LQ e a um nível duas ou dez vezes superior ao LQ.

A repetibilidade é então avaliada através do estudo da variância da repetibilidade associada aos resultados do desvio padrão de repetibilidade, limite de repetibilidade e coeficiente de variação de repetibilidade (Guia RELACRE 13, 2000). O limite de repetibilidade define-se como o valor abaixo do qual se deve situar, com uma determinada probabilidade, a diferença absoluta entre dois resultados obtidos em condições de repetibilidade (Guia RELACRE 13, 2000). Para um nível de confiança de 95%, o limite de repetibilidade é determinado de acordo com a **Equação 2.12**.

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

Equação 2.12 - Limite de repetibilidade, r , em que, t é o valor da distribuição de *t-student* para um nível de confiança de 95% para $n-1$ graus de liberdade e S_r é o desvio padrão de repetibilidade associada aos resultados.

2.5.5.2 Precisão Intermédia

A precisão intermédia avalia a precisão dos resultados obtidos sobre a mesma amostra, amostras idênticas ou padrões, utilizando o mesmo método, o mesmo laboratório, mas definindo as condições a variar, como o analista, o equipamento, a época, calibração, entre outros (Guia RELACRE 13, 2000). Em suma, a precisão intermédia distingue-se da repetibilidade por avaliar a precisão dentro de um longo período de tempo e por variar as condições de análise (Kruve *et al.*, 2015b).

Experimentalmente, para a determinação deste parâmetro são efetuadas n medições em replicado, duplicado ou ensaio único, sobre uma amostra em condições pré-definidas (Guia RELACRE 13, 2000).

A precisão intermédia pode então ser determinada através do cálculo do desvio padrão de precisão intermédia que é dado pela **Equação 2.13**. Segundo Magnusson & Örnemark (2014), o desvio-padrão da precisão intermédia pode também ser calculado através da raiz quadrada da soma da variância da repetibilidade e da precisão intermédia.

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

Equação 2.13 - Desvio padrão de precisão intermédia S_{pi} em que t é o número de amostras ensaiadas, n é o número de ensaios efetuados por amostra, j é o número da amostra, k o número do resultado obtido para a amostra j , y_{jk} é o resultado individual para a amostra j de 1 a t , e $\bar{y}_j$ é a média dos resultados a amostra j de 1 a t .

O objetivo da determinação da precisão intermédia é obter uma estimativa da precisão que reflita todas as fontes de variação que podem ocorrer num laboratório (Magnusson & Örnemark, 2014).

2.5.6 Exatidão

A exatidão de um resultado analítico refere-se à concordância entre o valor medido experimentalmente e o valor, por convenção, aceite como verdadeiro (Kruve *et al.*, 2015b). Este conceito está intrinsecamente ligado à combinação de componentes de erros sistemáticos e de erros aleatórios, e à recuperação do analito (EMA, 2015; Guia RELACRE 13, 2000). Com efeito, a exatidão é estudada como dois componentes: veracidade e precisão, sendo quantitativamente expressa através da incerteza (Kruve *et al.*, 2015b; Magnusson & Örnemark, 2014).

A veracidade, de acordo com a Decisão 2002/657/CE (2002), define-se como o grau de concordância entre o valor médio de uma longa série de resultados de ensaios e um valor de referência aceite. Este parâmetro é avaliado através do enviesamento podendo-se seguir três abordagens: análise de materiais de referência certificados (MRC), utilização de um método de referência, e ensaios de recuperação (Decisão 2002/657/CE, 2002; Magnusson & Örnemark, 2014; Thompson *et al.*, 2002).

Quando não estão presentes MRC, aceita-se que as medições da veracidade sejam realizadas através de ensaios de recuperação (Thompson *et al.*, 2002). Estes ensaios consistem no enriquecimento/fortificação de uma amostra, sem ou com analito em baixa concentração, com uma quantidade conhecida do analito em estudo (Peris-Vicente *et al.*, 2015).

A percentagem de recuperação é calculada de acordo com a **Equação 2.14**. De acordo com o Guia SANTE/12682/2019 a percentagem de recuperação aquando da implementação de um método deve variar entre 70 e 120%, podendo-se utilizar um intervalo de 60-140 % para recuperações individuais em análises de rotina.

$$\% R = \frac{C_F - C_A}{C_P}$$

Equação 2.14 - Percentagem de recuperação, %R, em que C_F corresponde à concentração da amostra fortificada; C_A corresponde à concentração da amostra; e C_P corresponde à concentração teórica de padrão.

Segundo o Guia SANTE/12682/2019, a percentagem de recuperação de um analito deve ser determinada em pelo menos dois níveis de concentração, num mínimo de cinco réplicas: ao nível do LQ e a cerca de duas ou dez vezes o nível do LQ.

Atente-se que esta metodologia produz resultados menos fiáveis uma vez que, ao contrário da analito, a substância adicionada não se encontra ligada quimicamente à matriz, pelo que, sempre que disponíveis devem ser utilizados MRC (Decisão 2002/657/CE, 2002).

2.5.7 Incerteza

De acordo com os guias Eurachem (2012; 2014), a incerteza define-se como o intervalo associado ao resultado de uma medição que caracteriza uma gama das dispersão dos valores que, com razoabilidade, podem ser atribuídos ao mesurando. Em cromatografia, a incerteza caracteriza a distância máxima entre a concentração medida e o valor real que pode ser obtido aquando da análise da amostra (Peris-Vicente *et al.*, 2015).

Durante a estimativa da incerteza deve-se ter em consideração todos efeitos reconhecidos que operam no resultado (Magnusson & Örnemark, 2014). Alguns exemplos de fontes de incerteza são a amostragem, efeitos matriz e interferentes, condições ambientais, incertezas dos materiais e aproximações no método de medição (Ellison & Williams, 2012).

Existem diversas abordagens para a quantificação da incerteza de medição, entre elas a abordagem por modelação ou “passo a passo” (1), abordagem baseada em informação interlaboratorial (2) e abordagem baseada em dados de validação de métodos analíticos (3) (Guia RELACRE 31, 2018; IPAC, 2007; Kruve *et al.*, 2015b).

Neste trabalho foi utilizada a abordagem (3) que consiste na combinação das incertezas associadas à precisão e exatidão do método, com fontes de incerteza relevantes que são mantidas constantes na sequência da realização dos ensaios experimentais necessários à quantificação da precisão e exatidão do ensaio (IPAC, 2007).

2.5.7.1 Incerteza associada à precisão e exatidão

Geralmente, nos ensaios químicos a precisão é uma componente maioritária da incerteza global pelo que, para que seja representativa da variabilidade dos resultados, deve ser avaliada em condições de precisão intermédia ou de repetibilidade (Guia RELACRE 31, 2018; IPAC, 2007).

A incerteza de precisão pode ser diretamente calculada através do desvio-padrão da precisão, ou caso o laboratório opte por quantificar este componente para diferentes níveis

de concentração, pode ser determinada conforme demonstrado na **Equação 2.15**, a partir do valor limite do critério de aceitação (Guia RELACRE 31, 2018).

$$u_{\text{precisão}} = \frac{CA}{\sqrt{3}}$$

Equação 2.15 - Incerteza associada à precisão, $u_{\text{precisão}}$, em que CA é o valor do limite do critério de aceitação associado à precisão do método.

Como já anteriormente mencionado, a exatidão está relacionada com os erros sistemáticos e aleatórios. Com efeito, o erro sistemático pode ser quantificado pela diferença da média de resultados de múltiplos ensaios replicados e o valor de verdadeiro (IPAC, 2007). A avaliação da exatidão pode ser avaliada através de MRC, ensaios com um método de referência ou, caso nenhum dos anteriores esteja disponível, através de ensaios de recuperação (Guia RELACRE 13, 2000).

Deste modo, a incerteza associada à exatidão pode ser calculada com base em ensaios de recuperação de amostras com ou sem analito às quais foi adicionada uma quantidade conhecida de padrão (Guia RELACRE 31, 2018). A incerteza associada a ensaios de recuperação, sem o analito nativo, com fortificadas a diferentes níveis de concentração, é dado pela **Equação 2.16** (Guia RELACRE 31, 2018; IPAC, 2007).

$$u_{\text{ver}}(\bar{R}) = \bar{R} \times \sqrt{\left(\frac{s_{\text{obs}}^2}{n \times \bar{c}_{\text{obs}}^2}\right) + \left(\frac{u(c_{\text{fort}})}{c_{\text{fort}}}\right)^2} = \bar{R} \times \frac{s_{\text{obs}}}{\bar{c}_{\text{obs}} \times \sqrt{n}}$$

Equação 2.16 – Incerteza associada à exatidão com base em dados de ensaios de recuperação $u_{\text{ver}}(\bar{R})$ em que $\bar{R}$ é a recuperação média das amostras fortificadas; s_{obs} é o desvio-padrão das amostras fortificadas; n é o número de ensaios realizados; $\bar{c}_{\text{obs}}$ é a concentração média dos fortificadas; $u(c_{\text{fort}})$ é a incerteza associada à concentração do analito adicionado à amostras; e c_{fort} é a concentração de fortificação da amostra. Esta equação só é válida quando $u_{\text{(fort)}}/c_{\text{fort}} \ll 1$.

2.5.7.2 Incerteza Combinada

Este parâmetro refere-se à incerteza total do resultado de uma medição, determinada através da combinação de todos os componentes de incerteza, obtidos através da validação do método analítico (Ellison & Williams, 2012; Guia RELACRE 31, 2018). A incerteza combinada baseia-se a lei da propagação das incertezas, podendo ser calculada conforme indicado na **Equação 2.17** (IPAC, 2007).

$$u_c(y) = \sqrt{u(p)^2 + u(q)^2 + \dots}$$

Equação 2.17 – Incerteza combinada u_c associada a um valor y , em que $u(p)$ e $u(q)$, correspondem às incertezas associadas aos parâmetros para os quais é determinada a incerteza.

2.5.7.3 Incerteza Expandida

A incerteza expandida, proporciona uma medida da incerteza, para uma função de distribuição de probabilidade apropriada ao resultado, associada a um elevado nível de confiança, por norma 95% ou 99% (IPAC, 2007).

A incerteza expandida é obtida através da incerteza combinada, afetada por um fator de expansão, K , conforme demonstrado na **Equação 2.18** (IPAC, 2007). Consoante o nível de confiança escolhido, K pode assumir diferentes valor (Ellison & Williams, 2012). Por defeito, a incerteza expandida é calculada para um nível de confiança de 95%, utilizando-se portanto um fator de expansão de 2 (IPAC, 2007).

$$U = u_c \times K$$

Equação 2.18 – Incerteza Expandida, U , em que u_c é a incerteza combinada e K é o fator ou coeficiente de expansão.

PARTE EXPERIMENTAL

3.1 Material e reagentes

3.1.1 Material e Equipamento

Para a realização do método foram necessários moinhos trituradores modelos GM 200 e GM 300 da marca *Retsch*, agitador mecânico (*multi reax*) da marca *Heidolph*, balança analítica modelo *Entris* da marca *Sartorius*, com precisão de 0,0001 g; sistema de purificação de água da marca *Milipore*, centrifugas modelos Universal 320 R da marca *Hettich*, equipamento de HPLC (*Elute UHPLC Pump HPG 1300*) da marca *Bruker*, equipamento de MS/MS (*EVOQ Qube*) da marca *Bruker*. Para além deste material, utilizou-se material de laboratório de uso corrente, das marcas *Normax*, *VWR*, *Terumo* e *Eppendorf*.

3.1.2 Amostras

O método foi implementado e validado para alimentos pertencentes a grupos alimentares distintos: frutos e vegetais. No caso dos frutos, utilizou-se o morango, uma matriz com elevado teor de pigmentos (antocianinas). Já para o grupo dos vegetais utilizou-se a curgete, um alimento com um elevado teor de água.

A seleção destas matrizes teve por base as diretrizes do guia SANTE/12682/2019, que indica que os métodos devem ser validados no mínimo para um alimento de cada grupo alimentar. Além disso, a escolha das matrizes validadas teve também em consideração a representatividade do tipo de amostras recebidas no laboratório da SGS Portugal para análise de glifosato.

De forma a avaliar a aplicabilidade do método à análise de rotina, foi também determinado o teor de glifosato em amostras enviadas pelos clientes da SGS para a análise do composto em estudo, nomeadamente em uvas e em milho fresco.

3.1.3 Reagentes

- (1) Ácido fórmico (CH_2O_2) (grau: *Analysis*) da marca *Carlo Erba Reagents S.A.S*
- (2) Ácido fórmico (CH_2O_2) (grau: LC-MS) da marca *Carlo Erba Reagents S.A.S*
- (3) Água *MilliQ* obtida através do sistema de purificação da marca *Milipore*
- (4) Água ultrapura tipo 1 (grau: HPLC) da marca *VWR Chemicals*
- (5) Glifosato ($\text{C}_3\text{H}_8\text{NO}_5\text{P}$) a 98,7% da marca *Dr. Ehrenstorfer GmbH*
- (6) Metanol (CH_3OH) a 99,9% (grau: *Analysis*) da marca *Carlo Erba Reagents S.A.S*
- (7) Metanol (CH_3OH) a 99,9% (grau: *HPLC plus*) da marca *Carlo Erba Reagents S.A.S*

3.1.3.1 Preparação da Solução de Metanol com Ácido Acético a 1% (v/v)

Para a preparação da solução de extração de metanol com ácido fórmico a 1%(v/v) pipetou-se 2 mL de ácido fórmico (1) para um balão volumétrico de 200 mL, tendo-se perfazido o volume com metanol (6).

3.1.3.2 Preparação da Solução de Fase Móvel A e Fase Móvel B

Para a preparação da fase móvel A de água com ácido fórmico a 0,1% (v/v) pipetou-se 1 mL de ácido fórmico (2) para um balão volumétrico de 1000 mL, tendo-se perfeito o volume com água (4). Para a preparação da fase móvel B de metanol com ácido fórmico a 0,1% (v/v) pipetou-se 1 mL de ácido fórmico (2) para um balão volumétrico de 1000 mL, tendo-se perfeito o volume com metanol (7).

3.1.3.3 Preparação da Solução Stock de Glifosato

A partir do padrão comercial de glifosato preparou-se uma solução stock de glifosato de 1000 $\mu\text{g/mL}$. Com efeito, atendendo ao grau de pureza do padrão (98,7%), pesou-se 0,0051 g do padrão de glifosato (5), tendo-se dissolvido em água (3), num banho de ultrassons durante cerca de 5 minutos. Seguidamente, adicionou-se a um balão volumétrico de 5 mL, tendo-se perfazido o volume com água (3).

3.1.3.4 Preparação das Soluções de Trabalho

Solução de Trabalho 1 (ST1): A partir da solução stock de glifosato de 1000 $\mu\text{g/mL}$ pipetou-se 500 μL para um balão volumétrico de 5 mL, tendo-se perfazido o volume com água (3), obtendo-se assim a solução de 100 ppm.

Solução de Trabalho 2 (ST2): A partir da solução padrão de glifosato de 100 $\mu\text{g/mL}$ pipetou-se 500 μL para um balão volumétrico de 5 mL, tendo-se perfazido o volume com água (3), obtendo-se assim a solução de 10 ppm.

Solução de Trabalho 3 (ST3): A partir da solução padrão de glifosato de 10 µg/mL pipetou-se 500 µL para um balão volumétrico de 5 mL, tendo-se perfazido o volume com água (3), obtendo-se assim a solução de 1,00 ppm.

3.2 Metodologia

3.2.1 Extração das Amostras

O processo de extração baseou-se no método QuPpe desenvolvido pelo EURL-SRM, tendo-se realizado algumas modificações.

As amostras foram trituradas com vista a reduzir o tamanho e a garantir a sua homogeneidade, tendo sido recolhidas para frascos coletores e devidamente identificadas. Para frutos e vegetais frescos, pesou-se $10,0 \pm 0,1$ g da amostra para um tubo de *Falcon* de 50 mL.

Posteriormente, adicionaram-se 10 mL da solução de extração a cada amostra, e agitou-se durante 15 minutos no *multi reax*. Após a agitação as amostras foram colocadas no congelador a -22°C durante 30 minutos, tendo sido imediatamente centrifugadas a 5000 rpm durante 10 minutos.

Após centrifugação as amostras foram filtradas através de um filtro de poro com dimensão de $0,45\ \mu\text{m}$ e diluídas com o solvente de extração, numa diluição de 1:10. Os extratos diluídos foram colocados em *vials* de vidro com 2 mL para posterior análise por LC-MS/MS.

Na **Figura 3.1** encontra-se uma representação esquemática do procedimento de extração.

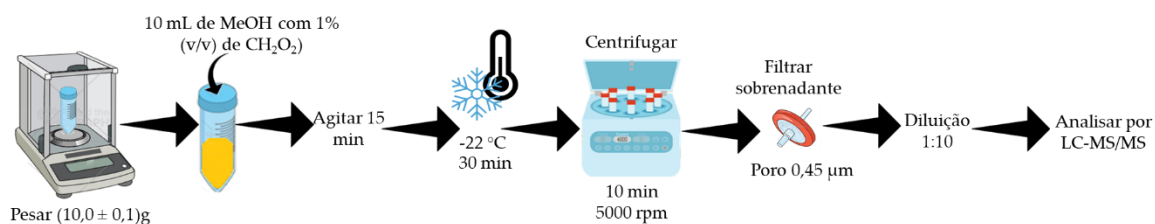


Figura 3.1 - Representação esquemática do método de extração desenvolvido.

3.2.2 Ensaio de Recuperação

Nos ensaios de recuperação foi avaliada a capacidade do método em recuperar o analito, adicionado previamente à amostra em concentrações conhecidas de acordo com a gama de trabalho escolhida.

Com efeito, escolheu-se fortificar as amostras numa gama de concentração baixa, $0,00500\ \mu\text{g/mL}$ ($0,0100\ \text{mg/kg}$), e numa gama de concentração intermédia, $0,0250\ \mu\text{g/mL}$ ($0,0500\ \text{mg/kg}$), estando os volumes de solução padrão adicionada descritos na **Tabela 3.1**.

Tabela 3.1 – Ensaio de Recuperação: Níveis das amostras fortificadas, com concentração em µg/mL e em mg/kg, e respetivo volume da solução de trabalho 3 adicionado, em µL, para as amostras de frutos e vegetais.

Matriz	Nível	Volume da ST3 (µL)	Concentração Fortificada	
			(µg/mL)	(mg/kg)
Frutas e vegetais	1	100	0,00500	0,0100
	2	500	0,0250	0,0500

3.2.3 Retas de Calibração em Matriz

De forma a quantificar a concentração de analito na amostra elaborou-se, a partir da solução de trabalho 3, uma reta de calibração em extrato. Com efeito, após a extração e filtração, pipetou-se um determinado volume do extrato para os *vials* aos quais foi posteriormente adicionado um determinado volume da solução padrão. Os volumes utilizados para a construção da reta de calibração em frutos e vegetais encontram-se descritos na **Tabela 3.2**.

Após a preparação das retas, realizou-se uma diluição de 1:10 tendo-se adicionado a um *vial*, 900 µL da solução de metanol com 1% de ácido fórmico e 100 µL de cada ponto da reta de calibração.

Tabela 3.2 – Reta de calibração em extrato para matrizes de frutos e vegetais: Volumes, em µL, da solução de trabalho 3 (1,00 µg/mL) e de extrato a adicionar ao *vial* para construção da reta de calibração nas matrizes de frutos e vegetais. Está também indicada a concentração de glifosato em cada ponto.

Matriz	Ponto	Solução Padrão		Extrato	
		Concentração (µg/mL)	Volume (µL)	Concentração (µg/mL)	Volume (µL)
Frutas e vegetais	1 (PC1)	1,00	5	0,00500	995
	2		10	0,0100	990
	3		25	0,0250	975
	4 (PC2)		50	0,0500	950
	5		75	0,0750	925
	6 (PC3)		100	0,100	900

3.2.4 Reta de Calibração em Solvente

A reta de calibração em solvente realizou-se de modo similar ao descrito anteriormente para as retas de calibração em matriz, tendo-se adicionado o solvente ao invés do extrato. Os volumes utilizados para a construção da reta de calibração, estão descritos na **Tabela 3.2**, tendo-se substituído o extrato por solvente.

3.2.5 Análise LC-MS/MS

Para quantificação do glifosato em amostras alimentares utilizou-se a técnica de cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massa em *tandem* (LC-MS/MS).

A análise cromatografia foi realizada através de um sistema de UHPLC, *Elute UHPLC Pump HPG 1300*, da *Bruker*, equipado com injetor automático. Os analitos foram separados pela coluna *Hypercarb* (2,1 mm x 100 mm, 5 µm), da *Thermo Fischer Scientific*, mantida a 40 °C. O volume injetado foi de 5 µL e as fases móveis foram 0,1% de ácido fórmico em água (A) e 0,1% de ácido fórmico em metanol (B). O gradiente de eluição iniciou-se com 95% de fase A, num fluxo de 0,5 mL/min, após 4,0 minutos o gradiente de A deslocou-se para os 2,0%, mantendo-se esta composição durante 2,1 minutos. Após a subida, a composição e fluxo da fase móvel foi reajustada às condições iniciais, tendo-se mantido assim durante, aproximadamente 1,4 minutos para reequilíbrio da coluna. O tempo da corrida cromatográfica foi de 7,5 minutos.

A análise por espectrometria de massa foi efetuada através de um equipamento de MS/MS, *EVOQ Qube*, da *Bruker*, equipado com uma fonte de ionização *electrospray*, que operou em modo negativo. O modo de aquisição utilizado foi a monitorização de reações múltiplas. As condições de operação foram as seguintes: temperatura do cone de 350 °C, fluxo de gás do cone 20 psi, temperatura da sonda 400 °C, fluxo de gás da sonda 20 psi, fluxo de gás do nebulizador 50 psi, modo de gás de exaustão On, IS (polaridade negativa) 4000 V e IS (polaridade positiva) 3500 V. O controlo do sistema, aquisição de dados e análise de dados foram todos realizados utilizando a versão 4.1 do software *Compass HyStar*, da *Bruker*.

Na **Tabela 3.3** estão sumarizadas as condições instrumentais utilizadas para a análise por LC-MS/MS de Glifosato.

Tabela 3.3 - Condições de LC-MS/MS para a análise de Glifosato.

Parâmetros	Condições			
Modo de Separação	UHPLC de fase reversa			
Coluna	<i>Hypercarb</i> (2,1x100 mm, 5 µm) (35005-102130) da <i>Thermo Fischer Scientific</i>			
Temperatura da Coluna	40 °C			
Fase Móvel A	Água com 0,1% de ácido fórmico			
Fase Móvel B	Metanol com 0,1% de ácido fórmico			
Volume de injeção	5 µL			
Gradiente	Tempo (min.)	Fluxo (mL/min)	%A	%B
	0,0	0,500	95,0	5,0
	3,0	0,500	95,0	5,0
	4,0	0,500	2,0	98,0
	6,0	0,500	2,0	98,0
	6,1	0,500	95,0	5,0
	7,5	0,500	95,0	5,0
Modo de Ionização	<i>Electrospray</i> negativo			
Detetor	MS/MS			
Transições de massas	168,0/63,0; 168,0/81,0			
Modo de Aquisição	MRM			

3.2.6 Validação

De forma a garantir a fiabilidade do método procedeu-se à validação do método de acordo com as orientações dos guias RELACRE 13 (2000) e SANTE/12682/2019 (2019).

A linearidade e gama de trabalho do método foram estudadas através da elaboração de uma curva de calibração com seis pontos, obtida partir dos dados cromatográficos para cada ponto de calibração de cada uma das matrizes. Para a análise da gama de trabalho avaliou-se a homogeneidade de variâncias, tendo-se procedido à leitura de dez ensaios para o primeiro e último ponto da reta de calibração, 0,00500 µg/mL e 0,100 µg/mL, respetivamente, de cada matriz. O estudo da linearidade foi elaborado por aplicação do teste de *Mandel*, descrito em 2.5.2.1; pelo cálculo do fator de correção, descrito em 2.5.2.2; pela análise de resíduos, descrito em 2.5.2.3; e pela aplicação do teste de *RIKILT*, descrito em 2.5.2.4, aos pontos das curvas de calibração de cada matriz. Os limiares analíticos (LD e LQ) foram determinados através dos dados das curvas de calibração elaboradas.

A exatidão e precisão do método foram avaliadas através de ensaios de recuperação para dois níveis de fortificação para as matrizes em estudo, conforme descrito em 3.2.2 e de acordo com as orientações do guia SANTE/12682/2019. A repetibilidade foi estimada através de cinco determinações para cada nível de fortificação no mesmo dia. De modo semelhante,

a repetibilidade foi avaliada através da realização de cinco ensaios para cada nível de fortificação durante dois dias. A incerteza foi determinada segundo uma abordagem baseada nos dados de validação do método analítico, tendo-se considerado um fator K de 2, para um nível de confiança de 95%, para o cálculo da incerteza expandida.

Na **Tabela 3.4**, encontram-se resumidos os critérios de aceitação utilizados na validação do método analítico em apreço.

Tabela 3.4 - Critérios de aceitação utilizados durante a validação do método analítico para os parâmetros de linearidade, gama de trabalho, limite de quantificação, limite de deteção, precisão intermédia, repetibilidade, exatidão e incerteza. Os critérios de aceitação utilizados tiveram como base o Guia RELACRE 13 (2000) e o Guia SANTE/12682/2019 (2019).

Parâmetro	Como?	Critério
Linearidade	Avaliação do fator de correção (1) e aplicação do teste de <i>Mandel</i> (2), da análise dos residuais (3) e do teste de <i>R/KILT</i> (4)	1. $R \geq 0,995$ 2. $VT \leq F_{\text{tabelado}}$ 3. %Desvio < 20% 4. $90\% \leq FR \leq 110\%$
Gama de Trabalho	Avaliação da homogeneidade de variâncias	$VT \leq F_{\text{tabelado}}$
LQ	Menor ponto de calibração da reta	$\leq \text{MRL}$ Inferior ao menor padrão de menor concentração
Razão Iónica	Avaliação da razão iónica das amostras relativamente à média da razão iónica dos padrões de calibração	$\pm 30\%$
Tempo de Retenção	Avaliação do tempo de retenção das amostras relativamente à média dos tempos de retenção dos padrões de calibração	$\pm 0,1 \text{ min}$
Precisão Intermédia	Avaliação do coeficiente de variação das amostras	$\leq 20\%$
Repetibilidade	Avaliação do coeficiente de variação das amostras	$\leq 20\%$
Exatidão	Avaliação da percentagem de recuperação para dois níveis de fortificação	70 – 120%
Incerteza	Avaliação da incerteza expandida do método, de acordo com a incerteza combinada, calculada a partir da incerteza associada à precisão e incerteza associada à exatidão	$\leq 50\%$

RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Otimização do Método

No laboratório da empresa SGS Portugal está implementado um método para a determinação do glifosato, com base no método QuPPE, todavia este carece de otimização uma vez que, por observação visual, os resultados instrumentais mostram difícil identificação cromatográfica dos sinais do analito, com fortes efeitos matriz.

Deste modo, foram realizadas determinadas alterações ao método original com vista a otimizar não só as condições de extração, como também as condições cromatográficas. A otimização do método teve especial enfoque no aperfeiçoamento das condições cromatográficas e na redução do efeito matriz, característico das matrizes alimentares.

4.1.1 Otimização das Condições de LC-MS/MS

A determinação e monitorização de resíduos de pesticidas em matrizes alimentares era convencionalmente realizada por cromatografia gasosa acoplada à espetrometria de massa (GC-MS) (Masiá *et al.*, 2016). No entanto, nem todos os pesticidas são adequados à análise por GC-MS, visto apresentarem características físico-químicas limitantes, como baixa volatilidade, ou por serem termolábeis (Han *et al.*, 2016; Harris, 2010; Skoog *et al.*, 2014; Wilson, 2010). É neste âmbito que devido aos avanços tecnológicos na área de LC-MS, relativamente à capacidade de deteção, passou a ser possível a análise de pesticidas mais polares, inadequados à análise por GC-MS (Masiá *et al.*, 2016).

O glifosato enquadra-se no grupo dos pesticidas de elevada polaridade que, em conjunto com a sua baixa volatilidade, peso molecular e ausência de grupos cromóforos, tornam-se difíceis de analisar (Ciasca *et al.*, 2020; Han *et al.*, 2016; Nørskov *et al.*, 2019). Apesar de existirem alguns métodos desenvolvidos para a determinação de glifosato por Cromatografia Gasosa acoplada à Espetrometria de Massa em *tandem* (GC-MS/MS), dado ao seu carácter iónico e baixa volatilidade, a análise por cromatografia líquida é preferida (Han *et al.*, 2016).

A cromatografia líquida de fase reversa é o método de separação mais utilizado para a análise de resíduos de pesticidas, apresentando-se como uma técnica versátil (Masiá *et al.*, 2016). Não obstante, um dos desafios inerentes à determinação do glifosato é a baixa retenção em colunas de fase reversa, podendo gerar picos mal resolvidos com compostos co-eluídos (Chamkasem & Harmon, 2016; Tolstikov & Fiehn, 2002). Apesar de se poderem utilizar reagentes de *ion-pairing* para melhorar a retenção dos analitos, estes permanecem no equipamento podendo afetar a sua reprodutibilidade (Hsiao *et al.*, 2018). Nesta perspetiva, são também muitas vezes utilizados processos de derivatização para alteração de grupos químicos da moléculas a fim de agilizar a análise (Guo *et al.*, 2018; Han *et al.*, 2016; Harris, 2010; Jensen *et al.*, 2016). Contudo, estes processos são onerosos e morosos, requerendo a utilização de reagentes perigosos como o cloreto de fluorenilmetiloxycarbonil (FMOC-Cl) (Chamkasem & Harmon, 2016; Guo *et al.*, 2018; Merck, 2021; Nørskov *et al.*, 2019).

Naturalmente, dadas as particularidades da molécula do glifosato, é expectável que exista um elevado conjunto de literatura com diferentes abordagens analíticas para a sua determinação e quantificação (Bernal *et al.*, 2012). Pela análise da literatura científica disponível, é notório um esforço coletivo para o desenvolvimento e otimização de novas abordagens para a análise de pesticidas altamente polares, com vista a métodos simples, práticos e aptos para análises em laboratórios de rotina, sem a utilização de agentes de derivatização (Nørskov *et al.*, 2019).

A cromatografia líquida de interação hidrofílica (HILIC) pode ser vista como uma alternativa para a separação de compostos que têm nenhuma ou limitada retenção em colunas de fase reversa convencionais (Masiá *et al.*, 2016). Esta técnica permite a separação de moléculas polares e apolares, dado que é formada uma camada rica em água na superfície da fase estacionária, capaz de interagir com compostos hidrofílicos (Buszewski & Noga, 2012; Hsiao *et al.*, 2018). Ainda assim, esta técnica está associada a maus picos cromatográficos, com baixa reprodutibilidade e a uma rápida degradação da coluna (Jensen *et al.*, 2016; Nørskov *et al.*, 2019). Segundo Myint *et al.* (2009), a forma dos picos cromatográficos está relacionada com a existência de resíduos de metais no sistema LC-MS, podendo-se usar ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA), um forte agente quelante, para remover os metais. Todavia, como reportado por Nørskov *et al.* (2019), a adição de EDTA causa supressão iónica, diminuindo a sensibilidade do equipamento. Em suma, atendendo a relação preço-eficácia, esta abordagem pode-se tornar desvantajosa para aplicação em laboratórios de rotina (Jensen *et al.*, 2016).

Outra alternativa interessante para a separação de compostos altamente polares são as colunas com CGP, como a coluna *Hypercarb*, utilizada no método QuPPE para a separação do glifosato em matrizes de origem vegetal (Anastassiades *et al.*, 2020; Thermo Fisher Scientific, 2007). Para além da elevada resistência a condições extremas de análise (solventes e temperatura) e do seu carácter redox, as CGP possuem características únicas que possibilitam a retenção de compostos altamente polares (Thermo Fisher Scientific, 2007; West *et al.*, 2010). É

de salientar que a utilização de temperatura em cromatografia apresenta-se como uma vantagem visto que leva não só à diminuição da viscosidade da fase móvel, permitindo fluxos mais elevados, mas também à diminuição da constante dielétrica da água aumentando o seu poder de eluição (Tajuddin & Smith, 2002). Em conjunto com a espetrometria de massa, a utilização de temperatura permite que o eluído chegue à fonte de ionização a uma temperatura mais alta, adjuvando o processo de vaporização e dessolvatação, aumentando a eficiência da ionização e sensibilidade instrumental (Pereira *et al.*, 2007).

Apesar de não existir literatura que compare a coluna *Hypercarb* com as outras colunas supramencionadas, pode-se inferir que, dentro dos métodos de LC-MS/MS, a coluna *Hypercarb* é preferida. Tal é corroborado pelos estudos de Golge *et al.* (2021), que avaliou comparativamente a performance cromatográfica da coluna *Hypercarb* face a uma coluna Waters Atlantic C18 (150×2,1 mm, 2,6 µm), tendo obtido melhor separação pela coluna de carbono. Resultados semelhantes foram obtidos por Marques (2019), na dissertação de mestrado desenvolvida para a determinação de cloratos e percloratos em matrizes de origem vegetal por LC-MS/MS na empresa SGS Portugal.

Posto isto, atendendo aos bons resultados reportados na literatura para a coluna *Hypercarb* e ao trabalho já desenvolvido no laboratório da SGS Portugal por Marques (2019), foi selecionada a coluna *Hypercarb*.

Alguns autores como Ciasca *et al.* (2020), referem como desvantagem das colunas *Hypercarb* a necessidade de realizar um *priming* da coluna antes da sua utilização. Efetivamente, segundo Anastassiades *et al.* (2020), é sugerido um *priming* da coluna com soluções de extrato de espinafre ou de casca de uva, que contêm moléculas planares, como a clorofila ou antocianinas, de forma a cobrir alguns dos centros ativos na superfície. A injeção repetida de extrato de espinafres mostra ter um grande impacto a nível cromatográfico, especialmente no tempo de retenção (Anastassiades *et al.*, 2020).

Os resultados mostraram que a injeção repetida (cinco injeções) de um extrato de espinafres, para *priming* da coluna leva a um melhoramento significativo da visualização dos picos cromatográficos, com diminuição do tempo de retenção. Com efeito, no método desenvolvido implementou-se um passo de *priming* da coluna, devendo este ser realizado sempre que se verifique deterioração dos resultados cromatográficos (Ciasca *et al.*, 2020).

Como já mencionado na introdução, além da coluna, também as fases móveis desempenham um papel fundamental na separação cromatográfica.

No método QuPPE, usado como ponto de partida para a elaboração do método analítico em apreço, é sugerido como fase móvel uma solução de água com 1% de ácido acético e 5% de metanol (fase móvel A) e uma solução de metanol com 1% de ácido acético.

Todavia, alguns autores que estudaram a otimização da análise de pesticidas altamente polares, sugerem fases móveis com acetonitrilo (ACN), ao invés de metanol, uma vez que o

ACN causa a precipitação de proteínas e produz extratos mais limpos (Guo *et al.*, 2018; Han *et al.*, 2016; Kaczyński, 2017; Masiá *et al.*, 2016; Zoller *et al.*, 2018). Ainda assim, apesar de alguns autores, como Guo *et al.* (2018) e Kaczyński (2017), afirmarem que o acetonitrilo permite obter melhores picos cromatográficos face a uma fase móvel com metanol, outros, como Chamkase & Harmon (2016) e Nørskov *et al.* (2019), afirmam que, pese embora o aumento da eficiência da ionização e da retenção, o acetonitrilo leva a picos cromatográficos mais largos e com caudas (*tailing*). É ainda importante salientar que a semelhança entre a composição da fase móvel e o solvente de extração é importante para que haja uma minimização do efeito solvente durante a separação cromatográfica (Guo *et al.*, 2018).

No método desenvolvido as fases móveis utilizadas foram 0,1% de ácido fórmico em água (fase A) e 0,1% de ácido fórmico em metanol (fase B). A escolha destas fases móveis deve-se a ensaios já realizados pela SGS Portugal para o desenvolvimento de métodos cromatográficos universais para a determinação de outros compostos analisados no laboratório, com base no estudo de Savini *et al.* (2019). A presença do ácido na fase móvel melhora o formato dos picos cromatográficos, não aumentando significativamente a supressão iónica na fonte de ionização (Hsiao *et al.*, 2018; Savini *et al.*, 2019).

Na **Tabela 4.1** encontra-se um resumo dos parâmetros cromatográficos otimizados, bem como a decisão da sua implementação.

Tabela 4.1 - Resumo dos estudos de otimização das condições de LC-MS/MS. Estão identificados os problemas, os estudos realizados, os resultados dos estudos de otimização e a conclusão face à implementação ou não, dos pontos otimizados.

Problema	Estudo	Resultado	Conclusão
<i>Priming</i> da Coluna	Injeção repetida (5 vezes) de extrato de espinafres	Melhoramento dos sinais instrumentais e diminuição do tempo de retenção	Implementado

4.1.2 Otimização do Método de Extração

A análise de resíduos de pesticidas em matrizes alimentares é complexa e desafiante, uma vez que, por um lado, não só os pesticidas possuem características físico-químicas que dificultam a análise, como que, por outro lado, também os alimentos são matrizes complexas que possuem vários compostos que podem atuar como interferentes (Kaczyński, 2017).

Evidentemente existe um elevado volume de literatura dedicado ao desenvolvimento de metodologias para a análise de glifosato, e outros compostos com elevada polaridade, em matrizes alimentares (Bernal *et al.*, 2012). Na **Tabela 4.3** estão ilustrados alguns dos métodos utilizados para a análise de glifosato em matrizes alimentares.

Como já referido anteriormente, o método de eleição para a análise de pesticidas altamente polares é o LC-MS/MS (Masiá *et al.*, 2016). Dada a seletividade e especificidade da técnica, a preparação das amostras direciona-se para a extração segundo métodos mais

genéricos, capazes de extrair um elevado número de compostos, evitando procedimentos de limpeza exaustivos (Malik *et al.*, 2010). Não obstante, dado à presença de compostos interferentes nas matrizes alimentares, nem sempre é possível obter bons resultados, pelo que é necessário proceder a passos de limpeza (Golge, 2021).

O método QuPPE, desenvolvido pelo EURL-SRM, para a análise de vários pesticidas altamente polares em matrizes de origem vegetal é um dos métodos mais utilizados (Anastasiades *et al.*, 2020; Savini *et al.*, 2019). Não obstante, vários autores como por exemplo Chiallo *et al.* (2019), Kaczyński (2017) e Savini *et al.* (2019), validaram e desenvolveram métodos através de modificações ao método QuPPE. As modificações apresentadas por estes autores compreendem essencialmente a introdução de passos de limpeza para minimização e/ou eliminação dos fortes efeitos matriz, verificados nas matrizes alimentares (Kaczyński, 2017).

Os alimentos possuem compostos, como proteínas, lípidos, glúcidos, pigmentos, compostos antioxidantes, compostos sulfurados e corantes, que durante o processo de extração podem ser simultaneamente extraídos e atuar como interferentes na análise (Kaczyński, 2017; Xu *et al.*, 2019). Com efeito, são observadas interferências no sinal do analito, com acréscimo ou supressão de sinal, devido às interações via forças fracas (*van der Waals*, dipolo-dipolo e eletrostáticas) entre o analito e os componentes co-extraídos que causam competição entre os iões na fonte de ionização do espectrómetro de massa (Masiá *et al.*, 2016; Nørskov *et al.*, 2019). Durante o trabalho desenvolvido, foi possível verificar a existência de efeito matriz, para as matrizes validadas, nomeadamente -85,2% para o morango e -86,6% para a curgete. O estudo do efeito matriz será explicado mais adiante no capítulo 4.2.1.

Efetivamente existem várias abordagens para a minimização do efeito matriz, como a limpeza do extrato das amostras, ou a diluição do extrato final, para redução dos componentes da matriz injetados (Masiá *et al.*, 2016). Alguns dos procedimentos de limpeza utilizados são a cromatografia de exclusão molecular, a extração em fase sólida (SPE), ou a extração em fase sólida dispersiva com sorbentes compatíveis com os pesticidas em análise (Chamkasem & Harmon, 2016; Han *et al.*, 2016; Herrera López *et al.*, 2019; Kaczyński, 2017; Masiá *et al.*, 2016; Zoller *et al.*, 2018).

O SPE é das técnicas de limpeza mais comuns, existindo vários estudos na literatura que avaliam a sua eficácia na limpeza de amostras para a análise de glifosato (Han *et al.*, 2016; Jensen *et al.*, 2016). A principal desvantagem do SPE é a fraca seletividade na separação de compostos com elevada polaridade como o glifosato, dado que os materiais de SPE também se conseguem ligar a compostos de estrutura semelhante (Rigobello-Masini *et al.*, 2019; Wirth *et al.*, 2021). Em contramedida têm vindo a ser desenvolvidos polímeros de impressão molecular que contêm sítios ativos, capazes de reconhecer e ligar-se às moléculas alvo de natureza semelhante (Rigobello-Masini *et al.*, 2019).

Além desta técnica, também a dSPE se tem demonstrado interessante para análise de pesticidas altamente polares, dado que agiliza e simplifica o processo de extração (Islas *et al.*,

2017). Aliás, o método de extração QuEChERS, também desenvolvido pelo EURL-SRM, contempla um passo de limpeza por dSPE com PSA, para remoção de ácidos orgânicos, ácidos gordos e açúcares (Payá *et al.*, 2007). A eficácia de cada sorbente depende de cada matriz e da natureza dos compostos em análise, visto que por exemplo, para matrizes com maior teor lipídico são indicados sorbentes como o C18, enquanto para matrizes com maior teor de pigmentos (antocianinas e clorofila) são preferidos sorbentes à base de carbono, como o GCB (Cabrera *et al.*, 2016; Kaczyński, 2017; Tomasini *et al.*, 2012). Efetivamente, a escolha do sorbente ideal é uma tarefa desafiante.

Neste trabalho foi avaliada a capacidade de dois sorbentes, C18 e GCB, disponíveis no laboratório, para a remoção de interferentes em amostras de barras de cereais para análise de glifosato. O objetivo da utilização destes sorbentes seria reduzir o efeito matriz, obtendo melhor visualização cromatográfica. Na **Figura 4.1** estão dispostos dois cromatogramas exemplificativos do efeito da extração com os dois sorbentes mencionados.

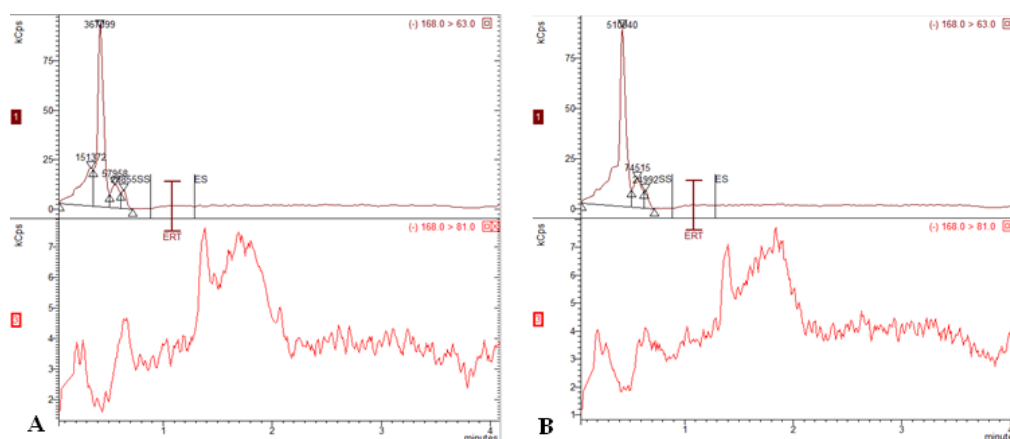


Figura 4.1 - Representação gráfica exemplificativa dos efeitos da extração de uma amostra para determinação de glifosato, segundo um passo de limpeza com PSA+C18 (A) e PSA+GCB (B). 1 e 3 correspondem aos cromatogramas das transições dos íons quantificadores e qualificadores, respetivamente.

Apesar de não ter sido avaliado o efeito matriz para cada tipo de extração, por observação da gráfica da **Figura 4.1**, pode-se afirmar que existe um deterioramento da visualização cromatográfica. De acordo Kaczyński (2017), o C18 não permite uma redução eficaz do efeito matriz, verificando-se um efeito semelhante ao obtido sem passo de limpeza. Segundo este autor, também a utilização de GCB leva a menores taxas de recuperação, tal como já provado noutros estudos, uma vez que os pesticidas polares e planares são fortemente adsorvidos por este sorbente (Han *et al.*, 2016). Com efeito, nenhum dos sorbentes foi considerado, não tendo sido introduzido um passo de limpeza por dSPE. É no entanto de salientar que, tem vindo a ser desenvolvidas e estudadas novas partículas, como o grafeno e o quitosano, que permitem ultrapassar as limitações dos sorbentes convencionais (Cabrera *et al.*, 2016; Han *et al.*, 2016; Kaczyński, 2017; Wu *et al.*, 2015). Ainda assim, as técnicas de limpeza continuam a ser dispendiosas, uma vez que requerem a utilização de muitos consumíveis (solventes e cartuchos), são morosas e, como reiterado, podem levar à perda de pesticidas por adsorção para o sorbente (Masiá *et al.*, 2016).

Segundo Nørskov *et al.* (2019), outra forma simples de reduzir o efeito matriz é através da diluição das amostras, dado que diminui a competição dos íons na fonte de ionização e melhora a análise. Com efeito, estudou-se a redução do efeito matriz segundo a aplicação de dois fatores de diluição, 10 e 20, tendo-se inferido que face à diluição de 20, a diluição de 10 permite minimizar eficazmente o ruído de base do espectro, sem que se perca visualização dos picos do analito.

Estes resultados divergem das conclusões de López *et al.* (2019), que verificaram que quanto maior o fator de diluição, menor é o efeito matriz observado. Não obstante, isto pode dever-se ao volume de injeção, já que em López *et al.* (2019) o volume de injeção é 15 µL, três vezes inferior ao volume de injeção utilizado no método implementado. Aliás, Anastassiades *et al.* (2020) sugere que para matrizes complexas deve ser realizada uma diluição de fator 5 ou 10, ou a injeção de um volume de 2 µL, que atua como uma diluição da amostra. Posto isto, implementou-se um passo de diluição da amostra de 1:10, com injeção de 5 µL de amostra.

Além da diluição, foi também implementado um passo de congelação dos extratos das amostras previamente à sua centrifugação. Apesar de os solventes orgânicos e ácidos utilizados promoverem a desnaturação das proteínas, o congelamento das amostras mostra-se particularmente relevante para a coagulação das proteínas e obtenção de extratos mais limpos (Anastassiades *et al.*, 2020; Chamkasem & Harmon, 2016). É de referir que, apesar deste passo já estar a ser utilizado no laboratório para a análise do pesticida em apreço, esta dissertação vem consolidar a sua implementação no método de extração com a inclusão do congelamento das amostras a -22°C durante 30 minutos.

Apesar de não terem sido realizados estudos de estabilidade aos padrões de glifosato foi possível verificar a sua degradação, e consequentemente a deterioração dos resultados experimentais. As soluções de trabalho foram preparadas em água *MillieQ*, sendo que, segundo Anastassiades *et al.* (2020), deveriam ter uma duração de aproximadamente seis meses, quando armazenadas a 6°C. Como contramedida foram elaborados padrões semanais de forma a garantir a obtenção de bons resultados. Em futuro, para melhor gestão laboratorial, será importante determinar a validade dos padrões. Na **Tabela 4.2** apresenta-se um resumo dos parâmetros do método de extração otimizados, bem como a decisão de implementação.

Tabela 4.2 - Resumo dos estudos de otimização do método de extração. Estão identificados os problemas, os estudos realizados, os resultados dos estudos de otimização e a conclusão face à implementação ou não, dos pontos otimizados.

Problema	Estudo	Resultado	Conclusão
Efeito matriz	Efeito de dois sorbentes: C18 e GCB	Perda de visualização, o analito é adsorvido pelos sorbentes	Não Implementado
	Efeito de dois fatores de diluição: 10 e 20	A diluição de fator 10 diminui eficazmente o efeito matriz, sem perda de visualização	Implementado
Limpeza dos Extratos	Congelamento dos extratos a -22°C durante 30 minutos	Extratos mais claros devido à coagulação das proteínas	Implementado
Degradação dos Padrões	Preparação semanal dos padrões	Menor deterioração dos sinais instrumentais	Implementado

Tabela 4.3 - Panorama dos métodos disponíveis na literatura para a determinação do glifosato em matrizes alimentares por LC-MS/MS, e respetivos parâmetros analíticos relevantes: matriz, solvente de extração, utilização de passo de limpeza, utilização de derivatização, limite de quantificação (LQ) e percentagem de recuperação (%R).

Matriz	Extração	Limpeza	Derivatização	LQ (mg/kg)	%R	Referência
Uvas	H ₂ O e MeOH com Na ₂ EDTA e ácido acético	<i>SPE</i>	Não	0,019	87-111	(Chamkasem, 2017)
Frutos, vegetais e cereais	H ₂ O e MeOH acidificado	<i>SPE</i>	Não	0,001	94-102	(Zoller <i>et al.</i> , 2018)
Cebola, trigo, batata e ervilha	H ₂ O acidificada	<i>dSPE</i>	Não	0,01	70-97	(Kaczyński, 2017)
Frutos, vegetais, chá, cereais e óleos	H ₂ O e MeOH acidificado	<i>dSPE</i>	Sim	0,0003-0,0033	80-108	(Han <i>et al.</i> , 2016)
Frutos, vegetais e cereais	H ₂ O e MeOH acidificado	Não	Não	0,02-0,1	91-112	(Anastassiades <i>et al.</i> , 2020)
Frutos, vegetais e cereais	H ₂ O e MeOH acidificado	Não	Não	0,02-0,05	83-113	(Herrera López <i>et al.</i> , 2019)
Óleos	H ₂ O com 1% de ácido fórmico	Não	Não	0,01	82-110	(Chiarello <i>et al.</i> , 2019)
Cerejas	H ₂ O e MeOH acidificado	Não	Não	0,0064	86	(Golge, 2021)
Frutos e vegetais	H ₂ O e MeOH acidificado	Não	Não	0,003	72-116	(Savini <i>et al.</i> , 2019)
Cereais	H ₂ O	Não	Não	ND	85	(Granby <i>et al.</i> , 2003)

Nota: Onde se lê ND deve-se entender "não disponível".

4.2 Validação do Método Analítico

A validação do método desenvolvido e otimizado foi realizada de acordo com as diretrizes do guia SANTE/12682/2019, da Comissão Europeia.

Em seguida são apresentados os resultados obtidos para a implementação e validação do método para determinação de glifosato em frutos e vegetais por LC-MS/MS, sendo abordados os seguintes parâmetros: gama de trabalho e linearidade, especificidade e seletividade, limiares analíticos (LD e LQ), precisão (repetibilidade e precisão intermédia), exatidão (recuperação) e incertezas de medição.

De acordo com o guia SANTE/12682/2019, os métodos devem ser validados pelo menos para um alimento de cada grupo alimentar. Assim, o método foi implementado e validado para as matrizes curgete e morango, uma vez que são representativas de dois grupos de alimentos distintos e ilustram o tipo de amostras enviadas pelos clientes da SGS para a análise da presença de glifosato.

4.2.1 Gama de Trabalho e Linearidade

Para a quantificação dos resíduos de pesticidas em amostras alimentares de frutas e vegetais foram construídas curvas de calibração que traduzem a relação entre a resposta do equipamento e a concentração do pesticida.

A minimização do efeito matriz em cromatografia líquida é complexa. No presente trabalho, a apreciação do efeito matriz foi realizada através do cálculo da razão entre o declive das retas de calibração em matriz e o declive da reta de calibração em solvente, conforme mostra a **Equação 4.1** (Savini *et al.*, 2019).

$$\%ME = \left(\left(\frac{m_{\text{matriz}}}{m_{\text{solvente}}} \right) - 1 \right) \times 100 = (F - 1) \times 100$$

Equação 4.1 - Percentagem de efeito matriz (%ME), em que m_{matriz} corresponde ao declive da reta de calibração em matriz; m_{solvente} corresponde ao declive da reta de calibração em solvente; e F corresponde à razão $m_{\text{matriz}}/m_{\text{solvente}}$.

Deste modo, foram elaboradas curvas de calibração em solvente e em extrato das matrizes analisadas, a partir de um mínimo de seis pontos de acordo com a gama de trabalho estipulada. Os resultados obtidos para o cálculo do efeito matriz para ambas as matrizes validadas, assim como o declive das retas de calibração, estão apresentados na **Tabela 4.4**. Para mais detalhes sobre a reta de calibração em solvente deve-se consultar o **Apêndice A**.

Tabela 4.4 - Percentagem de efeito matriz (%ME) na matriz morango e na matriz curgete. Estão também apresentados os declives das retas de calibração.

Matriz	Declive	%ME
Solvente	$2,86 \times 10^7$	-
Morango	$4,23 \times 10^6$	-85,2%
Curgete	$3,83 \times 10^6$	-86,6%

Segundo Kaczyński (2017) e Savini *et al.* (2019), quando o efeito de matriz é negativo significa que há supressão de sinal, afirmando-se ter-se um efeito de matriz forte quando o seu módulo é superior a 50%. Como se pode observar pela **Tabela 4.4**, verifica-se em ambas as matrizes a existência de um efeito matriz negativo, nomeadamente de -85,2% e -86,6%, o que significa a existência de uma forte supressão de sinal.

Por norma, é sugerida a minimização deste efeito matriz por adição de IS-IL (Anastassiades *et al.*, 2020; Krueve *et al.*, 2015a). Contudo, estes padrões têm um elevado custo e nem sempre estão disponíveis, pelo que não são aplicáveis a análises de rotina (Anastassiades *et al.*, 2020). Alternativamente, podem ser realizadas curvas de calibração em matriz de forma a compensar os efeitos verificados (SANTE/12682/2019, 2019). Posto isto, e dada à indisponibilidade de IS-IL no laboratório, foram realizadas curvas de calibração em matriz.

4.2.1.1 Gama de Trabalho

A definição da gama de trabalho baseou-se nas orientações do guia SANTE/12682/2019, tendo-se assumido como limite inferior, o limite máximo de resíduos assumido por defeito para pesticidas na UE, ou seja, 0,0100 mg/kg (Regulamento (CE) N.º 396/2005, 2005). O limite superior da gama de trabalho foi definido como 20 vezes o limite inferior da gama, ou seja, 0,200 mg/kg.

Apesar do LMR mais baixo permitido para o glifosato em alimentos ser de 0,100 mg/kg, segundo o Decreto-Lei N.º 233/2006 (2006) e o Regulamento (UE) N.º 293/2013 (2013), escolheu-se validar o método para 0,0100 mg/kg, uma vez que este é o valor exigido pelos clientes da SGS na apresentação de resultados.

A gama de trabalho foi apreciada através do estudo da homogeneidade de variâncias, pelo que foi analisada a existência de diferenças significativas entre o primeiro e último padrão da gama de trabalho, após a leitura de dez réplicas de cada extremo da gama de trabalho. Os resultados obtidos encontram-se na **Tabela 4.5**.

Tabela 4.5 – Estudo da homogeneidade de variâncias para as retas de calibração em matriz de morango e curgete. Estão apresentados os dados referentes à concentração do primeiro e último padrão de calibração, 0,00500 µg/mL e 0,100 µg/mL, respectivamente, bem como a média e as variâncias das áreas dos picos para cada amostra. Na última coluna está apresentado o valor de teste calculado (VT).

Matriz	Concentração (µg/mL)	Média	Variância	VT
Morango	0,00500	54084,6	$3,26 \times 10^6$	286
	0,100	618260	$9,31 \times 10^8$	
Curgete	0,00500	46682,0	$4,94 \times 10^6$	423
	0,100	800788	$2,09 \times 10^9$	

Para se averiguar a existência de diferenças significativas comparou-se o valor de teste calculado com o valor tabelado da distribuição F para um nível de confiança de 99% e para 9 graus de liberdade, ou seja, para um valor da distribuição F de 5,35. Assim, observando a **Tabela 4.5** constata-se que VT é superior ao valor tabelado em ambas as matrizes, pelo que existem diferenças significativas entre as variâncias, devendo a gama de trabalho ser reduzida.

Todavia, quando através de ensaios de fortificação se consegue comprovar que o método fornece resultados com recuperação aceitável dentro da gama de trabalho, pode-se assumir que a gama de trabalho está adequada (Henriques, 2008). Assim, verificou-se experimentalmente através de ensaios de recuperação que o método permite obter boas taxas de recuperação pelo que se considerou a gama de trabalho adequada, não se tendo efetuado a redução da mesma.

4.2.1.2 Linearidade

Para avaliar a capacidade de se obterem resultados diretamente proporcionais à concentração do analito nas amostras, avaliou-se a linearidade do método, por elaboração de uma curva de calibração em matriz, a partir de um mínimo de seis pontos, de acordo com a gama de concentração previamente estipulada.

Na **Figura 4.2** estão representadas as curvas de calibração para as matrizes em estudo, morango e curgete. No **Apêndice B** é possível consultar, em maior detalhe os dados utilizados para a construção das curvas de calibração.

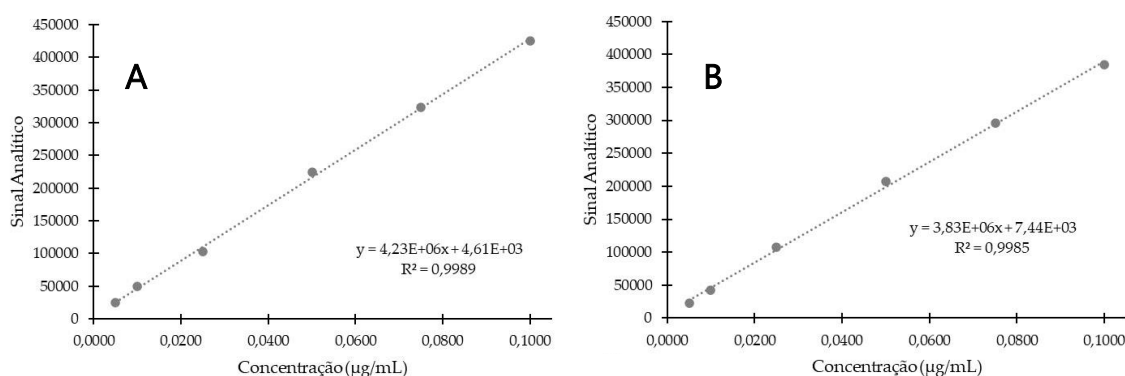


Figura 4.2 - Representação gráfica das retas de calibração em morango (A) e em curgete (B), com respetivas equações e coeficientes de determinação (R^2), na gama de concentrações de 0,00500 a 0,100 µg/mL.

Numa primeira instância, avaliou-se a aplicação de um modelo de regressão linear por aplicação do teste de *Mandel* e por apreciação do coeficiente de correlação, podendo os resultados destes parâmetros, juntamente com as respetivas equações das retas de calibração para cada matriz analisada, ser consultados na **Tabela 4.6**.

Tabela 4.6 – Estudo da linearidade das retas de calibração nas matrizes morango e curgete, e respetivas equações das retas de calibração. Estão apresentados os valores obtidos para o coeficiente de correlação (R), e para os parâmetros avaliados no teste de *Mandel*: desvio-padrão residual da reta de regressão linear ($S_{y/x}$), desvio-padrão residual da regressão não-linear ($S_{(y/x)^2}$), diferença de variâncias (DS^2) e valor de teste (VT).

Matriz	Equação da Reta	R	Teste de <i>Mandel</i>			
			$S_{y/x}$	$S_{(y/x)^2}$	DS^2	VT
Morango	$y=4,23 \times 10^6 x + 4,61 \times 10^3$	0,9995	$5,95 \times 10^3$	$4,37 \times 10^6$	$-5,73 \times 10^{13}$	-3,00
Curgete	$y=3,83 \times 10^6 x + 7,44 \times 10^3$	0,9993	$6,20 \times 10^3$	$1,04 \times 10^7$	$-3,27 \times 10^{14}$	-3,00

A validação das retas de calibração foi realizada de acordo com os critérios de aceitação do guia RELACRE 13, que sugere que, para existir linearidade, devem-se verificar coeficientes de correlação superiores a 0,995 (bons indicadores de correlação), e o teste de *Mandel* deve apresentar um valor de teste superior ao valor tabelado para a distribuição F para um grau de confiança de 95%. Deste modo, observando a **Tabela 4.6**, verifica-se que é possível descrever os dados de acordo com um modelo de regressão linear, uma vez que o valor tabelado para a distribuição F para um grau de confiança de 95% é de 10,13, e que ambas as retas apresentaram bons coeficientes de correlação, superiores a 0,995.

Ainda para averiguar a aplicabilidade do modelo de linearidade procedeu-se à análise dos residuais e ao teste de *RIKILT*. Os resultados obtidos estão apresentados na **Tabela 4.7**.

Tabela 4.7 – Análise dos residuais e para o teste de *RIKILT* em cada ponto da gama de trabalho para as matrizes morango e curgete.

Matriz	Ponto	Análise dos Residuais	Teste de <i>RIKILT</i>
Morango	1	-3,87	110
	2	5,66	110
	3	-6,93	91,1
	4	3,61	99,3
	5	0,48	95,7
	6	-0,79	94,1
Curgete	1	-17,0	107
	2	-7,79	102
	3	3,78	103
	4	4,20	100
	5	0,54	95,3
	6	-1,48	92,8

Nota: O valor a negrito encontra-se fora do critério de aceitabilidade para a análise de resíduos.

Segundo o Guia SANTE 12682/2019 (2019), para se garantir a existência de linearidade, o desvio entre a concentração calculada (através da equação da reta) e a concentração teórica deve situar-se a mais ou menos 20%. Ora, por observação da **Tabela 4.7**, relativamente à

análise de resíduos, destaca-se a existência de desvios significativos para o primeiro ponto da curva de calibração em curgete, dado que estes pontos não se enquadram nos critérios de aceitabilidade definidos pelo guia.

De outro modo, no teste de *RIKILT* assume-se que existe linearidade à curva se os valores não diferirem mais de 10%, isto é, se se situarem entre 90% e 110% (sendo que a 100% existe linearidade perfeita) (Reis, 2015). Pelos resultados apresentados na **Tabela 4.7** verifica-se que todos os pontos de ambas as retas de calibração cumprem o critério de aceitação do teste de *RIKILT*. Assim, atendendo a que o teste de *RIKILT* é um teste mais poderoso do que a análise de resíduos, considerou-se as retas validadas por cumprirem a aceitabilidade no teste de *RIKILT*.

De forma a sintetizar os resultados obtidos, na **Tabela 4.8** apresenta-se um sumário dos resultados obtidos durante a validação da gama de trabalho e da linearidade das curvas de calibração em cada matriz. Em suma, no estudo da linearidade verificou-se que quer a matriz morango e quer a matriz curgete obedecem aos requisitos de linearidade. O método pode ser descrito por um modelo regressão linear, apresentando bons coeficientes de correlação para ambas as matrizes, 0,9995 e 0,9993 para o morango e curgete, respetivamente.

Tabela 4.8 - Sumário dos resultados obtidos na validação da gama de trabalho e da linearidade para as matrizes morango e curgete.

Matriz	Gama	R	m	b	Resíduos	<i>RIKILT</i>	VT
Morango	[0,00500;0,100]	0,9995	$4,23 \times 10^6$	$4,61 \times 10^3$	[-6,93;5,66]	[91,1;110]	-3,00
Curgete	[0,00500;0,100]	0,9993	$3,83 \times 10^6$	$7,44 \times 10^3$	[-17,0;4,20]	[92,8;107]	-3,00

Nota: R corresponde ao coeficiente de correlação; m corresponde ao declive da reta de calibração; b corresponde à ordenada na origem; F corresponde ao valor tabelado da distribuição de *Fisher-Snedecor* para um nível de confiança de 99% e N-3 graus de liberdade; e VT corresponde ao valor do teste de *Mandel*.

4.2.2 Especificidade e Seletividade

A seletividade é fundamental na análise de compostos em cromatografia uma vez que permite avaliar a capacidade do método de separar e identificar inequivocamente os compostos de interesse de outros compostos da matriz e/ou de possíveis interferentes (Peris-Vicente *et al.*, 2015).

Num primeiro momento, verificou-se a existência de seletividade pela confirmação da inexistência de interferentes na amostra em branco, isto é, uma amostra apenas com o solvente. Além disso, é também de referir que não se observaram distorções na linha de base perto do tempo de retenção do analito.

Para identificar a presença de glifosato foram utilizadas duas transições específicas, uma quantificadora, 168,0→63,0 e outra qualificadora, 168,0 → 81,0. Na **Figura 4.3** está exemplificado um cromatograma obtido na análise de glifosato numa amostra. A sobreposição dos

picos dos iões quantificador e qualificador permite garantir a especificidade do método sendo possível confirmar a legitimidade dos compostos que se está a quantificar.

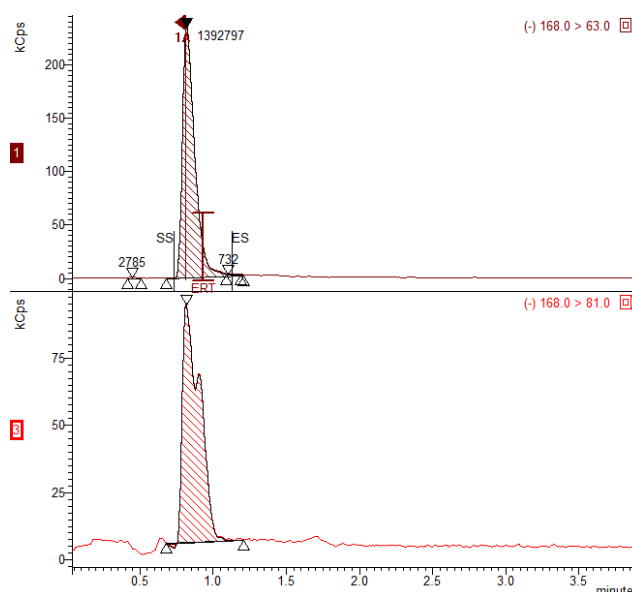


Figura 4.3 - Representação gráfica de um cromatograma obtido por análise do padrão de controlo 2 (PC2) do glifosato numa amostra. O cromatograma superior corresponde ao sinal do analito obtido segundo a transição de 168,0→63,0, ião quantificador. O cromatograma inferior corresponde ao cromatograma do ião qualificador com transição 168,0→81,0.

Foram ainda avaliados o tempo de retenção e a razão iónica para o glifosato em cada matriz, face aos tempos de retenção e razões iónicas médias dos padrões de calibração. Saliente-se que os tempos de retenção variam ligeiramente com o tipo de matriz pelo que devem ser elaboradas curvas de calibração para cada matriz.

De acordo com as recomendações do guia SANTE/12682/2019, o TR do analito pode variar com uma tolerância de 0,1 minutos relativamente ao valor de referência. Já para a razão iónica, o guia postula que os resultados só devem ser aceites se os valores estiverem compreendidos entre mais ou menos 30% o valor tomado como referência.

Como referência, consideram-se os valores médios do tempo de retenção e da razão iónica dos padrões de calibração, em cada matriz. Apesar de se verificarem algumas variações a nível de tempo de retenção em cada dia de análise, devido à deterioração do efeito do *priming* da coluna *Hypercarb*, todas as amostras cumpriram o critério de aceitação imposto pelo guia SANTE/12682/2019.

Relativamente à razão iónica, consideram-se aceitáveis para o morango, valores entre 44,4 e 82,4%, e valores entre 47,1 e 87,4% para a curgete. No **Apêndice C** podem ser consultados os valores da razão iónica para os padrões de calibração em cada matriz, assim como os resultados obtidos para cada amostra ao longo dos dias de análise.

Dado ao elevado volume de resultados, apresenta-se apenas, na **Tabela 4.9** os resultados relativamente à razão iónica média, para as matrizes morango e curgete ao longo dos dois dias de análise.

Tabela 4.9 - Razão iônica média ($\overline{RI}$), obtidos na análise de glifosato para as matrizes morango e curgete, ao longo dos dois dias de análise. Estão também apresentados o respetivo desvios-padrão (S_{RI}) e coeficiente de variação (CV_{RI}).

Matriz	$\overline{RI}$	S_{RI}	CV_{RI}
Morango	61,8	5,2	8,3
Curgete	68,4	6,5	9,6

De acordo com a **Tabela 4.9** pode-se afirmar que se respeitaram os critérios de tolerância estabelecidos, pelo que, inequivocamente a substância analisada era, efetivamente, o glifosato. É importante referir que o efeito matriz, assim como a concentração do analito na amostra influenciam fortemente a razão iônica, pelo que se podem observar variações (Marques, 2019).

4.2.3 Limiares Analíticos

Os limiares analíticos foram determinados a partir do declive da reta de calibração e do desvio padrão residual associado, conforme o explicado em 2.5.4, estando os resultados obtidos apresentados na **Tabela 4.10**.

Tabela 4.10 – Estudo dos limiares analíticos para as matrizes morango e curgete, e respetivas equações das retas de calibração. Estão apresentados os declives da reta de calibração e desvios-padrão residuais ($S_{y/x}$), assim como o limite de quantificação (LQ), em $\mu\text{g/mL}$, e o limite de deteção (LD), em $\mu\text{g/mL}$.

Matriz	Equação da Reta	Declive	$S_{y/x}$	LQ ($\mu\text{g/mL}$)	LD ($\mu\text{g/mL}$)
Morango	$y=4,23 \times 10^6 x + 4,61 \times 10^3$	$4,23 \times 10^6$	$5,95 \times 10^3$	0,0140	0,00463
Curgete	$y=3,83 \times 10^6 x + 7,44 \times 10^3$	$3,83 \times 10^6$	$6,20 \times 10^3$	0,0162	0,00535

Observando a **Tabela 4.10** tem-se que o limite de deteção teórico para as matrizes analisadas é de 0,00463 $\mu\text{g/mL}$ para o morango e de 0,00535 $\mu\text{g/mL}$ para a curgete, pelo que uma leitura inferior a este limite não permitirá afirmar ausência do analito, mas sim que existe 95% de probabilidade de concentração de glifosato ser menor àqueles valores. Relativamente ao limite de quantificação, obteve-se, um valor de 0,0140 $\mu\text{g/mL}$ para o morango e de 0,0162 $\mu\text{g/mL}$ para a curgete, sendo de notar que o LQ é superior ao padrão de menor concentração (0,00500 $\mu\text{g/mL}$) da gama de trabalho.

É de referir que, apesar de, por norma, o LQ ser calculado a partir do desvio padrão residual da reta e do seu declive, nem sempre se verifica que há correspondência com o primeiro ponto da gama de trabalho (Henriques, 2008). Contudo, a partir de ensaios de repetibilidade com amostras recuperadas é possível confirmar experimentalmente que o LQ cumpre sempre a condição de ser inferior ao primeiro ponto de calibração da gama de trabalho.

Com efeito, realizou-se uma confirmação experimental do LQ e LD com a avaliação da recuperação de amostras fortificadas ao nível do primeiro ponto da gama de trabalho. Atendendo às boas taxas de recuperação obtidas, considerou-se que o método desenvolvido tem um LQ de 0,00500 $\mu\text{g/mL}$ (0,0100 mg/kg) e que o LD do método é de 0,00165 $\mu\text{g/mL}$ (0,00330 mg/kg).

4.2.4 Precisão

A precisão do método foi avaliada em duas matrizes de frutos e vegetais, morango e curgete, em condições de repetibilidade e de precisão intermédia. Foi também estudada a precisão do equipamento em termos de repetibilidade.

4.2.4.1 Repetibilidade: do método e do equipamento

Para a determinação da repetibilidade foram efetuados ensaios de recuperação em quintuplicado, para cada nível de fortificação, isto é, 0,0100 mg/Kg e 0,0500 mg/kg de glifosato, para cada matriz.

Dado elevado volume de resultados, apresenta-se, na **Tabela 4.11**, um resumo dos resultados obtidos para a avaliação da repetibilidade do método em cada dia de análise, juntamente com os desvios-padrão de repetibilidade, limites de repetibilidade e coeficiente de variação de repetibilidade para as amostras de morango e curgete. No **Apêndice D**, podem ser consultados, com maior detalhe, os resultados de repetibilidade obtidos em cada dia de análise.

Tabela 4.11 – Resumo dos resultados obtidos para o estudo da repetibilidade do método, ao longo dos dois dias de análise, para as amostras morango e curgete, fortificadas com 0,00500 e 0,0250 µg/mL de glifosato. Apresenta-se também a concentração média obtida ($\bar{x}$), o desvio padrão de repetibilidade (S_r), limite de repetibilidade (r), a percentagem de repetibilidade ($\%r$) e o coeficiente de variação de repetibilidade (CV_r).

Matriz	Concentração (µg/mL)	$\bar{x}$	S_r	r	$\%r$	CV_r
Morango	0,00500	0,00400	0,00047	0,00134	33,5	11,7
		0,00505	0,00048	0,00137	27,1	9,50
	0,0250	0,0216	0,0013	0,00372	17,1	6,02
		0,0263	0,0031	0,00887	33,7	11,8
Curgete	0,00500	0,00411	0,00050	0,00143	34,8	12,2
		0,00450	0,00032	0,000915	20,3	7,11
	0,0250	0,0201	0,0012	0,00343	17,1	5,97
		0,0235	0,0022	0,00629	26,8	9,36

O guia SANTE/12682/2019 sugere que para que um método seja preciso, os resultados obtidos em condições de repetibilidade devem mostrar um coeficiente de variação da repetibilidade de inferior a 20%. Assim, observando a **Tabela 4.11**, podemos afirmar que se obtiveram resultados precisos, uma vez que os coeficientes de variação de repetibilidade são inferiores a 20%, permitindo o método obter resultados com uma precisão entre 7,11 e 12,2%, para o nível baixo de fortificação, e entre 5,97 e 11,8%, para o nível alto de fortificação.

Foi ainda determinada a repetibilidade do equipamento para ambas as matrizes, morango e curgete, com base na leitura de dez réplicas do ensaio para o padrão de calibração 1, 0,00500 µg/mL, e para o padrão de calibração 2, 0,100 µg/mL. Dado ao elevado volume de dados, na **Tabela 4.12** encontram-se um resumo dos resultados de repetibilidade obtidos para

as matrizes morango e curgete, juntamente com os desvios-padrão de repetibilidade, limites de repetibilidade e coeficiente de variação de repetibilidade. No **Apêndice E** é possível consultar, com maior pormenor, os resultados obtidos para a avaliação da repetibilidade do equipamento.

Tabela 4.12 - Resultados obtidos para o estudo da repetibilidade do equipamento para as matrizes morango e curgete, fortificadas com 0,00500 e 0,0100 µg/mL de glifosato. Apresenta-se também a concentração média obtida ($\bar{x}$), o desvio padrão de repetibilidade (S_r), limite de repetibilidade (r), a percentagem de repetibilidade (% r) e o coeficiente de variação de repetibilidade (CV_r).

Matriz	Concentração (µg/mL)	$\bar{x}$	S_r	r	% r	CV_r
Morango	0,00500	0,00452	0,00044	0,00126	27,9	9,73
	0,100	0,106	0,010	0,0286	27,0	9,43
Curgete	0,00500	0,00575	0,00030	0,000858	14,9	5,22
	0,100	0,109	0,010	0,0286	26,2	9,17

À semelhança do verificado anteriormente, observando a **Tabela 4.12**, podemos afirmar que a análise instrumental permite obter resultados precisos em todas as matrizes, uma vez que o coeficiente de variação de repetibilidade é inferior a 20%. Assim, o equipamento apresenta uma precisão de 5,22 a 9,73% para o nível baixo de fortificação, e de 9,17 a 9,43% para o nível mais alto de fortificação.

4.2.4.2 Precisão Intermédia

A precisão intermédia distingue-se da repetibilidade por avaliar a precisão dentro de um longo período de tempo e por variar as condições de análise (Kruve *et al.*, 2015b). No presente trabalho a condição que se variou foi o dia de análise, tendo-se mantido sempre o analista.

De forma a determinar a precisão intermédia foram realizados cinco ensaios de recuperação para cada nível de fortificação (0,0100 µg/mL e 0,0250 µg/mL) em dois dias diferentes, pelo que, ao todo foram realizados dez ensaios para cada nível de fortificação em cada matriz.

Devido ao elevado volume de resultados apresenta-se, na **Tabela 4.13**, de uma forma sumária, os resultados obtidos na determinação da precisão intermédia nas matrizes morango e curgete. No **Apêndice F**, poder-se-á consultar com maior detalhe, os dados utilizados para o cálculo deste parâmetro.

Tabela 4.13 - Resumo dos resultados obtidos para o estudo da precisão intermédia nas matrizes morango e curgete, fortificadas com 0,00500 e 0,0250 µg/mL de glifosato. Apresenta-se também a média ($\bar{x}$) das concentrações obtidas experimentalmente, o desvio-padrão (S_{PI}), a precisão intermédia (PI), a percentagem de precisão intermédia (%PI) e o coeficiente de variação da precisão intermédia (CV_{PI}).

Matriz	Concentração (µg/mL)	$\bar{x}$	S_{PI}	PI	%PI	CV_{PI}
Morango	0,00500	0,00452	0,00071	0,00203	44,9	15,7
	0,0250	0,0240	0,0033	0,00944	39,3	13,8
Curgete	0,00500	0,00431	0,00044	0,00126	29,2	10,2
	0,0250	0,0218	0,0024	0,00686	31,5	11,0

Para a precisão intermédia, o Guia SANTE/12682/2019 considera como critério de aceitação um coeficiente de variação inferior a 20%. Deste modo, pela **Tabela 4.13** verifica-se que, para ambas as matrizes, o critério de aceitação é cumprido, concluindo-se que, em condições de precisão intermédia, o método permite obter resultados aceitáveis, com uma precisão intermédia entre 10,2 e 15,7% para o nível baixo de fortificação e de 11,0 a 13,8% para o nível alto de fortificação.

4.2.5 Exatidão

Devido à inexistência de MRC, a exatidão do método foi avaliada segundo ensaios de recuperação com amostras fortificadas ao nível do LQ, 0,00500 µg/mL (0,0100 mg/kg), e a um nível cinco vezes superior ao do LQ, 0,0250 µg/mL (0,0500 mg/kg). Para aceitação dos resultados seguiu-se as recomendações do guia SANTE/12682/2019 aquando da implementação de um método, ou seja, consideram-se aceites os resultados com percentagens de recuperação entre 70 e 120%.

De forma a condensar o elevado número de resultados, na **Tabela 4.14** apresentam-se as taxas médias de recuperação obtidas para cada matriz. Para maior detalhe, podem ser consultadas, no **Apêndice G** as percentagem de recuperação obtidas para cada ensaio de recuperação nas matrizes validadas.

Tabela 4.14 – Concentração média obtida (µg/mL) e percentagem média de recuperação ($\bar{R}$) dos ensaios de fortificação com 0,00500 e 0,0250 µg/mL de glifosato, para as matrizes morango e curgete. Está também apresentando o desvio-padrão (S_R) e o coeficiente de variação (CV_R).

Matriz	Concentração Teórica (µg/mL)	% $\bar{R}$	S_R	CV_R
Morango	0,00500	93,1	13,7	14,7
	0,0250			
Curgete	0,00500	86,6	9,1	10,5
	0,0250			

Através da **Tabela 4.14**, observa-se que a percentagem de recuperação média para o morango e curgete foi de 93,1% e de 86,6%, respetivamente. Posto isto, e atendendo ao critério de aceitação imposto pelo guia SANTE/12682/2019, podemos afirmar que o método permite obter bons resultados de recuperação, sendo os valores aceitáveis. É também de

salientar que os coeficientes de variação dos resultados em ambas as matrizes são inferiores a 20%, mostrando existir baixa dispersão dos dados. Analisando os trabalhos de Anastassiades *et al.* (2020), Golge (2021) e Savini *et al.* (2019), que desenvolveram métodos para a análise de glifosato semelhantes à abordagem utilizada neste trabalho, podemos concluir que método permite obter taxas de recuperação dentro do reportado pela literatura.

4.2.6 Estimativa da Incerteza do Método

Para o método desenvolvido foram calculadas as incertezas associadas à precisão e à exatidão, e consequentemente a incerteza combinada e expandida. Estas incertezas foram calculadas conforme as **Equações 2.15, 2.16, 2.17 e 2.18**, descritas no capítulo 2.5.7. Considerou-se como critério de aceitação que a incerteza expandida deve ser inferior a 50%, conforme sugerido pelo guia SANTE/12682/2019.

Neste trabalho foi utilizada a abordagem (3) que consiste na combinação das incertezas associadas à precisão e exatidão do método.

Para a estimativa da incerteza associada ao método utilizou-se uma abordagem com base nos dados obtidos durante a validação, estando os componentes individuais de incerteza, assim como a incerteza combinada e expandida registados na **Tabela 4.15**. Note-se que a incerteza do método foi apenas determinada para o nível do LQ, considerando-se este como o pior cenário.

Tabela 4.15 - Componentes individuais das incertezas associadas à precisão, $u_{\text{precisão}}$, e exatidão, u_{ver} , do método analítico, obtidas pelos ensaios de recuperação nas matrizes em estudo, morango e curgete. Apresenta-se também a incerteza combinada, u_c , e a incerteza expandida, U .

Matriz	$u_{\text{precisão}}$	u_{ver}	u_c	U
Morango	11,5	4,49	12,4	24,6
Curgete	11,5	2,78	11,8	23,6

Com a análise da **Tabela 4.15** atenta-se que, em ambas as matrizes, a incerteza expandida cumpre o critério de aceitação imposto pelo guia, verificando-se que não existe uma grande variação da incerteza entre as diferentes matrizes. De uma forma geral, a incerteza do método varia entre 23,6 e 24,6%.

4.3 Aplicação à Análise de Rotina

Periodicamente, para o laboratório de Química da SGS Portugal alguns clientes enviam as suas amostras para a determinação de glifosato. Como já referido neste trabalho, as amostras recebidas são maioritariamente frutos e vegetais pelo que se tornou relevante a validação do método implementado para este tipo de matrizes, ou seja, com elevado teor de água. Pese embora a emergência do glifosato na atualidade e toda a controvérsia associada, verifica-se uma fraca requisição de análises para a sua quantificação, revelando que a sociedade ainda não está desperta e ciente desta problemática. Noutra perspetiva, a escassa análise também não permite aferir e prever a presença de glifosato nos alimentos disponíveis no mercado, nem avaliar se a legislação está a ser cumprida.

As matrizes de uva e milho fresco foram amostras enviadas por clientes para a determinação de glifosato no laboratório. As amostras foram analisadas pelo método implementado, servindo para verificar a sua aplicabilidade na análise de rotina. Na **Tabela 4.16** apresentam-se os teores de glifosato obtidos para as duas matrizes.

Tabela 4.16 - Concentração de glifosato em $\mu\text{g/mL}$ e mg/kg para as matrizes uvas e milho fresco, enviadas pelos clientes da SGS para análise de rotina.

Matriz	Concentração	
	$\mu\text{g/mL}$	mg/kg
Uvas	0,0104	0,0208
Milho fresco	<LQ	<LQ

Nota: LQ corresponde ao limite de quantificação, devendo-se ler "inferior ao limite de quantificação de quantificação" onde está "<LQ". A concentração do analito em mg/kg é obtida através da multiplicação da concentração em $\mu\text{g/mL}$ pelo fator do método, neste caso, 2.

Pela **Tabela 4.16** verifica-se que em nenhuma das matrizes avaliadas o teor de glifosato é superior ao LMR estabelecido quer pela Comissão Europeia, quer pela Legislação Portuguesa. Aliás, é de salientar que o teor de glifosato no milho foi inferior ao LQ do método.

Apesar de a aplicação de glifosato ainda ser permitida em Portugal de acordo com um conjunto de boas práticas, os resultados obtidos para as duas amostras revelam que os limites legais estão a ser cumpridos, pelo menos por estes dois clientes.

É de referir que, segundo a literatura científica, de um modo geral o glifosato encontra-se presente a níveis significativamente inferiores ao LMR, tal como verificado pela avaliação dos resíduos de glifosato em alimentos no mercado suíço por Zoller *et al.* (2018).

Contudo, não deixa de ser importante a monitorização constante da presença do glifosato nos produtos alimentares disponíveis no mercado, uma vez que a sua presença nestes produtos sugere inequivocamente exposição alimentar (Agostini *et al.*, 2018). De facto, como já referido na introdução, vários estudos revelam que os níveis do pesticida na urina são inferiores aos valores do ADI e AOEL (Bai & Ogbourne, 2016; Faniband *et al.*, 2021; Nova *et al.*,

2020). Ainda assim, como mencionado por Nova *et al.* (2020), os teores de glifosato observados não deixam de ser preocupantes visto que o conhecimento dos efeitos de uma exposição a níveis baixos a longo prazo ainda é escasso.

Em rotina, a avaliação da performance do método é realizada através de um controlo de qualidade das amostras por elaboração de um ensaio de fortificação ao nível do LQ (0,00500 µg/mL) e de padrões de calibração correspondentes ao primeiro e último ponto da reta de calibração (0,00500 µg/mL e 0,100 µg/mL).

Na **Tabela 4.17** apresenta-se as taxas de recuperação obtidas para cada matriz, segundo um ensaio de recuperação a um nível de fortificação de 0,00500 µg/mL. É de salientar que, segundo o guia SANTE 12681/2019, em análises individuais de rotina, podem-se considerar aceitáveis recuperações num intervalo de 60-140%.

Tabela 4.17 - Concentração obtida (µg/mL) e percentagem de recuperação (%R) do ensaio de fortificação com 0,00500 µg/mL de glifosato, para as matrizes uvas e milho fresco. Está também apresentando concentração na amostra nativa (µg/mL).

Matriz	Concentração Teórica (µg/mL)	Concentração Obtida (µg/mL)	Concentração na amostra (µg/mL)	% R
Uvas	0,00500	0,0129	0,0104	50,0
Milho fresco	0,00500	0,00577	0,000	115

De acordo com a **Tabela 4.17**, conclui-se que em rotina o método desenvolvido tem uma boa aplicabilidade, permitindo obter resultados dentro dos critérios de aceitação estabelecidos pelo guia SANTE/12682/2019. É de salientar, no entanto que no caso das uvas a taxa de recuperação foi inferior aos limites de aceitabilidade, devendo-se isto ao facto de a amostra nativa estar positiva, isto é, já apresentar uma quantidade de glifosato. Idealmente, quando uma amostra está positiva a análise deve ser repetida e dever-se-á realizar um ensaio de recuperação a um nível de fortificação superior (Marques, 2019). Não obstante, este valor foi aceite, tendo-se corrigido a concentração na amostra de acordo com a taxa de recuperação, ou seja, para uma recuperação de 100% a concentração da amostra seria de 0,0208 µg/mL.

Em suma, o método desenvolvido é aplicável à análise de rotina, permitindo quantificar eficazmente a presença de glifosato nas amostras enviadas pelos clientes da SGS. Apesar de se verificar que as amostras que chegam à SGS com pedidos para análise de glifosato, se encontrarem dentro da legalidade, é importante frisar mais uma vez que o escasso número de análises pedidas é ilustrativo da inconsciência para este pesticida e reforça a necessidade de existir um controlo mais atento e reforçado.

4.4 Perspetivas Futuras

Este capítulo visa apresentar algumas sugestões de melhoria para futura implementação de outras análises com base no método desenvolvido.

Como referido na introdução, após a absorção o glifosato é transportado ao longo da planta e lançado para a rizosfera onde, em contacto com o solo e os seus microrganismos sofre degradação formando-se o AMPA. Este metabolito, formado em menor escala, apresenta também alguma fitotoxicidade para as plantas, embora numa magnitude menor do que o glifosato (Reddy *et al.*, 2008). Naturalmente, para avaliar a exposição ao glifosato, é realizada a análise conjunta de glifosato e de AMPA (Jensen *et al.*, 2016). Além disso, como referido por Nørskov *et al.* (2019), dada a definição de resíduos e de resíduos para avaliação de riscos pela EFSA, é importante ter presente que o glifosato deve ser expresso como a soma dos seus metabolitos. Efetivamente, a generalidade dos artigos consultados durante a realização deste trabalho com abordagens para a determinação de glifosato, visam não só a implementação de um método para o glifosato como também para o AMPA (Anastassiades *et al.*, 2020; Bernal *et al.*, 2012; Cesar *et al.*, 2018; Chamkasem & Harmon, 2016; Chiarello *et al.*, 2019; Ciasca *et al.*, 2020; Golge, 2021; Granby *et al.*, 2003; Herrera López *et al.*, 2019; Hsiao *et al.*, 2018; Jensen *et al.*, 2016; Kaczyński, 2017; Melton *et al.*, 2019; Nørskov *et al.*, 2019; Rigobello-Masini *et al.*, 2019; Savini *et al.*, 2019; Tolstikov & Fiehn, 2002; Wirth *et al.*, 2021; Zoller *et al.*, 2018; Zouaoui *et al.*, 2013).

Posto isto, apesar do método desenvolvido não contemplar a determinação do metabolito de degradação do glifosato, considera-se importante que futuramente a metodologia seja adaptada de forma a permitir a quantificação conjunta de glifosato e AMPA. Esta adaptação permitirá obter um maior conhecimento sobre a contaminação das amostras e, em último caso, fornecer dados mais concisos sobre a presença de glifosato.

Idealmente, a exatidão do método é determinada através de MRC, visto que reproduzem melhor as condições nativas do analito nas amostras. Consequentemente, a exatidão determinada por este método confere resultados mais fiáveis. Dada a indisponibilidade destes materiais no laboratório, a exatidão foi determinada com recurso alternativo a ensaios de recuperação. Deste modo, entende-se como importante a realização de uma nova determinação da exatidão segundo a utilização de MRC. Malgrado o elevado preço destes materiais, a determinação deste parâmetro de acordo com a abordagem proposta acarretará para o laboratório SGS Portugal maior credibilidade e, por conseguinte, prestígio, na apresentação de resultados aos seus clientes contrabalançando o investimento inicial.

CONCLUSÃO

Dada à disparidade nas conclusões dos estudos científicos, bem como à escassez de investigação com foco na exposição real aos herbicidas derivados de glifosato e aos efeitos desta exposição a longo prazo, a toxicidade do glifosato é um tema controverso. Claramente, torna-se categórico o desenvolvimento de métodos analíticos que permitam obter resultados consistentes, fiáveis e precisos, de forma a possibilitar que os laboratórios disponham de meios e critérios para tomar de decisões adequadas às exigências estabelecidas, salvaguardando a saúde dos consumidores. Assim, foi desenvolvido um método para a análise de glifosato por UHPLC-ESI-MS/MS, em frutos e vegetais, com base na otimização do método QuPPE, utilizado pela SGS Portugal para a determinação do pesticida em estudo em matrizes alimentares.

Na otimização do método de extração, concluiu-se que, apesar dos fortes efeitos matriz verificados, a limpeza dos extratos com os sorbentes PSA+C18 e PSA+GCB leva a perda de analito. Alternativamente, foram testadas diluições segundo um fator de 10 e de 20, para minimizar o efeito matriz. Efetivamente, a diluição mostrou-se eficaz para o melhoramento da visualização dos picos cromatográficos, tendo sido usada a diluição de fator 10 para a implementação do método.

Como esperado, a coluna *Hypercarb* mostrou-se eficaz na separação do glifosato, dadas as características únicas das partículas de CGP que a constituem. Relativamente a esta, a realização de um *priming* com um extrato de espinafres revelou ser impactante para a diminuição do tempo de retenção e no melhoramento da forma dos picos cromatográficos.

O método foi validado para frutos e vegetais, com duas matrizes representativas do tipo de amostras enviadas pelos clientes da SGS. O método implementado abrange uma gama de trabalho de 0,00500 a 0,100 µg/mL, apresentando linearidade, com coeficientes de correlação entre 0,9995 e 0,9993, para o morango e curgete, respetivamente, permitindo quantificar a presença de glifosato a 0,0100 mg/kg. A precisão foi avaliada em condições de repetibilidade e de precisão intermédia, tendo o método cumprido os critérios de aceitação impostos visto que os coeficientes de variação obtidos foram inferiores a 20%. Além do mais, o método

permitiu obter taxas de recuperação, entre 86,6 e 93,1%, correspondendo aos critérios de aceitação estabelecidos. A estimativa da incerteza associada ao método permitiu concluir que o método tem uma incerteza expandida inferior a 50%. Em suma, o método desenvolvido foi validado em todos os parâmetros estudados, evidenciando uma performance que satisfaz todos os requisitos estabelecidos, pelo que se conclui que esta metodologia permite obter resultados confiáveis, exatos e precisos e que, pela análise de amostras de rotina o método é aplicável à rotina.

Por último, reitera-se a importância de futuramente avaliar a exatidão com materiais de referência e de adaptar o método à determinação de AMPA. Considera-se que estas propostas não só são importantes para a aquisição de maior conhecimento quanto à presença de glifosato, mas também por contribuírem para o prestígio e credibilidade associadas à SGS Portugal.

BIBLIOGRAFIA

- Agilent Technologies. (2016). *The LC Handbook: Guide to LC Columns and Method Development*. Agilent Technologies. <https://www.agilent.com/cs/library/primers/public/LC-Handbook-Complete-2.pdf>
- Agostini, L. P., Dettogni, R. S., Reis, R. S., Stur, E., Santos, E. V. W., Ventorim, D. P., Garcia, F. M., Cardoso, R. C., Graceli, J. B., & Louro, I. D. (2020). Effects of glyphosate exposure on human health: Insights from epidemiological and in vitro studies. *Science of The Total Environment*, 705, pp. 1–16.
- Ali, J., Linke, S., & Pereira, L. (2013). Robust Separation of Polar Compounds Utilising Porous Graphitic Carbon (PGC). *Chromatography Today*, pp. 17–21. https://www.chromatographytoday.com/article/electrophoretic-separations/35/jamil_ali1_simon_linke2_luisa_pereira3/robust_separation_of_polar_compounds_utilising_porous_graphitic_carbon_pgc/1432
- American Council on Science and Health. (2018). *IARC: Chris Portier Denies Being Paid By EDF Is A Conflict Of Interest For IARC Members*. Acedido 14 de Maio de 2021, de <https://www.acsh.org/news/2018/07/12/iarc-chris-portier-denies-being-paid-edf-conflict-interest-iarc-members-13061>
- Anastassiades, M., Kolberg, D. I., Eichhorn, E., Wachtler, A. K., Benkenstein, A., Zechmann, S., Mack, D., Wildgrube, C., Barth, A., Sigalov, I., Görlich, S., Dörk, D., & Cerchia, G. (2020). Quick Method for the Analysis of Numerous Highly Polar Pesticides in Food Involving Extraction with Acidified Methanol and LC-MS/MS Measurement. Version 11. *EURL-SRM*.
- ASAE. (2020, junho). *Estratégia "Farm to Fork" (Do Prado ao Prato) para um sistema alimentar justo, saudável e ecológico*. ASAEnews N.º 120. Acedido 5 de Abril de 2021, de <https://www.asae.gov.pt/newsletter2/asaenews-n-120-junho-2029/estrategia-farm-to-fork-do-prado-ao-prato-para-um-sistema-alimentar-justo-saudavel-e-ecologico.aspx>
- Attallah, E. R., Soliman, M., & Abo-Aly, M. M. (2017). Determination of diquat residues in potato

- using reversed-phase liquid chromatography with *tandem* mass spectrometry. *Journal of AOAC International*, 100 (3), pp. 789–795.
- Baer, K. N., & Marcel, B. J. (2014). Glyphosate. In: P. Wexler (Ed.), *Encyclopedia of Toxicology, Third Edition* (pp. 767–769). Academic Press, London, UK.
- Bai, S. H., & Ogbourne, S. M. (2016). Glyphosate: environmental contamination, toxicity and potential risks to human health via food contamination. *Environmental Science and Pollution Research*, 23(19), pp. 18988–19001.
- Beckie, H. J., Flower, K. C., & Ashworth, M. B. (2020). Farming without Glyphosate? *Plants*, 9(1): 96.
- Benbrook, C. M. (2016). Trends in glyphosate herbicide use in the United States and globally. *Environmental Sciences Europe*, 28(1): 3.
- Benbrook, C. M. (2019). How did the US EPA and IARC reach diametrically opposed conclusions on the genotoxicity of glyphosate-based herbicides? *Environmental Sciences Europe*, 31: 2.
- Bernal, J., Martin, M. T., Soto, M. E., Nozal, M. J., Marotti, I., Dinelli, G., & Bernal, J. L. (2012). Development and Application of a Liquid Chromatography–Mass Spectrometry Method To Evaluate the Glyphosate and Aminomethylphosphonic Acid Dissipation in Maize Plants after Foliar Treatment. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60 (16), pp. 4017–4025.
- Blake, R., & Pallett, K. (2018). The Environmental Fate and Ecotoxicity of Glyphosate. *Outlooks on Pest Management*, 29(6), pp. 266–269.
- Brewster, D. W., Warren, J., & Hopkjns, W. E. (1991). Metabolism of glyphosate in sprague-dawley rats: Tissue distribution, identification, and quantitation of glyphosate-derived materials following a single oral dose. *Toxicological Sciences*, 17(1), pp. 43–51.
- Bruggen, A. H. C., He, M. M., Shin, K., Mai, V., Jeong, K. C., Finckh, M. R., & Morris, J. G. (2018). Environmental and health effects of the herbicide glyphosate. *Science of The Total Environment*, 616–617, pp. 255–268.
- Buszewski, B., & Noga, S. (2012). Hydrophilic interaction liquid chromatography (HILIC)—a powerful separation technique. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 402(1), pp. 231–247.
- Cabrera, L. D. C., Caldas, S. S., Prestes, O. D., Primel, E. G., & Zanella, R. (2016). 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*, 39(10), pp. 1945–1954.
- Campaña, H., Pawluk, M. S., López Camelo, J. S., Carvallo, I. G., Minoli, B., Fuentes, M. L., Rittler,

- M., Rottenberg, D., Petracchi, F., Cosentino, V. R., Bosano, B., Aiello, H., Di Giano, L. I., Jewtuszyk, M. A., Lapunzina, P., Quiroga, J. A., Bisbal, M., Iraira, C., Lerner, M., Aguilar, P. G., Roubicek, M., Rivelis, C., Mussi, M. N., Schneider, C., Garbaccio, E., Ermini, M., Uranga, A., Medina, A., Deguer, C., Passarini, R., Crispino, P. M., Mores, F. J., Carciochi, M. L., Argüello, C. D., Cárpene, L., Izquierdo, M., Chirino Misisian, A.P., Echegaray, M. A., Pizarro, C. B., Ponce, F., Negri, C. J., Marsano, M., De Rosas, C., Menzio, M., Diorio, L., Cardetti, M., Sirabo, F., Ibáñez, O. J., Picón, C., Mayer, M. C., Saleme, C. M., Quinteros, C. R., Carrizo, S., Moreno, E., Hernández, E., Lombardelli, R., Mereb, J.C., Pedrozo, B. G., Raineri, A., Prefumo, L. D., Coria, R., Salmoni, M., Andrade, S., Doderio, N. R. (2010). Births prevalence of 27 selected congenital anomalies in 7 geographic regions of Argentina. *Archivos argentinos de pediatría*, 108(5), pp. 409–417.
- Capstaff, N. M., & Miller, A. J. (2018). Improving the Yield and Nutritional Quality of Forage Crops. *Frontiers in Plant Science*, 9, 535.
- Cassidy, E. S., West, P. C., Gerber, J. S., & Foley, J. A. (2013). Redefining agricultural yields: From tonnes to people nourished per hectare. *Environmental Research Letters*, 8 (3): 034015.
- CE. (2020). *Farm to Fork Strategy*. Food Safety. Acedido 5 de Abril de 2021, de https://ec.europa.eu/food/horizontal-topics/farm-fork-strategy_en
- Cesar, P., Rosa, R., Melo, K. G., De Nucci, G., Trape, A. Z., Jacobucci, S. R. F., Garlipp, C. R., & Rosa, P. C. P. (2018). Brief review analytical methods for the determination of glyphosate. *MOJ Toxicology*, 4(1), pp. 39–42.
- Chamkasem, N. (2017). Determination of Glyphosate, Maleic Hydrazide, Fosetyl Aluminum, and Ethephon in Grapes by Liquid Chromatography/ Tandem Mass Spectrometry. *Journal of agricultural and food chemistry*, 65(34), pp. 7535–7541.
- Chamkasem, N., & Harmon, T. (2016). Direct determination of glyphosate, glufosinate, and AMPA in soybean and corn by liquid chromatography/ tandem mass spectrometry. *Analytical and bioanalytical chemistry*, 408(18), 4995–5004.
- Chang, C.-B., & Chang, C.-C. (2009). Refractory cardiopulmonary failure after glyphosate surfactant intoxication: a case report. *Journal of Occupational Medicine and Toxicology*, 4, 2.
- Chawla, P., Kaushik, R., Shiva Swaraj, V. J., & Kumar, N. (2018). Organophosphorus pesticides residues in food and their colorimetric detection. *Environmental Nanotechnology, Monitoring & Management*, 10, pp. 292–307.
- Chiarello, M., Jiménez-Medina, M. L., Marín Saéz, J., Moura, S., Garrido Frenich, A., & Romero-González, R. (2019). 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 & Contaminants: Part A*, 36(9), pp. 1376–1384.

- Ciasca, B., Pecorelli, I., Lepore, L., Paoloni, A., Catucci, L., Pascale, M., & Lattanzio, V. M. T. (2020). Rapid and reliable detection of glyphosate in pome fruits, berries, pulses and cereals by flow injection – Mass spectrometry. *Food Chemistry*, 310: 125813.
- Comissão (2002). Decisão da Comissão 2002/657/CE de 12 de Agosto de 2002. Execução do disposto na Diretiva 96/23/CE do Conselho relativa ao desempenho de métodos analíticos e à interpretação dos resultados. *Jornal Oficial das Comunidades Europeias N.º L221*, pp. 8–36.
- Cordeiro, T. (2011). Alimentação Adequada: Faça mais pela sua saúde! Em A. Bento (Ed.), *Associação Portuguesa dos Nutricionistas*. Associação Portuguesa dos Nutricionistas. Acedido 3 de Abril de 2021, de <https://www.apn.org.pt/documentos/ebooks/AlimentacaoAdequada.pdf>
- CVUA Stuttgart. (2011). *QuEChERS*. Acedido 16 de Junho de 2021, de <https://www.quechers.eu/index.htm>
- Declaração de Retificação N.º 8/2007. (2007). Retificação do Decreto-Lei N.º 233/2006. *Diário da República N.º 16/2007, Série I de 23 de janeiro de 2007*, pp. 604–605.
- Decreto-Lei N.º 101/2009. (2009). Regula o uso não profissional de produtos fitofarmacêuticos em ambiente doméstico. *Diário da República N.º 90/2009, Série I de 11 de maio de 2009*, p. 4.
- Decreto-Lei N.º 233/2006. (2006). Novos limites máximos de resíduos de substâncias ativas de produtos fitofarmacêuticos permitidos nos produtos agrícolas de origem vegetal. *Diário da República N.º 230/2006, Série I de 29 de novembro de 2006*, pp. 8129–8163.
- Decreto Legislativo Regional N.º 28/2020/A. (2020). Interdita o uso no espaço público de herbicidas cuja substância ativa seja o glifosato. *Diário da República N.º 203/2020, Série I de 19 de outubro de 2020*, p. 3.
- Decreto Regulamentar Regional N.º 5/2021/A. (2021). Regulamentação do Decreto Legislativo Regional N.º 28/2020/A. *Diário da República N.º 80/2021, Série I de 26 de abril de 2021*, pp. 16–17.
- Delatour, T., Racault, L., Bessaire, T., & Desmarchelier, A. (2018). Screening of veterinary drug residues in food by LC-MS/MS. Background and challenges. *Food additives & contaminants. Part A, Chemistry, analysis, control, exposure & risk assessment*, 35(4), pp. 632–645.
- Dill, G. M., Sammons, D., Feng, P. C. C., Kohn, F., Kretzmer, K., Mehrsheikh, A., Bleeke, M., Honegger, J. L., Farmer, D., Wright, D., & Haupfear, E. A. (2010). Glyphosate: discovery, development, applications, and properties. In: V. K. Nandula (Ed.), *Glyphosate Resistance in Crops and Weeds* (pp. 1–33). John Wiley & Sons, Inc, Hoboken, EUA.
- Diretiva 2009/128/CE. (2009). Estabelecimento de um quadro de ação a nível comunitário para

- uma utilização sustentável dos pesticidas. *Jornal Oficial da União Europeia* N.º L 309, pp. 1-16.
- Dong, M. W. (2019). *HPLC and UHPLC for Practicing Scientists, Second Edition*. John Wiley & Sons, Inc, Hoboken, EUA, pp. 1-394.
- Duarte, R. P. (2019). *Otimização e validação de um método SPE-HPLC-DAD para quantificação do glifosato em águas superficiais. Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em Química Bioorgânica*. FCT/UNL, Caparica, Portugal, pp. 18-22.
- Duke. (2018). The history and current status of glyphosate. *Pest Management Science*, 74(5), pp. 1027–1034.
- Duke. (2020). Glyphosate: environmental fate and impact. *Weed Science*, 68(3), pp. 201–207.
- Duke, & Dayan, F. E. (2011). Plant Systems|Bioactivity of Herbicides. Em M. Moo-Young (Ed.), *Comprehensive Biotechnology, Second Edition* (pp. 23–35). Academic Press, Oxford, UK.
- Duke, S. O., & Powles, S. B. (2008). Glyphosate: a once-in-a-century herbicide. *Pest Management Science*, 64(4), pp. 319–325
- EFSA. (2015). Conclusion on the peer review of the pesticide risk assessment of the active substance glyphosate. *EFSA Journal*, 13(11):4302.
- EFSA. (2016). The 2014 European Union Report on Pesticide Residues in Food. *EFSA Journal*, 14(10):4611.
- EFSA. (2021). *Glyphosate: EU regulators begin review of renewal assessments*. Acedido 13 de Julho de 2021, de <https://www.efsa.europa.eu/en/news/glyphosate-eu-regulators-begin-review-renewal-assessments>
- Eker, S., Ozturk, L., Yazici, A., Erenoglu, B., Romheld, V., & Cakmak, I. (2006). Foliar-applied glyphosate substantially reduced uptake and transport of iron and manganese in sunflower (*Helianthus annuus* L.) plants. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(26), pp. 10019–10025.
- Ellison, S. L. R., & Williams, A. (2012). Eurachem/CITAC Guide Quantifying Uncertainty in Analytical Measurement. In: Ellison, S. L. R., & Williams, A. (Eds.), *Third Edition*. (pp. 1 – 141). <https://www.eurachem.org>
- EMA. (2015). VICH topic GL49: Studies to evaluate the metabolism and residues kinetics of veterinary drugs in human food-producing animals: validation of analytical methods used in residue depletion studies - Revision at step 9 – for implementation. EMA/CVMP/VICH/463202/2009, pp. 1–21. <https://www.ema.europa.eu/en/vich-gl49-studies-evaluate-metabolism-residue-kinetics-veterinary-drugs-food-producing-animals>
- EPA. (2016). *Glyphosate Issue Paper: Evaluation of Carcinogenic Potential EPA's Office of*

- Pesticide Programs*. Acedido 12 de Maio de 2021, de https://www.epa.gov/sites/production/files/2016-09/documents/glyphosate_issue_paper_evaluation_of_carcinogenic_potential.pdf
- Fagan, J., Bohlen, L., Patton, S., & Klein, K. (2020). Organic diet intervention significantly reduces urinary glyphosate levels in U.S. children and adults. *Environmental Research*, 189: 109898.
- Faniband, M. H., Norén, E., Littorin, M., & Lindh, C. H. (2021). Human experimental exposure to glyphosate and biomonitoring of young Swedish adults. *International Journal of Hygiene and Environmental Health*, 231: 113657.
- FAO. (2016). Pesticides Residues in Food 2016 - Joint FAO/WHO Meeting on Pesticide Residues. *FAO Plant Production and Protection Paper*, 227. Acedido 13 de Julho de 2021, de www.fao.org/publications
- FAO. (2021). *FAOSTAT*. New Food Balances. Acedido 4 de Abril de 2021, de <http://www.fao.org/faostat/en/#data/FBS>
- Fedtke, C., & Duke, S. O. (2004). Herbicides. In: B. Hock & E. F. Elstner (Eds.), *Plant Toxicology, Fourth Edition* (pp. 261–344). Marcel Dekker, Nova Iorque, EUA.
- Fenner, M. (1985). Regeneration and diversity. Em M. Fenner (Ed.), *Seed Ecology* (pp. 117–131). Chapman and Hall, Ltd, Londres, UK.
- Foley, J. A., Ramankutty, N., Brauman, K. A., Cassidy, E. S., Gerber, J. S., Johnston, M., Mueller, N. D., O'Connell, C., Ray, D. K., West, P. C., Balzer, C., Bennett, E. M., Carpenter, S. R., Hill, J., Monfreda, C., Polasky, S., Rockström, J., Sheehan, J., Sibiart, S., Tilman, D., Zaks, D. P. M. (2011). Solutions for a cultivated planet. *Nature*, 478(7369), pp. 337–342.
- Franz, J. E. (1971). *N-phosphonomethyl-glycine phytotoxicant composition* (Patent N.º 3799758). <https://patents.google.com/patent/US3799758A/en?q=Patente+EUA+Nr.+3799758>
- Gani, A., SM, W., & FA, M. (2012). Whole-Grain Cereal Bioactive Compounds and Their Health Benefits: A Review. *Journal of Food Processing & Technology*, 3(3): 146.
- Gerbens-Leenes, P. W., & Nonhebel, S. (2002). Consumption patterns and their effects on land required for food. *Ecological Economics*, 42(1-2), pp. 185–199.
- Golge, O. (2021). Validation of Quick Polar Pesticides (QuPPE) Method for Determination of Eight Polar Pesticides in Cherries by LC-MS/MS. *Food Analytical Methods*, 14(7), pp. 185–199.
- Gomes, M. P., Smedbol, E., Chalifour, A., Hénault-Ethier, L., Labrecque, M., Lepage, L., Lucotte, M., & Juneau, P. (2014). Alteration of plant physiology by glyphosate and its by-product aminomethylphosphonic acid: an overview. *Journal of Experimental Botany*, 65(17), pp.

4691–4703.

- Gomiero, T. (2018). Food quality assessment in organic vs. conventional agricultural produce: Findings and issues. *Applied Soil Ecology*, 123, pp. 714–728.
- Goulson, D. (2020). Pesticides, Corporate Irresponsibility, and the Fate of Our Planet. *One Earth*, 2(4), pp. 302–305.
- Granby, K., Johannesen, S., & Vahl, M. (2003). Analysis of glyphosate residues in cereals using liquid chromatography-mass spectrometry (LC-MS/MS). *Food Additives and Contaminants*, 20(8), pp. 692–698.
- Guia RELACRE 13. (2000). *Validação de Métodos Internos de Ensaio em Análise Química*. 1-60. https://www.relacre.pt/assets/relacreassets/files/commissionsandpublications/Guia_RELACRE_13.pdf
- Guia RELACRE 31. (2018). Quantificação da Incerteza de Medição em Ensaio Químicos e Físico-Químicos. pp. 1–43. https://www.relacre.pt/assets/relacreassets/files/commission-sandpublications/GuiaRELACRE_31_Publicacao_oficial.pdf
- Guo, H., Wang, H., Zheng, J., Liu, W., Zhong, J., & Zhao, Q. (2018). Sensitive and rapid determination of glyphosate, glufosinate, bialaphos and metabolites by UPLC-MS/MS using a modified Quick Polar Pesticides Extraction method. *Forensic science international*, 283, pp. 111–117.
- Guyton, K. Z., Loomis, D., Grosse, Y., El Ghissassi, F., Benbrahim-Tallaa, L., Guha, N., Scoccianti, C., Mattock, H., & Straif, K. (2015). Carcinogenicity of tetrachlorvinphos, parathion, malathion, diazinon, and glyphosate. *The Lancet Oncology*, 16(5), pp. 490–491.
- Han, Y., Song, L., Zhao, P., Li, Y., Zou, N., Qin, Y., Li, X., & Pan, C. (2016). 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*, 197, Part A, pp. 730–736.
- Harris, D. C. (2010). *Quantitative Chemical Analysis, Eighth Edition*. W. H. Freeman and Company, New York, EUA, pp. 1-892.
- Helander, M., Pauna, A., Saikkonen, K., & Saloniemi, I. (2019). Glyphosate residues in soil affect crop plant germination and growth. *Scientific Reports*, 9, 19653.
- Helander, M., Saloniemi, I., & Saikkonen, K. (2012). Glyphosate in northern ecosystems. *Trends in Plant Science*, 17(10), pp. 569–574.
- Henriques, M. L. G. S. (2008). *Hormonas naturais e de síntese, bisfenol A, octilfenol e nonilfenol em águas para consumo humano: otimização do método de análise por SPE-LC-ESI-MS/MS. Dissertação de para obtenção do Grau de Mestre em Controlo da Qualidade e Toxicologia dos Alimentos*. FFUL, Lisboa, Portugal, pp. 103-136.

- Hsiao, J. J., Potter, O. G., Chu, T.-W., & Yin, H. (2018). Improved LC/MS Methods for the Analysis of Metal-Sensitive Analytes Using Medronic Acid as a Mobile Phase Additive. *Analytical chemistry*, 90(15), pp. 9457–9464.
- Hu, J., Lesseur, C., Miao, Y., Manservigi, F., Panzacchi, S., Mandrioli, D., Belpoggi, F., Chen, J., & Petrick, L. (2021). Low-dose exposure of glyphosate-based herbicides disrupt the urine metabolome and its interaction with gut microbiota. *Scientific Reports*, 11: 3265.
- Huhn, C. (2018). More and enhanced glyphosate analysis is needed. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 410, pp. 3041–3045.
- IARC. (2017). Glyphosate. Em *IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans - volume 112: some organophosphate insecticides and herbicides* (pp. 321–412). Acedido 9 de abril de 2021, de <https://publications.iarc.fr/Book-And-Report-Series/Iarc-Monographs-On-The-Identification-Of-Carcinogenic-Hazards-To-Humans/Some-Organophosphate-Insecticides-And-Herbicides-2017>
- IAS. (2015). Guidelines for Food Testing Laboratories. *International Accreditation Service*, pp. 1–36.
- IPAC. (2007). *Guia para a Quantificação de Incerteza em Ensaios Químicos (OGC007)*, pp. 1-19
- IPAC. (2011). *Guia para a Acreditação de Laboratórios Químicos (OGC002)*, pp. 1-12
- Islas, G., Ibarra, I. S., Hernandez, P., Miranda, J. M., & Cepeda, A. (2017). Dispersive Solid Phase Extraction for the Analysis of Veterinary Drugs Applied to Food Samples: A Review. *International Journal of Analytical Chemistry*, 2017: 8215271, pp. 1–16. <https://doi.org/10.1155/2017/8215271>
- ISO 8466-1. (1990). *Water quality - Calibration and evaluation of the analytical methods and estimation of performance characteristics. Part 1: Statistical evaluation of the linear function*. pp. 1–12.
- IUPAC (Ed.). (1997). Detection and quantification capabilities Among the most important Performance Characteristics of the Chemical Measurement Process (CMP) are those that can serve as measures of the underlying. In: *Compendium on Analytical Nomenclature, Definitive Rules, Third Edition*. Blackwell Science, UK.
- Jensen, P. K., Wujcik, C. E., McGuire, M. K., & McGuire, M. A. (2016). Validation of reliable and selective methods for direct determination of glyphosate and aminomethylphosphonic acid in milk and urine using LC-MS/MS. *Journal of Environmental Science and Health, Part B*, 51(4), pp. 254–259.
- Kaczyński, P. (2017). Clean-up and matrix effect in LC-MS/MS analysis of food of plant origin for high polar herbicides. *Food Chemistry*, 230, pp. 524–531.
- Kaczyński, P., & Łozowicka, B. (2017). One-Step QuEChERS-Based Approach to Extraction and

- Cleanup in Multiresidue Analysis of Sulfonylurea Herbicides in Cereals by Liquid Chromatography–Tandem Mass Spectrometry. *Food Analytical Methods*, 10, pp. 147–160.
- Kearney, J. (2010). Food consumption trends and drivers. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 365(1554), pp. 2793–2807.
- Krueve, A., Rebane, R., Kipper, K., Oldekop, M.-L., Evard, H., Herodes, K., Ravio, P., & Leito, I. (2015a). Tutorial review on validation of liquid chromatography–mass spectrometry methods: Part I. *Analytica Chimica Acta*, 870, pp. 29–44.
- Krueve, A., Rebane, R., Kipper, K., Oldekop, M.-L., Evard, H., Herodes, K., Ravio, P., & Leito, I. (2015b). Tutorial review on validation of liquid chromatography–mass spectrometry methods: Part II. *Analytica Chimica Acta*, 870, pp. 8–28.
- Kudsk, P., & Mathiassen, S. K. (2020). Pesticide regulation in the European Union and the glyphosate controversy. *Weed Science*, 68(3), pp. 214–222.
- Landrigan, P. J., & Belpoggi, F. (2018). The need for independent research on the health effects of glyphosate-based herbicides. *Environmental Health*, 17(1): 51.
- Lei N.º 26/2013. (2013). Regula as atividades de distribuição, venda e aplicação de produtos fitofarmacêuticos para uso profissional e de adjuvantes de produtos fitofarmacêuticos. *Diário da República N.º 71/2013, Série I de 11 de abril de 2013*, pp. 1–26.
- Li, J., Smeda, R. J., Sellers, B. A., & Johnson, W. G. (2005). Influence of formulation and glyphosate salt on absorption and translocation in three annual weeds. *Weed Science*, 53(2), pp. 153–159.
- Li, S., Tian, Y., Jiang, P., Lin, Y., Liu, X., & Yang, H. (2021). Recent advances in the application of metabolomics for food safety control and food quality analyses. *Critical reviews in food science and nutrition*, 61(9), pp. 1448–1469.
- Herrera López, S., Scholten, J., Kiedrowska, B., & de Kok, A. (2019). 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 of Chromatography A*, 1594, pp. 93–104.
- Lorenz, K., Lee, V. A., & Jackel, S. S. (1977). The nutritional and physiological impact of cereal products in human nutrition. *C R C Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 8(4), pp. 383–456.
- Lucci, P., Busquets, R., & Núñez, O. (2014). UHPLC–MS(/MS) Analysis of Pesticides in Food. In: M. Naushad & M. R. Khan (Eds.), *Ultra Performance Liquid Chromatography Mass Spectrometry* (pp. 33–66). CRC Press, Boca Ratón, EUA.
- Maeda, H., & Dudareva, N. (2012). The Shikimate Pathway and Aromatic Amino Acid Biosynthesis in Plants. *Annual Review of Plant Biology*, 63(1), pp. 73–105.

- Magnusson, B., & Örnemark, U. (2014). *Eurachem Guide: The Fitness for Purpose of Analytical Methods – A Laboratory Guide to Method Validation and Related Topics*. In: Magnusson, B., & Örnemark, U. (Eds), *Second Edition* (pp. 1-70). <https://www.eurachem.org>
- Maldaner, L., & Jardim, I. C. S. F. (2009). O estado da arte da cromatografia líquida de ultra eficiência. *Química Nova*, 32(1), pp. 214–222.
- Maldaner, L., & Jardim, I. C. S. F. (2012). UHPLC Uma abordagem atual: desenvolvimentos e desafios recentes. *Scientia Chromatographica*, 4(3), pp. 197–207.
- Malik, A. K., Blasco, C., & Picó, Y. (2010). Liquid chromatography-mass spectrometry in food safety. *Journal of chromatography. A*, 1217(25), pp. 4018–4040.
- Marques, A. R. S. (2019). *Implementação e validação de um método cromatográfico para a determinação de cloratos e percloratos em matrizes de vegetais, frutos e cereais utilizando o LC-MS /MS*. Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em Tecnologia e Segurança Alimentar. FCT/UNL, Caparica, Portugal, pp. 1-95.
- Masiá, A., Suarez-Varela, M. M., Llopis-Gonzalez, A., & Picó, Y. (2016). Determination of pesticides and veterinary drug residues in food by liquid chromatography-mass spectrometry: A review. *Analytica chimica acta*, 936, pp. 40–61.
- McKevith, B. (2004). Nutritional aspects of cereals. *Nutrition Bulletin*, 29(2), pp. 111–142.
- McMaster, M. C. (2005). *LC/MS: A Practical User's Guide*. John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, EUA, pp. 1-168.
- Melton, L. M., Taylor, M. J., & Flynn, E. E. (2019). The utilisation of ion chromatography and tandem mass spectrometry (IC-MS/MS) for the multi-residue simultaneous determination of highly polar anionic pesticides in fruit and vegetables. *Food chemistry*, 298: 125028.
- Merck. (2021). Safety Information. Fmoc Chloride. Acedido 5 de Novembro de 2021, de <https://www.sigmaaldrich.com/PT/en/product/sigma/23184>
- Mertens, M., Höss, S., Neumann, G., Afzal, J., & Reichenbecher, W. (2018). Glyphosate, a chelating agent—relevant for ecological risk assessment? *Environmental Science and Pollution Research*, 25(6), pp. 5298–5317.
- Mesnage, R., & Antoniou, M. N. (2017). Facts and Fallacies in the Debate on Glyphosate Toxicity. *Frontiers in Public Health*, 5:316.
- Mesnage, R., Renney, G., Séralini, G.-E., Ward, M., & Antoniou, M. N. (2017). Multiomics reveal non-alcoholic fatty liver disease in rats following chronic exposure to an ultra-low dose of Roundup herbicide. *Scientific Reports*, 7: 39328.
- Myers, J. P., Antoniou, M. N., Blumberg, B., Carroll, L., Colborn, T., Everett, L. G., Hansen, M., Landrigan, P. J., Lanphear, B. P., Mesnage, R., Vandenberg, L. N., vom Saal, F. S., Welshons,

- W. V., & Benbrook, C. M. (2016). Concerns over use of glyphosate-based herbicides and risks associated with exposures: a consensus statement. *Environmental Health*, 15: 19.
- Myint, K. T., Aoshima, K., Tanaka, S., Nakamura, T., & Oda, Y. (2009). Quantitative profiling of polar cationic metabolites in human cerebrospinal fluid by reversed-phase nanoliquid chromatography/mass spectrometry. *Analytical chemistry*, 81(3), pp. 1121–1129.
- Naylor, R. E. L. (2002). Weed Management Handbook. In: Naylor, R. E. L. (Ed.), Ninth Edition, Blackwell Science, Ltd, Oxford, UK, pp. 1-434.
- Nerozzi, C., Recuero, S., Galeati, G., Bucci, D., Spinaci, M., & Yeste, M. (2020). Effects of Roundup and its main component, glyphosate, upon mammalian sperm function and survival. *Scientific Reports*, 10: 11026.
- Nez, O., Gallart-Ayala, H., Martins, C. P. B., & Lucci, P. (2012). New trends in fast liquid chromatography for food and environmental analysis. *Journal of Chromatography A*, 1228, pp. 298–323.
- Nielsen, S. S. (2010). *Food Analysis*. In: Nielsen, S. S. (Ed), *Fourth Edition*. Springer US, Boston, EUA, pp. 1-585.
- Niemann, L., Sieke, C., Pfeil, R., & Solecki, R. (2015). A critical review of glyphosate findings in human urine samples and comparison with the exposure of operators and consumers. *Journal fur Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit*, 10, pp. 3–12.
- Nørskov, N. P., Jensen, S. K., & Sørensen, M. T. (2019). Robust and highly sensitive micro liquid chromatography-*tandem* mass spectrometry method for analyses of polar pesticides (glyphosate, aminomethylphosphonic acid, N-acetyl glyphosate and N-acetyl aminomethylphosphonic acid) in multiple biological matrices. *Journal of chromatography. A*, 1605: 360343.
- Nova, P., Calheiros, C. S. C., & Silva, M. (2020). Glyphosate in Portuguese Adults – A Pilot Study. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 80: 1462.
- Östman, M. (2018). *Antimicrobials in sewage treatment plants: occurrence, fate and resistance. Dissertation for PhD in Environmental Chemistry*. Umeå University, pp. 19, Sweden.
- Patterson, D. T. (1995). Effects of Environmental Stress on Weed/Crop Interactions. *Weed Science*, 43(3), pp. 483–490.
- Payá, P., Anastassiades, M., MacK, D., Sigalova, I., Tasdelen, B., Oliva, J., & Barba, A. (2007). Analysis of pesticide residues using the Quick Easy Cheap Effective Rugged and Safe (QuEChERS) pesticide multiresidue method in combination with gas and liquid chromatography and *tandem* mass spectrometric detection. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 389, pp. 1697–1714.
- Peillex, C., & Pelletier, M. (2020). The impact and toxicity of glyphosate and glyphosate-based

- herbicides on health and immunity. *Journal of Immunotoxicology*, 17(1), pp. 163–174.
- Pereira, L., Aspey, S., & Ritchie, H. (2007). High temperature to increase throughput in liquid chromatography and liquid chromatography-mass spectrometry with a porous graphitic carbon stationary phase. *Journal of separation science*, 30(8), pp. 1115–1124.
- Peris-Vicente, J., Esteve-Romero, J., & Carda-Broch, S. (2015). Validation of Analytical Methods Based on Chromatographic Techniques: An Overview. Em J. L. Anderson, A. Berthod, V. P. Estévez, & A. M. Stalcup (Eds.), *Analytical Separation Science* (pp. 1757–1808). Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, Alemanha.
- Portier, C. J., Armstrong, B. K., Baguley, B. C., Baur, X., Belyaev, I., Bellé, R., Belpoggi, F., Biggeri, A., Bosland, M. C., Bruzzi, P., Budnik, L. T., Bugge, M. D., Burns, K., Calaf, G. M., Carpenter, D. O., Carpenter, H. M., López-Carrillo, L., Clapp, R., Cocco, P., Consonni, D., Comba, P., Craft, E., Dalvie, M. A., Davis, D., Demers, P. A., De Roos, A. J., DeWitt, J., Forastiere, F., Freedman, J. H., Fritschi, L., Gaus, C., Gohlke, J. M., Goldberg, M., Greiser, E., Hansen, J., Hardell, L., Hauptmann, M., Huang, W., Huff, J., James, M. O., Jameson, C. W., Kortenkamp, A., Kopp-Schneider, A., Kromhout, H., Larramendy, M. L., Landrigan, P. J., Lash, L. H., Leszczynski, D., Lynch, C. F., Magnani, C., Mandrioli, Daniele, Martin, F. L., Merler, E., Michelozzi, Paola, Miligi, L., Miller, A. B., Mirabelli, D., Mirer, F. E., Naidoo, S., Perry, M. J., Petronio, M. G., Pirastu, R., Portier, R. J., Ramos, K. S., Robertson, L. W., Rodriguez, T., Rössli, M., Ross, M. K., Roy, D., Rusyn, I., Saldiva, P., Sass, J., Savolainen, K., Scheepers, P. T.J., Sergi, C., Silbergeld, E. K., Smith, M. T., Stewart, B. W., Sutton, P., Tateo, F., Terracini, B., Thielmann, H. W., Thomas, D. B., Vainio, H., Vena, J. E., Vineis, P., Weiderpass, E., Weisenburger, D. D., Woodruff, T. J., Yorifuji, T., Yu, I. J., Zambon, P., Zeeb, H., Zhou, S. F. (2016). Differences in the carcinogenic evaluation of glyphosate between the international agency for research on cancer (IARC) and the european food safety authority (EFSA). *Journal of Epidemiology and Community Health*, 70(8), pp. 741–745.
- Prodhan, M. D. H., Alam, S. N., & Jalal Uddin, M. (2017). Analytical Methods in Measuring Pesticides in Foods. Em M. S. Khan & M. S. Rahman (Eds.), *Pesticide Residue in Foods, First Edition* (pp. 135–145). Springer International Publishing, Cham, Suíça.
- Proteomics International. (2021). *Target Mass Spectrometry (MRM/SRM)*. Analytical Services. Acedido 17 de outubro de 2021, de <https://www.proteomics.com.au/analytical-services/srms-mrm/>
- PubChem. (2021). *Glyphosate*. Compound Summary for CID 3496, Glyphosate. Acedido 25 de fevereiro de 2021, de <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Glyphosate>
- Reddy, K. N., Rimando, A. M., Duke, S. O., & Nandula, V. K. (2008). Aminomethylphosphonic Acid Accumulation in Plant Species Treated with Glyphosate. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(6), pp. 2125–2130.
- Regulamento (CE) N.º 178/2002. (2002). Princípios e normas gerais da legislação alimentar.

- Jornal Oficial* N.º L 031, pp. 1-42.
- Regulamento (CE) N.º 1107/2009. (2009). Colocação dos produtos fitofarmacêuticos no mercado. *Jornal Oficial da União Europeia* N.º L309, pp. 1-50.
- Regulamento (CE) N.º 396/2005. (2005). Estabelecimento de limites máximos de resíduos de pesticidas no interior e à superfície dos géneros alimentícios e dos alimentos para animais, de origem vegetal ou animal. *Jornal Oficial da União Europeia* N.º L70, pp. 1-16.
- Regulamento (UE) N.º 293/2013. (2013). Limites máximos de resíduos de benzoato de emamectina, etofenprox, etoxazol, flutriafol, glifosato, fosmete, piraclostrobina, espinosade e espirotetramato no interior ou à superfície de certos produtos. *Jornal Oficial da União Europeia* N.º L 96, pp. 1-30.
- Reis, D. R. F. (2015). *Desenvolvimento, implementação e validação de métodos cromatográficos. Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em Engenharia Química e Bioquímica*. FCT/UNL, Caparica, Portugal, pp. 4-9.
- Resolução da Assembleia da República N.º 88/2016. (2016). Recomendação ao Governo da promoção de um programa para verificação da presença de glifosato. *Diário da República* N.º 98/2016, Série I de 20 de maio de 2016, pp. 1622–1622.
- Richmond, M. E. (2018). Glyphosate: A review of its global use, environmental impact, and potential health effects on humans and other species. *Journal of Environmental Studies and Sciences*, 8, pp. 416–434.
- Rigobello-Masini, M., Pereira, E. A. O., Abate, G., & Masini, J. C. (2019). Solid-Phase Extraction of Glyphosate in the Analyses of Environmental, Plant, and Food Samples. *Chromatographia*, 82, pp. 1121–1138.
- SANTE/12682/2019. (2019). Guidance document on analytical quality control and method validation for pesticide residues analysis in food and feed. *Safety of the Food Chain Pesticides and Biocides. European Commission*, pp. 1–48. https://www.eurl-pesticides.eu/userfiles/file/EurlALL/AqcGuidance_SANTE_2019_12682.pdf
- Sapkota, A. R., Lefferts, L. Y., McKenzie, S., & Walker, P. (2007). What Do We Feed to Food-Production Animals? A Review of Animal Feed Ingredients and Their Potential Impacts on Human Health. *Environmental Health Perspectives*, 115(5), pp. 663–670.
- Savini, S., Bandini, M., & Sannino, A. (2019). 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*, 67(9), pp. 2716–2722.
- Schönbrunn, E., Eschenburg, S., Shuttleworth, W. A., Schloss, J. V., Amrhein, N., Evans, J. N. S., & Kabsch, W. (2001). Interaction of the herbicide glyphosate with its target enzyme 5-enolpyruvylshikimate 3-phosphate synthase in atomic detail. *Proceedings of the National*

- Academy of Sciences of the United States of America*, 98(4), pp. 1376–1380.
- SGS. (2020a). *A SGS de Forma Resumida*. A Empresa. Acedido 21 de Novembro de 2020, de <https://www.sgs.pt/pt-pt/our-company/about-sgs/sgs-in-brief>
- SGS. (2020b). *Competências*. A Empresa. Acedido 22 de Novembro de 2020, de <https://www.sgs.pt/pt-pt/our-company/about-sgs/expertise>
- SGS. (2020c). *Full Outturn Guarantee (FOG)*. Gestão de Risco. Acedido 25 de Novembro de 2020, de <https://www.sgs.pt/pt-pt/energy/power-generation/risk-management/full-outturn-guarantee-fog>
- SGS. (2020d). História do Grupo. *Documento informativo do Grupo SGS*, pp. 1-8.
- SGS. (2020e). SGS Group Profile. *Documento informativo do Grupo SGS*, pp. 1-8.
- SGS. (2021a). *Agricultura & alimentação*. O Que Fazemos. Acedido 22 de Fevereiro de 2021, de <https://www.sgs.pt/pt-pt/agriculture-food>
- SGS. (2021b). *SGS em Portugal*. A Empresa. Acedido 9 de Janeiro de 2021, de <https://www.sgs.pt/pt-pt/our-company/about-sgs/sgs-in-brief/sgs-in-portugal>
- Skoog, D. A., West, D. M., Holler, F. J., & Crouch, S. R. (2014). *Fundamentals of Analytical Chemistry* In: Skoog, D. A., West, D. M., Holler, F. J., & Crouch, S. R. (Eds), *Ninth Edition*. Brooks/Cole, Cengage Learning, Belmont, EUA, pp. 1-958.
- Steiner, D., Malachová, A., Sulyok, M., & Krska, R. (2021). Challenges and future directions in LC-MS-based multiclass method development for the quantification of food contaminants. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 413(1), pp. 25–34.
- Szekacs, A., & Darvas, B. (2012). Forty Years with Glyphosate. Em M. N. A. E.-G. Hasaneen (Ed.), *Herbicides - Properties, Synthesis and Control of Weeds* (pp. 247–284). InTech, Rijeka, Croácia.
- Tajuddin, R., & Smith, R. M. (2002). On-line coupled superheated water extraction (SWE) and superheated water chromatography (SWC). *The Analyst*, 127(7), pp. 883–885.
- Thermo Fisher Scientific. (2007). *Method Development Guide for Hypercarb Columns*. Run-corn, UK, pp. 1-34.
- Thielecke, F., Lecerf, J.-M., & Nugent, A. P. (2020). Processing in the food chain: do cereals have to be processed to add value to the human diet? *Nutrition Research Reviews*, pp. 1–15. <https://doi.org/10.1017/S0954422420000207>
- Thompson, M., Ellison, S. L. R., & Wood, R. (2002). Harmonized guidelines for single-laboratory validation of methods of analysis (IUPAC Technical Report). *Pure and Applied Chemistry*, 74(5), pp. 835–855.
- Tolstikov, V. V., & Fiehn, O. (2002). Analysis of highly polar compounds of plant origin:

- combination of hydrophilic interaction chromatography and electrospray ion trap mass spectrometry. *Analytical biochemistry*, 301(2), pp. 298–307.
- Tomasini, D., Sampaio, M. R. F., Caldas, S. S., Buffon, J. G., Duarte, F. A., & Primel, E. G. (2012). Simultaneous determination of pesticides and 5-hydroxymethylfurfural in honey by the modified QuEChERS method and liquid chromatography coupled to *tandem* mass spectrometry. *Talanta*, 99, pp. 380–386.
- Toy, A. D. F., & Uhing, E. H. (1964). *Aminomethylenephosphonic acids, salts thereof, and process for their production* (Patent N.º 3160632). <https://patents.google.com/patent/US3160632A/en>
- Turner, J. E., & Jenkins, K. M. (2018). The Evolution of Ultra High-Performance Liquid Chromatography : Expanding the Future of Separation Technologies. *Chromatography Today*, pp. 32–36.
- Wallace, T. C., Bailey, R. L., Blumberg, J. B., Burton-Freeman, B., Chen, C. O., Crowe-White, K. M., Drewnowski, A., Hooshmand, S., Johnson, E., Lewis, R., Murray, R., Shapses, S. A., & Wang, D. D. (2020). Fruits, vegetables, and health: A comprehensive narrative, umbrella review of the science and recommendations for enhanced public policy to improve intake. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 60(13), pp. 2174–2211.
- Watson, J. T., & Sparkman, O. D. (Eds.). (2007). *Introduction to Mass Spectrometry: Instrumentation, Applications and Strategies for Data Interpretation, Fourth Edition* (pp. 1-856). John Wiley & Sons, Ltd, Chichester, UK.
- Webster, B. (2017). *Weedkiller scientist was paid £120,000 by cancer lawyers*. The Times. Accessed 14 de Maio de 2021, de <https://www.thetimes.co.uk/article/weedkiller-scientist-was-paid-120-000-by-cancer-lawyers-v0qggbrk6>
- West, C., Elfakir, C., & Lafosse, M. (2010). Porous graphitic carbon: A versatile stationary phase for liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, 1217(19), pp. 3201–3216.
- Wilkowska, A., & Biziuk, M. (2011). Determination of pesticide residues in food matrices using the QuEChERS methodology. *Food Chemistry*, 125(3), pp. 803–812.
- Williams, G. M., Kroes, R., & Munro, I. C. (2000). Safety Evaluation and Risk Assessment of the Herbicide Roundup and Its Active Ingredient, Glyphosate, for Humans. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 31(2), pp. 117–165.
- Wilson, K. (2010). *Principles and Techniques of Biochemistry and Molecular Biology* In: K. Wilson & J. Walker (Eds.) *Seventh Edition* (pp. 1-761). Cambridge University Press, Cambridge, UK.
- Wirsenius, S., Azar, C., & Berndes, G. (2010). How much land is needed for global food production under scenarios of dietary changes and livestock productivity increases in 2030? *Agricultural Systems*, 103(9), pp. 621–638.

- Wirth, M. A., Schulz-Bull, D. E., & Kanwischer, M. (2021). The challenge of detecting the herbicide glyphosate and its metabolite AMPA in seawater - Method development and application in the Baltic Sea. *Chemosphere*, 262, 128327.
- Woodburn, A. T. (2000). Glyphosate: production, pricing and use worldwide. *Pest Management Science*, 56(4), pp. 309–312.
- Wu, X., Zhang, R., Liu, X., Guan, W., Liu, X., Wang, Z., Ma, Y., & Pan, C. (2015). Evaluation of Graphene for Effective Cleanup of Fruit and Vegetable Extracts in Pesticide Residue Analysis. *Food Analytical Methods*, 8(1), pp. 243–253.
- Xu, J., Smith, S., Smith, G., Wang, W., & Li, Y. (2019). Glyphosate contamination in grains and foods: An overview. *Food Control*, 106, 106710.
- Yahia, E. M., García-Solís, P., & Celis, M. E. M. (2019). Contribution of Fruits and Vegetables to Human Nutrition and Health. In: E. M. Yahia (Ed.), *Postharvest Physiology and Biochemistry of Fruits and Vegetables* (pp. 19–45). Woodhead, Duxford, UK.
- Yamada, T., Kremer, R. J., de Camargo e Castro, P. R., & Wood, B. W. (2009). Glyphosate interactions with physiology, nutrition, and diseases of plants: Threat to agricultural sustainability? *European Journal of Agronomy*, 31(3), pp. 111–113.
- Zhang, L., Rana, I., Shaffer, R. M., Taioli, E., & Sheppard, L. (2019). Exposure to glyphosate-based herbicides and risk for non-Hodgkin lymphoma: A meta-analysis and supporting evidence. *Mutation Research*, 781, pp. 186–206.
- Zoller, O., Rhyn, P., Rupp, H., Zarn, J. A., & Geiser, C. (2018). Glyphosate residues in Swiss market foods: monitoring and risk evaluation. *Food Additives & Contaminants: Part B*, 11(2), pp. 83–91.
- Zouaoui, K., Dulaurent, S., Gaulier, J. M., Moesch, C., & Lachâtre, G. (2013). Determination of glyphosate and AMPA in blood and urine from humans: About 13 cases of acute intoxication. *Forensic Science International*, 226 (1-3), pp. e20–e25.

APÊNDICE: RETA EM SOLVENTE

Inicialmente, de forma a averiguar a existência de efeito matriz e decidir qual método de calibração mais adequado para a quantificação de glifosato, foi elaborada, para além das retas em matriz, uma reta em solvente.

Na **Tabela A. 1**, encontram-se os dados utilizados para a construção da curva de calibração representada na **Figura A. 1**.

Tabela A. 1 - Curva de calibração: Valores do sinal de analito obtidos ao longo da gama de concentrações (em µg/mL e mg/kg) estipulada, para o solvente.

Pontos de Calibração	Concentração		Sinal do Analito
	µg/mL	mg/kg	
1	0,00500	0,0100	169723
2	0,0100	0,0200	348903
3	0,0250	0,0500	824095
4	0,0500	0,100	1537428
5	0,0750	0,150	2156751
6	0,100	0,200	2932006

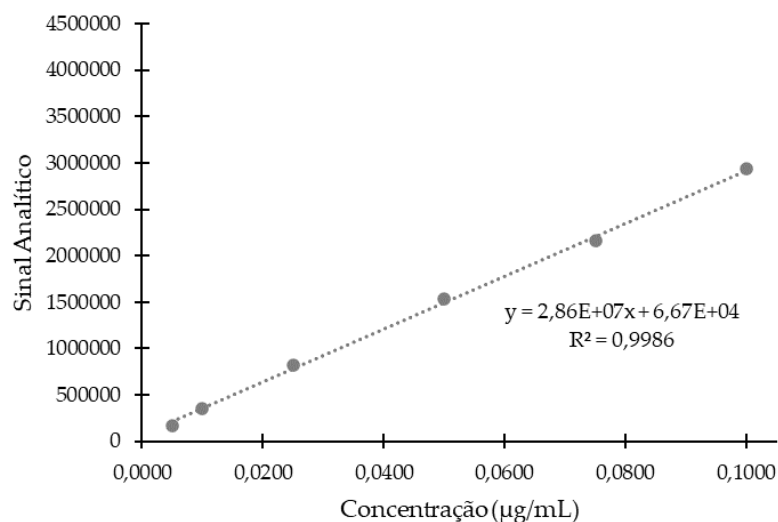


Figura A. 1 - Retas de calibração em solvente, com respectiva equação e coeficiente de determinação (R^2), na gama de concentrações de 0,00500 a 0,100 $\mu\text{g/mL}$.

A curva de calibração foi validada segundo os mesmos parâmetros que as retas de calibração em matriz, apresentando-se os parâmetros de validação nas **Tabelas A.2 e A.3**.

Tabela A. 2 - Estudo da linearidade da reta de calibração em solvente, e respectiva equação das. Estão apresentados os valores obtidos para o coeficiente de correlação (R), e para os parâmetros avaliados no teste de *Mandel*: desvio-padrão residual da reta de regressão linear ($S_{y/x}$), desvio-padrão residual da regressão não-linear ($S_{(y/x)^2}$), diferença de variâncias (DS^2) e valor de teste (PG).

Matriz	Equação da Reta	R	Teste de <i>Mandel</i>			
			$S_{y/x}$	$S_{(y/x)^2}$	DS^2	PG
Solvente	$y = 2,86 \times 10^7 + 6,67 \times 10^4$	0,9993	$4,50 \times 10^4$	$1,21 \times 10^7$	$-4,41 \times 10^{14}$	-3,00

Tabela A. 3 - Análise dos residuais e para o teste de *RIKILT* em cada ponto da gama de trabalho para a reta em solvente.

Matriz	Ponto	Análise dos Residuais	Teste de <i>RIKILT</i>
Solvente	1	-19,0	107
	2	-0,97	110
	3	5,55	104
	4	2,85	96,8
	5	-2,36	90,5
	6	0,31	92,3

Nota: O valor a negrito encontra-se fora do critério de aceitabilidade para a análise de resíduos.

Atendendo aos resultados apresentados em ambas as **Tabelas A.2 e A.3**, pode-se concluir que a curva de calibração elaborada cumpre todos os critérios de aceitação, podendo ser descrita por um modelo de regressão linear e apresentando um bom coeficiente de correlação, 0,9993. A curva de calibração em solvente mostra ainda que existe uma boa linearidade, conforme verificado na aplicação dos testes *RIKILT* e de análise de resíduos. Note-se que, apesar de os requisitos de aceitação na análise dos residuais não serem cumpridos para o

primeiro ponto, uma vez que este cumpre o teste de *R/KLT*, de maior poder estatístico, considera-se validado.

APÊNDICE: CURVAS DE CALIBRAÇÃO

As retas de calibração foram elaboradas a partir de um mínimo de seis pontos dentro da gama de validação estudada. Os valores dos sinais do analito lidos em cada ponto da curva de calibração, para as matrizes morango e curgete, estão apresentados nas **Tabelas B.1 e B.2**.

Tabela B. 1 - Curva de calibração: Valores do sinal de analito obtidos ao longo da gama de concentrações (em µg/mL e mg/kg) estipulada, para o morango.

Pontos de Calibração	Concentração		Sinal do Analito
	µg/mL	mg/kg	
1	0,00500	0,0100	24984
2	0,0100	0,0200	49716
3	0,0250	0,0500	102825
4	0,0500	0,100	224165
5	0,0750	0,150	323770
6	0,100	0,200	424720

Tabela B. 2 - Curva de calibração: Valores do sinal de analito obtidos ao longo da gama de concentrações (em µg/mL e mg/kg) estipulada, para a curgete.

Pontos de Calibração	Concentração		Sinal do Analito
	µg/mL	mg/kg	
1	0,00500	0,0100	22063
2	0,0100	0,0200	42161
3	0,0250	0,0500	107029
4	0,0500	0,100	207178
5	0,0750	0,150	296123
6	0,100	0,200	384439

APÊNDICE: RAZÃO IÔNICA

Nas **Tabela C. 1** e **Tabela C. 2** estão apresentadas as razões iônicas obtidas na análise dos padrões de calibração nas matrizes morango e curgete, respectivamente. Estão também apresentados os dados relativos à média, desvios-padrão e coeficiente de variação em cada matriz.

Tabela C. 1 - Razões iônicas (RI) dos padrões de calibração na matriz morango, com respectiva média, $\overline{RI}$, desvio-padrão, S_{RI} , e coeficiente de variação, CV_{RI} .

Ponto de calibração	RI	$\overline{RI}$	S_{RI}	CV_{RI}
1	65,8	63,4	4,2	6,7
2	66,2			
3	63,9			
4	66,0			
5	63,5			
6	55,1			

Tabela C. 2 - Razões iônicas (RI) dos padrões de calibração na matriz curgete, com respectiva média, $\overline{RI}$, desvio-padrão, S_{RI} , e coeficiente de variação, CV_{RI} .

Ponto de calibração	RI	$\overline{RI}$	S_{RI}	CV_{RI}
1	81,9	67,3	17,2	25,6
2	89,2			
3	71,6			
4	62,3			
5	55,9			
6	42,6			

A cada dia de análise foram realizados cinco ensaios de fortificação, para dois níveis de concentração, 0,00500 µg/mL e 0,0250 µg/mL. Nas **Tabelas C.3** e **C.4** apresentam-se os resultados para a razão iônica obtidos em cada dia de análise, dia 1 e dia 2, para os dois níveis de fortificação avaliados em cada matriz.

Tabela C. 3 - Razão iônica para as amostras fortificadas de morango e de curgete, analisadas no primeiro dia.

Matriz	Concentração (µg/mL)	Razão Iônica
Morango	0,00500	64,7
		51,1
		67,2
		62,2
		52,4
	0,0250	60,3
		57,7
		64,2
		61,0
		63,7
Curgete	0,00500	64,5
		67,4
		68,3
		51,3
		71,0
	0,0250	59,1
		67,9
		75,1
		64,8
		61,7

Tabela C. 4 - Razão iônica para as amostras fortificadas de morango e de curgete, analisadas no segundo dia.

Matriz	Concentração (µg/mL)	Razão Iônica
Morango	0,00500	69,7
		70,3
		56,6
		61,6
		65,5
	0,0250	56,2
		63,0
		67,1
		63,6
		57,1
Curgete	0,00500	76,7
		65,1
		71,0
		76,4
		76,4
	0,0250	70,0
		68,1
		66,7
		77,8
		68,4

APÊNDICE: REPETIBILIDADE DO MÉTODO

Para a determinação da repetibilidade de método em morango e curgete foram efetuados cinco ensaios para dois níveis de fortificação, 0,00500 $\mu\text{g/mL}$ e 0,0250 $\mu\text{g/mL}$. Estes ensaios foram repetidos ao longo de dois dias, tendo ao total sido realizados dez ensaios para cada nível de fortificação em cada matriz.

Nas **Tabelas D.1 e D.2**, encontram-se os resultados obtidos nas duas matrizes nos dias 1 e 2, respetivamente, estando também representados o sinal médio, o desvio padrão e o coeficiente de variação.

Tabela D. 1 - Repetibilidade do método para as matrizes morango e curgete, fortificadas com 0,00500 e 0,0250 µg/mL de glifosato no dia 1. Está também apresentada a concentração média obtida ($\bar{x}$), o desvio padrão de repetibilidade (S_r), limite de repetibilidade (r), a percentagem de repetibilidade (% r) e para o coeficiente de variação de repetibilidade (CV_r).

Matriz	Concentração Teórica (µg/mL)	Concentração Obtida (µg/mL)	$\bar{x}$	S_r	r	% r	CV_r
Morango	0,00500	0,00429	0,00400	0,00047	0,00134	33,5	11,8
		0,00454					
		0,00352					
		0,00350					
		0,00413					
	0,0250	0,0210	0,0216	0,0013	0,00372	17,2	6,02
		0,0214					
		0,0225					
		0,0233					
		0,0200					
Curgete	0,00500	0,00391	0,00411	0,00050	0,00143	34,8	12,2
		0,00372					
		0,00477					
		0,00365					
		0,00451					
	0,0250	0,0192	0,0201	0,0012	0,00343	17,1	5,97
		0,0208					
		0,0204					
		0,0185					
		0,0214					

Tabela D. 2 - Repetibilidade do método de extração para as matrizes morango e curgete, fortificadas com 0,0050 e 0,025 µg/mL de glifosato no dia 2. Está também apresentada a concentração média obtida ($\bar{x}$), o desvio padrão de repetibilidade (S_r), limite de repetibilidade (r), a percentagem de repetibilidade (% r) e para o coeficiente de variação de repetibilidade (CV_r).

Matriz	Concentração Teórica (µg/mL)	Concentração Obtida (µg/mL)	$\bar{x}$	S_r	r	% r	CV_r
Morango	0,00500	0,00566	0,00505	0,00048	0,00137	27,1	9,50
		0,00450					
		0,00467					
		0,00502					
		0,00538					
	0,0250	0,0297	0,0263	0,0031	0,00887	33,7	11,8
		0,0223					
		0,0236					
		0,0278					
		0,0279					
Curgete	0,00500	0,00487	0,00450	0,00032	0,000915	20,3	7,11
		0,00422					
		0,00453					
		0,00414					
		0,00474					
	0,0250	0,0262	0,0235	0,0022	0,00629	26,8	9,36
		0,0223					
		0,0234					
		0,0206					
		0,0248					

APÊNDICE: REPETIBILIDADE DO EQUIPAMENTO

Para a determinação da repetibilidade do equipamento foram efetuadas dez leituras do padrão de calibração 1 (PC1), 0,00500 µg/mL, e do padrão de calibração 2 (PC2), 0,100 µg/mL, de glifosato. Nas **Tabelas E.1** e **E.2** encontram-se os resultados obtidos na análise das duas matrizes, respetivamente, estando também representados o sinal médio, o desvio padrão e o coeficiente de variação.

Tabela E. 1 - Estudo da repetibilidade do equipamento para a matriz morango, ao nível do PC1, 0,00500 µg/mL, e do PC2, 0,100 µg/mL, de glifosato. Está também apresentada a concentração média obtida ($\bar{x}$), o desvio padrão de repetibilidade (S_r), limite de repetibilidade (r), a percentagem de repetibilidade (% r) e para o coeficiente de variação de repetibilidade (CV_r).

Matriz	Concentração Teórica (µg/mL)	Concentração Obtida (µg/mL)	$\bar{x}$	S_r	r	% r	CV_r
Morango	0,00500	0,00396	0,00452	0,00044	0,00126	27,9	9,73
		0,00508					
		0,00473					
		0,00410					
		0,00475					
		0,00436					
		0,00412					
		0,00428					
		0,00529					
		0,00455					
	0,100	0,101	0,106	0,010	0,0286	27,0	9,43
		0,100					
		0,101					
		0,0955					
		0,0914					
		0,106					
		0,114					
		0,118					
		0,118					
		0,114					

Tabela E. 2 - Estudo da repetibilidade do equipamento para a matriz curgete, ao nível do PC1, 0,00500 µg/mL, e do PC2, 0,100 µg/mL, de glifosato. Está também apresentada a concentração média obtida ($\bar{x}$), o desvio padrão de repetibilidade (S_r), limite de repetibilidade (r), a percentagem de repetibilidade (% r) e para o coeficiente de variação de repetibilidade (CV_r).

Matriz	Concentração Teórica (µg/mL)	Concentração Obtida (µg/mL)	$\bar{x}$	S_r	r	% r	CV_r
Curgete	0,00500	0,00594	0,00575	0,00030	0,000858	14,9	5,22
		0,00587					
		0,00497					
		0,00598					
		0,00574					
		0,00588					
		0,00581					
		0,00560					
		0,00584					
		0,00591					
	0,100	0,104	0,109	0,010	0,0286	26,2	9,17
		0,103					
		0,119					
		0,118					
		0,117					
		0,119					
		0,109					
		0,0907					
		0,118					
		0,0970					

APÊNDICE: PRECISÃO INTERMÉDIA

A precisão intermédia foi calculada a partir dos dados de repetibilidade obtidos ao longo dos dois dias de análise para os dois níveis de fortificação, já apresentados no **Apêndice E**.

Nas **Tabelas F.1** e **F.2** apresentam-se os resultados de precisão intermédia para as matrizes morango e curgete, respetivamente.

Tabela F. 1 - Estudo da precisão intermédia nos ensaios de fortificação com 0,00500 e 0,0250 µg/mL de glifosato, na matriz morango. Está também apresentada a média ($\bar{x}$) das concentrações obtidas experimentalmente, o desvio-padrão (S_{PI}), a precisão intermédia (PI), a percentagem de precisão intermédia (%PI) e o coeficiente de variação da precisão intermédia (CV_{PI}).

Matriz	Concentração Teórica (µg/mL)	Concentração Obtida (µg/mL)	$\bar{x}$	S_{PI}	PI	%PI	CV_{PI}
Morango	0,00500	0,00429	0,00452	0,00071	0,00203	44,9	15,7
		0,00454					
		0,00352					
		0,00350					
		0,00413					
		0,00566					
		0,00450					
		0,00467					
		0,00502					
		0,00538					
	0,0250	0,0210	0,0240	0,0033	0,00944	39,3	13,8
		0,0214					
		0,0225					
		0,0233					
		0,0200					
		0,0297					
		0,0223					
		0,0236					
		0,0278					
		0,0279					

Tabela F. 2 - Estudo da precisão intermédia nos ensaios de fortificação com 0,00500 e 0,0250 µg/mL de glifosato, na matriz curgete. Está também apresentada a média ($\bar{x}$) das concentrações obtidas experimentalmente, o desvio-padrão (S_{PI}), a precisão intermédia (PI), a percentagem de precisão intermédia (%PI) e o coeficiente de variação da precisão intermédia (CV_{PI}).

Matriz	Concentração Teórica (µg/mL)	Concentração Obtida (µg/mL)	$\bar{x}$	S_{PI}	PI	%PI	CV_{PI}
Curgete	0,00500	0,00391	0,00431	0,00044	0,00126	29,2	10,2
		0,00372					
		0,00477					
		0,00365					
		0,00451					
		0,00487					
		0,00422					
		0,00453					
		0,00414					
		0,00474					
	0,0250	0,0192	0,0218	0,0024	0,00686	31,5	11,0
		0,0208					
		0,0204					
		0,0185					
		0,0214					
		0,0262					
		0,0223					
		0,0234					
		0,0206					
		0,0248					

APÊNDICE: EXATIDÃO

A exatidão foi avaliada por ensaios de recuperação com amostras fortificadas ao nível de 0,00500 µg/mL (0,0100 mg/kg), e a um nível de 0,0250 µg/mL (0,0500 mg/kg). Com efeito, foram realizados cinco ensaios de fortificação com amostras fortificadas para os dois níveis já descritos. Estes ensaios foram repetidos ao longo de dois dias, dia 1 e dia 2, tendo-se ao total realizado dez ensaios para cada nível de fortificação em cada matriz.

Nas **Tabelas G.1 e G.2**, encontram-se agrupados, os resultados obtidos para as duas matrizes, morango e curgete, respetivamente, ao longo dos dois dias de análise, estando também representados o sinal médio, o desvio padrão e o coeficiente de variação.

Tabela G. 1 - Concentração obtida ($\mu\text{g/mL}$) e percentagem de recuperação (%R) dos ensaios de fortificação com 0,00500 e 0,0250 $\mu\text{g/mL}$ de glifosato, para a matriz morango. Está também apresentada a taxa de recuperação média ($\%\bar{R}$), desvio-padrão (S_R) e coeficiente de variação (CV_R).

Matriz	Concentração Teórica ($\mu\text{g/mL}$)	Concentração Obtida ($\mu\text{g/mL}$)	%R	$\%\bar{R}$	S_R	CV_R
Morango	0,00500	0,00429	85,8	93,1	13,7	14,7
		0,00454	90,8			
		0,00352	70,4			
		0,00350	70,0			
		0,00413	82,6			
		0,00566	113			
		0,00450	90,0			
		0,00467	93,4			
		0,00502	100			
		0,00538	108			
	0,0250	0,0210	84,0			
		0,0214	85,6			
		0,0225	90,0			
		0,0233	93,2			
		0,0200	80,0			
		0,0297	119			
		0,0223	89,2			
		0,0236	94,4			
		0,0278	111			
		0,0279	112			

Tabela G. 2 - Concentração obtida ($\mu\text{g/mL}$) e percentagem de recuperação (%R) dos ensaios de fortificação com 0,00500 e 0,0250 $\mu\text{g/mL}$ de glifosato, para a matriz curgete. Está também apresentada a taxa de recuperação média ($\%\bar{R}$), desvio-padrão (S_R) e coeficiente de variação (CV_R).

Matriz	Concentração Teórica ($\mu\text{g/mL}$)	Concentração Obtida ($\mu\text{g/mL}$)	%R	$\%\bar{R}$	S_R	CV_R
Curgete	0,00500	0,00391	78,2	86,6	9,1	10,5
		0,00372	74,4			
		0,00477	95,4			
		0,00365	73,0			
		0,00451	90,2			
		0,00487	97,4			
		0,00422	84,4			
		0,00453	90,6			
		0,00414	82,8			
		0,00474	94,8			
	0,0250	0,0192	76,8			
		0,0208	83,2			
		0,0204	81,6			
		0,0185	74,0			
		0,0214	85,6			
		0,0262	105			
		0,0223	89,2			
		0,0234	93,6			
		0,0206	82,4			
		0,0248	99,2			



2021

MARIANA PAIXÃO VARELA RIBEIRO

Determinação de Glifosato em Amostras Alimentares (frutos e vegetais)