



Faculdade de Farmácia da Universidade de Lisboa
Mestrado em Controlo da Qualidade
e Toxicologia dos Alimentos

Desenvolvimento de Metodologias
Analíticas para a Determinação de
Resíduos de Pesticidas em
Medicamentos à Base de Plantas

Rita Vasconcelos Pimentel

2007

Desenvolvimento de Metodologias Analíticas para a Determinação de Resíduos de Pesticidas em Medicamentos à Base de Plantas

Dissertação destinada à obtenção do grau de Mestre em
Controlo da Qualidade e Toxicologia dos Alimentos, pela
Faculdade de Farmácia da Universidade de Lisboa

Dissertação Orientada por:
Professora Doutora M. Rosário Bronze
e
Professor Doutor Higuinaldo Chaves das Neves

Rita Vasconcelos Pimentel
2007

Resumo

A preocupação com os produtos à base de plantas medicinais tem sido amplamente discutida, uma vez que se verifica um aumento da sua utilização nos últimos anos.

A Directiva 2004/24/CE do Parlamento Europeu e do Conselho de 31 de Março de 2004 e sua transposição para o Decreto-Lei 176/2006 veio reforçar a necessidade dos medicamentos tradicionais à base de plantas serem submetidos a um processo de registo para a sua introdução no mercado, no qual a qualidade tem que ser demonstrada, devendo ser cumpridas as normas da qualidade constantes das monografias relevantes da Farmacopeia Europeia ou da farmacopeia do Estado-Membro.

Documentos emitidos pela Agência Europeia da Avaliação de Medicamentos referem que os resíduos de pesticidas devem ser considerados entre os vários contaminantes a que as plantas medicinais possam estar sujeitas.

Neste âmbito, o objectivo deste trabalho foi o de otimizar, validar e aplicar a metodologia analítica descrita na Farmacopeia Europeia para a pesquisa de resíduos de pesticidas organoclorados e piretróides em medicamentos à base de plantas.

A extracção sobre a amostra foi efectuada com acetona, seguida de cromatografia de permeação em gel e extracção em fase sólida. Foi utilizada a cromatografia gasosa com detector de captura electrónica para a determinação dos compostos e a espectrometria de massa para a confirmação da identificação.

Uma vez que se trata de um método multiresíduo no qual numa só análise são determinados 27 compostos, a fase de optimização do processo de extracção e purificação das amostras foi particularmente crítica, pois houve a necessidade de ter cuidados especiais por forma a aumentar os factores de recuperação e a repetibilidade do método analítico. Foram também optimizadas as condições de separação dos compostos por cromatografia gasosa.

Nos últimos anos, várias publicações evidenciaram a utilização de métodos alternativos de preparação de amostra, apresentando uma maior rapidez, simplicidade de execução com menores custos comparativamente aos processos de extracção clássicos. Este facto reforçou o interesse em estudar metodologias alternativas de extracção e comparar resultados obtidos.

O método descrito na Farmacopeia Europeia demonstrou ser o mais adequado para a pesquisa de resíduos de pesticidas organoclorados e piretróides nas amostras analisadas, após optimização do processo de extracção.

Palavras chave: Resíduos de Pesticidas; Medicamentos à base de plantas; Método multiresíduo; Cromatografia Gasosa.

Abstract

In recent years we have witnessed an increasing use of herbal medicines which lead to several concerns and fears.

The Directive 2004/24/EC of the European Parliament and of the Council of 31 March 2004 and its transposition to the Decree-Law 176/2006 came to strengthen the need of traditional herbal medicinal products to be submitted to a registration procedure, in which the quality has to be demonstrated, and therefore these products should comply with quality standards in relevant European Pharmacopoeia monographs or those in the pharmacopoeia of a Member State.

Documents emitted by the European Agency for the Evaluation of Medicinal Products indicated that pesticide residues must be considered among the contaminants of medicinal plants.

The aim of this work was to optimize, validate and apply the described European Pharmacopoeia analytical methodology for the research of organochlorine and pyrethroid pesticide residues in herbal medicinal products.

The sample extraction was made with acetone followed by gel permeation chromatography and solid phase extraction. Gas chromatography with electron capture detector was used for the determination of the compounds and mass spectrometry for the confirmation of the identification.

As it is a multiresidue method in which only one analysis allows the determination of 27 compounds, it was necessary to have special attention in the optimization of the samples extraction and cleanup, therefore it was necessary to have special cares in order to increase the accuracy and the repeatability of the analytical method. The conditions for the separation of the compounds by gas chromatography were also optimized.

Lately, several publications described that the use of alternative methods for sample preparation showed to be faster, easy to perform and cheaper in comparison to conventional methods. This fact strengthened the interest of studying alternative methodologies of extraction and comparing results.

The methodology described in the European Pharmacopoeia demonstrated to be suitable for the research of organochlorine and pyrethroid pesticide residues in the analyzed samples, after a careful optimization of all the extraction process.

Keywords: Pesticide residues; Herbal medicinal products; Multiresidue method; Gas Chromatography.

Agradecimentos

À Prof. Doutora Maria do Rosário Bronze, orientadora deste trabalho, quero agradecer todo o apoio prestado ao longo de todo o trabalho experimental e durante a elaboração da tese, a sua inesgotável paciência, disponibilidade, objectividade na transmissão de conhecimentos, todas as críticas construtivas e sugestões que permitiram enriquecer o trabalho.

Ao Prof. Doutor Higuinaldo Chaves das Neves, orientador deste trabalho, quero agradecer a sua contribuição imprescindível na transmissão de todos os seus conhecimentos, o que foi determinante para a execução do trabalho experimental e para a elaboração da tese, assim como todas as suas críticas construtivas. Agradeço também a sua disponibilidade sempre manifestada.

Agradeço ao INFARMED que me disponibilizou desde o início todas as condições materiais que tornaram possível a execução do trabalho experimental apresentado nesta tese, assim como a todas as colegas que de uma forma ou de outra me auxiliaram durante elaboração do trabalho.

Agradeço a todos aos colegas de mestrado e à Prof. Doutora Matilde Castro todo o apoio manifestado ao longo do mestrado.

A toda a minha família, em especial ao Nuno e ao Tiago quero agradecer toda a compreensão e apoio manifestados desde o início.

Índice

Resumo	i
Abstract	ii
Agradecimentos	iii
Índice	iv
Índice de figuras	viii
Índice de tabelas	xi
Símbolos e Abreviaturas	xiv
I. Introdução	1
1. Medicamentos à base de plantas e aspectos regulamentares	1
2. Contaminantes - Resíduos de Pesticidas	5
2.1. Definição e sua utilização ao longo dos tempos	5
2.2. Classes de pesticidas	6
2.2.1. Pesticidas Organoclorados	6
2.2.2. Pesticidas Organofosforados	7
2.2.3. Pesticidas Carbamatos	7
2.2.4. Pesticidas Piretróides	8
2.3. Resíduos de pesticidas em medicamentos à base de plantas	8
3. Metodologia analítica	13
3.1. Aspectos gerais	13
3.2. Extração e Purificação	14
3.2.1. Cromatografia de exclusão molecular	15
3.2.2. Extração em fase sólida - Purificação com sílica gel	16
3.2.3. Métodos alternativos	17
3.3. Separação e detecção - Cromatografia em fase gasosa associada a detector μ ECD	19
3.3.1. Fonte de gás de arraste	20
3.3.2. Sistema de injeção da amostra	20
3.3.3. Coluna e forno	20
3.3.4. Detector	21

3.4. Confirmação - Cromatografia em fase gasosa associada a Espectrometria de Massa	22
3.4.1. Fonte iónica	23
3.4.2. Analisador de massas	23
3.4.3. Detector de iões e tratamento de dados	23
4. Amostras a considerar na determinação de resíduos de pesticidas	24
5. Objectivos do trabalho	24
II. Parte experimental	25
1. Materiais e métodos	25
1.1. Padrões	25
1.2. Amostras	26
1.3. Reagentes	26
1.4. Extração e purificação da amostra	27
1.4.1. Metodologia descrita na Farmacopeia Europeia	27
1.4.2. Metodologia segundo QuEChERS	27
1.5. Análise por GC- μ ECD	28
1.6. Análise por GC-MS	29
2. Soluções de trabalho	30
2.1. Preparação de soluções	30
2.1.1. Solução mãe combinada de padrões	30
2.1.2. Soluções de padrão interno	31
2.1.3. Solução combinada de padrões utilizada durante a optimização do método	31
2.1.4. Soluções combinadas de padrões para o estudo da linearidade e gama de trabalho	31
2.1.5. Soluções combinadas de padrões para o estudo da precisão	33
2.1.6. Soluções combinadas de padrões para a determinação dos limites analíticos	35
2.1.7. Soluções de amostra fortificada para o estudo da exactidão	35
2.2. Armazenamento de soluções	36
3. Validação do método analítico	37
3.1. Especificidade/Selectividade	37
3.2. Estudo da linearidade	37
3.3. Estudo da gama de trabalho	38
3.4. Estudo da precisão	38
3.4.1. Repetibilidade da injeção	38
3.4.2. Repetibilidade	39
3.4.3. Precisão intermédia	39

3.5. Estudo dos limites analíticos	39
3.6. Estudo da exactidão	39
III. Resultados e Discussão	40
1. Análise por GC- μ ECD - Optimização das condições cromatográficas	40
1.1. Estudo da eficiência da coluna cromatográfica em função da velocidade linear da fase móvel	40
1.2. Avaliação do Factor de Resolução	41
1.2.1. Optimização da temperatura do forno da coluna	43
1.2.2. Optimização do fluxo do gás de arraste	45
1.3. Optimização das condições do injector	46
1.3.1. Temperatura do injector	46
1.3.2. Tipo de injeção	51
1.3.3. Tipo de <i>liner</i>	54
1.4. Detector	56
1.5. Escolha do padrão interno	57
1.6. Adequabilidade do sistema	58
2. Análise por GC-MS	62
3. Optimização do processo de extracção e purificação da amostra segundo a metodologia descrita na Farmacopeia Europeia	69
3.1. Evaporação do solvente no evaporador rotativo	69
3.2. Teste da adequabilidade dos filtros	75
3.3. Cromatografia de exclusão molecular – Cromatografia de Permeação em Gel (GPC)	76
3.4. Extracção em fase sólida com colunas de sílica gel	79
3.5. Evaporação do solvente em atmosfera de azoto	81
3.6. Avaliação do processo de extracção	81
4. Método alternativo de preparação de amostra - QuEChERS	82
5. Validação do método analítico	84
5.1. Estudo da Especificidade/Selectividade	84
5.1.1. Identificação por GC-MS	84
5.1.2. Avaliação do tempo de retenção e resolução	85
5.1.3. Avaliação de brancos	85
5.1.4. Avaliação da matriz das amostras	86
5.2. Estudo da linearidade	87

5.3. Estudo da gama de trabalho	94
5.4. Estudo da precisão	99
5.4.1. Repetibilidade da injeção	99
5.4.2. Repetibilidade do método	100
5.4.3. Precisão intermédia	102
5.5. Estudo dos limites analíticos	104
5.6. Ensaios de recuperação	107
6. Análise de amostras	111
IV. Conclusões e perspectivas futuras	115
V. Bibliografia e referências bibliográficas	117
Anexos	I
Anexo I – Propriedades dos pesticidas pesquisados e dos padrões internos utilizados	II
Anexo II – Fórmulas utilizadas para a determinação dos parâmetros cromatográficos	VII

Índice de Figuras

Figura 1	Unidades de medicamentos à base de plantas, de acordo com a substância activa ou associação de substâncias activas, vendidas entre Janeiro e Maio de 2005	24
Figura 2	Estudo da AEPT em função da velocidade linear do gás de arraste argon/metano (95:5), medido à saída da coluna, utilizando uma solução de Carbofenotião a 0,4 µg/ml	40
Figura 3	Cromatograma da solução combinada de padrões, utilizando o Carbofenotião como padrão interno, obtido após análise no GC-µECD nas condições de temperatura do forno da coluna indicadas na Farmacopeia Europeia	42
Figura 4	Cromatograma da solução combinada de padrões, utilizando o Carbofenotião como padrão interno, obtido após análise no GC-µECD com o gradiente de temperatura do forno da coluna: 80° C (3 min) - 30°C/min - 150°C (3 min) - 1,5°C/min - 290°C (2 min)	43
Figura 5	Cromatograma da solução combinada de padrões, utilizando o Carbofenotião como padrão interno, obtido após análise no GC-µECD com o gradiente de temperatura do forno da coluna: 80° C (3 min) - 30°C/min - 150°C (3 min) - 0,8°C/min - 290°C (2 min)	44
Figura 6	Estudo da degradação da Endrina e DDT em função da temperatura do injector	49
Figura 7	Estudo da degradação do composto Endrina no respectivo aldeído e cetona em função da temperatura do injector (205°C e 290°C)	50
Figura 8	Estudo do DPR das AR dos compostos Endrina, e <i>p,p'</i> - DDT em função da temperatura do injector	51
Figura 9	Estudo da variação do número de pratos teóricos do composto Deltametrina em função do tempo de purga, utilizando um fluxo da válvula de <i>split</i> de 60 ml/min	53
Figura 10A	Estudo da degradação do composto Endrina em função do tipo de <i>liner</i> utilizado	55
Figura 10B	Estudo da degradação do composto <i>p,p'</i> - DDT em função do tipo de <i>liner</i> utilizado	55

Figura 11	Pico interferente detectado na amostra de Valeriana sob a forma de comprimidos (t_R 25,08 min)	57
Figura 12A	Cromatograma da solução combinada de padrões, utilizando o Etião como padrão interno, obtido após análise no GC- μ ECD (condições de análise descritas na parte experimental)	59
Figura 12B	Zona final do cromatograma da solução combinada de padrões obtido após análise no GC- μ ECD (condições de análise descritas na parte experimental)	60
Figura 13	Cromatograma da corrente iônica total obtido no modo de aquisição varrimento de 50 - 500 amu para a solução combinada de padrões, utilizando Etião como padrão interno (condições de análise descritas na parte experimental)	63
Figura 14	Cromatograma dos m/z característicos consoante o composto, para a solução combinada de padrões, utilizando Etião como padrão interno (condições de análise descritas na parte experimental)	68
Figura 15A	Cromatograma de amostra fortificada obtido após análise no GC- μ ECD (T de evaporação do solvente = 40°C)	72
Figura 15B	Cromatograma de amostra fortificada obtido após análise no GC- μ ECD (T de evaporação do solvente = 25°C, velocidade de rotação reduzida e transferência da solução durante a evaporação para balões de evaporação de menor capacidade)	72
Figura 16A	Cromatograma de solução padrão de Etião obtido após análise no GC- μ ECD	73
Figura 16B	Cromatograma obtido no GC- μ ECD de amostra de Ginkgo Biloba à qual foi adicionado inicialmente padrão interno (Etião), tendo sido esta amostra fortificada submetida ao processo de evaporação de solvente	74
Figura 16C	Cromatograma obtido no GC- μ ECD de amostra de Ginkgo Biloba que foi submetida ao processo de evaporação de solvente à qual foi posteriormente adicionado padrão interno (Etião)	74
Figura 17	Exemplo de sequência de cromatogramas obtidos após análise no GC- μ ECD na fase de determinação das frações de interesse a recolher no sistema de GPC	77
Figura 18A	Cromatograma de uma amostra de Valeriana não submetida a GPC, analisada por GC- μ ECD	78
Figura 18B	Cromatograma de uma amostra de Valeriana submetida a GPC, analisada por GC- μ ECD	79

Figura 19	Cromatograma do solvente (tolueno) após ter sido submetido ao processo de extracção descrito e analisado por GC- μ ECD	81
Figura 20	Cromatograma de amostra de Valeriana com padrão interno (Etião), extraída segundo o método QuEChERS e analisada por GC- μ ECD	82
Figura 21	Cromatograma de tolueno submetido ao método QuEChERS e analisado por GC- μ ECD	83
Figura 22	Cromatograma de solvente (tolueno) analisado por GC- μ ECD	85
Figura 23A	Cromatograma de uma amostra de Valeriana com o padrão interno Etião, analisada por GC- μ ECD onde é detectado um composto a eluir ao t_R do heptacloro	86
Figura 23B	Cromatograma de uma amostra de Valeriana com o padrão interno Etião, analisada por GC-MS onde são pesquisados os m/z característicos de cada composto	86
Figura 24	Curva de calibração (AR vs concentração) obtida após análise de todos os níveis de concentração testados das soluções de Lindano (0,0015 – 0,1758 mg/l) por GC- μ ECD	90
Figura 25	Curva da distribuição dos valores normalizados para a gama de concentrações testada (0,0015 – 0,1758 mg/l)	93
Figura 26	Curva de calibração (AR vs concentração) obtida após análise das soluções de Lindano correspondentes à gama de linearidade determinada (0,0293 – 0,1758 mg/l) por GC- μ ECD	94
Figura 27	Curva da distribuição dos valores normalizados para a gama de linearidade determinada (0,0293 – 0,1758 mg/l)	94
Figura 28	Cromatograma obtido no GC- μ ECD de amostra de Ginkgo biloba com o padrão interno Etião, sendo os restantes picos pertencentes ao perfil do extracto	111
Figura 29	Cromatograma obtido no GC- μ ECD de amostra de Valeriana com o padrão interno Etião, sendo os restantes picos pertencentes ao perfil do extracto.	112
Figura 30	Cromatograma obtido no GC- μ ECD de amostra de Sene com o padrão interno Etião, sendo os restantes picos pertencentes ao perfil do extracto	112

Índice de Tabelas

Tabela 1	Monografias de substâncias derivadas de planta e preparações à base de plantas incluídas nas várias edições da Farmacopeia Europeia	3
Tabela 2	Parâmetros a ter em consideração na avaliação da qualidade de substâncias derivadas de plantas, preparações à base de plantas ou medicamentos à base de plantas	10
Tabela 3	Limites (mg/kg de planta) para pesticidas	11
Tabela 4	Padrões de pesticidas organoclorados e piretróides utilizados no trabalho experimental	25
Tabela 5	Padrões internos utilizados no trabalho experimental	26
Tabela 6	Condições de análise por GC- μ ECD de pesticidas organoclorados e piretróides	28
Tabela 7	Condições de análise por GC-MS de pesticidas organoclorados e piretróides por GC-MS	29
Tabela 8	Esquema de diluições a efectuar na preparação da solução mãe combinada de padrões (solução 2)	30
Tabela 9	Níveis de concentração (ppm) a atingir das soluções padrão de pesticidas, para a avaliação da linearidade e gama de trabalho	32
Tabela 10	Concentração (ppm) a atingir das soluções padrão de pesticidas usadas na avaliação da repetibilidade do método analítico para 3 níveis de concentração diferentes	33
Tabela 11	Concentração (ppm) a atingir das soluções padrão de pesticidas usadas na avaliação da precisão intermédia do método analítico para 4 níveis de concentração diferentes	34
Tabela 12	Concentração (ppm) a atingir das soluções padrão de pesticidas usadas na avaliação da exactidão do método analítico para 3 níveis de concentração diferentes	36
Tabela 13	Estudo do Factor de Resolução, em função do fluxo do gás de arraste, para os compostos α Endossulfano, <i>o,p'</i> -DDE e <i>p,p'</i> -DDE, Dieldrina	45
Tabela 14	Estudo dos valores médios das AR dos vários compostos utilizando diferentes T do injecto	47

Tabela 15	Estudo dos valores do DPR das AR dos vários compostos utilizando diferentes T do injecto	48
Tabela 16	DPR das AR obtidas para cada um dos compostos utilizando diferentes tempos de purga	52
Tabela 17	Parâmetros para avaliação da adequabilidade do sistema, obtidos através da média de 6 injeções consecutivas de solução combinada de padrões	61
Tabela 18	Valores t_R e α obtidos para os padrões analisados por GC-MS	64
Tabela 19	Valores de m/z característicos de cada composto e respectivos tempos de programação em modo SIM	65
Tabela 20	Factores de resposta dos valores de m/z característicos de cada composto avaliados na solução padrão	66 - 67
Tabela 21	Efeito da T de evaporação do solvente na percentagem de recuperação dos pesticidas em estudo	70
Tabela 22	Percentagem de recuperação obtida por comparação da resposta no GC- μ ECD de cada um dos padrões antes e após filtração com filtros de fibra de vidro e antes e após filtração com filtros de membrana GHP 0,45 μ m	75
Tabela 23	Condições operacionais finais no sistema de GPC	78
Tabela 24	Percentagem de recuperação obtida por comparação da resposta no GC- μ ECD de cada um dos padrões após o processo de extracção em fase sólida	80
Tabela 25	Condições operacionais finais no sistema de extracção em fase sólida	81
Tabela 26	Índice de semelhança obtido após análise por GC-MS e comparação dos espectros correspondentes aos padrões de referência utilizados com os espectros existentes nas bibliotecas de espectros	84
Tabela 27	Parâmetros das curvas de calibração correspondentes à gama de linearidade determinada	88 – 89
Tabela 28	Cálculos intermédios efectuados para a execução do teste de Fisher Snedecor para o composto Lindano para os níveis de concentração testados (0,0015 – 0,1758 mg/l)	91
Tabela 29	Cálculo dos valores normalizados efectuado para o composto Lindano para a gama de concentrações testada (0,0015 – 0,1758 mg/l)	92

Tabela 30	Valores de AR de 10 soluções independentes de Lindano correspondentes aos níveis de concentração 0,0293 mg/l e 0,1758 mg/l, obtidos após análise por GC- μ ECD	95
Tabela 31	Valores de AR de 10 soluções independentes de Lindano correspondentes aos níveis de concentração 0,0440 mg/l e 0,1758 mg/l, obtidos após análise por GC- μ ECD	96
Tabela 32	Gama de trabalho para cada um dos compostos em estudo	97
Tabela 33	Parâmetros das curvas de calibração correspondentes à gama de trabalho para os padrões em estudo	98
Tabela 34	DPR para os t_R e AR obtidos em 6 injeções consecutivas de solução combinada de padrões	99
Tabela 35	Repetibilidade do método para diferentes níveis de concentração	100 - 102
Tabela 36	Precisão intermédia para diferentes níveis de concentração	102 - 103
Tabela 37	Limites analíticos obtidos através das curvas de calibração para os vários compostos	105
Tabela 38	Limites analíticos obtidos experimentalmente para os vários compostos	106
Tabela 39A	Percentagem de recuperação na matriz Ginkgo biloba, para diferentes níveis de concentração	107
Tabela 39B	Percentagem de recuperação na matriz Valeriana, para diferentes níveis de concentração	108
Tabela 39C	Percentagem de recuperação na matriz Sene, para diferentes níveis de concentração	109
Tabela 40	Tolerância máxima recomendada para a abundância relativa dos iões utilizando o método de GC-MS	113
Tabela 41	Análise das amostras em GC-MS, modo SIM e determinação dos factores de resposta dos valores de m/z característicos nos picos com t_R muito próximos dos compostos em estudo	114
Tabela 42A	Propriedades dos pesticidas organoclorados e piretróides pesquisados	II
Tabela 42B	Propriedades dos padrões internos utilizados	VI

Símbolos e Abreviaturas

a	Ordenada na origem (equação da recta $y = a + bx$)
A_{100}	Área correspondente à C_{100} no estudo dos valores normalizados
ADI	“Acceptable Daily Intake”, Dose Diária Admissível pela FAO/OMS
AEPT	Altura Equivalente a um Prato Teórico
A_i	Área do pico correspondente a cada nível de concentração
amu	“Atomic mass unit”, Unidade de massa atómica
α	Tempo de retenção relativo o padrão interno
AR	Área relativa ao padrão interno
As	Factor de assimetria
b	Declive da recta (equação da recta $y = a + bx$)
C_{100}	Concentração correspondente ao ponto experimental com melhor correlação, ou seja, ponto onde o quociente entre a área experimental e a área da regressão se aproxima mais de 1 no estudo dos valores normalizados
C	Concentração
C_i	Concentração correspondente à área do pico A_i
CAS	Registro único no banco de dados do Chemical Abstracts Service
d	Distância entre a perpendicular baixada a partir do máximo do pico e o ponto localizado no ramo ascendente do mesmo pico a um vigésimo da sua altura
DDD	Diclorodifenildicloroetano
DDE	Diclorodifenildicloroetileno
DDT	Diclorodifeniltricloroetano
DMCS	Dimetildiclorosilano
DPR	Desvio padrão relativo
DS^2	Diferença de variâncias

E	Coeficiente de extração do método de preparação, determinado experimentalmente e utilizado para o cálculo do MRL em fármacos destinados à preparação de extractos, tinturas ou outras formas farmacêuticas cuja preparação possa interferir no teor de pesticida no produto final
ECD	“Electron Capture Detector”, Detector de Captura Electrónica
EI	“Electron Impact Ionization”, Ionização por Impacto Electrónico
EMEA	“European Agency for the Evaluation of Medicinal Products”, Agência Europeia da Avaliação de Medicamentos
EPA	“Environmental Protection Agency”, Agência de Protecção Ambiental Americana
F	Valor tabelado de Fisher Snedecor
FAO	“Food and Agriculture Organization”, Organização das Nações Unidas para a Agricultura e Alimentação
FDA	“Food and Drug Administration”, Órgão governamental dos EUA que controla os alimentos, suplementos alimentares, medicamentos, cosméticos, equipamentos médicos, materiais biológicos e derivados do sangue humano
FPD	“Flame Photometric Detector”, Detector Fotométrico de Chama
GC	“Gas Chromatography”, Cromatografia em fase gasosa
GCB	“Graphitized Carbon Black”, Carbono preto grafitizado
GFC	“Gel Filtration Chromatography”, Cromatografia de Filtração em Gel
GPC	“Gel Permeation Chromatography”, Cromatografia de Permeação em Gel
HPLC	“High Performance Liquid Chromatography”, Cromatografia líquida de alta eficiência
ICH	“International Conference on Harmonisation”, Conferência Internacional da Harmonização.
INFARMED	Autoridade Nacional do Medicamento e dos Produtos de Saúde
K	Coeficiente de partilha
L	Comprimento da coluna
LC	“Liquid Chromatography”, Cromatografia em fase líquida
LD	Limite de Detecção
LEF	Laboratório de Estudos Farmacêuticos
LQ	Limite de Quantificação

Símbolos e Abreviaturas

MRL	“Maximum Residue Limit”, Limite Máximo de Resíduo
M	Massa corporal
MDD	“Daily dose of the drug”, Consumo diário do pesticida
MMR	Método Multiresíduo
MS	“Mass Spectrometry”, Espectrometria de Massa
<i>m/z</i>	Razão massa/carga
<i>n</i> ^{a)}	Número de pratos teóricos Número de pontos experimentais da recta de calibração
N	Número de pratos teóricos efectivos
NPD	“Nitrogen Phosphorus Detector”, Detector Azoto Fósforo
ODS	Octadecilsilano
OMS	Organização Mundial de Saúde
PDMS	Polidimetilsiloxano
<i>p.a.</i>	Pró-análise
PI	Padrão interno
PG	Valor teste de Fisher Snedecor
ppm	Partes por milhão (1/10 ⁶)
PSA	“Primary and secondary amines”, N-propiletlenodiamina que contém aminas primárias e secundárias
PTFE	Politetrafluoroetileno
QuEChERS	“Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe”
R	Resolução
<i>r</i> ²	Coefficiente de determinação da recta
Rec	Recuperação
<i>S</i>	Desvio padrão
<i>S</i> ²	Variância
<i>S</i> _{<i>y/x</i>}	Desvio padrão residual de uma função linear
<i>S</i> _{<i>y</i>2}	Desvio padrão residual de uma função polinomial

^{a)} Utilizado em função do contexto por ser a abreviatura estabelecida nas áreas da estatística e cromatografia.

$S_{y/x}^2$	Variância de uma função linear
S_{y^2}	Variância de uma função polinomial
SAX	“Strong Anion Exchanger”, Permutador forte de aniões
SIM	“Selected Ion Monitoring”, Monitorização de Ião Seleccionado
T	Temperatura
t_M	Tempo morto
t_R	Tempo de retenção
t'_R	Tempo de retenção ajustado
TIC	“Total Ion Current”, Corrente Iónica Total
$W_{0,05}$	Largura do pico a um vigésimo da sua altura
W_h	Largura do pico a meia altura
y_i	Sinal obtido para um padrão de determinada concentração
\bar{y}_i	Sinal estimado pela função de calibração linear para um padrão da mesma concentração
$\overline{y_i^2}$	Sinal estimado pela função de calibração polinomial do segundo grau para um padrão da mesma concentração

I. Introdução

1. Medicamentos à base de plantas e aspectos regulamentares

Até final do século XIX, as plantas foram a principal matéria prima utilizada no fabrico de medicamentos, sendo desta forma indicadas como os produtos mais antigos com actividade terapêutica.¹

Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), 70% a 80% da população mundial recorre à medicina não convencional para os seus cuidados de saúde, encontrando-se disponíveis, há várias centenas de anos, os produtos à base de plantas medicinais para o tratamento de doenças tanto na cultura ocidental como na cultura oriental. Dados da OMS referem ainda que 51% dos fármacos utilizados nos países industrializados são produzidos a partir de plantas.^{2,3}

As plantas medicinais foram, desta forma a base do desenvolvimento das actuais farmacopeias uma vez que muitos das substâncias activas das plantas tradicionalmente utilizadas foram isoladas e posteriormente colocadas à disposição dos utentes sob a forma de medicamentos.⁴

Os produtos à base de plantas medicinais são normalmente indicados para perturbações gastrointestinais, perturbações biliares, distúrbios psicológicos, gripes ou constipações e perturbações renais ou urinárias.^{5,6} Um estudo realizado pelo Laboratório de Estudos Farmacêuticos (LEF) em 1994 refere ainda que as situações relacionadas com o aparelho gastrointestinal e com o sistema nervoso são as que mais suscitam o aconselhamento de plantas medicinais por parte do farmacêutico de oficina.¹

Apesar deste tipo de produtos ter vindo a ser substituído gradualmente ao longo dos anos por outros contendo substâncias activas obtidas por síntese química, verifica-se que tem ocorrido recentemente um aumento da sua procura em alguns sectores das sociedades ocidentais, quer como prática de medicina alternativa, quer como complemento da medicina tradicional, o que conduz para a expansão da fitoterapia em determinados países como é o caso de Portugal.^{4,5,7,8}

O aumento do consumo de produtos à base de plantas medicinais nos últimos anos, poderá estar relacionado com vários factores, tais como a existência de um enraizamento da sua utilização tradicional por determinados sectores da população, ou pelo facto de, por serem normalmente constituídos por várias substâncias activas, proporcionarem propriedades terapêuticas únicas com ausência ou escassos efeitos secundários.¹

Segundo a Directiva 2004/24/CE do Parlamento Europeu e do Conselho de 31 de Março de 2004 ⁹, os produtos à base de plantas medicinais podem ser distinguidos em substâncias derivadas de plantas, preparações à base de plantas ou medicamentos à base de plantas, consoante as suas características.

Por substâncias derivadas de plantas entende-se como quaisquer plantas inteiras, fragmentadas ou cortadas, partes de plantas, algas, fungos e líquenes não transformados, geralmente secos, mas por vezes frescos. São igualmente consideradas substâncias derivadas de plantas alguns exsudados não sujeitos a um tratamento específico. As substâncias derivadas de plantas são definidas de forma exacta através da parte da planta utilizada e da taxonomia botânica, de acordo com o sistema binomial (género, espécie, variedade e autor). ⁹

As preparações à base de plantas são obtidas submetendo as substâncias derivadas de plantas a tratamentos como a extracção, a destilação, a expressão, o fraccionamento, a purificação, a concentração ou a fermentação. São disso exemplo as substâncias derivadas de plantas pulverizadas ou em pó, as tinturas, os extractos, os óleos essenciais, os sucos espremidos e os exsudados transformados. ⁹

No que diz respeito ao medicamento à base de plantas, este é definido como qualquer medicamento que tenha exclusivamente como substâncias activas uma ou mais substâncias derivadas de plantas, uma ou mais preparações à base de plantas ou uma ou mais substâncias derivadas de plantas em associação com uma ou mais preparações à base de plantas. Todos os medicamentos à base de plantas que tenham indicações para perturbações menores, utilizados sem vigilância médica, administrados por via oral, externa ou inalatória, que sejam objecto de uma longa utilização terapêutica e comprovadamente não nocivos, demonstrando efeitos farmacológicos ou uma eficácia plausível tendo em conta a sua utilização e experiência de longa data, são classificados como medicamentos tradicionais à base de plantas. ⁹

A preocupação com os produtos à base de plantas é relativamente recente, apesar de ter vindo a aumentar ao longo dos anos. Assim, é importante salientar que há 30 - 40 anos atrás existia apenas um número limitado de substâncias derivadas de plantas disponíveis na Farmacopeia Europeia. As determinações quantitativas quando aplicáveis eram efectuadas por métodos espectrofotométricos ou por titulações, não era efectuado o parâmetro doseamento em muitas das substâncias derivadas de plantas e o seu controlo da qualidade era baseado apenas em parâmetros macroscópicos e microscópicos e em alguns ensaios tais como a perda por secagem e cinzas. ¹⁰

Nos últimos anos verifica-se uma nova realidade, que se traduz num aumento significativo de requisitos regulamentares, numa necessidade de efectuar uma avaliação qualitativa e quantitativa das preparações e medicamentos à base de plantas e pela introdução de novas metodologias analíticas para efectuar o seu controlo da qualidade. ¹⁰

A tabela 1 mostra o aumento do número de monografias de substâncias derivadas de plantas (excluindo os exsudados) e de preparações à base de plantas nas várias edições da Farmacopeia Europeia desde 1971. Verifica-se que na última década ocorreu um aumento significativo do número de monografias. ¹⁰

Tabela 1 – Monografias de substâncias derivadas de plantas e preparações à base de plantas incluídas nas várias edições da Farmacopeia Europeia ¹⁰

Farmacopeia Europeia	Ano	Nº de Substâncias derivadas de plantas	Nº de Preparações à base de plantas
1ª Edição Volume II	1971	12	4
2ª Edição Fascículo 17º	1993	31	5
3ª Edição	1997	37	5
4ª Edição	2002	96	13
5ª Edição incluindo o Suplemento 5.4	2006	119	27

No que diz respeito aos medicamentos à base de plantas, muitas das suas propriedades e indicações terapêuticas foram determinadas empiricamente numa altura em que os conceitos de farmacotecnia e farmacodinamia eram desconhecidos. Hoje em dia, é cada vez mais preocupante a demonstração da qualidade, eficácia e inoquidade deste tipo de medicamentos. ^{3,6}

Para serem introduzidos no mercado, todos os medicamentos devem obrigatoriamente demonstrar qualidade, eficácia e segurança mas a demonstração destes três requisitos nem sempre é muito fácil nos medicamentos à base de plantas. O facto de serem misturas complexas de várias substâncias, torna necessário a existência de um esforço acrescido por forma a garantir a sua qualidade. A complexidade deste tipo de produtos deve-se não só à própria natureza dos componentes da matriz, mas também à variação biológica que está inerente, visto esta ser influenciada por diversos factores relacionados com a planta medicinal nomeadamente a sua origem, crescimento, colheita, secagem ou condições de armazenamento. Os dados relativos à eficácia e à segurança são também por vezes escassos. ^{3,11}

Desta forma, alguns extractos de plantas com longa tradição não reuniram todas as requisitos para serem licenciados como medicamentos. Alguns foram considerados como medicamentos, enquanto que outros são comercializados sem qualquer licenciamento, sendo considerados como suplementos alimentares, existindo por vezes “fronteiras” pouco claras entre medicamentos à base de plantas e suplementos alimentares. ^{4,11}

Com a publicação do Decreto-Lei nº 176/2006 de 30 de Agosto de 2006 que transpõe a Directiva 2004/24/CE do Parlamento Europeu e do Conselho de 31 de Março de 2004, é marcada uma profunda mudança no sector do medicamento, designadamente nas áreas do fabrico, controlo da qualidade, segurança, eficácia, introdução e comercialização dos medicamentos para uso humano. ¹²

A secção VI do referido Decreto-Lei estabelece a necessidade dos medicamentos tradicionais à base de plantas serem também submetidos a um processo de registo, embora simplificado para a sua introdução no mercado. A longa tradição do medicamento permite renunciar aos ensaios clínicos, na medida em que a sua eficácia é plausível. No entanto, não exclui possíveis receios quanto à sua segurança, podendo ser exigidos dados por parte das entidades regulamentares para a avaliação da segurança do medicamento. As normas da qualidade deverão também ser cumpridas, sendo necessária a demonstração da qualidade farmacêutica. ¹²

Segundo Directiva 2004/24/CE, o aspecto da qualidade do medicamento é independente da sua utilização tradicional, pelo que não deve existir nenhuma derrogação em relação aos testes físico-químicos, biológicos ou microbiológicos. Os medicamentos deverão cumprir as normas da qualidade constantes das monografias relevantes da Farmacopeia Europeia ou da farmacopeia de um Estado-Membro.⁹

Dada a especificidade dos medicamentos à base de plantas, a Directiva 2004/24/CE, refere a necessidade de criação de um Comité dos Medicamentos à Base de Plantas no âmbito da Agência Europeia da Avaliação dos Medicamentos (EMA) que deve desempenhar funções relativas ao registo simplificado e à autorização de medicamentos, nomeadamente através da criação de monografias comunitárias de plantas medicinais, elaboração de uma lista de substâncias derivadas de plantas, preparações e associações para a sua utilização nos medicamentos tradicionais à base de plantas. Este comité deve ser composto por peritos em medicamentos à base de plantas.⁹

Assim sendo, em Portugal a partir da publicação do Decreto-Lei nº 176/2006, todos os novos produtos à base de plantas que possuam alguma indicação terapêutica serão considerados como medicamentos e como tal, para a sua introdução no mercado é necessário submeter um processo de registo à Autoridade Nacional do Medicamento e dos Produtos de Saúde (INFARMED) que procederá à sua avaliação. Todos aqueles que se encontrem já no mercado terão um prazo de sete anos para proceder à submissão do processo de registo ao INFARMED.^{9,12}

Como parte integrante do processo de registo, é necessária a demonstração da qualidade e entre os vários parâmetros a ter em conta no controlo da qualidade dos medicamentos à base de plantas, a EMA destaca a pesquisa de contaminantes, nomeadamente a pesquisa de resíduos de pesticidas.¹³

2. Contaminantes - Resíduos de Pesticidas

2.1. Definição e sua utilização ao longo dos tempos

Os pesticidas são os agentes empregues para prevenir, destruir ou controlar as pragas, que são definidas como todo e qualquer organismo que seja indesejável aos interesses do Homem. Segundo a Agência de Protecção Ambiental Americana (EPA), o termo pesticida aplica-se a vários tipos de agentes, entre os quais se destacam os insecticidas, herbicidas, fungicidas, algicidas, agentes desfolhantes, fumegantes.^{14,15}

O Homem desde os tempos mais remotos tem actuado por forma a evitar as pragas. No entanto, só a partir da segunda metade do século XIX é que se considerou que as substâncias químicas permitiram controlar as pragas com algum grau de sucesso.^{15,16}

A utilização dos pesticidas ao longo dos tempos foi caracterizada por várias fases: Período da Euforia, Período da Desilusão, Período da Condenação e Período da Procura do Equilíbrio.¹⁶

Período da Euforia – Anos 40:

Este período iniciou-se em 1939 com a descoberta, que valeu a Paul Meuller a atribuição do Prémio Nobel, de que o diclorodifeniltricloroetano (DDT) poderia funcionar como um pesticida.¹⁶

As primeiras aplicações de DDT causaram um espantoso aumento na produção agrícola, tendo em alguns casos conduzido a um aumento da produção para quatro vezes mais.¹⁶

Determinados compostos foram vistos como miraculosos pois conseguiram “dominar” pestes incontrolláveis até à data. A redução de casos de malária e tifo após a utilização de DDT e de fungicidas carbamatos foi uma das descobertas científicas de maior importância a nível humanitário.¹⁶

Período da Desilusão – Anos 50:

Ao período de euforia seguiu-se um período de maior apreensão devido a pareceres que indicavam a não existência de evidência suficiente relativamente à segurança da utilização destes compostos e à necessidade de se proceder a uma maior regulamentação.¹⁶

A informação relativa aos efeitos adversos dos pesticidas no solo e água levaram a uma fase de alarme, especialmente quando foi descoberto que estas substâncias apresentavam uma elevada persistência ao nível ambiental. Relatórios de que novas colheitas tinham sido recontaminadas por pestes secundárias contribuíram igualmente para esta desilusão.¹⁶

Período da Condenação – Anos 60 e 70:

A década de 60 foi caracterizada pela existência de preocupações ambientais assim como relatos de que a aplicação de pesticidas nos campos teria conduzido a um envenenamento de pássaros e peixes.¹⁶

O aparecimento persistente de pestes secundárias e dados de que os insectos se tinham tornado cada vez mais resistentes e imunes aos efeitos de pesticidas, levaram à utilização de maior quantidade de pesticidas e de doses cada vez mais fortes.¹⁶

Ao nível da saúde pública, os seus receios tiveram como base o conhecimento de que o DDT se degradava em diclorodifenildicloroetano (DDD) e diclorodifenildicloroetileno (DDE), sendo estes metabolitos armazenados durante um período de tempo indeterminado no tecido adiposo.¹⁶

A utilização do Agente Laranja (mistura de dois herbicidas) como agente desfolhante na Guerra do Vietname e os seus efeitos conduziram a um aumento das incertezas acerca da utilização deste tipo de produtos.¹⁶

Todos estes factos contribuíram para que o DDT fosse banido em alguns países 30 anos após a sua introdução.¹⁶

Período da Procura do Equilíbrio – a partir dos anos 80:

A partir dos anos 80 têm sido efectuados estudos com o objectivo de maximizar os benefícios da utilização dos pesticidas e minimizar os seus riscos ao nível da saúde pública, da agricultura e do meio ambiente por forma a conduzir a uma utilização racional e segura deste tipo de produtos.¹⁶

2.2. Classes de pesticidas

Os pesticidas podem ser classificados de acordo com a composição química, função e modo de acção nos organismos.

Quimicamente podem ser divididos em agentes biológicos, inorgânicos e orgânicos, de origem sintética ou natural, sendo a grande maioria constituída por misturas complexas de moléculas orgânicas.^{2,15,16}

Das várias classificações possíveis para pesticidas existe a divisão em 4 classes distintas: Pesticidas Organoclorados, Organofosforados, Piretróides e Carbamatos.

2.2.1. Pesticidas Organoclorados

Os pesticidas organoclorados foram amplamente utilizados entre meados dos anos 40 até aos anos 60.¹⁶

Como pesticidas pertencentes a este grupo destaca-se o DDT e o seu metabolito DDE, a Dieldrina, a Aldrina, a Endrina, o Heptacloro, o Lindano, entre outros.^{2,16}

O mais conhecido e mais polémico é sem dúvida o DDT que foi até determinada altura considerado como o pesticida perfeito por ser extremamente eficaz contra várias pragas, tendo sido inicialmente considerado seguro.¹⁶

Os compostos pertencentes a esta classe apresentam como características principais uma baixa volatilidade, elevada estabilidade química, lipossolubilidade, lentas taxas de degradação e biotransformação o que faz com que sejam extremamente persistentes a nível ambiental, conduzindo a uma bioconcentração e bioamplificação ao longo da cadeia alimentar. Desta forma, estes compostos podem persistir nos solos vários meses ou até vários anos após a sua aplicação, ao nível das plantas acumulam-se nas partes edíveis e no que diz respeito à sua acumulação nos animais e humanos, esta é feita principalmente ao nível do seu tecido adiposo.^{2,16,17,18,19,20,21,22}

A sua elevada persistência ambiental conduziu a que a utilização de muitos compostos pertencentes a esta classe fosse banida em alguns países.^{2,14,16,21,22}

Carreño *et al.* verificaram que apesar da utilização dos isómeros do DDT (*o,p'*-DDT e *p,p'*-DDT) ter sido banida em Espanha desde 1977, níveis destes compostos continuam a ser detectados cerca de 30 anos depois no soro de uma população de indivíduos do sexo masculino.¹⁷

A toxicidade aguda dos pesticidas organoclorados localiza-se ao nível do sistema nervoso central e fígado, enquanto que a toxicidade crónica é caracterizada por conduzir a problemas hematopoiéticos, sendo alguns compostos considerados agentes carcinogénicos e desreguladores endócrinos.^{16,17,18,22}

2.2.2. Pesticidas Organofosforados

Estes compostos foram desenvolvidos durante o século XIX e são utilizados frequentemente na agricultura como insecticidas.^{14,16}

Como pesticidas pertencentes a este grupo destaca-se o Malatião e o Paratião.^{2,16}

Ao contrário dos organoclorados, estes compostos não são persistentes, não se verificando o efeito de concentração ao longo da cadeia alimentar. Devido ao seu reduzido tempo de semi-vida, têm vindo gradualmente a substituir os pesticidas organoclorados.^{2,16,23}

No entanto, estes compostos apresentam uma elevada toxicidade aguda, sendo os seus efeitos irreversíveis.¹⁶

O seu mecanismo de acção assenta na enzima acetilcolinestraxe. A inibição da acetilcolinestraxe provoca uma acumulação da acetilcolina nos terminais nervosos, o que resulta em convulsões podendo levar à morte.^{2,14,16}

Alguns compostos demonstraram igualmente ser teratogénicos e mutagénicos.¹⁶

2.2.3. Pesticidas Carbamatos

Os carbamatos são normalmente utilizados na agricultura sempre que os insectos se tornam resistentes aos compostos organofosforados.¹⁶

Dos vários compostos pertencentes a este grupo destacam-se o Aldicarbe e o Carbarilo.¹⁶

Este grupo de pesticidas é caracterizado por afectar o sistema nervoso através da acetilcolinestrerase. O seu mecanismo de acção é muito semelhante ao dos pesticidas organofosforados mas os seus efeitos na enzima são geralmente reversíveis.^{14,16}

2.2.4. Pesticidas Piretróides

Os pesticidas piretróides foram desenvolvidos como uma versão sintética de uma classe de insecticidas de origem natural extraídos de uma planta, o piretro.^{14,20}

Desta classe fazem parte a Permetrina e a Cipermetrina.

Estes compostos apresentam um mecanismo de acção semelhante ao dos pesticidas organoclorados. No entanto, à sua elevada eficácia é adicionada uma reduzida toxicidade nos mamíferos. É a classe de pesticidas que apresenta menores efeitos nocivos para o Homem e para o meio ambiente.^{14,20}

2.3. Resíduos de pesticidas em medicamentos à base de plantas

O facto das plantas medicinais estarem expostas a um conjunto de condições ambientais, pode ocasionar uma contaminação por substâncias orgânicas ou inorgânicas, quer de origem natural ou sintética tais como microrganismos, metais pesados, material radioactivo ou resíduos de pesticidas.³

A Farmacopeia Europeia apresenta monografias gerais para o despiste de contaminantes como é o caso dos metais pesados, pesticidas, contaminação microbiana e aflatoxinas.^{13,24}

No âmbito dos produtos à base de plantas medicinais, o pesticida é definido pela Farmacopeia Portuguesa como sendo qualquer substância ou associação destinada a prevenir, destruir ou combater pragas e espécies indesejáveis que causem danos durante a produção, transformação, armazenagem, transporte ou distribuição de fármacos de origem vegetal. Engloba também substâncias utilizadas como reguladoras do crescimento de plantas, desfolhantes ou agentes secantes e substâncias aplicadas nas culturas para proteger os produtos contra a deterioração durante a armazenagem e transporte.²⁵

Tal como para outro tipo de plantas, é muito difícil cultivar em grande escala as plantas medicinais sem recorrer à utilização de agentes de protecção. É indiscutível a contribuição dos pesticidas para o aumento da produção agrícola, melhoria da qualidade assim como da variedade dos produtos.^{2,6,26}

Este facto reforça a necessidade da utilização racional dos pesticidas e do respeito pelo seus intervalos de segurança para que seja possível manter o conteúdo dos seus resíduos dentro dos limites admissíveis.⁶

Esta questão é particularmente preocupante, uma vez que hoje em dia os resíduos de pesticidas estão, muitas das vezes, presentes em qualquer tipo de plantas quer estas tenham sido ou não tratadas com pesticidas devido à elevada propagação ambiental destes agentes. Mesmo quando utilizados correctamente, os pesticidas podem causar danos ecológicos, problemas de saúde pública e originar a presença de resíduos tóxicos nos produtos vegetais.^{6,26}

A presença de pesticidas em plantas medicinais, infusões, tinturas, óleos essenciais e outros produtos à base de plantas tem sido reportada em vários estudos.^{2,7,27,28,29}

Foi demonstrado que o consumo de produtos à base de plantas medicinais é uma importante fonte de exposição do Homem aos pesticidas organoclorados, sendo estes os mais frequentemente encontrados neste tipo de produtos.^{2,3} Relativamente a este assunto, a OMS refere que, dos vários tipos de pesticidas, apenas os hidrocarbonetos clorados e alguns organofosforados possuem uma elevada acção residual, sendo assim essencial a sua determinação.³⁰

O aporte de resíduos de pesticidas a partir de plantas medicinais não deve, no entanto exceder 1% do aporte total devido a todas as outras fontes, incluindo os alimentos e água de consumo, o que justifica o facto de existir pouca informação no que diz respeito à presença de pesticidas em plantas medicinais, comparativamente a publicações relativas a resíduos de pesticidas nos alimentos.^{2,3,30}

A fase de processamento a que as plantas são sujeitas pode ocasionar alteração dos teores dos seus possíveis contaminantes. No que diz respeito aos resíduos de pesticidas, o processo de secagem a que a planta está sujeita pode conduzir à sua parcial decomposição.⁶

Algumas plantas medicinais podem conter um teor elevado de um determinado resíduo de pesticida, no entanto, devido a processos de extracção a que são sujeitas o teor final pode ser bastante reduzido. Considera-se desta forma essencial a sua determinação não só na matéria prima (planta medicinal) mas também na forma final de consumo.³⁰

A partir dos anos 50 a *Food and Drug Administration* (FDA) preocupou-se em estabelecer limites máximos admissíveis. O aparecimento, ao longo dos anos, de metodologias analíticas cada vez mais sensíveis e que permitem detectar quantidades cada vez mais reduzidas destes compostos, tem auxiliado para o estabelecimento destes limites.¹⁶

A OMS tem efectuado uma série de recomendações para promover a elaboração de uma listagem internacional dos pesticidas adequados e não adequados para o cultivo de plantas medicinais, estabeleceu os limite máximos de resíduo (MRL), assim como a metodologia apropriada para a sua análise.²

Para a avaliação toxicológica dos resíduos de pesticidas nos produtos à base de plantas medicinais e determinação dos respectivos MRL deve ser tido em conta não só o seu aporte (via de administração, dosagem e duração do tratamento), mas também a sensibilidade acrescida de determinados grupos populacionais tais como crianças, grávidas e idosos. Factores tais como a sua bioacumulação, bioreactividade e possíveis interacções sinérgicas devem ser também considerados.²

Introdução

A determinação de resíduos de pesticidas em produtos à base de plantas medicinais tem sido sistematicamente mencionada. Muitos documentos emitidos pela EMEA indicam que um dos ensaios aplicável aos produtos à base de plantas medicinais é a determinação de resíduos de pesticidas devendo ser seguida, sempre que possível, a metodologia e os critérios de aceitação definidos na Farmacopeia Europeia.^{13,24}

Segundo a *guideline* emitida pela EMEA “*Guideline on specifications: test procedures and acceptance criteria for herbal substances, herbal preparations and herbal medicinal products/traditional herbal medicinal products*”¹³, a qualidade das substâncias derivadas de plantas, preparações à base de plantas e medicamentos à base de plantas é determinada pela qualidade da matéria prima, cumprimento de boas práticas de fabrico e controlo do processo ao longo do desenvolvimento e fabrico do produto.

Esta *guideline* estabelece as especificações (testes, procedimentos e critérios de aceitação) utilizadas para assegurar a qualidade destes produtos na libertação dos lotes e durante toda a vida do produto. A tabela 2 ilustra os vários parâmetros a ter em conta para na avaliação da qualidade nas substâncias derivadas de plantas, preparações à base de plantas ou medicamentos à base de plantas.¹³

Tabela 2 – Parâmetros a ter em consideração na avaliação da qualidade de substâncias derivadas de plantas, preparações à base de plantas ou medicamentos à base de plantas¹³

Substâncias derivadas de plantas	Preparações à base de plantas	Medicamentos à base de plantas
Definição	Definição	Descrição
Caracterização	Caracterização	Ensaio específicos de acordo com a forma farmacêutica em questão
Identificação	Identificação	Identificação
Doseamento	Doseamento	Doseamento
Testes: - Tamanho de partículas - Conteúdo em água - Contaminantes (impurezas inorgânicas, metais tóxicos, limites microbiológicos, micotoxinas, pesticidas e agentes fumegantes)	Testes: - Conteúdo em água - Impurezas (solventes residuais, impurezas inorgânicas, metais tóxicos, limites microbiológicos, micotoxinas, pesticidas e agentes fumegantes)	Testes: - Impurezas das substâncias derivadas e plantas e/ou preparações à base de plantas (resíduos de pesticidas, agentes fumegantes, metais pesados) - Solventes residuais - Produtos de degradação das preparações à base de plantas ou substâncias derivadas de plantas - Limites microbiológicos

A *guideline* - “*Note for guidance on quality of herbal medicinal products*”²⁴, estabelece que, para as substâncias derivadas de plantas e preparações à base de plantas deve ser sempre testada a qualidade microbiológica, a presença de resíduos de pesticidas e agentes fumegantes, metais tóxicos e outros contaminantes a não ser que a sua omissão seja justificável. Todos os procedimentos analíticos a utilizar e que não estejam definidos em farmacopeias, devem ser validados de acordo com a *guideline* ICH “*Validation of analytical procedures: methodology*” (CPMP/ICH/281/95)³¹ e *guideline* VICH (CVMP/VICH/591/98)³².

No que diz respeito a aspectos regulamentares para este tipo de produtos, são as monografias das farmacopeias que se sobrepõem. Algumas farmacopeias fixaram os limites para um determinado conjunto de pesticidas, expressos em mg de pesticida/kg de planta (ppm) e respectiva metodologia para a sua determinação, tal como se encontra na monografia “*Pesticides Residues*” descrita na Farmacopeia Europeia.^{25,33,34,35}

Tabela 3 – Limites (mg/kg de planta) para pesticidas³³

Substância	Limite (mg/kg)
Alacloro	0,02
Aldrina e Dieldrina (soma de)	0,05
Azinfos-metilo	1,0
Bromopropilato	3,0
Cipermerina (e isómeros)	1,0
Clordano (mistura dos isómeros <i>cis</i> , <i>trans</i> e oxiclordano)	0,05
Clorofenvinfos	0,5
Clorpirifos	0,2
Clorpirifos-metilo	0,1
DDT (mistura de <i>p,p'</i> -DDT, <i>o,p'</i> -DDT, <i>p,p'</i> -DDE e <i>p,p'</i> -TDE)	1,0
Deltametrina	0,5
Diazinão	0,5
Diclorvos	1,0
Ditiocarbamatos (em CS ₂)	2,0
Endossulfano (mistura de isómeros e de sulfato de endossulfano)	3,0
Endrina	0,05
Etião	2,0
Fenvalerato	1,5
Fonofos	0,05
Fosalona	0,1
Heptacloro (mistura de Heptacloro e Heptacloro-epóxido)	0,05
Hexaclorobenzeno	0,1
Hexaclorociclo-hexano (isómeros excepto o γ)	0,3
Lindano (γ - Hexaclorociclo-hexano)	0,6
Malatião	1,0
Metidatião	0,2
Paratião	0,5
Paratião-metilo	0,2
Permetrina	1,0
Piperonilo-butóxido	3,0
Piretrinas (mistura de)	3,0
Pirimifos-metilo	4,0
Quintozeno (mistura de quintozeno, pentacloroanilina e sulfureto de metilpentaclorofenil)	1,0

Os limites para pesticidas que não estão indicados na tabela 3, devem estar de acordo com os limites definidos na directivas da União Europeia 76/895 e 90/642 relativas à fixação de teores máximos de resíduos de pesticidas nas e sobre as frutas e produtos hortícolas e directiva, incluindo os seus anexos e sucessivas actualizações.^{33,36,37}

No caso de pesticidas que não se encontrem indicados nas farmacopeias ou nas directivas europeias, os seus limites devem ser calculados através da seguinte expressão:³³

$$MRL = \frac{ADI \times M}{MDD \times 100} \quad (\text{Equação 1})$$

Sendo:

MRL - Limite máximo de resíduo;

ADI - Dose diária admissível pela FAO/OMS, expressa em mg/kg de massa corporal;

M - Massa corporal expressa em kg (60 kg);

MDD - Consumo diário do fármaco, expresso em kg.

No caso de fármacos destinados à preparação de extractos, tinturas ou outras formas farmacêuticas cuja preparação possa interferir no teor de pesticida no produto final, a Farmacopeia indica a seguinte expressão:³³

$$MRL = \frac{ADI \times M \times E}{MDD \times 100} \quad (\text{Equação 2})$$

Sendo:

E - Coeficiente de extracção do método de preparação, determinado experimentalmente.

A Farmacopeia Europeia indica ainda que sempre que determinada planta exija uma cultura particular, ou apresente um metabolismo ou estrutura que possa levar a um teor de pesticida superior ao normal, podem ser autorizados limites mais elevados.³³

Apesar do método da Farmacopeia para a determinação de resíduos de pesticidas ser o método oficial, apresenta, segundo vários autores, algumas limitações.^{38,39}

Assim, tal como foi referido anteriormente, devem ser cumpridos os limites das directivas da União Europeia 76/895 e 90/642 sempre que a Farmacopeia não indica os limites máximos para determinado pesticida. No entanto, alguns autores alertam para o facto da informação referida nestas directivas não ser por vezes apropriada, uma vez que se refere a determinados grupos de produtos alimentares, não abrangendo desta forma as plantas medicinais. É referido ainda o facto do método multiresíduo descrito pela Farmacopeia ser apenas aplicável a 25 dos 34 pesticidas indicados na sua tabela dos limites máximos. Autores referem também, que o número de compostos indicado na Farmacopeia não é representativo do espectro de pesticidas encontrado em plantas medicinais, devendo ser actualizado para um número de 70.^{38,39}

3. Metodologia analítica

3.1. Aspectos gerais

Os métodos publicados para a análise de resíduos de pesticidas em produtos à base de plantas medicinais são muito semelhantes aos utilizados para a análise de produtos alimentares. São habitualmente utilizados métodos multiresíduo (MMR) sempre que uma amostra apresenta um historial desconhecido da exposição a pesticidas, ou quando não se procura um pesticida alvo, dependendo a escolha do método das características dos analitos. Os MMR apresentam a vantagem de determinarem simultaneamente mais do que um resíduo de pesticida numa única análise, o que permite uma diminuição do tempo e do custo de análise. Por vezes, quando se desconfia da presença de determinado pesticida que devido às suas características não possa ser determinado por MMR, deve ser utilizado um método alternativo específico para esse composto.^{26,30,40}

A metodologia geral descrita nas normas europeias e nas várias farmacopeias para a determinação de resíduos de pesticidas envolve os passos de extracção, separação e detecção com especial atenção para uma correcta identificação e confirmação do composto em causa.^{25,33,34,41,42}

A extracção dos resíduos da matriz da amostra é efectuada através de solventes apropriados com o objectivo de obter uma máxima eficiência da extracção e uma co-extracção mínima de substâncias que possam constituir interferentes.⁴²

Segue-se uma fase de purificação com o objectivo de remover as substâncias interferentes com a mínima perda de analito, obtendo-se uma solução final na qual o solvente deve ser apropriado para a determinação quantitativa através do método seleccionado.^{42,43}

A determinação dos analitos é normalmente efectuada por cromatografia em fase gasosa (GC) associada a vários detectores que devem ser escolhidos consoante as características dos compostos a pesquisar.⁴²

A OMS refere que só os hidrocarbonetos clorados e poucos organofosforados possuem alguma acção residual, pelo que quando a exposição da planta a pesticidas é desconhecida, devem ser pesquisados estes compostos, utilizando para este efeito o detector de captura de electrões (ECD) para os organo-halogenados, o detector azoto fósforo (NPD) ou o detector fotométrico de chama (FPD) para os organofosforados.³⁰

Por fim deve ser efectuada uma confirmação dos analitos, devendo ser estabelecidos procedimentos para a confirmação da identificação e quantificação dos resíduos observados, nomeadamente nos casos onde foi ultrapassado o limite máximo de resíduo (MRL). A Norma Portuguesa 12393-3 referente a métodos multi-resíduos para determinação de resíduos de pesticidas por cromatografia em fase gasosa em alimentos não gordos refere como ensaios de confirmação possíveis a utilização de diferentes

colunas de GC, a utilização de diversos detectores de GC, a cromatografia em camada fina, reacções de derivatização, a espectrometria de massa, entre outros. A espectrometria de massa é considerada a técnica de confirmação menos sujeita a equívocos.^{42,44,45}

A OMS define alguns aspectos gerais da metodologia analítica para a determinação de resíduos de pesticidas em produtos à base de plantas medicinais.³⁰

No que diz respeito às amostras, a OMS refere que estas devem ser analisadas o mais rapidamente possível após a sua colheita antes da ocorrência de alguma alteração física ou química. No caso de ser necessário conservar as amostras por longos períodos antes da sua análise, devem utilizar-se, sempre que possível, recipientes estanques e o armazenamento deve ser efectuado sob refrigeração.³⁰

Como possíveis fontes de degradação de pesticidas destaca-se a luz. Desta forma, a amostra e todas as soluções e extractos devem ser mantidos ao abrigo da luz.³⁰

O tipo de material a utilizar durante a análise não deve interferir com a amostra. Assim, todos os solventes e reagentes a utilizar devem ser livres de substâncias que possam interferir ou que provoquem alguma degradação dos pesticidas na amostra. Os solventes devem possuir um elevado grau de pureza e devem ser sempre efectuados ensaios em branco por forma a demonstrar a ausência de interferência com a matriz a analisar.³⁰

Durante a execução da metodologia analítica é feita uma referência à fase de concentração das soluções, nomeadamente na fase de evaporação de solvente não sendo aconselhável a evaporação total do solvente pois poderá levar à perda de resíduos de pesticidas.³⁰

3.2. Extracção e Purificação

O processo de extracção sobre a amostra é um passo fundamental na análise que tem por objectivo extrair os compostos desejáveis para posterior separação e caracterização. A maior parte do tempo de análise é consumido nesta fase e é também a fase que pode originar mais erros. Este processo pode apresentar dificuldades específicas nomeadamente em matrizes complexas.^{8,18,26}

Os processos de extracção tradicionais utilizam uma elevada quantidade de solventes orgânicos e são geralmente processos muito morosos e dispendiosos.⁸

A título de exemplo, a Farmacopeia Europeia que apresenta um método aplicável a fármacos vegetais refere que a extracção dos resíduos de pesticidas deve ser efectuada recorrendo à homogeneização da amostra em acetona, seguindo-se uma filtração, evaporação quase à secura e diluição final em tolueno. O método N da Norma Portuguesa 12393-2 que apresenta aplicação em chás e similares de chás refere a homogeneização da amostra em acetona após a sua hidratação, seguindo-se uma filtração, saturação com cloreto de sódio para remover o excesso de água, extracções sucessivas com diclorometano, sendo este solvente posteriormente evaporado quase à secura.^{25,46}

Vários artigos referem outros tipos de extracção para a determinação de resíduos de pesticidas, nomeadamente a extracção assistida por microondas ou extracção com Soxhlet que foi o método de eleição até início dos anos 90 e a utilização de ultrassons e técnicas de extracção sólido-líquido turbulentas. Estes processos de extracção foram aplicados em matrizes diversas tais como sedimentos, cortiça, relva e vegetais.^{22,47,48}

Durante a etapa de extracção, sempre se procede à evaporação do solvente e concentração dos extractos, podem ocorrer perdas do analito. Para evitar este facto deve ser utilizado um pequeno volume de solvente de ponto de ebulição elevado (por exemplo o tolueno) e a temperatura de evaporação deve ser mantida tão baixa quanto possível. É preferível utilizar uma corrente de azoto ou evaporação sob vácuo em vez do ar pois este pode conduzir mais facilmente a oxidações ou introdução de água ou outros contaminantes.⁴⁵

A purificação é um dos passos mais importantes da metodologia analítica. Se não for possível eliminar completamente os interferentes, pelo menos é necessário conduzi-los a níveis extremamente reduzidos.^{43,49}

A cromatografia de exclusão molecular seguida de purificação com colunas de sílica gel encontra-se mencionada em diversas metodologias para a determinação de resíduos de pesticidas tais como: a Farmacopeia Europeia cujo método é aplicável a fármacos vegetais, a Norma Portuguesa 12393-2 cujo método N foi testado em chás e produtos similares a chás e métodos EPA aplicáveis a água, solo e sedimentos.^{33,44,50}

3.2.1. Cromatografia de exclusão molecular

A cromatografia de exclusão molecular é uma técnica baseada na separação das partículas com base no seu tamanho. Neste tipo de separação não existe nenhuma interacção física ou química entre as moléculas do analito e a fase estacionária, sendo muito utilizada na separação de espécies de elevada massa molecular.^{51,52,53}

A amostra é introduzida numa coluna, que contém determinado enchimento constituído por partículas de sílica de pequena dimensão (5 µm a 10 µm) ou de um polímero contendo uma rede uniforme de poros na qual se difundem as moléculas do solvente e do soluto.⁵⁴

O tempo de permanência na coluna é dependente do tamanho efectivo das moléculas do analito, sendo as moléculas de tamanho superior as primeiras a serem eluídas. Como as moléculas mais pequenas penetram nos poros são eluídas posteriormente. Entre estes dois extremos encontram-se as moléculas de tamanho intermédio cuja capacidade de penetração nos poros é dependente do seu diâmetro.^{51,52,54}

É normalmente utilizada uma bomba que faz com que a fase móvel percorra a coluna a um determinado fluxo e um colector de fracções onde são colhidas as fracções de interesse.^{50,51}

A cromatografia de exclusão molecular é subdividida em Cromatografia de Filtração em Gel (GFC) e Cromatografia de Permeação em Gel (GPC) no caso de utilizar respectivamente solventes aquosos e fase estacionária hidrofílica ou solventes orgânicos apolares e fase estacionária hidrofóbica.^{51,54}

No caso da purificação de matrizes para a pesquisa de pesticidas é muito utilizada a GPC que é uma técnica de purificação que utiliza solventes orgânicos ou géis hidrofóbicos na separação de macromoléculas naturais ou sintéticas. O empacotamento é poroso e é caracterizado por uma uniformidade no tamanho do poro. Para a selecção do gel há que ter em consideração o facto do tamanho dos poros ter que ser superior ao tamanho das moléculas que se pretende separar.^{26,50}

A GPC é o método universalmente mais aplicado na remoção de compostos de elevada massa molecular. É recomendada para a remoção da amostra de lípidos, polímeros, copolímeros, proteínas, resinas naturais, componentes celulares, vírus, esteróides e compostos dispersos de massa molecular elevada. Como é adequada tanto para analitos polares como apolares, tem um campo de aplicação muito vasto.^{55,56}

A Farmacopeia Europeia e o método N da Norma Portuguesa 12393-2 referem o processo de purificação por GPC recorrendo a uma coluna com o copolímero estireno-divinilbenzeno, sendo a fase móvel tolueno na Farmacopeia Europeia, enquanto que na Norma Portuguesa a fase móvel é constituída por uma mistura de ciclohexano e acetato de etilo (1:1).^{33,46}

Esta técnica apresenta a limitação de não oferecer selectividade no que diz respeito a interferência de compostos de baixa massa molecular. Esta selectividade pode ser ganha aplicando posteriormente técnicas de purificação adicional em escala reduzida tais como técnicas de separação cromatográfica em sílica, florissil ou alumina.^{26,53,54}

Apresenta igualmente a desvantagem de ser dispendiosa no que diz respeito ao tempo de análise necessário para cada amostra e ao volume de solvente gasto.^{26,53,54,57}

3.2.2. Extracção em fase sólida - Purificação com sílica gel

O processo de extracção em fase sólida é muito utilizado na purificação de extractos contendo pesticidas organoclorados, sendo a sílica gel utilizada para esta finalidade desde os anos 60.^{53,58}

A purificação recorrendo a sílica gel pode ser efectuada recorrendo a uma coluna cromatográfica ou cartuchos de extracção em fase sólida consoante o volume de extracto a purificar, apresentando a coluna em geral uma maior capacidade de purificação devido à maior quantidade de adsorvente que utiliza.^{58,59}

O processo de extracção em fase sólida, recorre habitualmente ao acondicionamento da coluna ou dos cartuchos pré-empacotados com um solvente apropriado antes da sua utilização, segue-se a introdução de alíquotas do extracto da amostra, ocorrendo posteriormente a eluição com um solvente adequado, ficando retidos os compostos interferentes indesejáveis.⁵⁸

O controlo da velocidade de eluição é feito com o auxílio de uma bomba de vácuo associada a um regulador de pressão o que permite a repetibilidade dos resultados.^{50,59}

A extracção em fase sólida apresenta como vantagens a reduzida utilização de solventes orgânicos, a possibilidade de utilização de uma quantidade reduzida de amostra, a possibilidade de automatização do processo e o facto de ser uma técnica pouco dispendiosa.^{26,60}

A escolha do solvente a utilizar para a extracção em fase sólida deve ter em conta vários aspectos, tais como, a sua volatilidade por forma a que seja evaporado facilmente mas sem perda dos compostos alvo e deve ser adequado para os compostos em questão, permitindo apenas uma co-extracção mínima de possíveis interferentes da matriz.⁶⁰

É um processo bastante eficiente na remoção de compostos fenólicos que interferem na análise dos pesticidas.⁵³

O método EPA 3630 refere ainda que a coluna ou os cartuchos a utilizar devem ser de material inerte tal como o vidro ou PTFE por forma a minimizar a contaminação por ftalatos.⁵⁸

A Farmacopeia Europeia e o método N da Norma Portuguesa 12393-2 referem a purificação adicional dos extractos com colunas de sílica gel desactivadas utilizando como eluentes tolueno e n-hexano respectivamente.^{33,46}

Vários autores demonstraram também que a extracção em fase sólida com adsorventes C18, Florisil ou SAX/PSA (*Strong Anion Exchanger/Primary Secondary Amine*) foi extremamente útil no processo de extracção e purificação de matrizes complexas na análise de resíduos de pesticidas.^{8,21,23,49,50,60,61,62,63}

3.2.3. Métodos alternativos

É importante o desenvolvimento de metodologias de preparação de amostras que tragam vantagens comparativamente aos processos mais convencionais, nomeadamente na redução de solventes orgânicos utilizados, redução de custos, melhoria da eficiência de extracção e selectividade ou mesmo ao nível da possibilidade de automatização do método. Por isso, nos últimos anos têm surgido vários trabalhos que evidenciam a utilização de métodos recentes de preparação de amostra, tendo sido demonstrado que alguns deles apresentam uma maior rapidez e simplicidade de execução.^{8,18,64}

Das várias metodologias de preparação de amostra evidenciadas destacam-se a extracção em fluido supercrítico^{64,65,66}, dispersão da matriz em fase sólida^{67,68}, microextracção em fase sólida^{69,70,71} e extracção sorptiva com barra agitadora⁷².

Extracção em fase sólida dispersiva - QuEChERS

Dos vários métodos que têm sido desenvolvidos nos últimos anos, só alguns conseguem conjugar simultaneamente a obtenção de bons resultados analíticos para uma vasta gama de compostos com a rapidez tão desejada pelos laboratórios.^{67,73}

Em 2003 Anastassiades *et al.* introduziram um novo método para a extracção de resíduos de pesticidas em alimentos (frutos e vegetais) e potencialmente noutras matrizes, que foi caracterizado por ser um método simples, rápido e pouco dispendioso, comparativamente aos métodos mais clássicos.^{67,74,75}

A metodologia desenvolvida envolve uma extracção sólido-líquido seguida de uma extracção em fase sólida dispersiva, tendo sido designada por QuEChERS devido às iniciais dos adjectivos que o caracterizam: “*Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe*”.^{73,74}

Este método apresenta várias vantagens comparativamente aos métodos mais tradicionais, nomeadamente no que diz respeito à sua exactidão onde foram obtidas taxas de recuperação superiores a 85% para a maioria dos compostos.^{67,73}

A reduzida utilização de solventes e a ausência de utilização de solventes clorados nesta metodologia, traz vantagens económicas e ambientais.⁷³

O método apresenta também outro tipo de vantagens pelo facto de ser possível uma única pessoa executar o método sem necessitar de elevada formação, não é utilizado muito equipamento logo o método pode ser executado num espaço reduzido e é utilizada uma reduzida quantidade de material de laboratório.⁷³

Foi demonstrado ser possível analisar 10 a 20 amostras em apenas 30 a 40 minutos.⁷³

Anastassiades *et al.* descreveram o processo como envolvendo uma única fase de extracção com acetonitrilo (contendo 1% de ácido acético), seguida de uma partição líquido-líquido através da adição de sulfato de magnésio anidro e cloreto de sódio (ou acetato de sódio). A remoção de resíduos de água e a purificação do extracto é efectuada simultaneamente através do processo de extracção em fase sólida dispersiva no qual o sulfato de magnésio anidro e a fase polimérica são agitados com 1 ml a 8 ml do extracto dissolvido em acetonitrilo.^{67,74}

Lehotay *et al.* verificaram que o facto de adicionar ácido acético ao acetonitrilo aumenta a estabilidade dos compostos pois poucos pesticidas se degradam em meio ácido.⁷⁶

Para amostras contendo um teor em água reduzido, pode ser necessário hidratar a amostra antes da extracção inicial, uma vez que este método foi concebido inicialmente para amostras contendo um teor em água superior a 75%.⁷³

Para a análise por cromatografia em fase gasosa pode ser necessário evaporar o acetonitrilo e reconstituir em tolueno. O tolueno como solvente final apresenta a vantagem de funcionar como um bom solvente de armazenamento para pesticidas, apresenta uma reduzida taxa de evaporação devido ao seu elevado ponto de ebulição, a maioria dos pesticidas apresentam uma elevada solubilidade e estabilidade em tolueno, é miscível com o acetonitrilo e apresenta ainda vantagens ao nível da cromatografia em fase gasosa tais como o reduzido volume de expansão durante a vaporização o que permite volumes de injeção superiores a 1 µl numa injeção em *splitless*.⁷⁶

Este passo de evaporação do solvente acetonitrilo e reconstituição do extracto em tolueno normalmente duplica o tempo de preparação de amostra mas conseguem-se atingir limites analíticos muito mais satisfatórios, cabendo ao técnico a decisão de efectuar ou não este passo. Lehotay *et al.* demonstraram que este passo baixa cinco vezes o limite de quantificação, comparativamente aos extractos em acetonitrilo, concluindo que apresenta vantagens indiscutíveis apesar de comportar um aumento de custo e tempo de análise.⁷⁶

Esta metodologia de purificação é eficaz na remoção de componentes polares da matriz tais como ácidos orgânicos, ácidos gordos (ácido oleico, palmítico e linoleico), pigmentos polares e açúcares.⁶⁷

Para além da PSA foram também efectuados estudos utilizando outros adsorventes tais como -NH₂ (aminopropilo), alumina-N (alumina neutra), GCB (*graphitized carbon black*), -CN (cianopropilo), SAX e ODS (octadecilsilano) chegando-se à conclusão de que a PSA utilizada isoladamente ou em combinação com o GCB foi a mais eficaz na purificação dos extractos.⁶⁷

O método QuEChERS original utilizando apenas PSA não remove totalmente clorofila e esteróides de alguns extractos. A presença de clorofila requer que haja uma maior frequência na manutenção do injector e da coluna. A utilização de uma purificação adicional com GCB apresenta a vantagem de remover eficazmente a clorofila e esteróides mas apresenta a desvantagem de reter fortemente alguns pesticidas de estrutura plana tais como o Hexaclorobenzeno.⁷⁶

O método foi validado e sujeito a um estudo interlaboratorial envolvendo 15 laboratórios em 7 países e está a ser sujeito a um estudo com vista à sua utilização nos programas de monitorização de pesticidas em vários países.⁷⁴

Os pesticidas que falharam nos estudos de validação foram: Asulame, Daminozida, Dicofol, Captana, Folpete, Piridato e Tirame.⁷⁶

A forte retenção à PSA faz com que a Daminozida não possa ser analisada. O Dicofol degrada-se rapidamente nas amostras em diclorobenzofenona. Os pesticidas Asulame, Piridato e Tirame são pesticidas considerados difíceis de analisar, não sendo por isso habitualmente incluídos nos métodos multiresíduo. Os problemas com a Captana e o Folpete não se devem ao método de preparação da amostra mas à própria determinação pois são facilmente degradados no cromatógrafo gasoso.⁷⁶

O método demonstrou ser eficiente em extrair cerca de 200 pesticidas numa grande variedade de matrizes alimentares nomeadamente frutos e vegetais tais como laranjas e alface, tanto para análise por GC-MS como para LC-MS-MS.^{74,75,77}

No que diz respeito à aplicação do método a matrizes contendo um elevado teor de gordura (ovos e leite), verificou-se que apesar do método não ser muito eficaz na extracção de pesticidas lipofílicos tais como o Hexaclorobenzeno nesse tipo de amostras, apresenta resultados adequados na extracção sobre alimentos pouco gordos e na extracção de pesticidas polares e semi-polares de uma grande variedade de matrizes alimentares contendo um elevado teor de gordura.⁷⁵

3.3. Separação e detecção - Cromatografia em fase gasosa associada a detector μ ECD

O conceito de cromatografia em fase gasosa baseia-se na vaporização da amostra e introdução numa coluna cromatográfica, revestida ou empacotada com uma fase estacionária líquida ou sólida, sendo a eluição efectuada por uma fase móvel que apresenta como características o facto de ser gasosa e inerte, não interagindo com o analito.^{52,54}

Existem dois tipos de cromatografia em fase gasosa, consoante a fase estacionária utilizada seja líquida ou sólida, sendo a primeira bastante utilizada e vulgarmente conhecida por cromatografia gás-líquido.⁵⁴

Esta técnica de separação cromatográfica é aplicada a substâncias, ou derivados das substâncias que são volatilizadas a determinadas condições de temperatura.⁵⁴

O conceito de cromatografia gás-líquido foi enunciado por Martin e Synge em 1941, surgindo o primeiro equipamento no mercado apenas em 1955.⁵⁴

A aparelhagem é constituída por um sistema de injeção da amostra, uma coluna cromatográfica colocada num forno, um detector e um sistema de aquisição de dados.⁵⁴

3.3.1. Fonte de gás de arraste

Os gases de arraste devem ser puros e quimicamente inertes dependendo a sua escolha do tipo de detector utilizado. Dos vários gases de arraste que podem ser utilizados destacam-se o hélio, argon, azoto, dióxido de carbono e hidrogénio.⁵⁴

3.3.2. Sistema de injeção da amostra

O método mais comum de injeção da amostra envolve uma microseringa que injecta a amostra através de um septo para uma câmara de vaporização localizada no topo da coluna. Existem vários tipos de sistema de injeção, cada um com vantagens e inconvenientes. A técnica de injeção é crítica e os seus detalhes demasiado complexos não cabendo a sua discussão no âmbito desta introdução.^{54, 78}

Este local de vaporização da amostra deve estar a cerca de 50°C acima do ponto de ebulição do composto menos volátil.⁵⁴

3.3.3. Coluna e forno

As colunas que contêm a fase estacionária podem ser de diferentes tipos tais como colunas capilares de sílica fundida de parede recoberta pela fase estacionária, colunas de enchimento com partículas inertes impregnadas com a fase estacionária ou colunas de enchimento com uma fase estacionária sólida.⁷⁸

As colunas capilares são as mais frequentemente utilizadas nos dias de hoje. Estas colunas apresentam um diâmetro interno que pode variar entre 0,1 mm e 0,53 mm e atingem um comprimento de 5 m a 60 m. A fase estacionária encontra-se depositada na parede interna da coluna, podendo estar quimicamente ligada à parede da coluna sob a forma de uma película com uma espessura de 0,1 µm a 5,0 µm.⁷⁸

As colunas de enchimento apresentam um diâmetro interno de 2 mm a 4 mm e um comprimento de 1 m a 3 m. A fase estacionária é geralmente constituída por polímeros impregnados com uma fase líquida.⁷⁸

A coluna encontra-se localizada num forno onde é programada a temperatura que permite a separação dos vários compostos podendo esta separação desenvolver-se a uma temperatura constante ou de acordo com um gradiente de temperaturas ao longo do tempo.⁷⁸

3.3.4. Detector

O detector ideal para cromatografia em fase gasosa deve apresentar como características principais, o facto de poder proporcionar uma sensibilidade adequada, boa estabilidade e reprodutibilidade e dar uma resposta linear numa gama alargada de concentrações para os analitos em questão. Deve ter uma gama alargada de temperatura de funcionamento, o seu tempo de resposta deve ser reduzido e independente do fluxo e ser de fácil utilização. A sua resposta deve ser equivalente para todos os analitos ou em alternativa uma resposta selectiva para determinadas classes de compostos e idealmente não deve destruir a amostra.⁵⁴

Um detector com todas estas características não existe pelo que devem ser utilizados diversos tipos de detectores consoante as características desejáveis.⁵⁴

O detector habitualmente utilizado para a pesquisa de pesticidas organoclorados e piretróides é o detector ECD. A sua elevada sensibilidade e selectividade para moléculas contendo grupos funcionais electronegativos, levou a que fosse adoptado para a análise de pesticidas clorados em vários métodos EPA, normas europeias e em metodologias descritas nas farmacopeias.^{44,78,79}

O detector ECD contém uma célula chapeada com um isótopo radioactivo ^{63}Ni que liberta partículas β que ao colidirem com o gás de arraste produzem electrões de baixa energia. É produzida uma corrente devido aos electrões livres que é posteriormente recebida e determinada num circuito pulsado. Esta corrente é designada por corrente de referência. Quando uma molécula orgânica de um componente da amostra entra em contacto com os electrões livres, ocorre a captação desses electrões por parte da molécula originando iões de carga negativa. A corrente da célula é medida e comparada com a corrente de referência por forma a que sempre que ocorre a captação de electrões por parte de uma molécula há a conversão numa voltagem que é registada.^{52,80}

Recentemente surgiu no mercado um detector designado por μECD que apresenta vantagens relativamente ao detector ECD, nomeadamente no que diz respeito à sua elevada sensibilidade, estabilidade e robustez.^{81,82}

No detector μECD *Agilent* HP 6890, a sua célula foi optimizada para colunas capilares e é apresentado como sendo o detector mais sensível do mercado. Este detector apresenta um factor de resposta em função da concentração que demonstrou ser linear a quatro níveis de magnitude para uma grande maioria de compostos. Apresenta limites de detecção para alguns compostos equivalentes ao quádruplo do que era conseguido com o HP 6890 ECD.^{81,82}

3.4. Confirmação - Cromatografia em fase gasosa associada a Espectrometria de Massa

As metodologias para a determinação de resíduos de pesticidas requerem uma etapa de confirmação.^{33,44} Segundo a *guideline* para a monitorização de resíduos de pesticidas na União Europeia⁴⁵, os resultados negativos podem por si só ser considerados confirmados se as taxas de recuperação forem aceitáveis. Os resultados positivos requerem uma confirmação adicional sendo aconselhável a utilização de uma metodologia mais específica. A natureza e a extensão da confirmação requerida para um resultado positivo é dependente da importância do resultado e da frequência com que os resíduos similares são encontrados.

A combinação da cromatografia em fase gasosa como método separativo com a espectrometria de massa é considerada como sendo a técnica de confirmação menos sujeita a equívocos.^{19,54,63} O facto do espectrómetro de massa estar acoplado ao cromatógrafo gasoso requer a existência de uma interface especializada. No caso de colunas capilares a coluna é inserida directamente na fonte de ionização do multiplicador electrónico.⁵⁴

A espectrometria de massa baseia-se na ionização das moléculas. Os iões formados são acelerados e depois separados consoante a sua razão massa/carga (m/z). Este facto permite que seja traçado um espectro de massas característico onde é representada a abundância relativa das diferentes espécies iónicas existentes em função de m/z por forma a que seja possível a identificação inequívoca das moléculas. Estas operações ocorrem sob vácuo, na ordem dos 10^{-5} a 10^{-8} torr.^{54,83}

Para além do sistema que deve permitir a introdução de uma amostra representativa com a perda mínima de vácuo, é essencial a presença de uma fonte iónica, um analisador de massas e um detector de iões.^{54,83}

3.4.1. Fonte iónica

A aparência de um espectro de massa de uma determinada espécie molecular está dependente da metodologia utilizada para a formação dos iões.⁵⁴

As fontes de ionização convertem os componentes da amostra em iões podendo ser classificadas em duas categorias principais. A primeira categoria corresponde às fontes de fase gasosa, nas quais a amostra é volatilizada, sendo posteriormente os componentes gasosos ionizados de formas diversas tais como a ionização por impacto electrónico (EI) e a ionização química. A segunda categoria corresponde às fontes de desorção, em que vaporização de toda amostra é dispensada, sendo necessário uma sonda.^{54,83}

A fonte iónica utilizada no trabalho apresentado nesta tese foi a electroinização que é caracterizada pela emissão de electrões a partir de um filamento aquecido de tungsténio ou rénio com um potencial de aproximadamente 70 eV entre o filamento emissor e o ânodo, ocorrendo o bombardeamento das moléculas, o que resulta como produto primário num ião molecular com uma carga positiva. A energia do feixe de impacto é suficiente para provocar uma fragmentação da molécula originando um número elevado de iões com carga positiva característico do composto.⁵⁴

3.4.2. Analisador de massas

Os iões ao serem acelerados são conduzidos para o analisador de massas que separa as espécies carregadas da amostra ionizada segundo a razão m/z , o que permite a determinação da abundância e da massa de cada espécie. Os analisadores de massas podem ser de diferentes tipos, devendo-se as diferenças dos seus desempenhos ao intervalo em que é possível medir a relação m/z e ao seu poder de resolução.⁸³

Dos vários tipos de analisadores de massas destaca-se o analisador de quadrupolo que é o mais frequentemente utilizado e que é constituído por quatro barras metálicas paralelas, cilíndricas ou hiperbólicas. Estas barras encontram-se dispostas simetricamente em relação ao eixo da trajectória dos iões e ligadas electricamente duas a duas, em diagonal e em relação ao seu eixo de simetria. São aplicados a cada par de barras potenciais opostos que são a resultante de uma componente contínua e outra alterna. A separação e transmissão dos iões formados na fonte de diferentes m/z para o detector é feita fazendo variar os sinais eléctricos do quadrupolo.^{54,83}

3.4.3. Detector de iões e tratamento de dados

Os iões separados são convertidos em sinais eléctricos através de um sistema de detecção constituído por um fotomultiplicador ou multiplicador electrónico. Os sinais eléctricos são amplificados antes da sua conversão final em sinais numéricos a partir dos quais é efectuado o seu tratamento informático de acordo com a finalidade pretendida.^{54,83}

É importante salientar que a aquisição do sinal pode ser normalmente efectuada de duas formas diferentes. No modo do espectro completo regista-se a totalidade do sinal obtido na gama de massas seleccionada, sendo obtido um traçado de corrente iónica (TIC). A aquisição do sinal pode ser também efectuada seleccionando apenas um ou vários iões característicos, o que permite que haja uma maior sensibilidade e conseqüentemente uma diminuição do limite de detecção.^{54,83}

4. Amostras a considerar na determinação de resíduos de pesticidas

Um estudo efectuado pelo LEF em 1994 que consistiu na elaboração de um questionário dirigido aos farmacêuticos de oficina e que foi respondido por 660 farmácias, permitiu concluir que relativamente à utilização de plantas medicinais para infusão, as mais solicitadas são a Tília, o Hipericão, o Sene e a Cidreira. ¹

Os dados fornecidos pela Autoridade Nacional do Medicamento e dos Produtos de Saúde (INFARMED), referentes ao consumo em Portugal de medicamentos à base de plantas entre Janeiro e Maio de 2005, permitiram seleccionar o tipo de amostra mais relevante em termos de interesse para a saúde pública. Os dados de consumo são relativos ao número de unidades (embalagens) vendidas de cada medicamento de acordo com a substância activa ou associação de substâncias activas, tal como é ilustrado na figura 1.

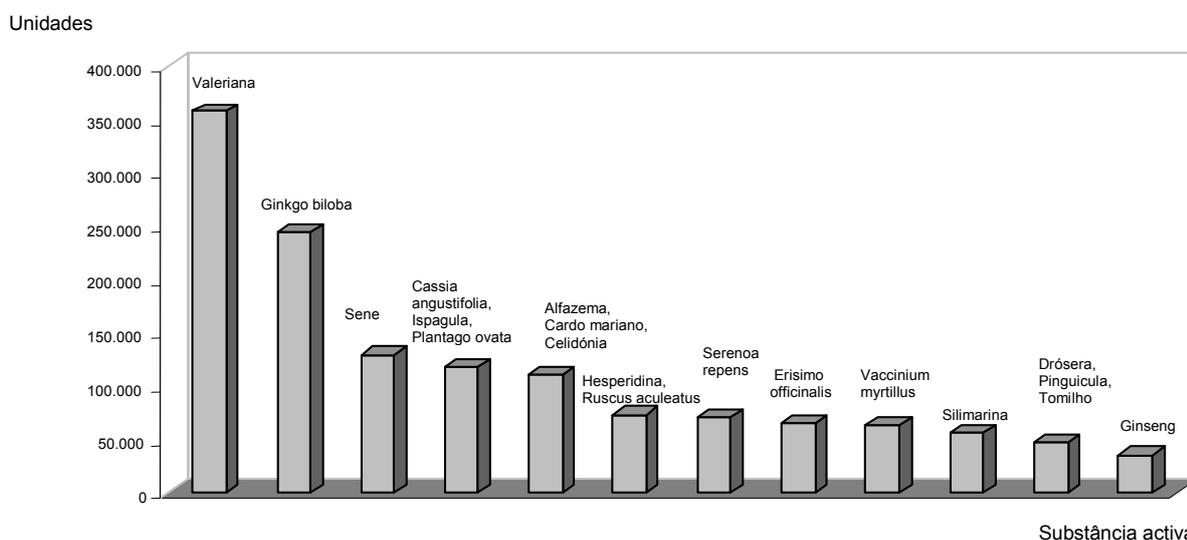


Figura 1 – Unidades de medicamentos à base de plantas, de acordo com a substância activa ou associação de substâncias activas, vendidas entre Janeiro e Maio de 2005

Os dados apresentados permitem concluir que a substância activa mais consumida nos medicamentos à base de plantas é sem dúvida a Valeriana, seguindo-se o Ginkgo biloba e o Sene, pelo que haverá todo o interesse em estudar estas matrizes.

5. Objectivos do trabalho

O objectivo deste trabalho é o de optimizar a metodologia analítica descrita na Farmacopeia Europeia para a determinação de resíduos de pesticidas organoclorados e piretróides. Pretende-se que este método seja posteriormente implementado em rotina, na análise de medicamentos à base de plantas contendo Valeriana, Sene e Ginkgo biloba, que são os que apresentam um maior impacto ao nível da saúde pública. Pretende-se igualmente o estudo de métodos alternativos ao apresentado na Farmacopeia que tragam vantagens no que diz respeito ao tempo de análise, custo e simplicidade de execução e a comparação de eventuais resultados obtidos.

II. Parte experimental

1. Materiais e métodos

1.1. Padrões

Os 23 padrões referentes aos pesticidas organoclorados e piretróides a pesquisar foram adquiridos a Riedel-de Haën, Alemanha e a Dr Ehrenstorfer GmbH, Alemanha. A tabela 4 refere as características dos padrões utilizados.

Tabela 4 – Padrões de pesticidas organoclorados e piretróides utilizados no trabalho experimental

Padrão	Marca	Pureza (%)	Validade
α – Hexaclorociclo-hexano	Riedel-de Haën - Pestanal	99,7	02/2009
Hexaclorobenzeno	Dr Ehrenstorfer GmbH	99,5	03/2009
β – Hexaclorociclo-hexano	Riedel-de Haën - Pestanal	98,1	04/2008
Lindano	Riedel-de Haën - Pestanal	99,8	10/2009
δ – Hexaclorociclo-hexano	Riedel-de Haën - Pestanal	98,6	08/2007
ε – Hexaclorociclo-hexano	Dr Ehrenstorfer GmbH	99,9	05/2008
Heptacloro	Dr Ehrenstorfer GmbH	98,5	04/2010
Aldrina	Riedel-de Haën - Pestanal	98,1	10/2008
<i>cis</i> – Heptacloro-epóxido	Dr Ehrenstorfer GmbH	98,0	03/2009
<i>o,p'</i> – DDE	Dr Ehrenstorfer GmbH	97,0	02/2010
α – Endossulfano	Dr Ehrenstorfer GmbH	99,4	11/2009
Dieldrina	Riedel-de Haën - Pestanal	97,9	10/2009
<i>p,p'</i> – DDE	Dr Ehrenstorfer GmbH	98,5	04/2009
<i>o,p'</i> – DDD	Dr Ehrenstorfer GmbH	99,5	07/2007
Endrina	Dr Ehrenstorfer GmbH	97,0	12/2010
β – Endossulfano	Dr Ehrenstorfer GmbH	99,0	11/2010
<i>o,p'</i> – DDT	Dr Ehrenstorfer GmbH	99,5	02/2009
<i>p,p'</i> – DDT	Dr Ehrenstorfer GmbH	99,5	04/2009
<i>cis</i> – Permetrina	Dr Ehrenstorfer GmbH	93,0	07/2009
<i>trans</i> – Permetrina	Dr Ehrenstorfer GmbH	94,0	07/2010
Cipermetrina	Dr Ehrenstorfer GmbH	94,0	10/2007
Fenvalerato	Dr Ehrenstorfer GmbH	98,0	04/2009
Deltametrina	Riedel-de Haën - Pestanal	99,8	05/2010

Como padrão interno utilizou-se numa primeira fase de optimização do método analítico o Carbofenotião, tendo-se posteriormente optado por utilizar o Etião. Estes padrões foram adquiridos a Dr Ehrenstorfer GmbH, Alemanha. A tabela 5 refere as características dos padrões utilizados.

Tabela 5 – Padrões internos utilizados no trabalho experimental

Padrão	Marca	Pureza (%)	Validade
Carbofenotião	Dr Ehrenstorfer GmbH	90,0	06/2008
Etião	Dr Ehrenstorfer GmbH	98,0	07/2008

1.2. Amostras

Foram estudadas amostras contendo como substâncias activas Valeriana, Sene e Ginkgo biloba.

1.3. Reagentes

Para a execução da metodologia descrita na Farmacopeia Europeia foi utilizada acetona como solvente de extracção e tolueno como solvente final. Ambos os reagentes apresentam um grau de pureza adequado para cromatografia gasosa e foram adquiridos a Merck, Alemanha.

Foi realizado um método alternativo de preparação de amostra (QuEChERS) para o qual foi utilizado como solvente de extracção acetonitrilo com um grau de pureza adequado para cromatografia (J.T. Baker, Holanda), ácido acético glacial *p.a* (Merck, Alemanha) e os reagentes acetato de sódio (> 99% Aldrich, Alemanha), sulfato de magnésio anidro (\geq 99% Aldrich, Alemanha) e PSA sílica Bulk (Supelco, Alemanha). O solvente final foi o tolueno adquirido a Merck, Alemanha e que apresenta um grau de pureza adequado para cromatografia gasosa. A água utilizada na fase de hidratação da amostra foi água Milli-Q (Millipore, E.U.A).

1.4. Extracção e purificação da amostra

1.4.1. Metodologia descrita na Farmacopeia Europeia

Uma quantidade de amostra equivalente a cerca de 1 g de substância activa foi pesada utilizando uma balança analítica (Mettler Toledo AX204, Suíça) com uma resolução de 0,01 mg e extraída utilizando como solvente de extracção acetona. A extracção ocorreu por agitação em placas de agitação magnética (Heidolph MR 3000D, Alemanha), durante 30 minutos e à temperatura ambiente. Foi adicionado 1 ml de solução de padrão interno de concentração 0,002 mg/ml. A solução foi filtrada com filtros de microfibras de vidro (Whatman, Inglaterra). O filtrado foi evaporado quase à secura num evaporador rotativo (Heidolph Laborotta 4003, Alemanha) com bomba de vácuo (Rotavac), garrafa Woulff com braçadeira e arrefecedor com frasco e braçadeira. O resíduo foi dissolvido e diluído para 5 ml de tolueno.

Os compostos de maior massa molecular foram separados por cromatografia de permeação em gel. A amostra foi previamente filtrada (filtros de membrana Gelman GHP 0,45 µm, E.U.A) e foi injectado um volume de 100 µl de solução numa coluna de estireno-divinilbenzeno 7,8 x 300 mm (Waters Styragel HR1 Toluene), utilizando tolueno como fase móvel a um fluxo de 1,0 ml/min controlado por uma bomba (Waters Alliance 2695, E.U.A). As alíquotas correspondentes aos tempos de saída dos compostos em estudo foram colectadas num colectador de fracções (Waters Fraction Collector II, E.U.A).

As fracções foram evaporadas quase à secura em atmosfera de azoto no evaporador múltiplo (Turbovap LV Zymark, E.U.A) e o resíduo foi posteriormente purificado em colunas de sílica 3ml/500mg (Restek, E.U.A) através do auxílio de um suporte múltiplo sob vácuo (Restek, Alemanha) associado a bomba de vácuo (Boc Edwards E-LAB2, Reino Unido), utilizando tolueno como fase móvel.

O extracto purificado foi novamente evaporado quase à secura em atmosfera de azoto, completado o volume para cerca de 100 µl com tolueno e injectado 1 µl nos sistemas cromatográficos GC-µECD e GC-MS onde foi efectuada respectivamente a quantificação e a confirmação da identificação dos analitos em causa.

1.4.2. Metodologia segundo QuEChERS

Uma quantidade de amostra equivalente a cerca de 1 g de substância activa foi pesada utilizando uma balança analítica (Mettler Toledo AX204, Suíça) com uma resolução de 0,01 mg e extraída adicionando num tubo de centrifuga: 9 ml de acetonitrilo com 1% de ácido acético, 6 g de sulfato de magnésio anidro, 1,5 g de acetato de sódio e 1 ml de solução de padrão interno de concentração 0,002 mg/ml.

A solução foi agitada vigorosamente durante 5 minutos num agitador tipo vortex (Heidolph, Alemanha), seguindo-se uma centrifugação durante 5 minutos a 3000 rpm (Centrifuga Allegra 21 Beckman, Alemanha). Foram pipetados 4 ml do sobrenadante aos quais se adicionaram 600 mg de sulfato de magnésio anidro e 200 mg de PSA,

Parte experimental

seguinte-se nova agitação durante 5 minutos num agitador tipo vortex e centrifugação durante 5 minutos a 3000 rpm.

Foram retirados 2 ml do sobrenadante para um tubo contendo 1 ml de tolueno e esta solução foi evaporada quase à secura em atmosfera de azoto no evaporador múltiplo (Turbovap LV Zymark, E.U.A) e completada para cerca de 1 ml com tolueno. O extracto foi injectado nos sistemas cromatográficos GC- μ ECD e GC-MS onde foi efectuada a quantificação e confirmação da identificação dos analitos em estudo.

Foi efectuada uma segunda preparação da amostra que incluiu uma fase de hidratação da amostra. Desta forma, foi pesada uma quantidade equivalente a cerca de 1 g de substância activa, à qual foi adicionado: 1 ml de água ultra-pura, 8 ml de acetonitrilo com 1% de ácido acético, 6 g de sulfato de magnésio anidro, 1,5 g de acetato de sódio e 1 ml de solução de padrão interno de concentração 0,002 mg/ml. Esta solução foi submetida a todo o processo de preparação de amostra descrito anteriormente.

1.5. Análise por GC- μ ECD

A análise foi efectuada utilizando um cromatógrafo gasoso (6890N Agilent Technologies, Alemanha) com injector automático 7683 modelo G2613A, detector μ -ECD e *software* Millennium versão 4.00, equipado com uma Coluna HP-5 (5% fenil-metilpolisiloxano) 30 m x 0,32 mm, 0,25 μ m (J & W Scientific, E.U.A).

As condições cromatográficas finais obtidas após optimização do método estão descritas na tabela 6.

Tabela 6 – Condições de análise por GC- μ ECD de pesticidas organoclorados e piretróides

Injector	Temperatura do injector	230° C
	Injecção	<i>Splitless</i>
	Tempo <i>splitless</i>	1,25 min
	Fluxo da válvula de <i>split</i>	60 ml/min
	Volume injecção	1 μ l
Coluna	Tipo de coluna e características	HP-5 (5% fenil-metilpolisiloxano) 30 m x 0,32 mm, 0,25 μ m
	Temperatura do forno	80° C (3 min) - 30°C/min - 150°C (3 min) - - 4°C/min - 290°C (2 min)
	Gás de arraste	Argon/metano (95:5)
	Fluxo do gás de arraste	1,4 ml/min
Detector	Temperatura do detector	310°C
	Gás de <i>make-up</i>	Argon/metano (95:5)
	Fluxo do gás de <i>make up</i>	30 ml/min

1.6. Análise por GC-MS

A análise foi efectuada utilizando um cromatógrafo gasoso com detector de massa (Agilent, Series GC system 6890 Mass selective detector 5873N, Alemanha), injector automático 7683, bomba de vácuo Edwards e *software* MSD Productivity (ChemStation *software* Agilent G1701CA). A coluna utilizada foi uma Coluna HP-5MS (5% fenil-metilpolisiloxano) 30 m x 0,25 mm, 0,25 μm (J & W Scientific, E.U.A).

As condições cromatográficas finais obtidas após optimização do método encontram-se descritas na tabela 7.

Tabela 7 – Condições de análise por GC-MS de pesticidas organoclorados e piretróides

Injector	Temperatura do injector	230° C
	Injecção	<i>Splitless</i>
	Tempo <i>splitless</i>	1,25 min
	Fluxo da válvula de <i>split</i>	60 ml/min
	Volume injecção	1 μl
Coluna	Tipo de coluna e características	HP-5 MS (5% fenil-metilpolisiloxano) 30 m x 0,25 mm, 0,25 μm
	Temperatura do forno	80° C (3 min) - 30°C/min - 150°C (3 min) - - 4°C/min - 290°C (2 min)
	Gás de arraste	Hélio
	Fluxo do gás de arraste	1,4 ml/min
Interface GC/MS	Temperatura da interface	280°C
Espectrómetro de massa	Modo de ionização	EI ⁺
	Temperatura do Quadrupolo	150°C
	Temperatura da fonte iónica	230°C
	Voltagem do fotomultiplicador	2800 V
	Início de aquisição de dados	5 minutos
	Modo de aquisição	Varrimento total
SIM		Foram utilizados <i>m/z</i> diferentes dependendo do composto a analisar

EI⁺ - Impacto electrónico; amu - unidades de massa atómica.

Parte experimental

2. Soluções de trabalho

2.1. Preparação de soluções

2.1.1. Solução mãe combinada de padrões

Prepararam-se soluções mãe individuais de cada composto, pesando rigorosamente quantidades aproximadas às indicadas na tabela 8 e transferiram-se para balões volumétricos adequados, diluindo com tolueno. As pesagens dos padrões de trabalho foram efectuadas utilizando uma micro-balança (Mettler Toledo MX5, Suíça) com uma resolução de 0,001 mg.

A partir das soluções individuais foi preparada uma solução combinada intermédia (solução 1) e por fim a solução mãe combinada de padrões (solução 2) cuja concentração corresponde a 200% da concentração alvo de cada um dos pesticidas (ver tabela 8) e que serviu para a preparação de soluções combinadas de padrões de diferentes níveis de concentração, durante a execução deste trabalho experimental.

Tabela 8 – Esquema de diluições a efectuar na preparação da solução mãe combinada de padrões (solução 2)

Composto	Limite (mg/kg)	Conc. alvo (ppm)	Solução mãe individual		Solução 1		Solução 2	
			Pesar (mg)	Diluição (ml)	Pipetar (ml)	Diluição (ml)	Pipetar (ml)	Diluição (ml)
α – Hexaclorociclo-hexano	0,30	0,06	6,000	50	1	100	10	100
Hexaclorobenzeno	0,10	0,02	4,000	100	1			
β – Hexaclorociclo-hexano	0,30	0,06	6,000	50	1			
Lindano	0,60	0,12	6,000	25	1			
δ – Hexaclorociclo-hexano	0,30	0,06	6,000	50	1			
ϵ – Hexaclorociclo-hexano ^{b)}	0,30	0,06	1200 μ l					
Heptaclo	0,05	0,01	4,000	200	1			
Aldrina	0,05	0,01	4,000	200	1			
<i>cis</i> – Heptaclo-epóxido	0,05	0,01	4,000	200	1			
<i>o,p'</i> – DDE	1,00	0,20	8,000	20	1			
α – Endossulfano	3,00	0,60	12,000	10	1			
Dieldrina	0,05	0,01	4,000	200	1			
<i>p,p'</i> – DDE	1,00	0,20	8,000	20	1			
<i>o,p'</i> – DDD	1,00	0,20	8,000	20	1			
Endrina	0,05	0,01	4,000	200	1			
β – Endossulfano	3,00	0,06	12,000	10	1			
<i>o,p'</i> – DDT	1,00	0,20	8,000	20	1			
<i>p,p'</i> – DDT	1,00	0,20	8,000	20	1			
<i>cis</i> – Permetrina	1,00	0,20	8,000	20	1			
<i>trans</i> – Permetrina	1,00	0,20	8,000	20	1			
Cipermetrina ^{c)}	1,00	0,20	8,000	20	1			
Fenvalerato ^{d)}	1,50	0,30	12,000	20	1			
Deltametrina	0,50	0,10	10,000	50	1			

^{b)} O ϵ - Hexaclorociclo-hexano encontra-se comercialmente disponível sob a forma de uma solução em acetonitrilo (0,1 mg/ml). Utilizou-se uma micropipeta de 1000 μ l, Brand para pipetar esta solução.

^{c)} O padrão Cipermetrina é constituído por uma mistura de 4 isómeros.

^{d)} O padrão Fenvalerato é constituído por uma mistura de 2 isómeros.

2.1.2. Soluções de padrão interno

Segundo a metodologia descrita na Farmacopeia Europeia, a concentração final de padrão interno na solução deve ser equivalente a cerca de 0,4 µg/ml.

A solução mãe de padrão interno foi preparada pesando rigorosamente cerca de 8,000 mg de padrão interno utilizando uma micro-balança (Mettler Toledo MX5, Suíça) para balão volumétrico de 100 ml e diluiu-se com tolueno. Posteriormente transferiu-se 10 ml desta solução mãe para balão volumétrico de 100 ml e diluiu-se com tolueno. Esta solução (0,008 mg/ml) é a solução a adicionar às soluções padrão.

A solução a adicionar às soluções amostra foi preparada transferindo 5 ml da solução mãe para balão volumétrico de 200 ml e diluindo com tolueno (0,002 mg/ml).

2.1.3. Solução combinada de padrões utilizada durante a otimização do método

A partir de uma solução mãe combinada de padrões (solução 2 – ver tabela 8) foi preparada uma solução combinada de padrões correspondente à concentração alvo de cada pesticida. Desta forma, foi transferido para um balão volumétrico de 20 ml, 10 ml de uma solução mãe combinada de padrões (solução 2) e 1 ml da solução de padrão interno de concentração 0,008 mg/ml e diluiu-se com tolueno.

2.1.4. Soluções combinadas de padrões para o estudo da linearidade e gama de trabalho

A partir de uma solução mãe combinada de padrões (solução 2 - ver tabela 8) foram preparadas 15 soluções combinadas de padrões, cujas concentrações variaram entre 0,5% e 120% da concentração alvo de cada pesticida. Transferiu-se para este efeito, respectivamente 50 µl, 100 µl, 250 µl, 500 µl, 1 ml, 2 ml, 3 ml, 4 ml, 5 ml, 6 ml, 7 ml, 8 ml, 9 ml, 10 ml, e 12 ml da solução 2 para balões volumétricos de 20 ml, adicionou-se a cada solução 1 ml da solução de padrão interno de concentração 0,008 mg/ml e diluiu-se com tolueno.

A tabela 9 indica os 15 níveis de concentração a atingir para cada pesticida em estudo.

Tabela 9 – Níveis de concentração (ppm) a atingir das soluções padrão de pesticidas, para a avaliação da linearidade e gama de trabalho

Composto	Concentração (ppm)														
	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	P8	P9	P10	P11	P12	P13	P14	P15
α -Hexaclorociclo-hexano	0,0003	0,0006	0,0015	0,0030	0,0060	0,0120	0,0180	0,0240	0,0300	0,0360	0,0420	0,0480	0,0540	0,0600	0,0720
Hexaclorobenzeno	0,0001	0,0002	0,0005	0,0010	0,0020	0,0040	0,0060	0,0080	0,0100	0,0120	0,0140	0,0160	0,0180	0,0200	0,0240
β -Hexaclorociclo-hexano	0,0003	0,0006	0,0015	0,0030	0,0060	0,0120	0,0180	0,0240	0,0300	0,0360	0,0420	0,0480	0,0540	0,0600	0,0720
Lindano	0,0006	0,0012	0,0030	0,0060	0,0120	0,0240	0,0360	0,0480	0,0600	0,0720	0,0840	0,0960	0,1080	0,1200	0,1440
δ -Hexaclorociclo-hexano	0,0003	0,0006	0,0015	0,0030	0,0060	0,0120	0,0180	0,0240	0,0300	0,0360	0,0420	0,0480	0,0540	0,0600	0,0720
ϵ -Hexaclorociclo-hexano	0,0003	0,0006	0,0015	0,0030	0,0060	0,0120	0,0180	0,0240	0,0300	0,0360	0,0420	0,0480	0,0540	0,0600	0,0720
Heptacloro	0,00005	0,0001	0,0003	0,0005	0,0010	0,0020	0,0030	0,0040	0,0050	0,0060	0,0070	0,0080	0,0090	0,0100	0,0120
Aldrina	0,00005	0,0001	0,0003	0,0005	0,0010	0,0020	0,0030	0,0040	0,0050	0,0060	0,0070	0,0080	0,0090	0,0100	0,0120
cis-Heptacloro-epóxido	0,00005	0,0001	0,0003	0,0005	0,0010	0,0020	0,0030	0,0040	0,0050	0,0060	0,0070	0,0080	0,0090	0,0100	0,0120
α,p' -DDE	0,0010	0,0020	0,0050	0,0100	0,0200	0,0400	0,0600	0,0800	0,1000	0,1200	0,1400	0,1600	0,1800	0,2000	0,2400
α -Endossulfano	0,0030	0,0060	0,0150	0,0300	0,0600	0,1200	0,1800	0,2400	0,3000	0,3600	0,4200	0,4800	0,5400	0,6000	0,7200
Dieldrina	0,00005	0,0001	0,0003	0,0005	0,0010	0,0020	0,0030	0,0040	0,0050	0,0060	0,0070	0,0080	0,0090	0,0100	0,0120
p,p' -DDE	0,0010	0,0020	0,0050	0,0100	0,0200	0,0400	0,0600	0,0800	0,1000	0,1200	0,1400	0,1600	0,1800	0,2000	0,2400
α,p' -DDD	0,0010	0,0020	0,0050	0,0100	0,0200	0,0400	0,0600	0,0800	0,1000	0,1200	0,1400	0,1600	0,1800	0,2000	0,2400
Endrina	0,00005	0,0001	0,0003	0,0005	0,0010	0,0020	0,0030	0,0040	0,0050	0,0060	0,0070	0,0080	0,0090	0,0100	0,0120
β -Endossulfano	0,0003	0,0006	0,0015	0,0030	0,0060	0,0120	0,0180	0,0240	0,0300	0,0360	0,0420	0,0480	0,0540	0,0600	0,0720
α,p' -DDT	0,0010	0,0020	0,0050	0,0100	0,0200	0,0400	0,0600	0,0800	0,1000	0,1200	0,1400	0,1600	0,1800	0,2000	0,2400
p,p' -DDT	0,0010	0,0020	0,0050	0,0100	0,0200	0,0400	0,0600	0,0800	0,1000	0,1200	0,1400	0,1600	0,1800	0,2000	0,2400
cis-Permetrina	0,0010	0,0020	0,0050	0,0100	0,0200	0,0400	0,0600	0,0800	0,1000	0,1200	0,1400	0,1600	0,1800	0,2000	0,2400
trans-Permetrina	0,0010	0,0020	0,0050	0,0100	0,0200	0,0400	0,0600	0,0800	0,1000	0,1200	0,1400	0,1600	0,1800	0,2000	0,2400
Cipermetrina	0,0010	0,0020	0,0050	0,0100	0,0200	0,0400	0,0600	0,0800	0,1000	0,1200	0,1400	0,1600	0,1800	0,2000	0,2400
Fenvalerato	0,0015	0,0030	0,0075	0,0150	0,0300	0,0600	0,0900	0,1200	0,1500	0,1800	0,2100	0,2400	0,2700	0,3000	0,3600
Deltametrina	0,0005	0,0010	0,0025	0,0050	0,0100	0,0200	0,0300	0,0400	0,0500	0,0600	0,0700	0,0800	0,0900	0,1000	0,1200

2.1.5. Soluções combinadas de padrões para o estudo da precisão

Para o estudo da repetibilidade do método foram preparadas 3 soluções mãe individuais de cada composto através de pesagens independentes. A partir de cada solução mãe foi preparada uma solução intermédia combinada de padrões (solução 1) e a partir de cada uma destas prepararam-se 3 soluções 2 diferentes, tendo sido obtido um total de 9 soluções (ver tabela 8). Estas soluções serviram para a preparação de soluções finais de cada nível de concentração a estudar, sendo o primeiro nível correspondente ao ponto mais baixo da gama de trabalho ^{e)}, o segundo nível a um ponto intermédio (transferindo 5 ml para balão volumétrico de 20 ml) e o último nível ao ponto mais elevado da gama de trabalho (transferindo 12 ml para balão volumétrico de 20 ml). A cada uma das soluções foi adicionado 1 ml de padrão interno de concentração 0,008 mg/ml e diluiu-se com tolueno.

A tabela 10 indica os diferentes níveis de concentração estudados para cada composto.

Tabela 10 – Concentração (ppm) a atingir das soluções padrão de pesticidas usadas na avaliação da repetibilidade do método analítico para 3 níveis de concentração diferentes

Composto	Concentração (ppm)		
	Padrão mais baixo	Padrão intermédio (P9)	Padrão mais elevado (P15)
α – Hexaclorociclo-hexano	O nível de concentração corresponde ao primeiro ponto da gama de trabalho de cada um dos pesticidas em estudo (ver tabela 35)	0,0300	0,0720
Hexaclorobenzeno		0,0100	0,0240
β – Hexaclorociclo-hexano		0,0300	0,0720
Lindano		0,0600	0,1440
δ – Hexaclorociclo-hexano		0,0300	0,0720
ϵ – Hexaclorociclo-hexano		0,0300	0,0720
Heptacloro		0,0050	0,0120
Aldrina		0,0050	0,0120
<i>cis</i> – Heptacloro-epóxido		0,0050	0,0120
<i>o,p'</i> – DDE		0,1000	0,2400
α – Endossulfano		0,3000	0,7200
Dieldrina		0,0050	0,0120
<i>p,p'</i> – DDE		0,1000	0,2400
<i>o,p'</i> – DDD		0,1000	0,2400
Endrina		0,0050	0,0120
β – Endossulfano		0,0300	0,0720
<i>o,p'</i> – DDT		0,1000	0,2400
<i>p,p'</i> – DDT		0,1000	0,2400
<i>cis</i> – Permetrina		0,1000	0,2400
<i>trans</i> – Permetrina		0,1000	0,2400
Cipermetrina	0,1000	0,2400	
Fenvalerato	0,1500	0,3600	
Deltametrina	0,0500	0,1200	

^{e)} O nível de concentração deste ponto varia de acordo com o composto em questão, pois o primeiro ponto da gama de trabalho não é coincidente para todos os compostos, o que faz com que tenha sido necessário preparar várias soluções para abranger todos os casos em estudo.

Parte experimental

Para avaliar a precisão intermédia foram preparadas a partir da solução mãe de cada um dos compostos, 3 soluções 2 (ver tabela 8). A partir de cada uma destas soluções 2, foram preparadas 4 soluções finais de níveis de concentração distintos, sendo o primeiro nível correspondente ao ponto mais baixo da gama de trabalho ^{f)}, o segundo nível e o terceiro nível a pontos intermédios (transferindo respectivamente 5 ml e 8 ml para balão volumétrico de 20 ml) e o último nível ao ponto mais elevado da gama de trabalho (transferindo 12 ml para balão volumétrico de 20 ml). A cada uma das soluções foi adicionado 1 ml da solução de padrão interno de concentração 0,008 mg/ml e diluiu-se com tolueno.

Repetiu-se o procedimento acima descrito em mais 2 dias independentes, tendo sido as soluções obtidas preparadas a partir de soluções mãe efectuadas a partir de pesagens independentes.

A tabela 11 indica os diferentes níveis de concentração estudados para cada composto.

Tabela 11 – Concentração (ppm) a atingir das soluções padrão de pesticidas usadas na avaliação da precisão intermédia do método analítico para 4 níveis de concentração diferentes

Composto	Concentração (ppm)			
	Padrão mais baixo	Padrão intermédio 1 (P9)	Padrão intermédio 2 (P12)	Padrão mais elevado (P15)
α – Hexaclorociclo-hexano	O nível de concentração corresponde ao primeiro ponto da gama de trabalho de cada um dos pesticidas em estudo (ver tabela 36)	0,0300	0,0480	0,0720
Hexaclorobenzeno		0,0100	0,0160	0,0240
β – Hexaclorociclo-hexano		0,0300	0,0480	0,0720
Lindano		0,0600	0,0960	0,1440
δ – Hexaclorociclo-hexano		0,0300	0,0480	0,0720
ϵ – Hexaclorociclo-hexano		0,0300	0,0480	0,0720
Heptacloro		0,0050	0,0080	0,0120
Aldrina		0,0050	0,0080	0,0120
<i>cis</i> – Heptacloro-epóxido		0,0050	0,0080	0,0120
<i>o,p'</i> – DDE		0,1000	0,1600	0,2400
α – Endossulfano		0,3000	0,4800	0,7200
Dieldrina		0,0050	0,0080	0,0120
<i>p,p'</i> – DDE		0,1000	0,1600	0,2400
<i>o,p'</i> – DDD		0,1000	0,1600	0,2400
Endrina		0,0050	0,0080	0,0120
β – Endossulfano		0,0300	0,0480	0,0720
<i>o,p'</i> – DDT		0,1000	0,1600	0,2400
<i>p,p'</i> – DDT		0,1000	0,1600	0,2400
<i>cis</i> – Permetrina		0,1000	0,1600	0,2400
<i>trans</i> – Permetrina		0,1000	0,1600	0,2400
Cipermetrina		0,1000	0,1600	0,2400
Fenvalerato		0,1500	0,2400	0,3600
Deltametrina		0,0500	0,0800	0,1200

^{f)} O nível de concentração deste ponto varia de acordo com o composto em questão, pois o primeiro ponto da gama de trabalho não é coincidente para todos os compostos, o que faz com que tenha sido necessário preparar várias soluções para abranger todos os casos em estudo.

2.1.6. Soluções combinadas de padrões para a determinação dos limites analíticos

Foram efectuadas diluições de uma solução mãe combinada de padrões (solução 2), transferindo respectivamente 50 µl, 100 µl, 250 µl, 500 µl, 1 ml, 2 ml, 3 ml, 4 ml para balões volumétricos de 20 ml. Adicionou-se a cada solução 1 ml da solução de padrão interno de concentração 0,008 mg/ml e diluiu-se com tolueno. Estas soluções foram preparadas em 5 dias independentes por forma a determinar os limites analíticos do método consoante o composto em causa.

2.1.7. Soluções de amostra fortificada para o estudo da exactidão

Uma quantidade de amostra equivalente a cerca de 1 g de substância activa foi pesada utilizando uma balança analítica (Mettler Toledo AX204, Suíça) e à qual foram em seguida adicionados cerca de 100 ml de acetona, 1 ml de solução de padrão interno de concentração 0,002 mg/ml e 1 ml de solução mãe combinada de padrões (solução 2). Todo o processo de preparação de amostra foi efectuado tal como está indicado em 1.4.1.

Efectuou-se o procedimento referido anteriormente, adicionando respectivamente 1,5 ml e 2 ml da solução mãe combinada de padrões por forma a obter um estudo da recuperação a três níveis de concentração diferentes.

A tabela 12 indica as concentrações a atingir de cada um dos pesticidas para os três níveis de fortificação.

Parte experimental

Tabela 12 – Concentração (ppm) a atingir das soluções padrão de pesticidas usadas na avaliação da exactidão do método analítico para 3 níveis de concentração diferentes

Composto	Concentração (ppm)		
	Nível fortificação 1	Nível fortificação 2	Nível fortificação 3
α – Hexaclorociclo-hexano	0,0240	0,0360	0,0480
Hexaclorobenzeno	0,0080	0,0120	0,0160
β – Hexaclorociclo-hexano	0,0240	0,0360	0,0480
Lindano	0,0480	0,0720	0,0960
δ – Hexaclorociclo-hexano	0,0240	0,0360	0,0480
ϵ – Hexaclorociclo-hexano	0,0240	0,0360	0,0480
Heptaclo	0,0040	0,0060	0,0080
Aldrina	0,0040	0,0060	0,0080
<i>cis</i> – Heptaclo-epóxido	0,0040	0,0060	0,0080
<i>o,p'</i> – DDE	0,0800	0,1200	0,1600
α – Endossulfano	0,2400	0,3600	0,4800
Dieldrina	0,0040	0,0060	0,0080
<i>p,p'</i> – DDE	0,0800	0,1200	0,1600
<i>o,p'</i> – DDD	0,0800	0,1200	0,1600
Endrina	0,0040	0,0060	0,0080
β – Endossulfano	0,0240	0,0360	0,0480
<i>o,p'</i> – DDT	0,0800	0,1200	0,1600
<i>p,p'</i> – DDT	0,0800	0,1200	0,1600
<i>cis</i> – Permetrina	0,0800	0,1200	0,1600
<i>trans</i> – Permetrina	0,0800	0,1200	0,1600
Cipermetrina	0,0800	0,1200	0,1600
Fenvalerato	0,1200	0,1800	0,2400
Deltametrina	0,0400	0,0600	0,0800

2.2. Armazenamento de soluções

Como possíveis fontes de degradação de pesticidas destaca-se a luz. Desta forma, a amostra e todas as soluções e extractos foram mantidos ao abrigo da luz, tendo sido utilizado para este efeito material de vidro âmbar. Até completar a análise, todas as soluções foram armazenadas num recipiente bem rolhado, sob refrigeração.

3. Validação do método analítico

3.1. Especificidade/Selectividade

A especificidade/selectividade é a capacidade de um método identificar e distinguir um analito em particular numa mistura complexa sem interferência dos outros componentes.^{84,85}

Para a avaliação da especificidade/selectividade do método analítico cada composto em estudo foi identificado por GC-MS em modo varrimento total por comparação com bibliotecas de espectros.^{86,87}

Com o objectivo de determinar a resolução entre os vários compostos, o tempo de retenção e o desvio padrão relativo do tempo de retenção, foi injectada 6 vezes no sistema cromatográfico GC- μ ECD solução combinada de padrões correspondente à concentração alvo. Determinou-se o valor médio dos vários parâmetros mencionados.

Injectou-se também um branco de solvente (tolueno) para confirmar a inexistência de picos interferentes.

A possível interferência das matrizes das amostras em estudo foi avaliada recorrendo ao GC-MS sempre que existiam dúvidas relativamente à identidade do pico em questão.

3.2. Estudo da linearidade

O intervalo de linearidade é o intervalo de concentrações onde a resposta instrumental é proporcional à concentração do analito.^{84,85,88}

Para o estudo da linearidade foram analisadas cada uma das soluções indicadas em 2.1.4., injectando em triplicado no sistema GC- μ ECD. Para cada um dos compostos em estudo determinaram-se as áreas relativas ao padrão interno.

Foi efectuado para cada composto o cálculo da regressão linear pelo método dos mínimos quadrados das áreas relativas obtidas em função dos vários níveis de concentração e calculado o coeficiente de determinação (r^2) para cada uma das curvas. Efectuou-se o teste de Fisher Snedecor para confirmar a linearidade da função de acordo com a norma ISO 8466-1⁸⁸ e o estudo da distribuição dos valores normalizados.

3.3. Estudo da gama de trabalho

A gama de trabalho é definida como sendo o intervalo de concentrações para o qual foi demonstrado a inexistência de diferenças significativas das variâncias relativas ao primeiro e ao último padrão.⁸⁴

O Guia Relacre 13⁸⁴ relativo à validação de métodos internos de ensaio em análise química recomenda a avaliação da gama de trabalho através do teste da homogeneidade de variâncias e a utilização da norma ISO 8466-1⁸⁸ para modelos lineares e da norma 8466-2⁸⁹ para modelos polinomiais.

Através do teste de homogeneidade de variâncias, foi analisada a solução correspondente ao nível de concentração mais baixo e a solução correspondente ao nível de concentração mais elevado em 10 réplicas independentes, injectadas no sistema cromatográfico GC- μ ECD em duplicado. Para cada um dos compostos em estudo determinaram-se as áreas relativas ao padrão interno.

Após a determinação da gama de trabalho foi determinada a equação da recta e o coeficiente de determinação (r^2).

3.4. Estudo da precisão

A precisão tem como finalidade a avaliação da dispersão de resultados entre ensaios independentes, repetidos sobre uma mesma amostra, amostras semelhantes ou padrões em condições definidas.^{84,85}

Na avaliação desta dispersão existem duas medidas extremas: a repetibilidade e a reprodutibilidade. Enquanto que a repetibilidade exprime a precisão de um método efectuado em condições idênticas (mesmo Laboratório, analista, equipamento, reagentes e curtos intervalos de tempo), a reprodutibilidade refere-se à precisão de um método efectuado em condições diferentes, sobre uma mesma amostra fazendo variar as condições de medição. A precisão intermédia encontra-se entre estas duas medidas extremas de precisão na qual são definidas exactamente qual ou quais as condições a variar.⁸⁴

3.4.1. Repetibilidade da injeção

Para o estudo da repetibilidade da injeção efectuaram-se 6 injeções consecutivas no sistema cromatográfico GC- μ ECD da solução combinada de padrões correspondente à concentração alvo. Determinou-se o valor médio do desvio padrão relativo do tempo de retenção obtido para cada um dos compostos, assim como o desvio padrão relativo das áreas relativas ao padrão interno.

3.4.2. Repetibilidade

Injectou-se em triplicado no sistema cromatográfico GC- μ ECD cada uma das 9 soluções de cada nível de concentração, indicadas em 2.1.5. (Tabela 10). Determinaram-se as áreas relativas ao padrão interno, calculou-se a percentagem do valor médio da concentração das 9 determinações em função do valor esperado e o desvio padrão relativo obtido.

3.4.3. Precisão intermédia

Injectou-se em triplicado no sistema cromatográfico GC- μ ECD cada uma das 3 soluções de cada nível de concentração, indicadas em 2.1.5. (Tabela 11). Repetiu-se o mesmo procedimento em mais 2 dois dias independentes. Determinaram-se as áreas relativas ao padrão interno, calculou-se a percentagem do valor médio da concentração das 9 determinações em função do valor esperado e o desvio padrão relativo obtido.

3.5. Estudo dos limites analíticos

Considerando que o limite de detecção (LD) é o teor, a partir do qual é possível detectar a presença do analito com uma certeza estatística razoável e que o limite de quantificação (LQ) corresponde à menor concentração, a partir da qual é possível a quantificação do analito com uma determinada exactidão e precisão, efectuou-se a sua determinação através do desvio padrão residual da recta de calibração.^{84,85}

Os resultados obtidos através do desvio padrão residual da recta de calibração foram confirmados experimentalmente injectando em triplicado no sistema GC- μ ECD soluções padrão de cada composto nos vários níveis de concentração preparados em 5 dias independentes, tal como indicado em 2.1.6.

3.6. Estudo da exactidão

A exactidão é definida como sendo a concordância entre o resultado de um ensaio e o valor de referência aceite como convencionalmente verdadeiro.^{84,85}

Para a avaliação da exactidão foram injectadas em triplicado no sistema GC- μ ECD as soluções de amostra fortificada em três níveis de concentração, tal como indicado em 2.1.7. Determinaram-se as áreas obtidas para os diferentes compostos relativas ao padrão interno e foi calculada para cada um dos compostos em estudo a percentagem de recuperação para cada nível de concentração nas matrizes analisadas.

III. Resultados e Discussão

1. Análise por GC- μ ECD - Optimização das condições cromatográficas

1.1. Estudo da eficiência da coluna cromatográfica em função da velocidade linear da fase móvel

Iniciou-se o trabalho analítico utilizando uma coluna com as características indicadas na monografia da Farmacopeia Europeia - coluna 5% fenil-metilpolisiloxano 30 m x 0,32 mm x 0,25 μ m.³³ O gás de arraste utilizado foi o argon/metano (95:5).

Para estudar a eficiência da coluna em função do fluxo do gás de arraste foi preparada uma solução do padrão interno indicado pela Farmacopeia Europeia – Carbofenotião a 0,4 μ g/ml. Esta solução foi injectada em triplicado no GC- μ ECD, utilizando diferentes fluxos do gás de arraste (1,0 a 4,0 ml/min).

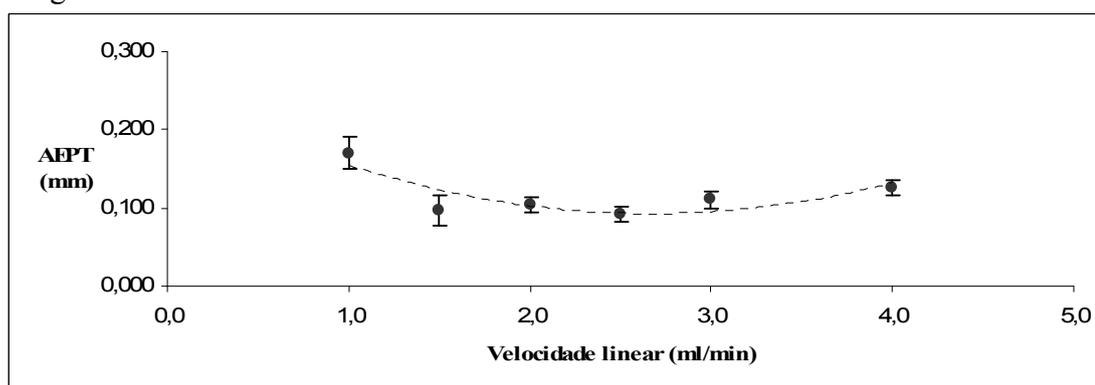
Foi determinado o valor médio do número de pratos teóricos efectivos obtido para o Carbofenotião nas diferentes velocidades lineares testadas medidas à saída da coluna e a partir dos resultados obtidos e considerando que a coluna apresenta um comprimento de 30 metros, foi determinada a altura equivalente do prato teórico (AEPT), através da equação 3.

$$AEPT = \left(\frac{L}{N} \right) \quad \text{(Equação 3)}$$

Sendo:

L - Comprimento da coluna; N - Número de pratos teóricos efectivos.

A figura 2 ilustra os resultados obtidos.



Velocidade linear (ml/min)	1,0	1,5	2,0	2,5	3,0	4,0
AEPT (mm)	0,170	0,097	0,105	0,092	0,110	0,126

Figura 2 – Estudo da AEPT em função da velocidade linear do gás de arraste argon/metano (95:5), medido à saída da coluna, utilizando uma solução de Carbofenotião a 0,4 μ g/ml

Os resultados apresentados na figura 2 mostram que a eficiência da coluna é equivalente quando são utilizados fluxos de argon/metano de 1,5 ml/min a 3,0 ml/min, diminuindo quando os fluxos utilizados são de 1,0 ml/min ou 4,0 ml/min.

Para os valores testados, o fluxo aconselhável à saída da coluna encontra-se entre 1,5 ml/min e 3,0 ml/min, pelo que vão ser tidos em conta estes resultados na escolha do fluxo do gás de arraste. No entanto, para auxiliar na escolha do fluxo óptimo do gás de arraste é necessário avaliar igualmente outros factores, nomeadamente a resolução entre os vários compostos.

1.2. Avaliação do Factor de Resolução

Avaliou-se o Factor de Resolução entre os vários compostos preparando uma solução combinada de padrões de pesticidas em estudo, com o padrão interno Carbofenotião e injectando no sistema cromatográfico GC- μ ECD utilizando várias condições de trabalho, nomeadamente diferentes gradientes de temperatura do forno da coluna e fluxos do gás de arraste.

Iniciou-se este estudo utilizando as condições indicadas na Farmacopeia Europeia por forma a verificar se com estas condições ocorria a separação eficiente dos vários compostos.

Condições de temperatura do forno da coluna indicadas na Farmacopeia Europeia ³³:
80° C (1 min) - 30°C/min - 150°C (3 min) - 4°C/min - 280°C (1 min)

Uma vez que a Farmacopeia Europeia não indica o fluxo de gás de arraste a utilizar, optou-se por utilizar um fluxo de 2 ml/min por ser um compromisso razoável entre os valores adequados ao desempenho da coluna e velocidade da análise.

A figura 3 ilustra o cromatograma obtido nas condições de temperatura do forno da coluna indicadas na Farmacopeia, na análise por GC- μ ECD da solução combinada de padrões, utilizando o Carbofenotião como padrão interno.

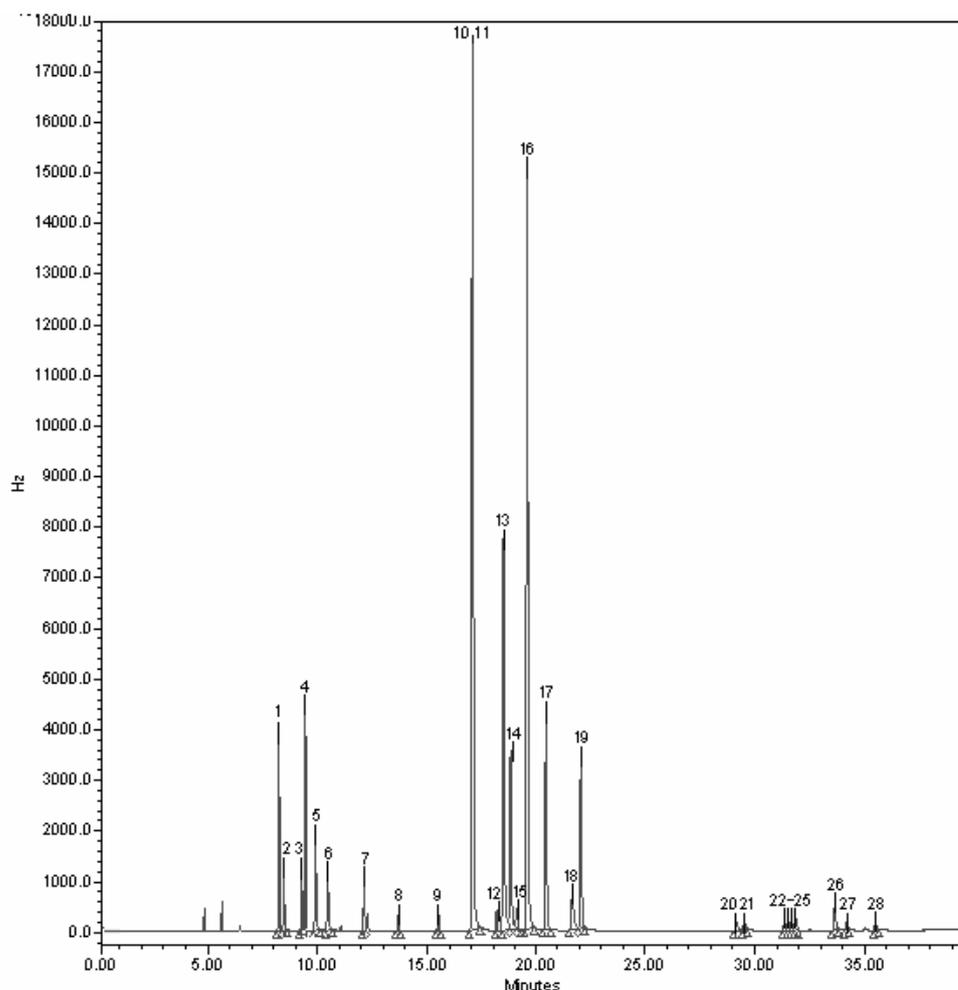


Figura 3 – Cromatograma da solução combinada de padrões, utilizando o Carbofenotião como padrão interno, obtido após análise no GC- μ ECD nas condições de temperatura do forno da coluna indicadas na Farmacopeia Europeia

Legenda:

1 - α Hexaclorociclo-hexano; **2** - Hexaclorobenzeno; **3** - β Hexaclorociclo-hexano; **4** - Lindano;
5 - δ Hexaclorociclo-hexano; **6** - ϵ Hexaclorociclo-hexano; **7** - Heptacloro; **8** - Aldrina;
9 - *cis*-Heptacloro-epóxido; **10** - *o,p'*-DDE; **11** - α Endossulfano; **12** - Dieldrina; **13** - *p,p'*-DDE;
14 - *o,p'*-DDD; **15** - Endrina; **16** - β Endossulfano; **17** - *o,p'*-DDT; **18** - Carbofenotião (padrão interno);
19 - *p,p'*-DDT; **20** - *cis*-Permetrina; **21** - *trans*-Permetrina; **22 a 25** - isómeros da Cipermetrina;
26 - Fenvalerato isómero_1; **27** - Fenvalerato isómero_2; **28** - Deltametrina.

Utilizando as condições indicadas na Farmacopeia Europeia ocorre a co-eluição dos compostos *o,p'*-DDE (10) e α Endossulfano (11), pelo que foi necessário alterar as condições de trabalho por forma a obter uma separação eficiente dos compostos em causa.

1.2.1. Otimização da temperatura do forno da coluna

Utilizaram-se vários gradientes de temperatura do forno da coluna com o objectivo de otimizar a separação dos compostos *o,p'*-DDE e α Endossulfano.

São apresentados no texto alguns exemplos dos cromatogramas obtidos utilizando diferentes condições de programa de temperatura de forno da coluna e com um fluxo de gás de arraste de 2 ml/min.

Foi efectuado, numa primeira fase, um gradiente de temperatura mais lento e a temperatura final do forno foi aumentada para 290°C para promover uma limpeza mais eficiente da coluna entre as várias análises. As condições instrumentais relativas à temperatura do forno da coluna são: 80° C (3 min) - 30°C/min - 150°C (3 min) - 1,5°C/min - 290°C (2 min). A figura 4 ilustra o cromatograma obtido.

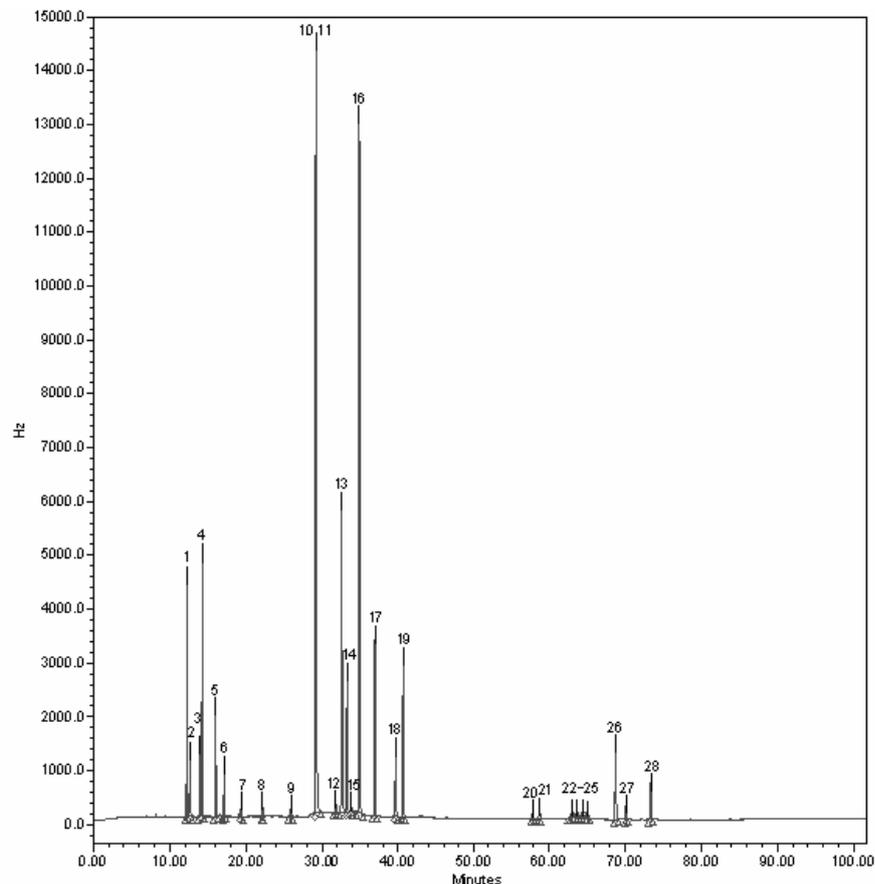


Figura 4 – Cromatograma da solução combinada de padrões, utilizando o Carbofenotião como padrão interno, obtido após análise no GC- μ ECD com o gradiente de temperatura do forno da coluna: 80° C (3 min) - 30°C/min - 150°C (3 min) - 1,5°C/min - 290°C (2 min)

Legenda:

- 1 - α Hexaclorociclo-hexano; 2 - Hexaclorobenzeno; 3- β Hexaclorociclo-hexano; 4 - Lindano;
 5 - δ Hexaclorociclo-hexano; 6 - ϵ Hexaclorociclo-hexano, 7 - Heptacloro; 8 - Aldrina;
 9 - *cis*-Heptacloro-epóxido; 10 - *o,p'*-DDE; 11 - α Endossulfano; 12 - Dieldrina; 13 - *p,p'*-DDE;
 14 - *o,p'*-DDD; 15 - Endrina; 16 - β Endossulfano; 17 - *o,p'*-DDT; 18 - Carbofenotião (padrão interno);
 19 - *p,p'*-DDT; 20 - *cis*-Permetrina; 21 - *trans*-Permetrina; 22 a 25 - isómeros da Cipermetrina;
 26 - Fenvalerato isómero₁; 27 - Fenvalerato isómero₂; 28 - Deltametrina.

Com estas condições de trabalho continua a ocorrer a co-eluição dos compostos *o,p'*-DDE e α Endossulfano.

Foi utilizado em seguida um gradiente de temperatura do forno ainda mais lento para verificar se era possível efectuar a separação entre o *o,p'*-DDE e α Endossulfano. As condições instrumentais relativas à temperatura do forno da coluna utilizadas foram: 80° C (3 min) - 30°C/min - 150°C (3 min) - 0,8°C/min - 290°C (2 min). A figura 5 ilustra o resultado obtido.

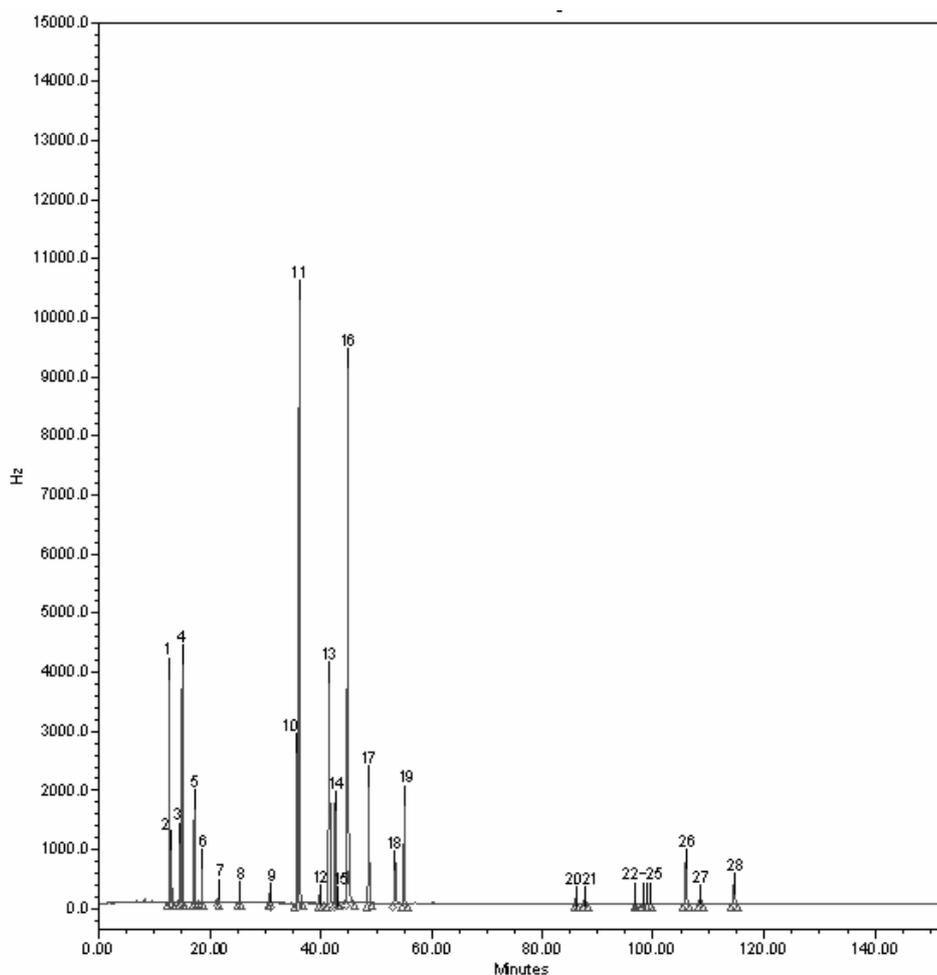


Figura 5 – Cromatograma da solução combinada de padrões, utilizando o Carbofenotião como padrão interno, obtido após análise no GC- μ ECD com o gradiente de temperatura do forno da coluna: 80° C (3 min) - 30°C/min - 150°C (3 min) - 0,8°C/min - 290°C (2 min)

Legenda:

1 - α Hexaclorociclo-hexano; 2 - Hexaclorobenzeno; 3- β Hexaclorociclo-hexano; 4 - Lindano;
5 - δ Hexaclorociclo-hexano; 6 - ϵ Hexaclorociclo-hexano; 7 - Heptacloro; 8 - Aldrina;
9 - *cis*-Heptacloro-epóxido; 10 - *o,p'*-DDE; 11 - α Endossulfano; 12 - Dieldrina; 13 - *p,p'*-DDE;
14 - *o,p'*-DDD; 15 - Endrina; 16 - β Endossulfano; 17 - *o,p'*-DDT; 18 - Carbofenotião (padrão interno);
19 - *p,p'*-DDT; 20 - *cis*-Permetrina; 21 - *trans*-Permetrina; 22 a 25 - isómeros da Cipermetrina;
26 - Fenvalerato isómero_1; 27 - Fenvalerato isómero_2; 28 - Deltametrina.

Utilizando o gradiente de temperatura do forno descrito ocorre uma melhor separação entre os compostos α Endossulfano e *o,p'*-DDE, apresentando um Factor de Resolução de 1,26. No entanto, o cromatograma obtido apresenta um tempo de análise extremamente longo, o que torna pouco viável a utilização em rotina de um método analítico com estas condições cromatográficas.

1.2.2. Otimização do fluxo do gás de arraste

Uma vez que alterando o gradiente de temperatura do forno não foi possível obter uma resolução adequada para os vários compostos com um tempo de análise aceitável (inferior a 60 minutos), foram utilizados diferentes fluxos do gás de arraste com as condições de gradiente de temperatura de forno: 80° C (3 min) - 30°C/min - 150°C (3 min) - 4°C/min - 290°C (2 min).

São apresentados na tabela 13 alguns valores do Factor de Resolução obtidos em função do fluxo do gás de arraste para os grupos de compostos que foram considerados como sendo os mais problemáticos (α Endossulfano, *o,p'*-DDE e *p,p'*-DDE, Dieldrina) devido à sua co-eluição em determinadas condições instrumentais.

Tabela 13 – Estudo do Factor de Resolução, em função do fluxo do gás de arraste, para os compostos α Endossulfano, *o,p'*-DDE e *p,p'*-DDE, Dieldrina

Fluxo (ml/min)	R α Endossulfano e <i>o,p'</i> -DDE	R Dieldrina e <i>p,p'</i> -DDE
1,1	1,70	co-eluem
1,2	1,62	co-eluem
1,3	1,55	1,25
1,4	1,32	1,55
1,5	1,26	1,51
2,0	co-eluem	2,06

R - Resolução.

Para as várias condições de análise testadas, verificou-se que a separação mais eficiente de todos os compostos foi obtida utilizando um fluxo constante de gás de arraste de 1,4 ml/min com um programa de temperatura do forno de: 80° C (3 min) - 30°C/min - 150°C (3 min) - 4°C/min - 290°C (2 min).

Com estas condições foi obtido um Factor de Resolução para a maior parte dos compostos superior a 2,0 apesar de para alguns dos compostos só ter sido possível obter uma resolução superior a 1,0 como é o caso da resolução obtida entre o *o,p'*-DDE e o α Endossulfano e entre a Dieldrina e o *p,p'*-DDE. No que diz respeito aos vários isómeros da Cipermetrina, o Factor de Resolução obtido foi também superior a 1,0 nas condições de análise descritas. Os valores de resolução obtidos permitiram ainda a integração adequada dos picos.

1.3. Optimização das condições do injector

O injector de um cromatógrafo gasoso deve ser sujeito a uma optimização das condições de trabalho quando é utilizado na análise de pesticidas organoclorados, nomeadamente para compostos como a Endrina e o DDT.⁷⁹

O protocolo da EPA (métodos SW-846) requer a verificação da degradação destes compostos e refere que factores tais como a contaminação dos injectores, a sua actividade química ou a utilização de temperaturas demasiado elevadas podem ocasionar a degradação da Endrina e o DDT.⁷⁹

1.3.1. Temperatura do injector

A temperatura do injector indicada no método cromatográfico descrito na Farmacopeia Europeia é de 250°C.³³ No entanto, tal foi referido anteriormente, o método da EPA para a análise de pesticidas organoclorados por cromatografia gasosa refere que temperaturas demasiado elevadas podem levar à degradação de compostos ao nível do injector, indicando como uma das medidas correctivas a necessidade de baixar a temperatura do injector, para valores até 205°C.^{50,79} Uma vez que a técnica de injeção utilizada é a técnica de *splitless*, esta discrepância de recomendações vai ser avaliada neste trabalho.

Com a finalidade de verificar a influência da temperatura do injector (T), procedeu-se à injeção em triplicado de uma solução combinada de padrões de referência com o injector a diferentes temperaturas: 205°C, 215°C, 230°C, 250°C, 270°C e 290°C.

A influência da temperatura do injector foi avaliada tendo em conta os valores das áreas relativas ao padrão interno - AR (área do composto/área do padrão interno) observadas para os vários compostos e os valores de desvio padrão relativo (DPR) das áreas relativas observadas.

Os valores médios das áreas relativas (AR) mostram que não se verificam diferenças relevantes para cada um dos compostos nas várias temperaturas estudadas, sendo os valores obtidos da mesma ordem de grandeza (Tabela 14).

Tabela 14 – Estudo dos valores médios das AR dos vários compostos utilizando diferentes T do injecto

Composto	Valores de AR a diferentes T do injecto					
	T=205°C	T=215°C	T=230°C	T=250°C	T=270°C	T=290°C
α – Hexaclorociclo-hexano	2,12	2,13	1,99	2,03	1,96	2,05
Hexaclorobenzeno	0,68	0,69	0,65	0,67	0,66	0,70
β – Hexaclorociclo-hexano	0,97	0,97	0,92	0,94	0,92	0,95
Lindano	2,51	2,52	2,35	2,38	2,28	2,35
δ – Hexaclorociclo-hexano	1,63	1,66	1,53	1,52	1,45	1,46
ϵ – Hexaclorociclo-hexano	0,93	0,97	0,95	0,95	0,97	0,95
Heptacloro	0,32	0,33	0,31	0,27	0,25	0,22
Aldrina	0,26	0,26	0,25	0,26	0,26	0,27
<i>cis</i> – Heptacloro-epóxido	0,24	0,25	0,24	0,24	0,24	0,25
<i>o,p'</i> – DDE	2,55	2,56	2,49	2,61	2,60	2,80
α – Endossulfano	6,68	6,72	6,46	6,70	6,64	6,97
Dieldrina	0,26	0,27	0,25	0,26	0,26	0,28
<i>p,p'</i> – DDE	4,09	4,18	4,04	4,22	4,23	4,56
<i>o,p'</i> – DDD	1,67	1,67	1,62	1,76	1,78	1,93
Endrina	0,24	0,23	0,23	0,19	0,18	0,15
β – Endossulfano	6,57	6,52	6,13	6,44	6,36	6,77
<i>o,p'</i> – DDT	2,73	2,82	2,65	2,21	2,05	1,98
<i>p,p'</i> – DDT	2,16	2,24	2,09	1,90	1,78	1,70
<i>cis</i> -Permetrina	0,24	0,26	0,26	0,26	0,28	0,30
<i>trans</i> -Permetrina	0,29	0,30	0,31	0,32	0,35	0,37
Cipermetrina_1	0,29	0,29	0,30	0,35	0,36	0,30
Cipermetrina_2	0,27	0,21	0,22	0,22	0,25	0,20
Cipermetrina_3	0,10	0,10	0,11	0,11	0,10	0,10
Cipermetrina_4	0,10	0,11	0,10	0,14	0,12	0,10
Fenvalerato_1	2,03	2,12	2,13	2,16	2,35	2,34
Fenvalerato_2	0,50	0,54	0,56	0,58	0,64	0,70
Deltametrina	1,03	1,10	1,19	1,21	1,27	1,29

O desvio padrão relativo das áreas relativas é um indicador mais adequado para a escolha da temperatura injecto, uma vez que são observadas diferenças relevantes para o mesmo composto consoante a temperatura seleccionada.

A tabela 15 ilustra os resultados obtidos, encontrando-se assinalados a vermelho todos os valores obtidos superiores a 2,0%.

Resultados e discussão

Tabela 15 - Estudo dos valores do DPR das AR dos vários compostos utilizando diferentes T do injector

Composto	Valores de DPR (%) das AR a diferentes T do injector					
	T=205°C	T=215°C	T=230°C	T=250°C	T=270°C	T=290°C
α – Hexaclorociclo-hexano	1,93	2,11	0,66	1,34	2,82	2,85
Hexaclorobenzeno	1,92	2,01	0,51	1,23	2,49	2,65
β – Hexaclorociclo-hexano	1,36	1,57	0,66	1,33	3,57	2,09
Lindano	1,94	2,06	0,49	1,47	2,56	2,57
δ – Hexaclorociclo-hexano	1,43	1,73	0,59	1,08	1,92	1,60
ϵ – Hexaclorociclo-hexano	0,61	1,92	0,98	1,01	0,73	1,91
Heptacloro	1,17	1,33	0,45	0,79	0,81	2,31
Aldrina	1,68	1,69	0,53	1,06	2,05	1,63
<i>cis</i> – Heptacloro-epóxido	1,13	1,11	0,45	0,95	1,70	1,14
<i>o,p'</i> – DDE	1,29	1,71	0,60	0,66	2,42	2,76
α – Endossulfano	1,42	2,09	0,45	1,20	4,60	3,17
Dieldrina	0,35	1,06	0,43	1,01	1,76	0,97
<i>p,p'</i> – DDE	0,51	1,94	0,57	1,16	2,41	2,99
<i>o,p'</i> – DDD	0,99	1,37	0,54	1,10	2,60	2,90
Endrina	1,32	0,63	0,11	3,16	5,15	4,41
β – Endossulfano	0,93	1,94	0,43	1,05	5,81	2,72
<i>o,p'</i> – DDT	0,65	1,36	0,58	0,48	0,77	0,49
<i>p,p'</i> – DDT	0,58	0,79	0,26	0,88	1,39	1,51
<i>cis</i> -Permetrina	2,70	1,05	0,90	0,86	0,28	0,82
<i>trans</i> -Permetrina	3,62	1,38	1,22	1,25	0,45	0,66
Cipermetrina_1	3,69	3,62	2,54	1,85	5,31	7,86
Cipermetrina_2	6,45	1,52	1,60	1,93	2,46	3,18
Cipermetrina_3	3,80	1,24	0,25	1,71	2,95	1,74
Cipermetrina_4	6,59	0,97	0,79	1,87	2,20	2,25
Fenvalerato_1	6,16	1,57	1,25	1,01	1,40	0,83
Fenvalerato_2	7,81	1,46	0,86	1,35	1,17	0,87
Deltametrina	10,51	1,04	1,38	1,60	2,14	1,97

Como é possível verificar na tabela 15, a 205°C, 215°C, 270°C e 290°C são observados valores de desvio padrão relativo mais elevados e uma maior dispersão dos resultados, enquanto que as temperaturas que originam valores mais baixos são as correspondentes a 230°C e 250°C. A 230°C são observados valores de DPR para todos os compostos inferiores a 2,0%, excepto para um dos isómeros da Cipermetrina, enquanto que a 250°C os valores observados são sempre inferiores a 2,0% com excepção da Endrina que apresenta um valor de 3,2%. Os valores mais elevados de DPR a temperaturas baixas podem ser interpretados como irregularidades na evaporação, enquanto as temperaturas mais elevadas podem provocar degradação dos compostos, o que pode justificar os elevados valores de DPR.

O protocolo da EPA refere a Endrina e o DDT como compostos particularmente susceptíveis de degradação ao nível do injector ⁷⁹, os valores obtidos de DPR para estes compostos a temperaturas mais elevadas confirmam este facto (Tabela 15) e por isso procedeu-se também à injeção de soluções padrão de Endrina e de DDT utilizando diferentes valores de temperatura do injector para permitir auxiliar na escolha da temperatura mais adequada.

Desta forma, é interessante avaliar a ocorrência dos seus produtos de degradação. No caso da Endrina formam-se a cetona e aldeído correspondente, e no caso do *p,p'*-DDT formam-se compostos de DDE e DDD. ^{57,79}

A avaliação da ocorrência dos produtos de degradação foi efectuada através da determinação da percentagem de área do composto que não é convertida nos respectivos produtos de degradação em função da temperatura do injector utilizada.

Para a identificação dos produtos de degradação da Endrina e DDT procedeu-se à sua injeção no sistema cromatográfico GC-MS em modo varrimento 50 - 500 *m/z* por comparação dos espectros obtidos com espectros existentes nas bibliotecas de espectros. ^{86,87}

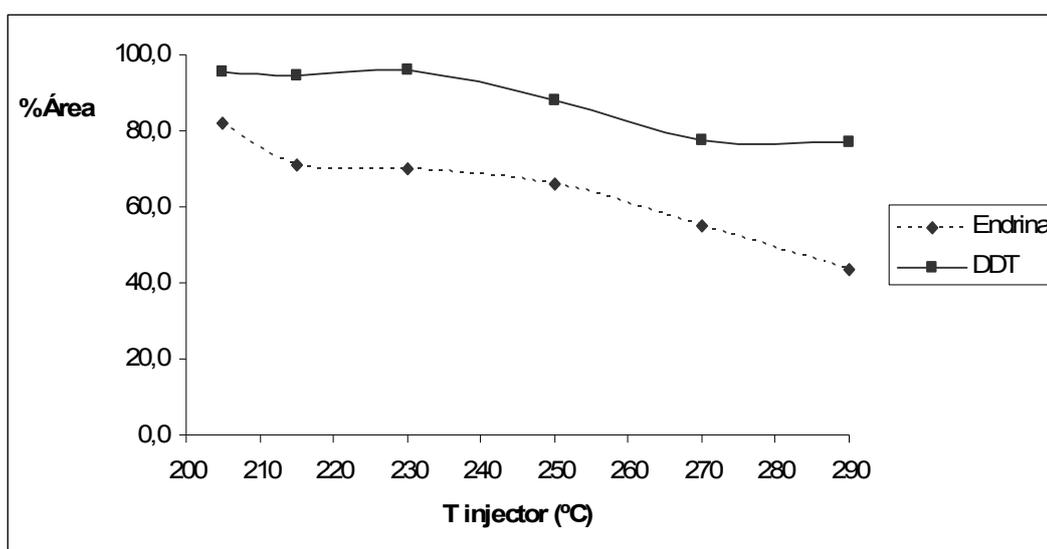


Figura 6 – Estudo da degradação da Endrina e DDT em função da temperatura do injector

A figura 6 ilustra a ocorrência de um aumento da degradação da Endrina para o valor de 215°C comparativamente a 205°C. No intervalo de 215°C a 230°C não se observam diferenças relevantes nos valores da percentagem da sua área, sendo esta diferença mais notória a partir dos 250°C. A percentagem de área da Endrina diminui à medida que a temperatura do injector aumenta, pois aumentam as áreas dos seus compostos de degradação (aldeído e cetona).

Resultados e discussão

A figura 7 ilustra dois cromatogramas obtidos para a injeção da solução padrão de Endrina, utilizando respectivamente temperaturas do injetor de 205°C e 290°C.

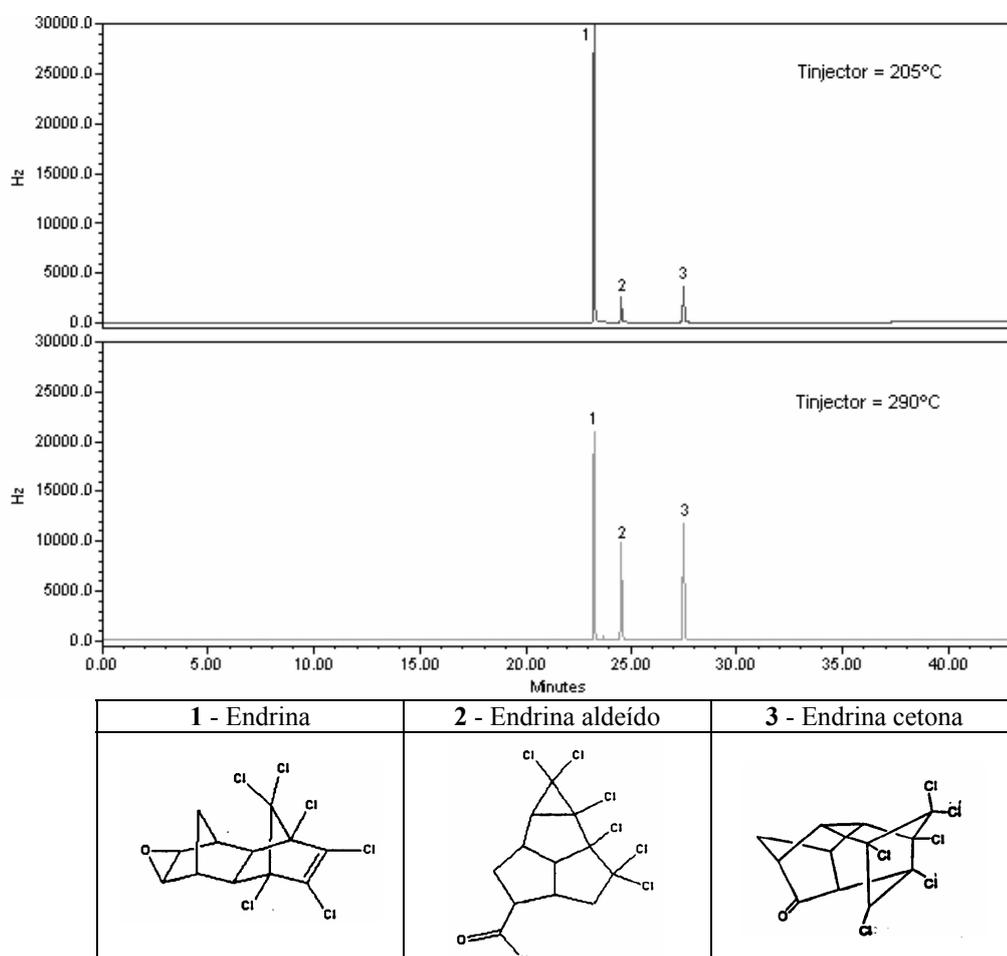


Figura 7 – Estudo da degradação do composto Endrina no respectivo aldeído e cetona em função da temperatura do injetor (205°C e 290°C)

No que diz respeito ao estudo da degradação do DDT em função da temperatura do injetor é possível verificar através da figura 6 que este composto apresenta uma degradação mais notória a partir dos 250°C.

Apesar da temperatura onde se verifica uma menor degradação dos compostos Endrina e DDT ser a de 205°C, nesta temperatura são verificados valores de DPR muito elevados em injeções repetidas de solução combinada de padrões, nomeadamente para os compostos de tempo de retenção mais elevado (Tabela 15), pelo que se optou por não utilizar este valor de temperatura do injetor. Entre 215°C e 230°C não são observadas diferenças relevantes no que diz respeito à degradação da Endrina e DDT, no entanto a temperatura de 230°C conduziu a valores mais reduzidos de DPR para todos os compostos (Tabela 15), inclusive para a Endrina e o DDT (Figura 8).

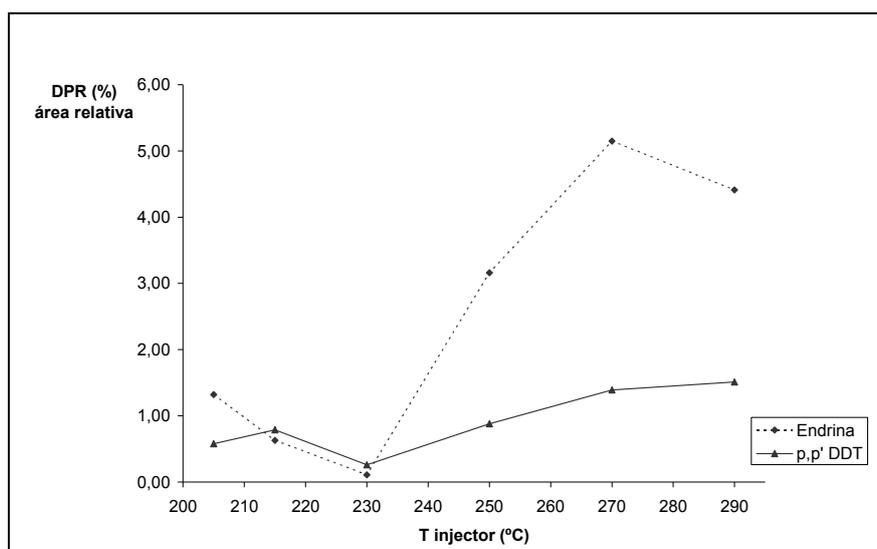


Figura 8 – Estudo do DPR das AR dos compostos Endrina, e *p,p'*- DDT em função da temperatura do injetor

Os factos anteriormente mencionados permitiram seleccionar a temperatura de 230°C como sendo a mais adequada ao compromisso necessário.

1.3.2. Tipo de injeção

O modo de injeção em *splitless* é normalmente utilizado para a análise de resíduos e é caracterizado por existir uma transferência lenta da amostra para a coluna, ocorrendo um contacto mais ou menos longo com o *liner*^{g)} que promove a vaporização.^{90,91,92}

Uma determinada quantidade de amostra é injectada no *liner* que se encontra a uma temperatura elevada, onde é vaporizada e posteriormente introduzida na coluna que se encontra inicialmente a uma temperatura abaixo do ponto de ebulição do solvente. Para evitar a perda da amostra, numa primeira fase o fluxo do gás é desligado levando a que consequentemente toda a amostra entre na coluna. Após um tempo determinado, a válvula de *split* é aberta e o fluxo do gás é novamente ligado por forma a que qualquer quantidade de amostra residual presente no *liner* seja eliminada, iniciando-se o programa de temperatura do forno.^{90,92}

O tempo que vai desde a injeção da amostra até à abertura da válvula é designado por tempo de purga.^{90,92}

É necessária uma optimização do tempo de purga uma vez que tempos não adequados podem levar à degradação dos compostos ao nível do injetor ou à vaporização incompleta da amostra.^{53,91}

g) Não existe consenso em português sobre a sua designação, sendo designado por alguns autores por protector de vidro.⁹⁶

Resultados e discussão

Para auxiliar na escolha do tempo de purga mais adequado foi injectada em triplicado a solução combinada de padrões de referência aos tempos de purga: 0,25 min, 0,50 min, 0,75 min, 1,00 min, 1,25 min, 1,50 min, 1,75 min e 2,00 min.

Foram avaliados os valores do desvio padrão relativo (DPR) das áreas relativas (AR) dos vários compostos aos vários tempos de purga, tal como está indicado na tabela 16. Todos os valores obtidos superiores a 2,0% encontram-se assinalados a vermelho.

Tabela 16 – DPR das AR obtidas para cada um dos compostos utilizando diferentes tempos de purga

Composto	Valores de DPR (%) das AR a diferentes tempos de purga							
	0,25 min	0,50 min	0,75 min	1,00 min	1,25 min	1,50 min	1,75 min	2,00 min
α – Hexaclorociclo-hexano	10,62	7,92	4,76	3,74	1,51	3,04	1,49	0,88
Hexaclorobenzeno	8,54	6,82	4,13	3,02	1,21	2,79	1,34	0,88
β – Hexaclorociclo-hexano	10,87	8,05	4,67	3,73	1,56	2,86	1,53	0,88
Lindano	8,57	6,49	4,36	2,71	1,14	2,78	1,20	0,78
δ - Hexaclorociclo-hexano	6,28	2,92	4,51	2,78	1,82	1,49	1,33	0,35
ϵ - Hexaclorociclo-hexano	9,16	3,53	4,78	1,15	0,70	2,56	0,61	0,49
Heptacloro	7,76	5,36	3,39	2,81	1,13	2,61	1,31	0,63
Aldrina	7,76	5,36	3,39	2,81	1,13	2,61	1,31	0,63
<i>cis</i> – Heptacloro-epóxido	7,34	4,92	2,78	3,49	0,89	2,27	1,30	0,65
<i>o,p'</i> – DDE	9,19	6,20	2,91	3,26	1,19	1,90	1,43	0,43
α – Endossulfano	10,20	7,71	3,32	4,24	1,43	2,25	1,98	0,83
Dieldrina	6,56	4,95	1,79	2,87	0,91	1,93	1,67	0,49
<i>p,p'</i> – DDE	9,41	6,06	2,67	3,48	1,17	1,86	1,42	0,68
<i>o,p'</i> – DDD	8,69	6,29	2,56	3,84	1,40	1,79	1,40	0,48
Endrina	5,03	2,38	1,99	3,07	0,62	0,75	1,05	0,98
β – Endossulfano	10,12	7,05	2,67	1,40	1,23	1,70	0,50	0,31
<i>o,p'</i> – DDT	8,24	5,43	2,51	2,41	0,86	1,20	1,32	0,66
<i>p,p'</i> – DDT	6,29	3,04	1,47	1,36	0,25	0,71	1,24	0,11
<i>cis</i> -Permetrina	4,47	0,79	3,04	2,49	0,64	0,95	0,92	0,87
<i>trans</i> -Permetrina	3,26	1,44	2,86	2,01	0,41	1,25	1,20	0,67
Cipermetrina_1	8,32	5,44	4,41	11,03	1,77	1,20	5,40	3,21
Cipermetrina_2	13,71	3,63	6,43	1,16	1,98	2,20	1,03	0,99
Cipermetrina_3	12,11	2,18	5,46	1,94	1,54	1,44	0,85	2,09
Cipermetrina_4	18,84	3,03	6,05	2,00	1,53	1,78	1,60	2,86
Fenvalerato_1	2,76	2,29	3,24	2,92	0,78	0,92	0,99	0,55
Fenvalerato_2	1,82	2,48	4,69	2,76	0,86	1,23	1,45	0,74
Deltametrina	1,45	3,35	4,79	2,11	1,35	1,72	1,25	0,57

A tabela 16 mostra que os valores de DPR são bastante mais elevados para os tempos de purga mais baixos, observando-se uma diminuição destes valores a partir de 1,25 minutos.

A escolha do tempo de purga mais adequado pode ser também determinada através do pico do solvente que deve cair abruptamente fazendo um ângulo recto com a linha de base ou através do número de pratos teóricos dos analitos.⁹¹

O tempo deve ser ajustado de forma a que haja uma maior sensibilidade para o analito com o mínimo de arrastamento do solvente. Uma vez que o pico do solvente não é detectado com este tipo de detector, não foi possível utilizar esta metodologia como indicação para a escolha do tempo de purga mais adequado.

A análise do gráfico apresentado na figura 9 mostra que o número de pratos teóricos do composto de tempo de retenção mais elevado (Deltametrina) sofre um aumento progressivo do seu valor à medida que o tempo de purga aumenta, ocorrendo uma estabilização do seu valor a partir de 1,25 minutos.

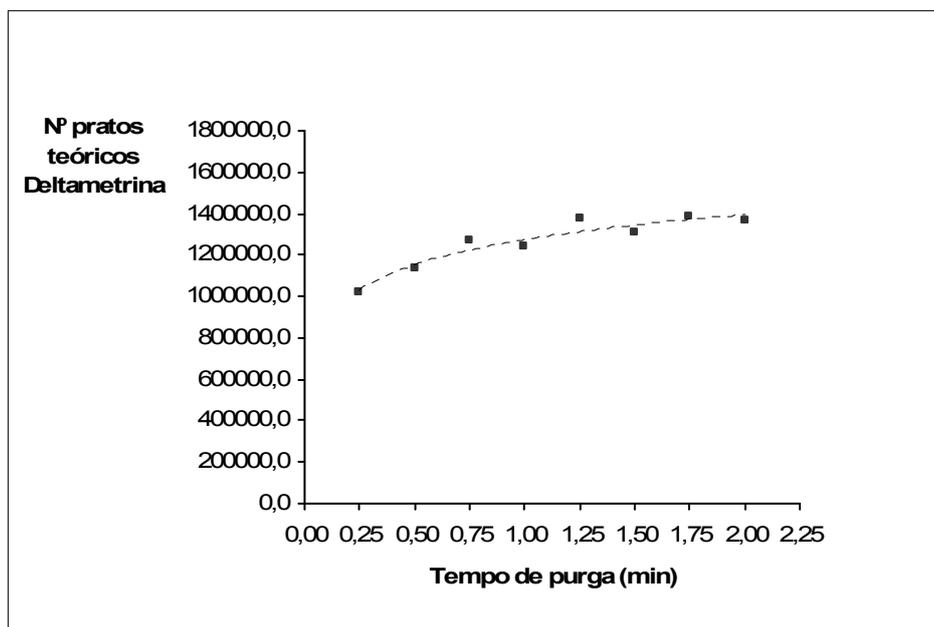


Figura 9 – Estudo da variação do número de pratos teóricos do composto Deltametrina em função do tempo de purga, utilizando um fluxo da válvula de *split* de 60 ml/min

Os resultados obtidos na tabela 16 e figura 9 levaram a optar pelo tempo de purga de 1,25 minutos.

1.3.3. Tipo de *liner*

O *liner* corresponde à superfície que entra em contacto com a amostra antes da sua entrada na coluna.

O vidro, sendo o material mais adequado para constituir o *liner*, pode apresentar actividade devido à presença de grupos silanol, sendo muitas vezes, dependendo dos casos, aconselhável a sua desactivação.⁹³

O *liner* utilizado é, desta forma um factor crítico, estando descrito que *liners* não desactivados podem conduzir a uma quebra de 98% de Endrina, devido ao elevado tempo a que a amostra está em contacto com o *liner* numa injeção em *splitless*.⁹³

Um dos processos de desactivação do vidro consiste em mergulhá-lo numa solução de dimetildiclorosilano (DMCS) em tolueno ou tratamentos com ácido e DMCS.⁹³

Este processo de desactivação do *liner* reduz a quebra de Endrina mas é um processo instável e raramente reduz a degradação para valores inferiores a 15%.⁹³

Neste sentido, têm surgido recentemente *liners* comercialmente disponíveis com características definidas com o objectivo de diminuir a degradação deste tipo de compostos ao nível do injector.

Um artigo da VICI Gig Harbor Group refere a utilização de um *liner* Valco que sofreu um novo processo de desactivação que consiste na incorporação de um revestimento de 2 µm de siloxano num *liner* desactivado o que reduz a degradação destes compostos ao nível do injector para valores inferiores a 1%.⁹³

A Restek apresenta também um *liner* que apresenta uma desactivação por Siltek® apresentando características inertes e um aumento da sua resistência tanto a valores elevados de temperatura como a valores de pH extremos.^{94,95}

Procedeu-se desta forma à comparação de resultados utilizando um *liner* desactivado *straight splitless* da Agilent e *liners straight splitless* da VICI Valco e Restek que apresentam indicações específicas para este tipo de análise.

Foram injectadas nas mesmas condições cromatográficas, soluções padrão de Endrina e DDT utilizando os três tipos de *liners*.

As figuras 10A e 10B ilustram a degradação da Endrina e *p,p'*-DDT através do aparecimento dos vários produtos de degradação aquando da utilização dos 3 *liners* distintos.

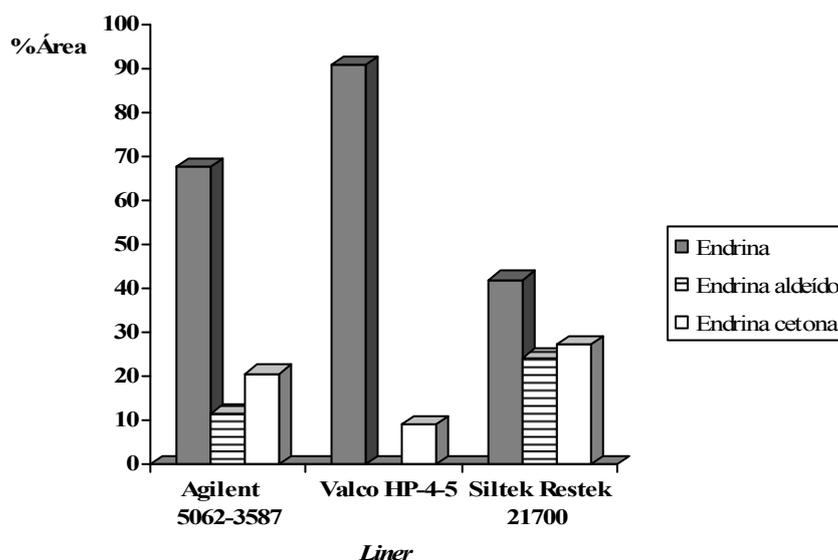


Figura 10A - Estudo da degradação do composto Endrina em função do tipo de *liner* utilizado

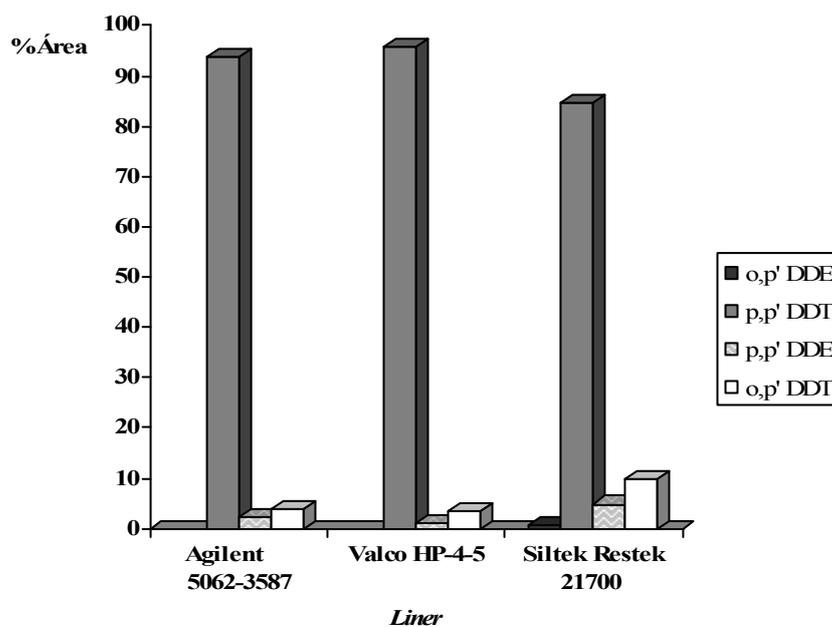


Figura 10B - Estudo da degradação do composto *p,p'*- DDT em função do tipo de *liner* utilizado

A degradação de compostos é mais notória no caso da Endrina do que no DDT, verificando-se que o *liner* que conduz a uma menor degradação do composto, nas mesmas condições cromatográficas, é o *liner* da VICI Valco, sendo este o *liner* a adoptar no decorrer do trabalho analítico em função dos resultados experimentais obtidos.

Segundo o método EPA 8081B ⁷⁹ a degradação de Endrina de DDT pode ser calculada através das seguintes fórmulas:

$$\% \text{ degradação Endrina} = \frac{\sum \text{áreas dos picos de degradação (aldeído + cetona)}}{\sum \text{áreas de todos os picos (endrina + aldeído + cetona)}} \times 100 \quad (\text{Equação 4})$$

$$\% \text{ degradação DDT} = \frac{\sum \text{áreas dos picos de degradação (DDD + DDE)}}{\sum \text{áreas de todos os picos (DDT + DDE + DDD)}} \times 100 \quad (\text{Equação 5})$$

Utilizando as condições cromatográficas optimizadas e utilizando o *liner* escolhido, a percentagem de degradação de Endrina e de DDT é de 9,2 % e 1,0 %, respectivamente. Estes valores estão dentro da margem de erro aceitável para o método analítico e encontram-se também de acordo com o limite máximo recomendado pela EPA de 15 % para cada um dos compostos. ⁷⁹

1.4. Detector

Foi também necessário efectuar uma optimização das condições operacionais do detector μ ECD.

O gás de *make-up* normalmente utilizado no detector ECD é o argon/metano (95:5), sendo recomendável pelo fabricante a utilização de um fluxo de 30 a 60 ml/min. ⁸⁰ Uma vez que o fabricante descreve que a sensibilidade do detector assim como a rapidez cromatográfica pode ser aumentada se houver uma diminuição do fluxo do gás *make-up*, optou-se por utilizar um fluxo de 30 ml/min. ⁸⁰

A escolha do valor da temperatura do detector deve ter em conta a temperatura de eluição do último composto e deve ser 20 a 25°C mais alta do que a temperatura máxima atingida pela coluna, por forma a minimizar a ocorrência de picos, permitindo também que a célula se mantenha sempre limpa entre cada injeção. O valor a seleccionar da temperatura deste detector pode variar entre 250°C e 400°C. ⁸⁰ Uma vez que a temperatura máxima atingida pela coluna para a eluição dos compostos em estudo é de 290°C, foi seleccionada a temperatura do detector de 310°C.

1.5. Escolha do padrão interno

A Farmacopeia Europeia indica o Carbofenotião (pesticida organofosforado) como o padrão interno a utilizar na análise de pesticidas organoclorados e piretróides.³³

A optimização das condições experimentais anteriormente demonstradas foi efectuada utilizando o Carbofenotião como padrão interno. No entanto, ao proceder à análise de vários tipos de matrizes (Valeriana comprimidos e Sene drageias) verificou-se que estas possuem um pico interferente ao mesmo tempo de retenção (t_R) do Carbofenotião (t_R Carbofenotião = 25,08 minutos). Este facto conduziu a que necessário utilizar um padrão interno alternativo que eluísse numa zona que não apresentasse interferentes nas matrizes a analisar.

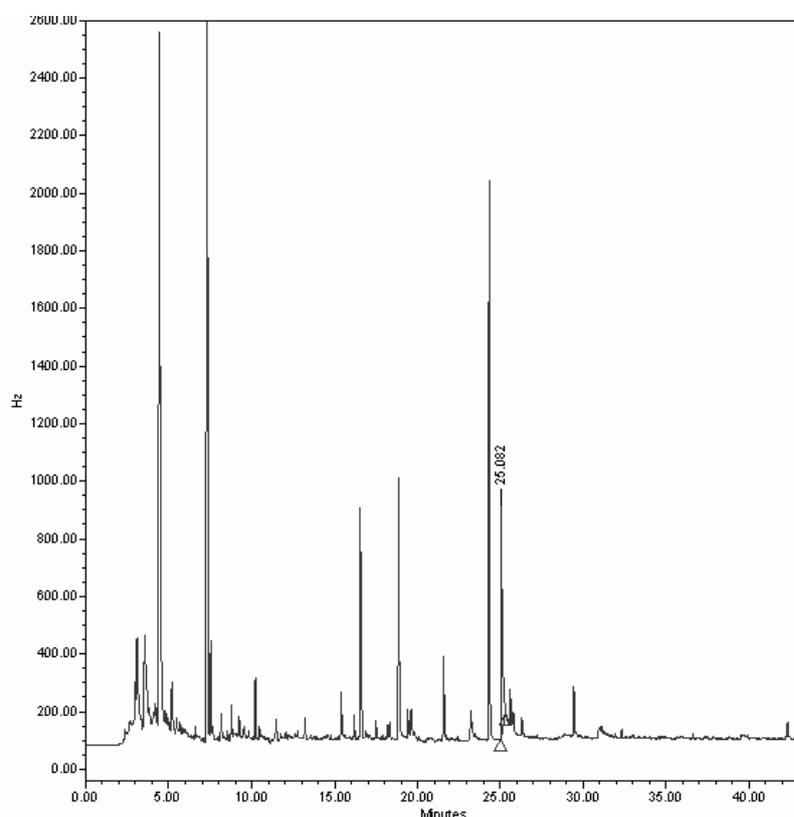


Figura 11 – Pico interferente detectado na amostra de Valeriana sob a forma de comprimidos (t_R 25,08 min)

O método da EPA 8081B, sugere a utilização do Pentacloronitrobenzeno ou do 1-Bromo-2-nitrobenzeno como possíveis padrões internos a utilizar.⁷⁹

Uma vez que para a escolha do padrão interno há que ter em conta não só a resolução deste composto em relação aos outros compostos em estudo mas também a ausência de interferentes na matriz, foi necessário averiguar qual a zona do cromatograma onde iriam eluir os padrões sugeridos pela EPA.

Desta forma, procedeu-se à avaliação de uma tabela elaborada pela *Agilent Technologies (Pesticide Elution Order Using Low Bleed Phases)*⁹⁷ que indica qual o tempo de retenção esperado em função do tipo de coluna utilizada. Verificou-se que relativamente ao 1-Bromo-2-nitrobenzeno não era viável a sua utilização pois este iria ter um t_R muito baixo (cerca de 5 min), o que corresponde a uma zona no cromatograma das amostras que normalmente apresenta muitos picos. O Pentacloronitrobenzeno iria sair no cromatograma aproximadamente aos 14 minutos, entre o δ -Hexaclorociclo-hexano e o ϵ -Hexaclorociclo-hexano, o que faria com que provavelmente não tivesse uma resolução adequada.

Avaliando os padrões disponíveis no laboratório, optou-se por utilizar um pesticida organofosforado (Etião) que apresenta uma resolução adequada ($R = 2,7$) e um tempo de retenção adequado relativamente ao composto que sai imediatamente antes no cromatograma (*o,p'*-DDT) e sai numa zona sem interferentes nos cromatogramas das matrizes analisadas.

1.6. Adequabilidade do sistema

Para avaliar a adequabilidade do sistema com as condições cromatográficas finais, efectuaram-se 6 injeções consecutivas de solução combinada de padrões correspondente à concentração alvo de cada um dos compostos e foram em seguida determinados para os vários compostos diferentes parâmetros cromatográficos: tempo de retenção, tempo de retenção relativo, factor de assimetria, factor de capacidade e resolução.

As expressões utilizadas para a determinação dos parâmetros cromatográficos encontram-se em anexo.

As condições cromatográficas utilizadas foram as optimizadas (ver parte experimental: Tabela 6) e utilizou-se como padrão interno o Etião.

Uma vez que o método cromatográfico descrito na Farmacopeia Europeia não impõe limites para os parâmetros avaliados, os valores obtidos experimentalmente foram considerados como sendo valores de referência e que foram utilizados no decorrer de todo o trabalho analítico como forma de confirmação de que os resultados obtidos estavam de acordo com critérios pré-estabelecidos como adequados, para os ensaios a efectuar.

A figura 12A ilustra o cromatograma obtido na análise de uma solução combinada dos vários padrões de pesticidas, utilizando como padrão interno o composto Etião.

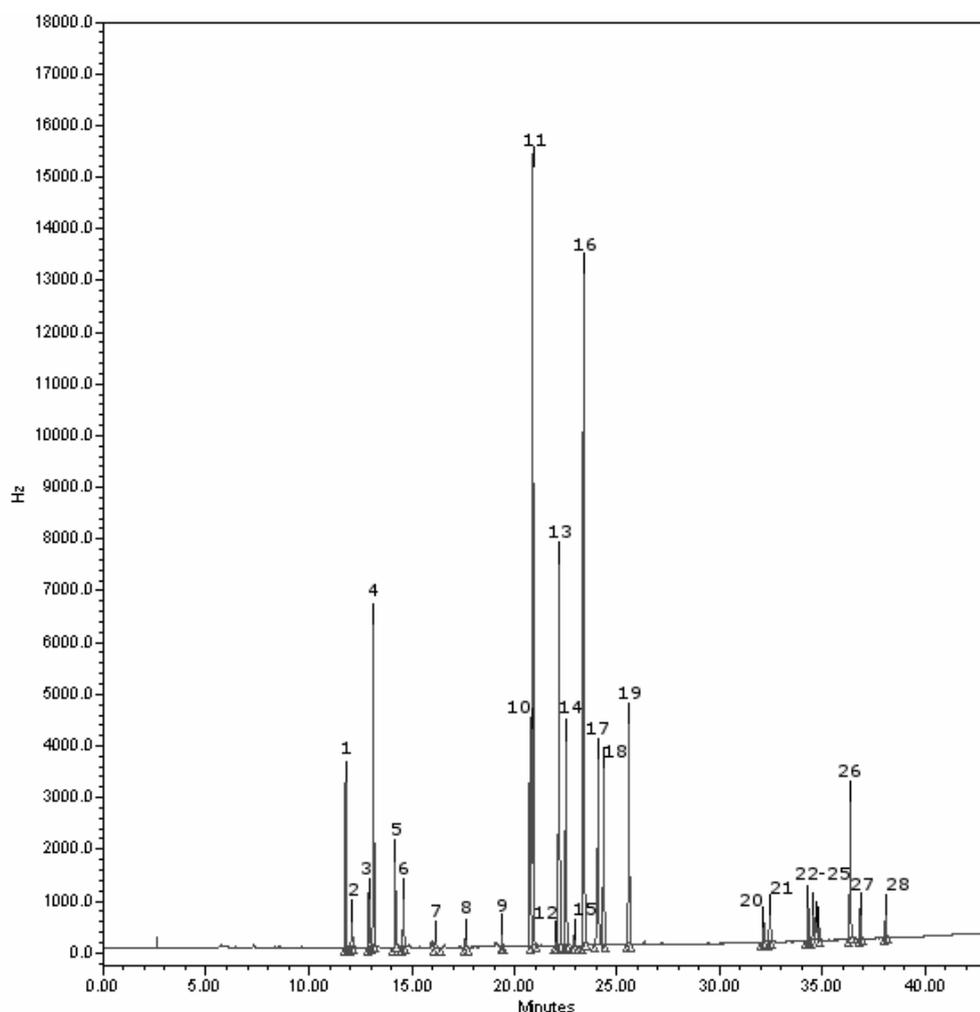


Figura 12A – Cromatograma da solução combinada de padrões, utilizando o Etião como padrão interno, obtido após análise no GC- μ ECD (condições de análise descritas na parte experimental)

Legenda:

1 - α Hexaclorociclo-hexano; 2 - Hexaclorobenzeno; 3- β Hexaclorociclo-hexano; 4 - Lindano;
 5 - δ Hexaclorociclo-hexano; 6 - ϵ Hexaclorociclo-hexano, 7 - Heptacloro; 8 - Aldrina;
 9 - *cis*-Heptacloro-epóxido; 10 - *o,p'*-DDE; 11 - α Endossulfano; 12 - Dieldrina; 13 - *p,p'*-DDE;
 14 - *o,p'*-DDD; 15 - Endrina; 16 - β Endossulfano; 17 - *o,p'*-DDT; 18 - Etião (padrão interno);
 19 - *p,p'*-DDT; 20 - *cis*-Permetrina; 21 - *trans*-Permetrina; 22 a 25 - isômeros da Cipermetrina;
 26 - Fenvalerato isômero_1; 27 - Fenvalerato isômero_2; 28 - Deltametrina.

A figura 12B pretende ilustrar a zona do cromatograma correspondente à solução combinada de padrões, por forma a que seja visível a região do cromatograma que apresenta pior resolução e que corresponde aos vários isómeros da Cipermetrina.

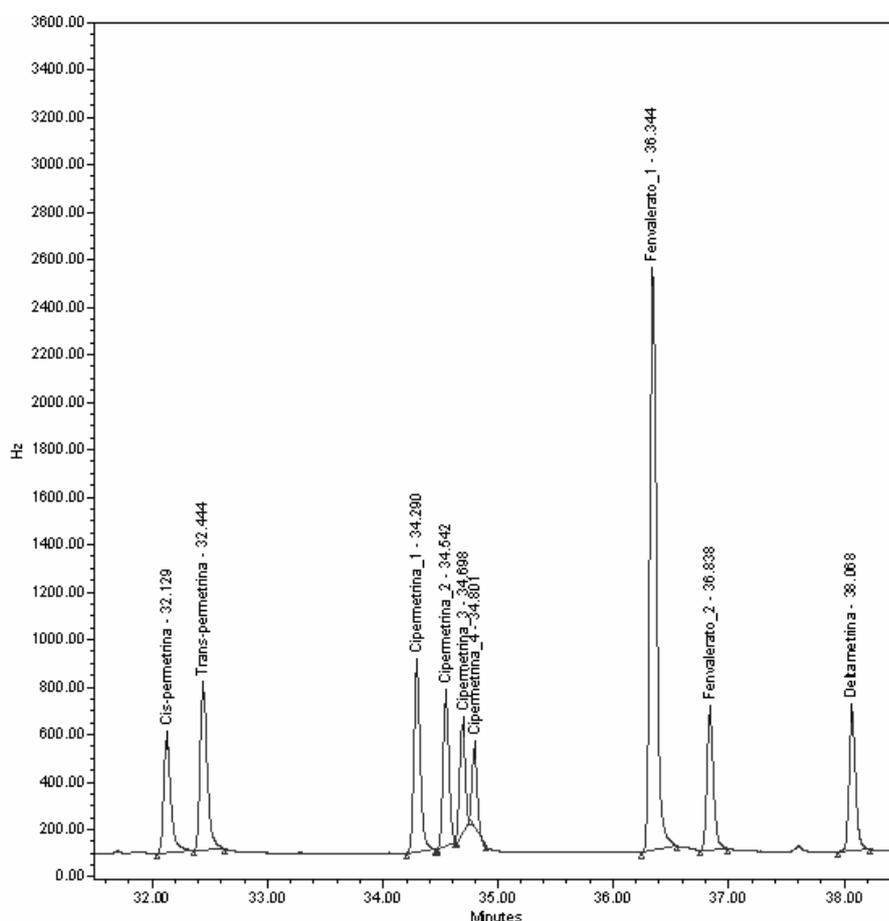


Figura 12B – Zona final do cromatograma da solução combinada de padrões obtido após análise no GC- μ ECD (condições de análise descritas na parte experimental)

A tabela 17 resume o valor médio das 6 determinações efectuadas para os vários parâmetros cromatográficos.^{h)}

^{h)} Os vários parâmetros da adequabilidade do sistema foram calculados de acordo com a Farmacopeia Europeia.

Tabela 17 – Parâmetros para avaliação da adequabilidade do sistema, obtidos através da média de 6 injeções consecutivas de solução combinada de padrões

Composto	t_R (min)	α	As	K	R
α – Hexaclorociclo-hexano	11,8	0,48	1,20	10,77	-
Hexaclorobenzeno	12,1	0,50	1,45	11,07	3,63
β – Hexaclorociclo-hexano	12,9	0,53	1,60	11,90	9,72
Lindano	13,1	0,54	1,20	12,12	2,66
δ – Hexaclorociclo-hexano	14,2	0,58	1,56	13,17	12,36
ϵ – Hexaclorociclo-hexano	14,6	0,60	1,38	13,58	4,64
Heptacloro	16,1	0,66	1,03	15,14	18,04
Aldrina	17,6	0,72	1,00	16,61	17,26
<i>cis</i> – Heptacloro-epóxido	19,4	0,80	1,04	18,40	20,91
<i>o,p'</i> – DDE	20,8	0,85	1,01	19,81	16,05
α – Endossulfano	20,9	0,86	1,09	19,93	1,32
Dieldrina	22,1	0,91	0,97	21,07	11,86
<i>p,p'</i> – DDE	22,2	0,91	1,21	21,21	1,55
<i>o,p'</i> – DDD	22,6	0,93	1,18	21,55	3,48
Endrina	23,0	0,94	1,02	21,98	4,60
β – Endossulfano	23,4	0,96	1,13	22,41	4,33
<i>o,p'</i> – DDT	24,1	0,99	1,13	23,11	7,00
Etião (Padrão Interno)	24,4	1,00	1,14	23,38	2,83
<i>p,p'</i> – DDT	25,6	1,05	1,11	24,60	12,80
<i>cis</i> -permetrina	32,1	1,32	1,26	31,13	65,11
<i>trans</i> -permetrina	32,4	1,33	1,32	31,45	3,00
Cipermetrina_1	34,3	1,41	1,18	33,30	17,94
Cipermetrina_2	34,5	1,41	1,11	33,55	2,54
Cipermetrina_3	34,7	1,42	0,98	33,70	1,67
Cipermetrina_4	34,8	1,43	1,32	33,81	1,17
Fenvalerato_1	36,3	1,49	1,28	35,35	15,87
Fenvalerato_2	36,8	1,51	1,26	35,84	4,85
Deltametrina	38,1	1,56	1,21	37,07	12,10

t_R – Tempo de retenção; α – Tempo de retenção relativo; As – factor de assimetria; K – Factor de capacidade; R – Resolução.

Um factor de assimetria de 1,0 corresponde ao valor ideal.⁹⁸ Nas condições de análises descritas foram obtidos factores de assimetria para todos os compostos entre 0,97 e 1,60 o que é considerado como sendo satisfatório.

Segundo a Farmacopeia Europeia, um valor de resolução superior a 1,5 corresponde a uma separação da linha de base, sendo considerado como o ideal.⁹⁸

Para a maior parte dos compostos foram obtidos valores de resolução superiores a 2,0. Uma vez que a solução combinada de padrões apresenta um elevado número de compostos, nem sempre foi possível obter experimentalmente o valor ideal. Assim, entre o α - Endossulfano e o *o,p'* - DDE, entre o *p,p'*- DDE e a Dieldrina e entre os últimos isómeros da Cipermetrina foram obtidos valores que apesar de serem inferiores a 2,0 são superiores a 1,0 o que é considerado adequado a uma separação suficiente para permitir a integração apropriada dos picos em questão.

2. Análise por GC-MS

Foram utilizadas as condições cromatográficas já optimizadas aquando da análise por GC- μ ECD, relativamente ao injector e coluna. As condições instrumentais finais encontram-se descritas na parte experimental (Tabela 7).

Iniciou-se o trabalho em modo varrimento total o que permitiu a monitorização de todos os iões produzidos numa gama de massas seleccionada (50 a 500 unidades de massa atómica), tendo sido obtido o traçado da corrente iónica (TIC).

Os tempos de retenção e a identificação de cada um dos compostos, foram determinados após a injeção de uma solução combinada de padrões e comparação dos espectros obtidos para cada um dos compostos com os espectros existentes nas bibliotecas de espectros disponíveis.^{86,87}

Uma vez que muitos dos compostos em estudo são isómeros, as bibliotecas de espectros existentes no *software* por vezes identificavam os vários isómeros com um índice de semelhança muito idêntico, o que impossibilitava a sua identificação inequívoca. Este facto levou à necessidade de injectar muitos dos compostos em estudo individualmente para confirmar a sua ordem de eluição.

Na figura 13 apresenta-se o traçado da corrente iónica total (TIC) de uma injeção de solução combinada de padrões, utilizando o Etião como padrão interno.

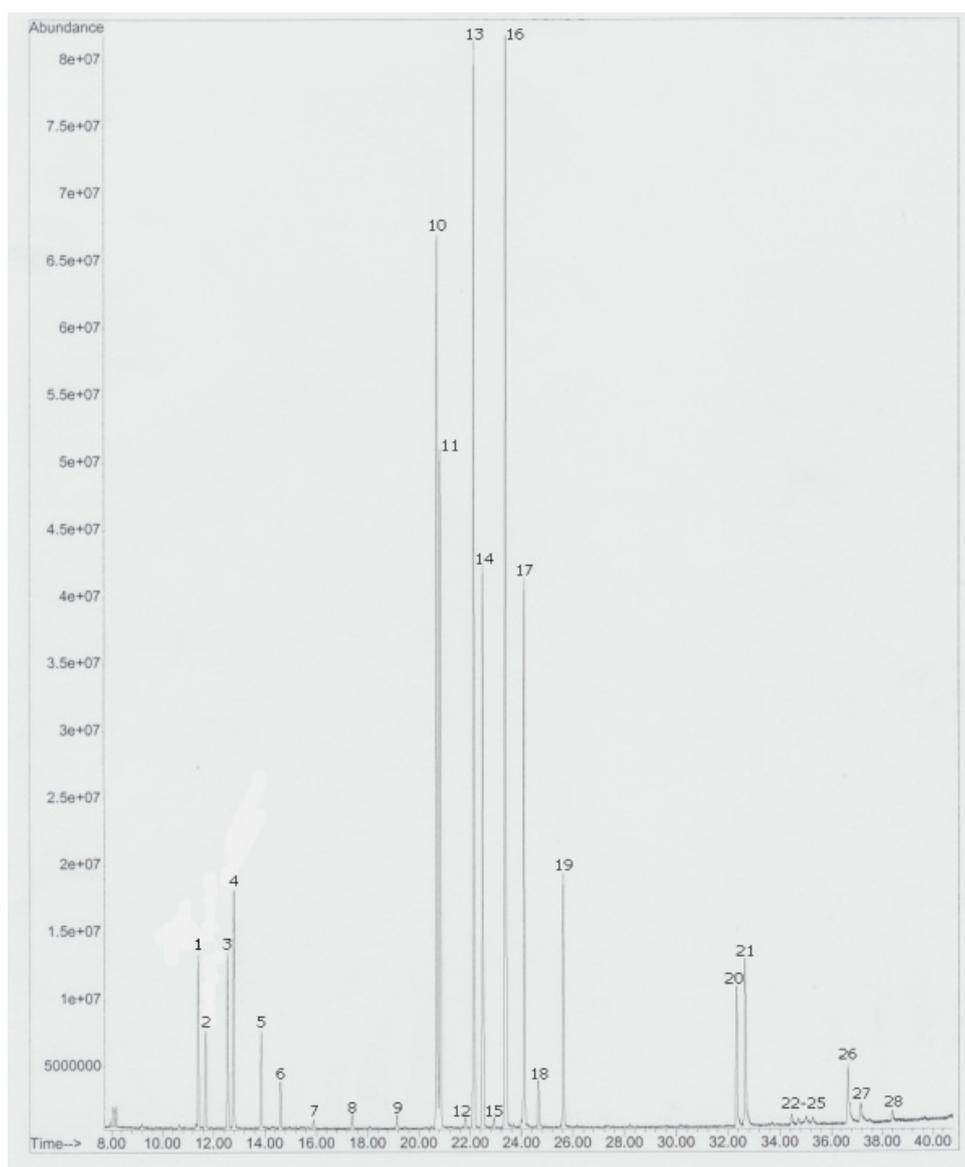


Figura 13 – Cromatograma da corrente iônica total obtido no modo de aquisição varrimento de 50 - 500 amu para a solução combinada de padrões, utilizando Etião como padrão interno (condições de análise descritas na parte experimental)

Legenda:

1 - α Hexaclorociclo-hexano; **2** - Hexaclorobenzeno; **3**- β Hexaclorociclo-hexano; **4** - Lindano;
5 - δ Hexaclorociclo-hexano; **6** - ϵ Hexaclorociclo-hexano, **7** - Heptacloro; **8** - Aldrina;
9 - *cis*-Heptacloro-epóxido; **10** - *o,p'*-DDE; **11** - α Endossulfano; **12** - Dieldrina; **13** - *p,p'*-DDE;
14 - *o,p'*-DDD; **15** - Endrina; **16** - β Endossulfano; **17** - *o,p'*-DDT; **18** - Etião (padrão interno);
19 - *p,p'*-DDT; **20** - *cis*-Permetrina; **21** - *trans*-Permetrina; **22 a 25** - isômeros da Cipermetrina;
26 - Fenvalerato isômero_1; **27** - Fenvalerato isômero_2; **28** - Deltametrina.

A tabela 18 resume os tempos de retenção obtidos assim como os tempos de retenção relativos para cada um dos compostos em estudo por GC-MS.

Tabela 18 – Valores t_R e α obtidos para os padrões analisados por GC-MS

Composto	t_R (min)	α
α – Hexaclorociclo-hexano	11,4	0,47
Hexaclorobenzeno	11,7	0,48
β – Hexaclorociclo-hexano	12,6	0,52
Lindano	12,8	0,52
δ – Hexaclorociclo-hexano	13,9	0,57
ϵ – Hexaclorociclo-hexano	14,3	0,59
Heptacloro	15,9	0,65
Aldrina	17,4	0,71
<i>cis</i> – Heptacloro-epóxido	19,2	0,79
<i>o,p'</i> – DDE	20,7	0,85
α – Endossulfano	20,8	0,85
Dieldrina	22,0	0,90
<i>p,p'</i> – DDE	22,1	0,91
<i>o,p'</i> – DDD	22,5	0,92
Endrina	22,9	0,94
β – Endossulfano	23,4	0,96
<i>o,p'</i> – DDT	24,1	0,99
Etião (Padrão Interno)	24,4	1,00
<i>p,p'</i> – DDT	25,6	1,05
<i>cis</i> - Permetrina	32,3	1,32
<i>trans</i> - Permetrina	32,8	1,34
Cipermetrina ¹⁾	34,5; 34,6; 35,0 e 35,7	1,41; 1,42, 1,43 e 1,46
Fenvalerato ¹⁾	36,8 e 37,2	1,51 e 1,52
Deltametrina	38,4	1,57

t_R – Tempo de retenção expresso em minutos; α – Tempo de retenção relativo ao padrão interno.

Após a confirmação da ordem de eluição de cada um dos compostos, procedeu-se à análise dos espectros de massa obtidos, com o objectivo de determinar quais os iões característicos correspondentes a determinada razão massa/carga (m/z), com maior contribuição para a área total do pico.

A tabela 19 resume os valores de m/z característicos de cada um dos compostos em estudo, sendo o ião que está indicado em primeiro lugar para cada composto, o ião de maior abundância. São indicados também os tempos de análise a que serão monitorizados cada um dos iões no modo de aquisição em SIM (Monitorização do Ião Seleccionado).

¹⁾ Uma vez que estes compostos apresentam vários isómeros, são definidos os t_R e α para cada um dos respectivos isómeros.

Tabela 19 – Valores de m/z característicos de cada composto e respectivos tempos de programação em modo SIM

Composto	Valores de m/z característicos	Janelas do programa em SIM (min)
α – Hexaclorociclo-hexano	183, 111, 219	5,0 – 11,5
Hexaclorobenzeno	284, 142, 249	11,5 – 12,3
β – Hexaclorociclo-hexano	181, 111, 219	12,3 – 12,6
Lindano	181, 111, 219	12,6 – 13,5
δ – Hexaclorociclo-hexano	183, 109, 219	13,5 – 14,0
ϵ – Hexaclorociclo-hexano	183, 147, 219	14,5 – 15,5
Heptacloro	272, 100, 237	15,5 – 17,2
Aldrina	263, 66, 293	17,2 – 19,0
<i>cis</i> – Heptacloro-epóxido	353, 81, 263	19,0 – 20,0
<i>o,p'</i> – DDE	246, 176, 318	20,0 – 20,8
α – Endossulfano	241, 170, 195, 265	20,8 – 21,8
Dieldrina	263, 277, 345	21,8 – 22,1
<i>p,p'</i> – DDE	246, 176, 318	22,1 – 22,2
<i>o,p'</i> – DDD	235, 165, 199	22,2 – 22,7
Endrina	317, 193, 263, 345	22,7 – 23,0
β – Endossulfano	195, 159, 237	23,0 – 23,8
<i>o,p'</i> – DDT	235, 165, 212	23,8 – 24,1
Etião (Padrão Interno)	231, 153, 384	24,1 – 25,3
<i>p,p'</i> – DDT	235, 165, 212	25,3 – 30,0
<i>cis</i> e <i>trans</i> – Permetrina	183, 127, 163	30,0 – 34,0
Cipermetrina	163, 181, 207	34,0 – 36,0
Fenvalerato	125, 167, 419	36,0 – 38,2
Deltametrina	181, 209, 253	38,2 – 43,0

m/z – razão massa/carga

Para além da determinação dos valores de m/z característicos é também importante ter em conta a sua abundância relativa. Desta forma, para cada composto foi determinado um factor de resposta dos vários iões característicos, sendo este factor obtido através da divisão da abundância do ião mais intenso pela abundância de cada um dos restantes iões observados na solução padrão, tal como é indicado na tabela 20.

Tabela 20 – Factores de resposta dos valores de m/z característicos de cada composto avaliados na solução padrão

Composto	Valores de m/z característicos	Factor
α – Hexaclorociclo-hexano	183 / 183	1,000
	183 / 111	2,162
	183 / 219	1,031
Hexaclorobenzeno	284 / 284	1,000
	284 / 142	4,219
	284 / 249	4,365
β – Hexaclorociclo-hexano	181 / 181	1,000
	181 / 111	1,373
	181 / 219	1,011
Lindano	181 / 181	1,000
	181 / 111	1,677
	181 / 219	1,173
δ – Hexaclorociclo-hexano	183 / 183	1,000
	183 / 109	1,924
	183 / 219	1,138
ϵ – Hexaclorociclo-hexano	183 / 183	1,000
	183 / 147	3,341
	183 / 219	2,236
Heptacoloro	272 / 272	1,000
	272 / 100	1,028
	272 / 237	2,895
Aldrina	263 / 263	1,000
	263 / 66	1,002
	263 / 293	3,036
<i>cis</i> – Heptacoloro-epóxido	353 / 353	1,000
	353 / 81	2,685
	353 / 263	7,039
<i>o,p'</i> – DDE	246 / 246	1,000
	246 / 176	4,452
	246 / 318	2,355
α – Endossulfano	241 / 241	1,000
	241 / 170	1,006
	241 / 195	1,419
	241 / 265	1,535
Dieldrina	263 / 263	1,000
	263 / 277	1,243
	263 / 345	4,027
<i>p,p'</i> – DDE	246 / 246	1,000
	246 / 176	1,069
	246 / 318	3,217
<i>o,p'</i> – DDD	235 / 235	1,000
	235 / 165	2,902
	235 / 199	7,509
Endrina	317 / 317	1,000
	317 / 193	1,457
	317 / 263	1,319
	317 / 345	1,281

Factor – Razão entre a abundância do ião mais intenso pelos restantes iões.

Tabela 20 (continuação) – Factores de resposta dos valores de *m/z* característicos de cada composto avaliados na solução padrão

Composto	Valores de <i>m/z</i> característicos	Factor
β – Endossulfano	195 / 195	1,000
	195 / 159	1,660
	195 / 237	1,336
<i>o,p'</i> – DDT	235 / 235	1,000
	235 / 165	2,849
	235 / 212	7,479
Etião (Padrão Interno)	231 / 231	1,000
	231 / 153	1,872
	231 / 384	6,558
<i>p,p'</i> – DDT	235 / 235	1,000
	235 / 165	3,080
	235 / 212	7,179
<i>cis</i> – Permetrina	183 / 183	1,000
	183 / 127	17,588
	183 / 163	5,281
<i>trans</i> – Permetrina	183 / 183	1,000
	183 / 127	17,091
	183 / 163	4,155
Cipermetrina_1	163 / 163	1,000
	163 / 181	1,241
	163 / 207	5,359
Cipermetrina_2	163 / 163	1,000
	163 / 181	1,528
	163 / 207	5,442
Cipermetrina_3	163 / 163	1,000
	163 / 181	1,278
	163 / 207	3,470
Cipermetrina_4	163 / 163	1,000
	163 / 181	1,379
	163 / 207	4,141
Fenvalerato_1	125 / 125	1,000
	125 / 167	1,219
	125 / 419	5,631
Fenvalerato_2	125 / 125	1,000
	125 / 167	1,093
	125 / 419	6,040
Deltametrina	181 / 181	1,000
	181 / 209	3,342
	181 / 253	1,058

Factor – Razão entre a abundância do ião mais intenso pelos restantes iões.

Desta forma, utilizando o modo de monitorização de ião seleccionado (SIM), são apenas monitorizados os iões de interesse o que provoca um sinal maior para cada um dos compostos em estudo, originando um aumento da sensibilidade para um mesmo nível de concentração, no caso do analisador de quadrupolo que foi o utilizado.

A figura 14 ilustra o cromatograma obtido para a solução combinada de padrões de referência utilizando o modo de monitorização de íão seleccionado.

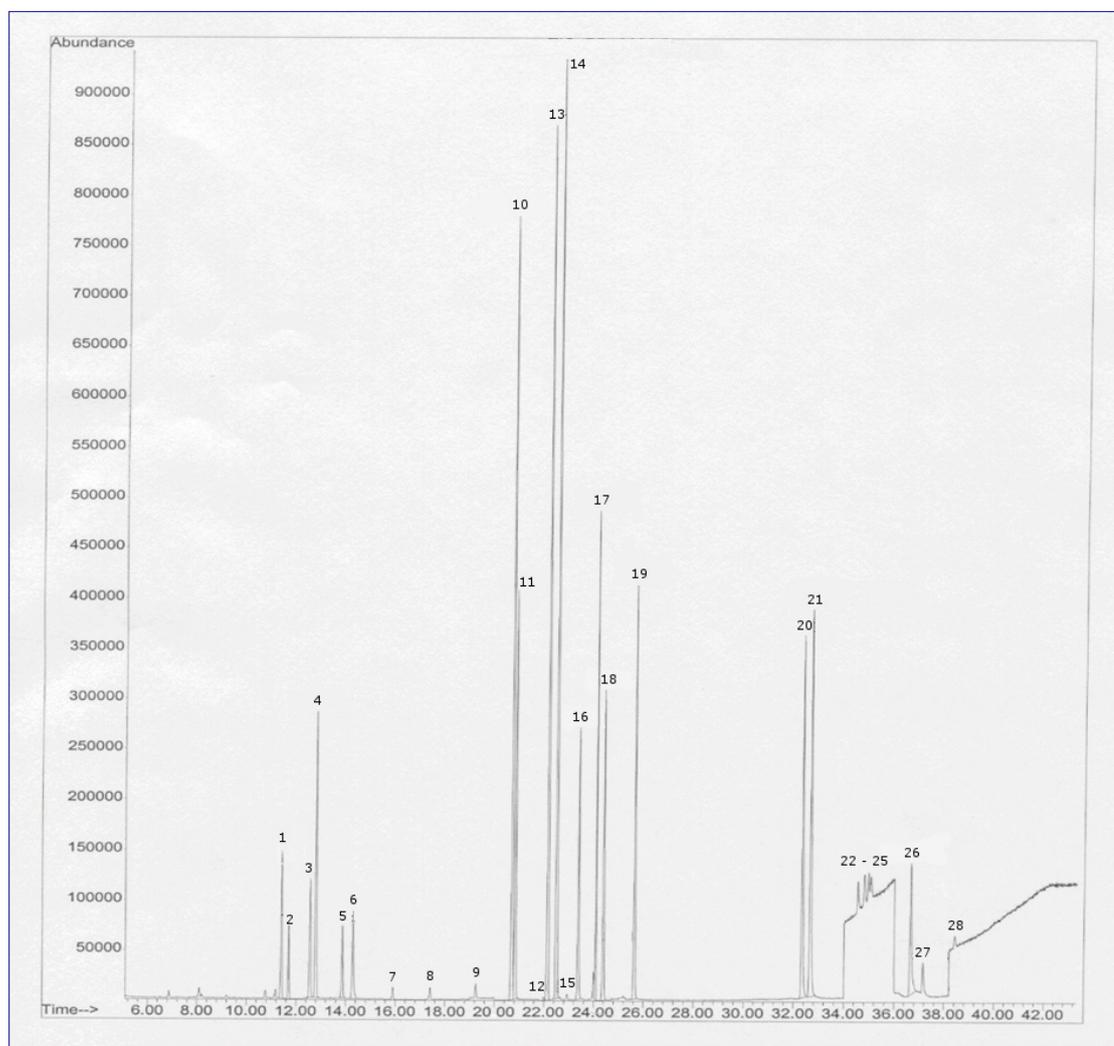


Figura 14 – Cromatograma dos m/z característicos consoante o composto, para a solução combinada de padrões, utilizando Etião como padrão interno (condições de análise descritas na parte experimental)

Legenda:

1 - α Hexaclorociclo-hexano; **2** - Hexaclorobenzeno; **3**- β Hexaclorociclo-hexano; **4** - Lindano;
5 - δ Hexaclorociclo-hexano; **6** - ϵ Hexaclorociclo-hexano; **7** - Heptacloro; **8** - Aldrina;
9 - *cis*-Heptacloro-epóxido; **10** - *o,p'*-DDE; **11** - α Endossulfano; **12** - Dieldrina; **13** - *p,p'*-DDE;
14 - *o,p'*-DDD; **15** - Endrina; **16** - β Endossulfano; **17** - *o,p'*-DDT; **18** - Etião (padrão interno);
19 - *p,p'*-DDT; **20** - *cis*-Permetrina; **21** - *trans*-Permetrina; **22 a 25** - isómeros da Cipermetrina;
26 - Fenvalerato isómero_1; **27** - Fenvalerato isómero_2; **28** - Deltametrina.

3. Optimização do processo de extracção e purificação da amostra segundo a metodologia descrita na Farmacopeia Europeia

Tal como está indicado no ponto 1.4.1. do capítulo referente à parte experimental, os vários passos a executar para a extracção e purificação da amostra são:

- Extracção com acetona por agitação em placa de agitação magnética;
- Filtração com filtros de fibra de vidro;
- Evaporação quase à secura no evaporador rotativo;
- Filtração com filtros de membrana;
- Separação dos compostos de maior massa molecular por Cromatografia de Permeação em Gel;
- Evaporação quase à secura em atmosfera de azoto;
- Extracção em fase sólida utilizando colunas de sílica gel;
- Evaporação quase à secura em atmosfera de azoto.

Procedeu-se neste trabalho à optimização dos passos considerados como sendo os mais críticos no decorrer de todo o processo de preparação da amostra.

3.1. Evaporação do solvente no evaporador rotativo

O método definido na Farmacopeia Europeia refere que a temperatura de evaporação do solvente não deve ser superior a 40°C.³³ Foram testadas várias temperaturas de evaporação do solvente, tendo-se verificado que à medida que a temperatura era reduzida, eram obtidos valores de recuperação mais aceitáveis para os vários compostos em estudo.

A tabela 21 indica os valores de recuperação obtidos utilizando diferentes temperaturas de evaporação do solvente.

Tabela 21 – Efeito da T de evaporação do solvente na percentagem de recuperação dos pesticidas em estudo

Composto	% Recuperação T40°C	% Recuperação T30°C	% Recuperação T25°C
α – Hexaclorociclo-hexano	não detectado	40,6	90,5
Hexaclorobenzeno	não detectado	44,4	110,7
β – Hexaclorociclo-hexano	não detectado	103,7	99,8
Lindano	não detectado	53,4	79,9
δ – Hexaclorociclo-hexano	não detectado	40,0	92,2
ϵ – Hexaclorociclo-hexano	não detectado	42,8	109,6
Heptacloro	84,4	120,9	116,3
Aldrina	68,6	96,6	108,3
<i>cis</i> – Heptacloro-epóxido	33,0	78,8	107,6
<i>o,p'</i> – DDE	65,8	106,9	103,0
α – Endossulfano	61,3	87,3	83,1
Dieldrina	82,1	100,5	114,4
<i>p,p'</i> – DDE	73,9	92,7	90,2
<i>o,p'</i> – DDD	110,7	99,6	88,9
Endrina	38,4	96,6	96,4
β – Endossulfano	110,7	91,6	89,5
<i>o,p'</i> – DDT	67,7	101,8	101,8
<i>p,p'</i> – DDT	47,8	75,5	110,0
<i>cis</i> – Permetrina	108,6	94,0	88,3
<i>trans</i> – Permetrina	125,7	83,9	81,0
Cipermetrina_1	não detectado	97,6	85,2
Cipermetrina_2	não detectado	75,0	97,5
Cipermetrina_3	não detectado	66,7	109,3
Cipermetrina_4	não detectado	69,6	103,1
Fenvalerato_1	137,9	110,0	96,3
Fenvalerato_2	173,2	107,0	86,4
Deltametrina	88,5	122,6	88,3

Pode concluir-se dos resultados apresentados que, utilizando um valor de temperatura de 40°C, os compostos de menor tempo de retenção (compostos com ponto de ebulição mais baixo) não são detectados. A 30°C já são detectados todos os compostos, no entanto, os primeiros compostos apresentam uma taxa de recuperação muito baixa (cerca de 40%). À temperatura de 25°C os vários compostos apresentam taxas de recuperação aceitáveis para este método (a variar entre 80% e 116%), admitindo como referência o critério de aceitação indicado na Farmacopeia Europeia (70% a 110%).³³

Apesar dos valores obtidos de recuperação serem aceitáveis, verificou-se que o sinal obtido para todos os compostos, era muito inferior ao sinal observado quando comparado com a injeção de uma solução padrão na mesma gama de concentrações, o que levou a supor que ocorria uma perda de todos os compostos de uma forma uniforme nesta fase de preparação de amostra.

Para ultrapassar este facto, houve o cuidado de diminuir a velocidade de rotação do balão aquando da evaporação do solvente no evaporador rotativo. À medida que o solvente ia sendo evaporado, o conteúdo do balão de evaporação foi transferido progressivamente para balões de menor capacidade. Desta forma, iniciou-se a evaporação do solvente colocando a solução num balão de evaporação de 250 ml, transferindo-se em seguida para um balão de 100 ml e por final para um balão de 25 ml, o que facilitou depois a sua transferência final para o balão volumétrico, minimizando a ocorrência de perdas.

Um factor também importante neste passo, é nunca levar a evaporação completamente à secura e para este efeito, quando quase toda a acetona estava evaporada, adicionaram-se algumas gotas de tolueno. A evaporação continua até que toda a acetona tenha sido eliminada, ficando os compostos de interesse dissolvidos em tolueno que, como apresenta um ponto de ebulição de 110°C, funciona como um bom solvente de armazenamento.

As figuras seguintes permitem comparar os resultados obtidos utilizando o método tal como está descrito na Farmacopeia e após optimização.

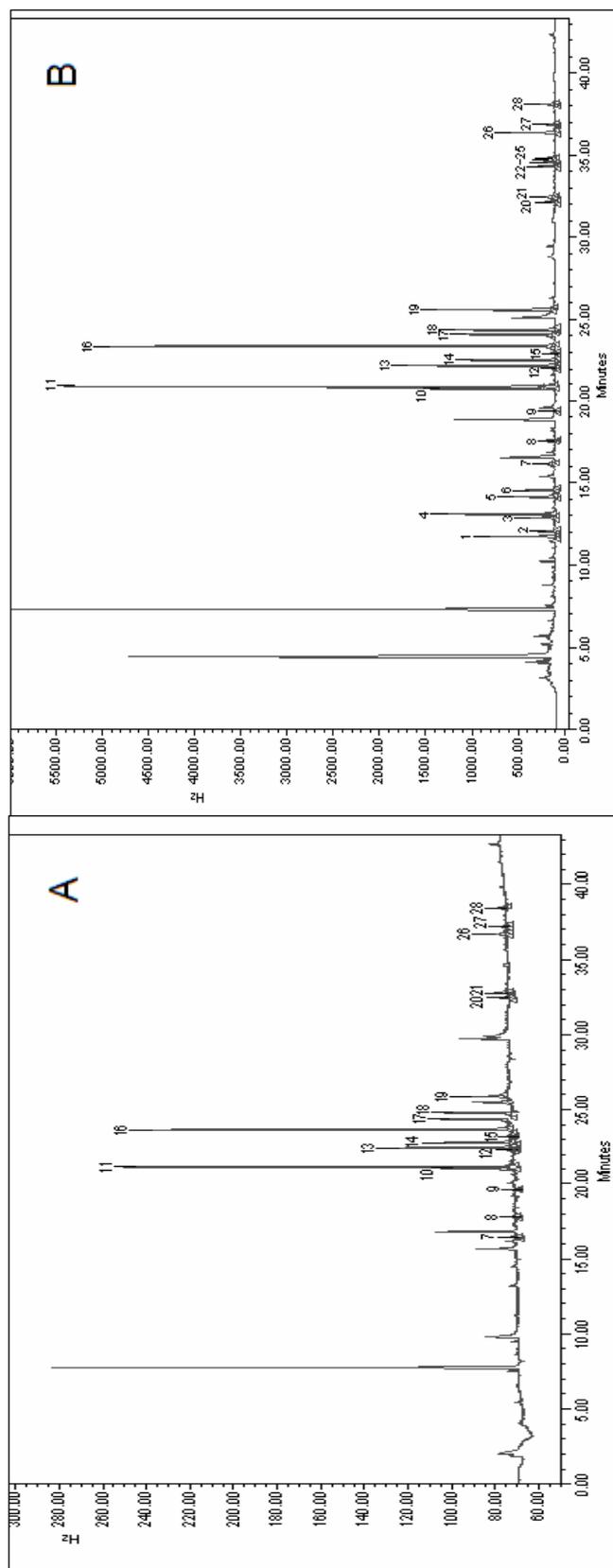


Figura 15 – Cromatograma de amostra fortificada obtido após análise no GC- μ ECD (T de evaporação do solvente = 40°C) (A) e Cromatograma de amostra fortificada obtido após análise no GC- μ ECD (T de evaporação do solvente = 25°C, velocidade de rotação reduzida e transferência da solução durante a evaporação para balões de menor capacidade) (B)

Legenda:

- 1** - α Hexaclorociclo-hexano; **2** - Hexaclorobenzeno; **3**- β Hexaclorociclo-hexano; **4** - Lindano; **5** - δ Hexaclorociclo-hexano;
- 6** - ϵ Hexaclorociclo-hexano; **7** - Heptacloro; **8** - Aldrina; **9** - *cis* -Heptacloro-epóxido; **10** - *o,p'* -DDE; **11** - α Endossulfano; **12** - Dieldrina;
- 13** - *p,p'* -DDE; **14** - *o,p'* -DDD; **15** - Endrina; **16** - β Endossulfano; **17** - *o,p'* -DDT; **18** - Carbofenotião (padrão interno); **19** - *p,p'* -DDT;
- 20** - *cis*-Permetrina; **21** - *trans*-Permetrina; **22 a 25** - isômeros da Cipermetrina; **26** - Fenvalerato isômero **1**; **27** - Fenvalerato isômero **2**;
- 28** - Deltametrina.

Como é possível observar comparando a escala dos dois cromatogramas, verificou-se uma recuperação cerca de 20 vezes superior para todos os compostos utilizando as condições otimizadas durante a evaporação do solvente.

Para avaliar o rendimento obtido neste passo, comparou-se também o valor da área do padrão interno (Etião), injectando no sistema cromatográfico GC- μ ECD 3 soluções distintas:

Solução A – Solução padrão de Etião (Figura 16A);

Solução B – Amostra de Ginkgo biloba à qual foi adicionado inicialmente padrão interno, tendo sido esta amostra fortificada submetida ao processo de evaporação de solvente no evaporador rotativo (Figura 16B);

Solução C – Amostra de Ginkgo biloba que foi submetida ao processo de evaporação de solvente no evaporador rotativo à qual foi posteriormente adicionado padrão interno (Figura 16C).

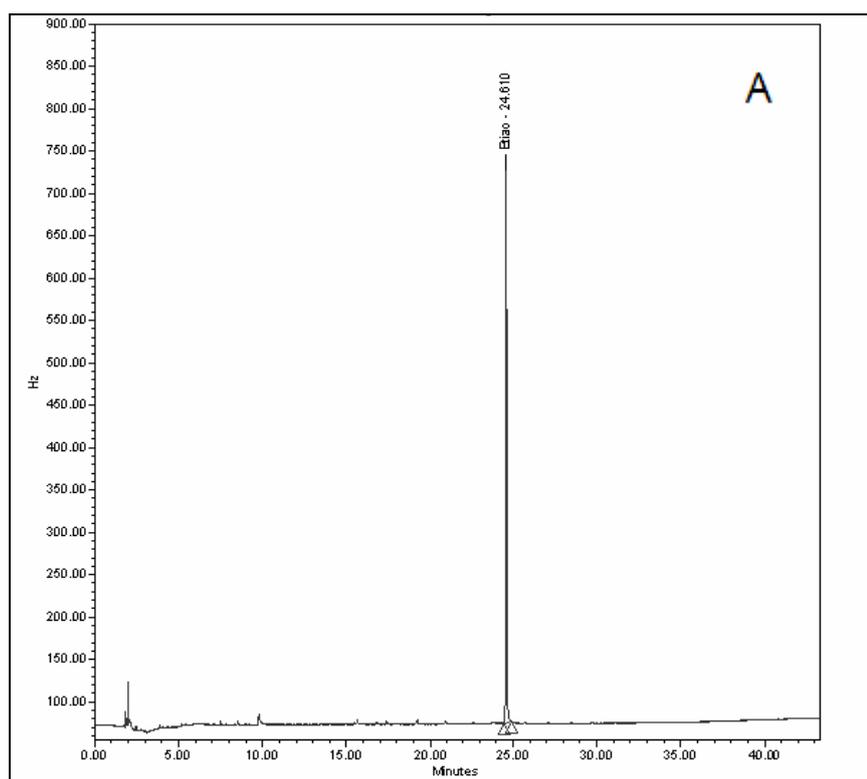
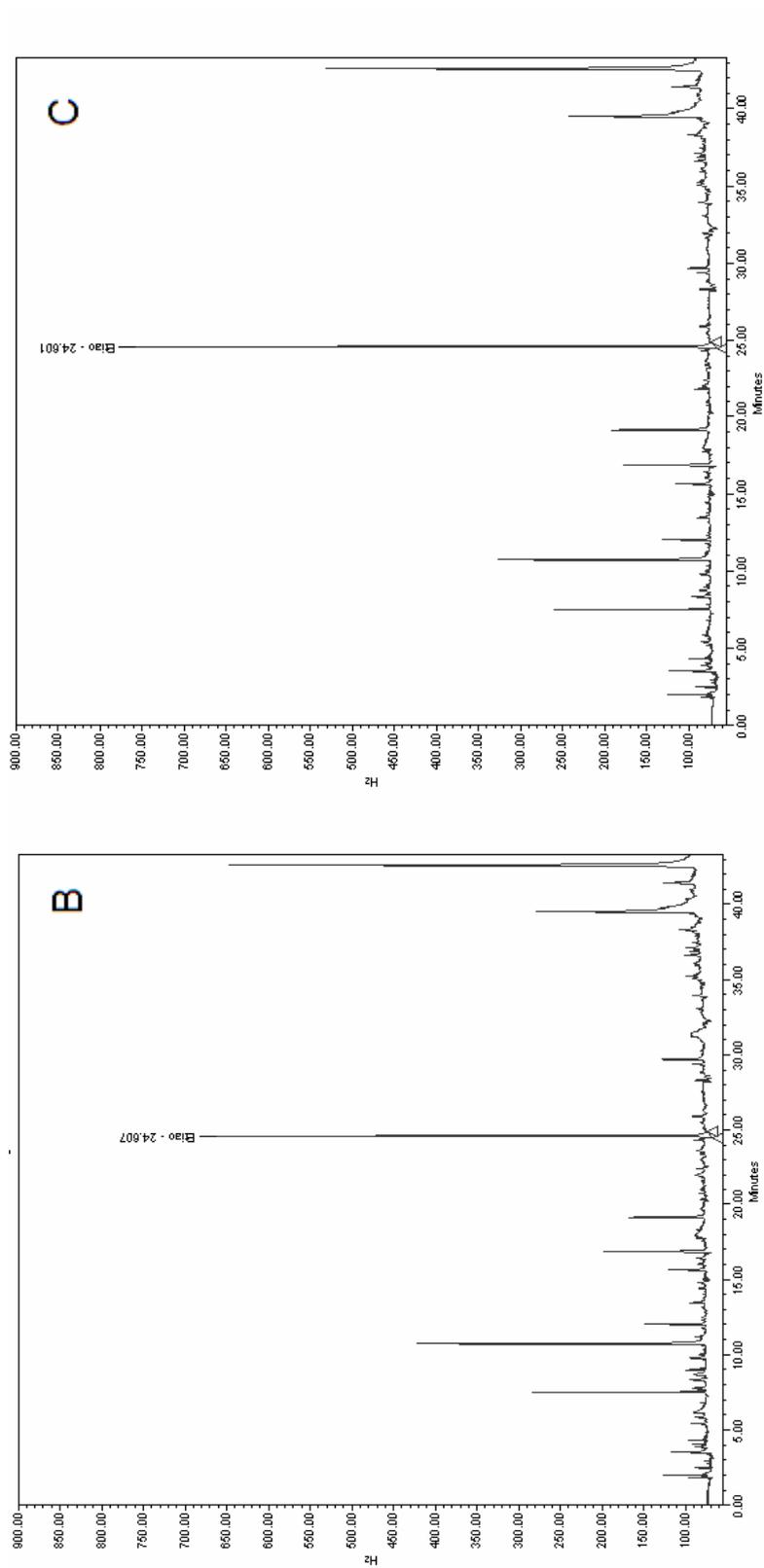


Figura 16A – Cromatograma de solução padrão de Etião obtido após análise no GC- μ ECD



Figuras 16 – Cromatograma obtido no GC- μ ECD de amostra de Ginkgo biloba à qual foi adicionado inicialmente padrão interno (Etíao), tendo sido esta amostra fortificada submetida ao processo de evaporação de solvente (**B**) e Cromatograma da amostra de Ginkgo biloba que foi submetida ao processo de evaporação de solvente à qual foi posteriormente adicionado padrão interno (Etíao) (**C**)

Comparando os 3 cromatogramas, verifica-se que o Etião apresenta uma resposta muito semelhante nas várias situações. Adicionando Etião à amostra antes e após a processo de evaporação de solvente são obtidos valores de área do composto que variam apenas em 10%, o que significa que nestas condições optimizadas de evaporação de solvente o rendimento obtido é cerca de 90%, o que é satisfatório.

3.2. Teste da adequabilidade dos filtros

Para averiguar a adequabilidade dos filtros utilizados na preparação da amostra, procedeu-se à filtração com filtros de fibra de vidro de uma solução combinada de padrões e injeção no sistema cromatográfico GC- μ ECD do padrão filtrado e não filtrado. Avaliou-se a percentagem de recuperação obtida para cada um dos compostos. A recuperação obtida para todos os compostos variou de 100% a 106% (Tabela 22).

Previamente à colocação da amostra no sistema de GPC procede-se a uma filtração com filtros de membrana GHP 0,45 μ m. Efectuou-se igualmente um teste da adequabilidade destes filtros utilizados de uma forma semelhante ao efectuado para os filtros de fibra de vidro. A recuperação obtida para todos os compostos variou de 96 % a 114 % (Tabela 22).

Tabela 22 – Percentagem de recuperação obtida por comparação da resposta no GC- μ ECD de cada um dos padrões antes e após filtração com filtros de fibra de vidro e antes e após filtração com filtros de membrana GHP 0,45 μ m

Composto	% Rec (filtros fibra vidro)	% Rec (filtros de membrana 0,45 μ m)
α – Hexaclorociclo-hexano	100,7	103,3
Hexaclorobenzeno	102,4	101,8
β – Hexaclorociclo-hexano	100,0	103,1
Lindano	100,0	103,6
δ - Hexaclorociclo-hexano	100,0	107,6
ϵ - Hexaclorociclo-hexano	100,0	101,4
Heptacloro	100,0	102,8
Aldrina	100,0	107,8
<i>cis</i> – Heptacloro-epóxido	100,0	102,2
<i>o,p'</i> – DDE	100,0	101,5
α – Endossulfano	100,7	100,6
Dieldrina	100,0	106,0
<i>p,p'</i> – DDE	101,1	100,5
<i>o,p'</i> – DDD	101,3	99,6
Endrina	100,0	97,8
β – Endossulfano	100,4	100,6
<i>o,p'</i> – DDT	100,9	101,2
<i>p,p'</i> – DDT	100,5	103,9
<i>cis</i> – Permetrina	100,0	98,1
<i>trans</i> – Permetrina	100,0	98,2
Cipermetrina_1	105,9	96,2
Cipermetrina_2	100,0	105,9
Cipermetrina_3	100,0	102,6
Cipermetrina_4	100,0	100,0
Fenvalerato_1	101,5	105,6
Fenvalerato_2	105,3	101,1
Deltametrina	103,4	113,9

% Rec - % Recuperação

As recuperações obtidas são aceitáveis para os vários compostos em causa, nos dois tipos de filtros estudados, utilizando como referência o critério de aceitação indicado na Farmacopeia Europeia (70% a 110%).³³

3.3. Cromatografia de exclusão molecular – Cromatografia de Permeação em Gel (GPC)

Para proceder à separação de compostos interferentes de maior massa molecular, utilizou-se uma bomba de HPLC que permitiu a passagem de eluente (tolueno) através de uma coluna de estireno-divinilbenzeno, à qual foi ligada um colector de fracções.

Com o objectivo de determinar o tempo de saída dos compostos em estudo, foi preparada uma solução padrão combinada do composto de menor massa molecular (α -Hexaclorociclo-hexano) e do composto de maior massa molecular (Deltametrina).

Esta solução foi injectada no sistema de GPC e procedeu-se à recolha no colector de fracções de alíquotas de 2,5 em 2,5 minutos. Cada uma destas alíquotas foi injectada no sistema cromatográfico GC- μ ECD por forma a verificar quais eram as fracções que apresentavam os compostos em estudo.

Verificou-se que os compostos em estudo se encontravam presentes nas alíquotas de 7,5 a 19,5 min pelo que esta será a fracção total a colher aquando da análise das amostras.

A figura 17 ilustra um exemplo de uma sequência de cromatogramas obtidos no GC- μ ECD de uma solução combinada dos padrões α -Hexaclorociclo-hexano e Deltametrina na fase de determinação das fracções de interesse.

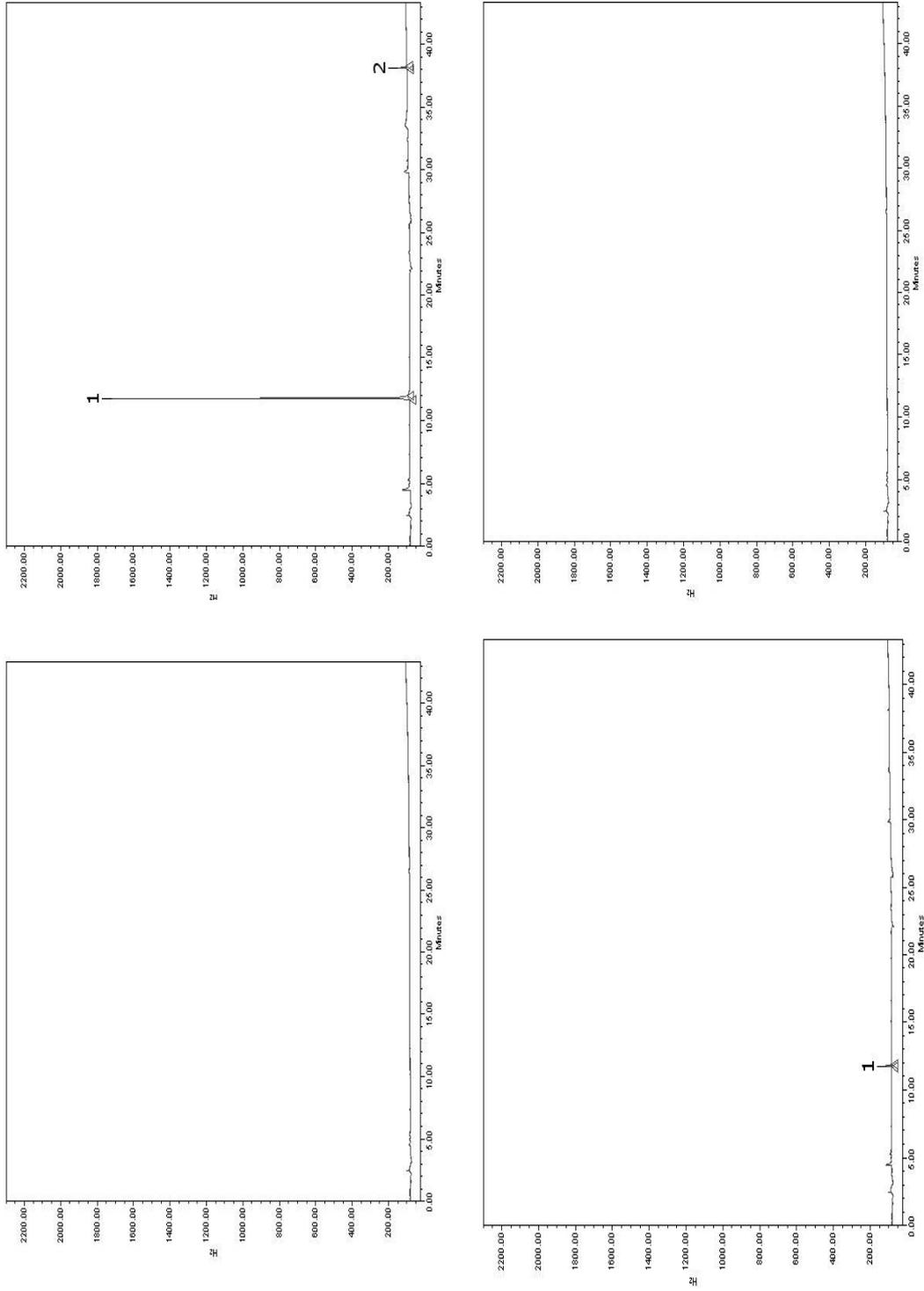


Figura 17 – Exemplo de sequência de cromatogramas obtidos após análise no GC- μ ECD na fase de determinação das frações de interesse a recolher no sistema de GPC
 Legenda : 1 - α Hexaclorociclo-hexano (composto de menor massa molecular); 2 - Deltametrina (composto de maior massa molecular).

Resultados e discussão

A tabela 23 reúne as condições operacionais a ter em conta nesta fase de preparação da amostra.

Tabela 23 – Condições operacionais finais no sistema de GPC

Injector	Volume injeção	100 µl
Coluna	Tipo de coluna	Coluna estireno-divinilbenzeno 7,8 x 300 mm
	Temperatura do forno	Ambiente (25°C ± 5°C)
	Fase móvel	Tolueno
	Fluxo	1,0 ml/min
Fracção a colher	Tempo a iniciar na injeção	7,5 aos 19,5 min

Uma vez que este passo de preparação de amostra é muito moroso e visto que está principalmente recomendado para matrizes alimentares para a remoção de lípidos, polímeros, componentes celulares e resinas naturais⁵⁵, avaliou-se a necessidade de efectuar este passo, comparando os cromatogramas obtidos da matriz Valeriana submetida a GPC e não submetida a GPC.

Comparando os dois cromatogramas (Figuras 18A e B), verifica-se que quando a matriz não passou pelo processo de GPC aparecem alguns picos interferentes nos tempos de retenção de alguns compostos de interesse. Este facto reforçou a necessidade em executar este passo.

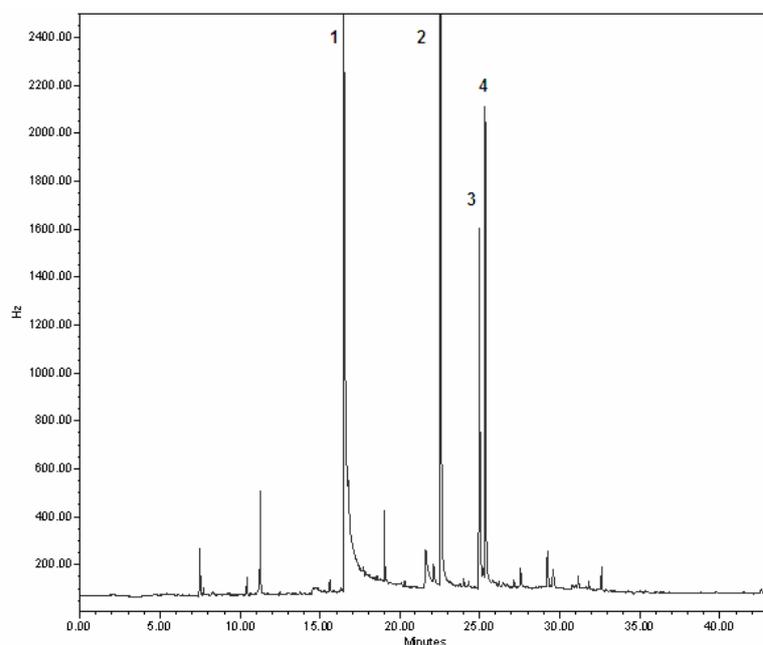


Figura 18A – Cromatograma de uma amostra de Valeriana não submetida a GPC, analisada por GC-µECD

Legenda: 1 - pico interferente com o Heptcloro, Aldrina e *cis*-Heptacloro-epóxido; 2 - pico interferente com o *o,p'*-DDD; 3 - pico interferente com o Etião; 4 - pico interferente com o *p,p'*-DDT.

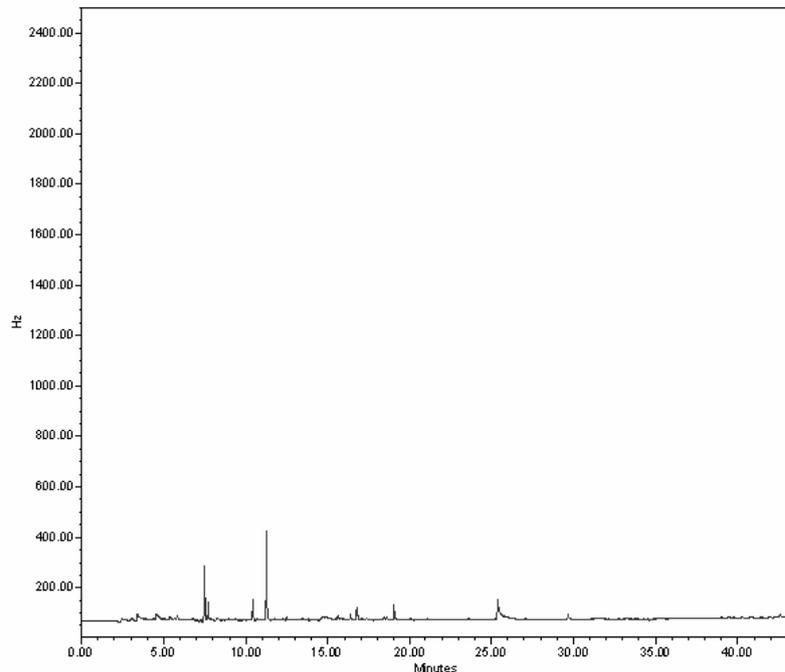


Figura 18B – Cromatograma de uma amostra de Valeriana submetida a GPC, analisada por GC- μ ECD

3.4. Extracção em fase sólida com colunas de sílica gel

A purificação da amostra é efectuada por extracção em fase sólida, utilizando colunas de sílica gel e tolueno como eluente.

Avaliou-se a recuperação obtida no sistema de extracção em fase sólida, comparando a resposta obtida de uma solução combinada de padrões com uma solução combinada de padrões submetida ao processo de extracção em fase sólida. Os valores de recuperação obtidos estão indicados na tabela 24.

Tabela 24 – Percentagem de recuperação obtida por comparação da resposta no GC- μ ECD de cada um dos padrões após o processo de extracção em fase sólida

Composto	% Recuperação (Extracção em fase sólida)
α – Hexaclorociclo-hexano	102,8
Hexaclorobenzeno	102,4
β – Hexaclorociclo-hexano	104,5
Lindano	102,7
δ – Hexaclorociclo-hexano	96,4
ϵ – Hexaclorociclo-hexano	109,6
Heptaclo-ro	103,2
Aldrina	105,1
<i>cis</i> – Heptaclo-ro-epóxido	97,8
<i>o,p'</i> – DDE	110,3
α – Endossulfano	109,0
Dieldrina	102,6
<i>p,p'</i> – DDE	107,3
<i>o,p'</i> – DDD	108,8
Endrina	86,7
β – Endossulfano	108,3
<i>o,p'</i> – DDT	105,7
<i>p,p'</i> – DDT	104,5
<i>cis</i> – Permetrina	107,6
<i>trans</i> – Permetrina	107,8
Cipermetrina_1	94,0
Cipermetrina_2	94,0
Cipermetrina_3	86,7
Cipermetrina_4	102,4
Fenvalerato_1	110,2
Fenvalerato_2	110,1
Deltametrina	110,3

A percentagem de recuperação obtida para os vários compostos em estudo variou entre 87% e 110%, o que é considerado como sendo aceitável, utilizando como critério de aceitação os valores indicados na Farmacopeia Europeia (70% a 110%).³³

A tabela 25 reúne as condições a ter em conta na purificação com colunas de sílica gel.

Tabela 25 – Condições operacionais finais no sistema de extração em fase sólida

Fracção a purificar	Volume	100 µl
Coluna	Tipo de coluna	Colunas sílica 3ml/500mg
	Eluente	Tolueno
Suporte múltiplo sob vácuo	Pressão	P = 5 mm Hg

3.5. Evaporação do solvente em atmosfera de azoto

Durante o processo de preparação da amostra indicado, é efectuada uma evaporação de solvente (tolueno) em atmosfera de azoto logo após a colheita da fracção de interesse no sistema de GPC e uma segunda evaporação de solvente no final, antes de introduzir a amostra no cromatógrafo gasoso.

Uma vez que a temperatura de evaporação do solvente tinha sido otimizada para 25°C, tal como é indicado em 3.1., optou-se por manter este valor de temperatura na etapa de evaporação do solvente em atmosfera de azoto.

Para evitar a perda de compostos durante esta fase, a evaporação nunca foi efectuada completamente à secura, foram utilizados tubos de evaporação de fundo cónico e a pressão de azoto a utilizar nunca excedeu os 10 psi, por forma a que a evaporação fosse efectuada de uma forma lenta e que não provocasse turbulência no solvente.

3.6. Avaliação do processo de extração

Foi avaliada a possível existência de picos interferentes resultantes do processo de extração submetendo o solvente (tolueno) a todo o processo de extração descrito. O cromatograma obtido apresenta-se livres de interferentes, tal como ilustra a figura 19.

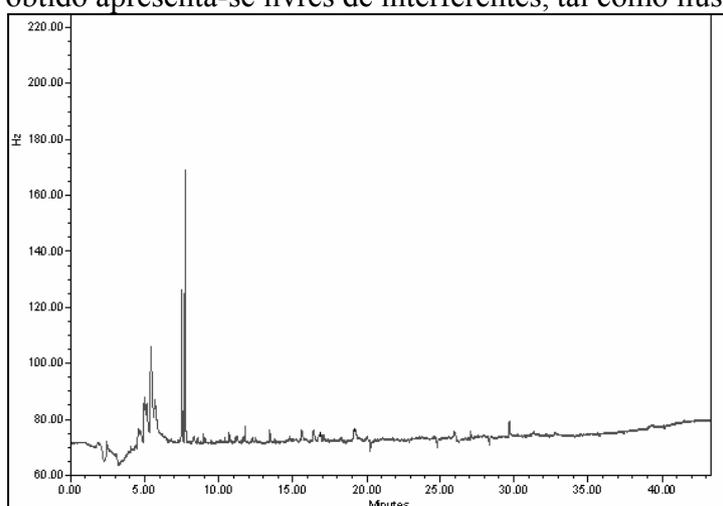


Figura 19 – Cromatograma do solvente (tolueno) após ter sido submetido ao processo de extração descrito e analisado por GC-µECD

4. Método alternativo de preparação de amostra - QuEChERS

Foi efectuado um método alternativo ao método apresentado pela Farmacopeia Europeia para a preparação da amostra. Este método de dispersão da matriz em fase sólida é caracterizado por ser um método simples, rápido e pouco dispendioso, comparativamente aos métodos mais clássicos.^{67,73,74}

Uma vez que a principal aplicação descrita para este método são os produtos alimentares (frutos e vegetais)⁷³, optou-se por aplicar esta metodologia às matrizes em estudo (Valeriana, Sene e Ginkgo biloba) para verificar até que ponto este método poderia ser utilizado na preparação de amostras de medicamentos à base de plantas.

O processo de preparação de amostra efectuado encontra-se indicado no ponto 1.4.2. do capítulo referente à parte experimental, tendo sido o extracto final injectado no sistema cromatográfico GC- μ ECD.

A figura 20 ilustra o cromatograma obtido para uma das matrizes analisadas.

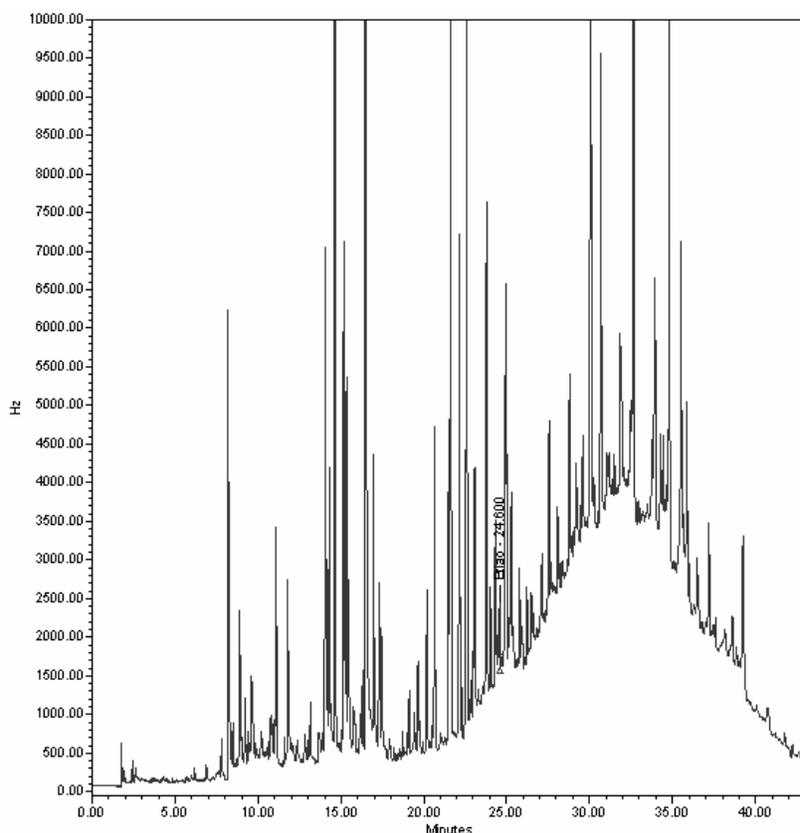


Figura 20 – Cromatograma de amostra de Valeriana com padrão interno (Etião), extraída segundo o método QuEChERS e analisada por GC- μ ECD

Tal como é possível observar, o cromatograma da amostra de Valeriana apresenta muitos picos interferentes.

Para confirmar se os picos interferentes eram inerentes à própria matriz ou ao processo de preparação da amostra, foi efectuado um branco submetendo o solvente (tolueno) a todo o processo de preparação de amostra, tendo sido posteriormente injectado no sistema cromatográfico GC- μ ECD (Figura 21).

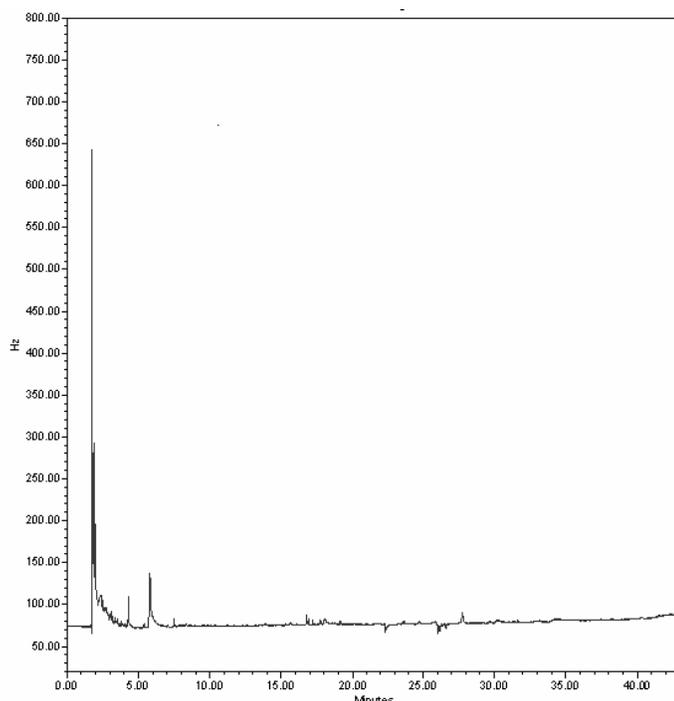


Figura 21 – Cromatograma de tolueno submetido ao método QuEChERS e analisado por GC- μ ECD

O cromatograma do branco demonstra a ausência de picos interferentes pelo que se pode concluir que estes são inerentes à própria matriz.

Uma vez que o método QuEChERS foi inicialmente concebido para amostras contendo um elevado teor em água (superior a 75%)⁷³, efectuou-se uma segunda preparação da amostra à qual se incluiu um passo inicial de hidratação da amostra antes da extracção, tal como está descrito na parte experimental. O cromatograma obtido foi idêntico ao obtido inicialmente sem efectuar a hidratação da amostra.

Assim, nestas condições o método QuEChERS não elimina de uma forma eficaz todos os interferentes da matriz pelo que não vai ser possível a sua utilização neste tipo de matrizes, tendo-se optado por utilizar o método da Farmacopeia Europeia com todos os passos optimizados descritos anteriormente.

5. Validação do método analítico

5.1. Estudo da Especificidade/Selectividade

A especificidade/selectividade é a capacidade de um método distinguir um analito em particular numa mistura complexa sem interferência dos outros componentes.⁸⁴

A especificidade/selectividade em cromatografia pode ser determinada garantindo que não há picos a eluir no mesmo tempo de retenção, o que pode ser avaliado através da identificação dos compostos por GC-MS, por tempo de retenção (t_R), avaliando a resolução entre os vários compostos, através da análise de brancos e das matrizes das amostras em estudo.

5.1.1. Identificação por GC-MS

Cada um dos padrões correspondentes aos compostos em estudo foi inicialmente identificado por GC-MS em modo varrimento total por comparação com as bibliotecas de espectros disponíveis^{86,87}, tendo sido obtido um índice de semelhança entre 90 e 99, tal como é demonstrado na tabela 26.

Tabela 26 – Índice de semelhança obtido após análise por GC-MS e comparação dos espectros correspondentes aos padrões de referência utilizados com os espectros existentes nas bibliotecas de espectros^{86,87}

Composto	Índice de semelhança
α – Hexaclorociclo-hexano	94
Hexaclorobenzeno	99
β – Hexaclorociclo-hexano	91
Lindano	99
δ – Hexaclorociclo-hexano	99
ϵ – Hexaclorociclo-hexano	-
Heptacloro	99
Aldrina	99
<i>cis</i> – Heptacloro-epóxido	99
<i>o,p'</i> – DDE	97
α – Endossulfano	99
Dieldrina	99
<i>p,p'</i> – DDE	99
<i>o,p'</i> – DDD	95
Endrina	93
β – Endossulfano	93
<i>o,p'</i> – DDT	99
Etião (padrão interno)	99
<i>p,p'</i> – DDT	95
<i>cis</i> – Permetrina	90
<i>trans</i> – Permetrina	94
Cipermetrina (1 a 4)	-
Fenvalerato_1	99
Fenvalerato_2	99
Deltametrina	91

Uma vez que o composto ϵ - Hexaclorociclo-hexano não existia nas bibliotecas de espectros disponíveis, adicionou-se o espectro obtido à biblioteca de espectros.

Os espectros correspondentes aos vários isómeros da Cipermetrina foram também adicionados à biblioteca de espectros, pois o *software* identificou os vários isómeros como se fossem todos o mesmo composto.

Este facto permitiu estudar os espectros de cada composto, retirar os seus iões característicos assim como a sua abundância relativa, o que constituiu um método de confirmação dos compostos em estudo nas matrizes analisadas.

5.1.2. Avaliação do tempo de retenção e resolução

Através de 6 injecções consecutivas de solução combinada de padrões de referência no sistema cromatográfico GC- μ ECD foi determinado para cada um dos compostos o tempo de retenção (t_R) e seu desvio padrão relativo (DPR), tendo sido obtidos valores de DPR muito satisfatórios (entre 0,003% a 0,011%), o que permitiu demonstrar a elevada repetibilidade ao nível do t_R .

Foi igualmente determinada a resolução entre os vários compostos, tendo sido obtidos valores sempre superiores a 1,0 (Tabela 17) o que se considera como sendo satisfatório pois permite uma integração apropriada dos picos em causa.

5.1.3. Avaliação de brancos

Foi injectado tolueno no sistema GC- μ ECD, tendo sido obtido um cromatograma livre de picos interferentes (Figura 22).

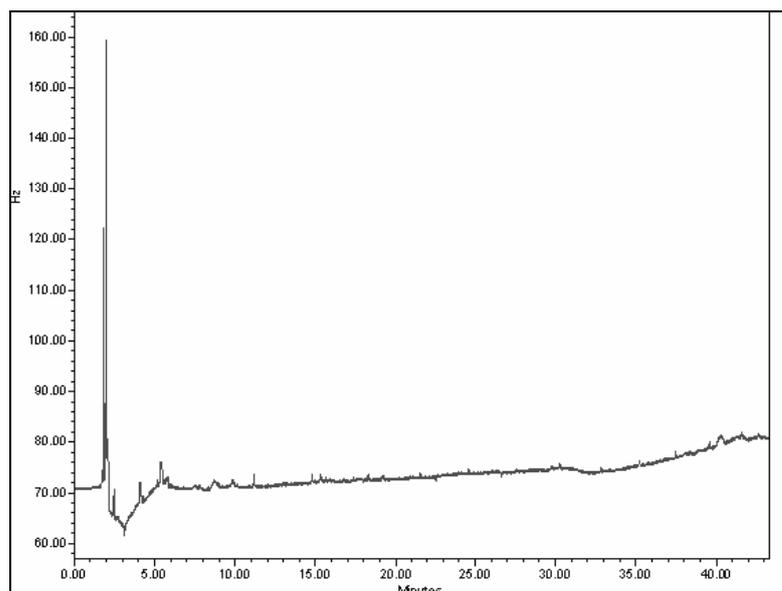


Figura 22 – Cromatograma de solvente (tolueno) analisado por GC- μ ECD

5.1.4. Avaliação da matriz das amostras

Ao efectuar a análise das matrizes no GC- μ ECD verificou-se que por vezes alguns picos resultantes da matriz não se encontravam bem resolvidos com os picos dos compostos em estudo, sendo por vezes identificados como sendo um desses compostos devido à semelhança dos seus t_R .

A título de exemplo a figura 23A ilustra o cromatograma da matriz Valeriana na qual um dos componentes da matriz apresenta um tempo de eluição muito próximo do Heptacloro (16,15 min), sendo desta forma identificado como sendo o Heptacloro.

Ao analisar posteriormente a mesma matriz no GC-MS em modo SIM chegou-se à conclusão que esse pico não correspondia ao Heptacloro pois não foram encontrados os iões característicos do Heptacloro nessa zona do cromatograma. (Figura 23B)

A espectrometria de massa é considerada desta forma uma ferramenta muito útil para o despiste de possíveis dúvidas aquando da análise das matrizes.

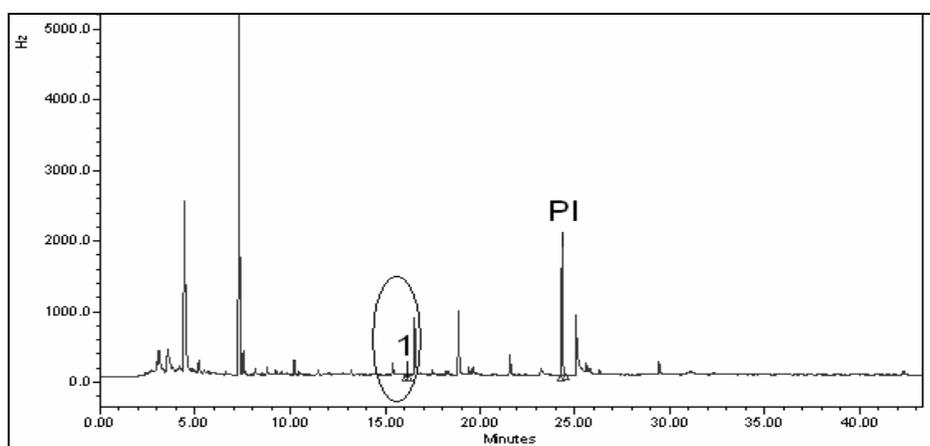


Figura 23A – Cromatograma de uma amostra de Valeriana com o padrão interno Etião, analisada por GC- μ ECD onde é detectado um composto a eluir ao t_R do heptacloro
Legenda: **1** – Composto identificado pelo t_R como heptacloro; **PI** – Padrão interno (Etião).

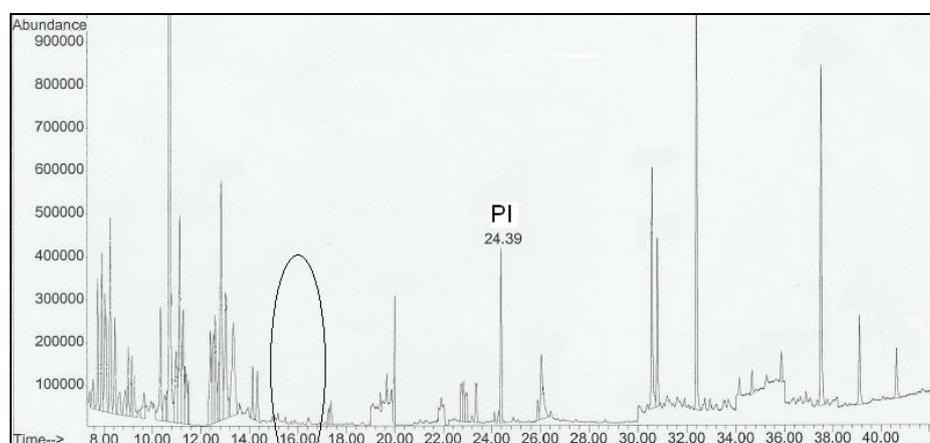


Figura 23B – Cromatograma de uma amostra de Valeriana com o padrão interno Etião, analisada por GC-MS onde são pesquisados os m/z característicos de cada composto
Legenda: **PI** – Padrão interno (Etião)

5.2. Estudo da linearidade

O intervalo de linearidade para os diferentes compostos analisados foi determinado com base no coeficiente de determinação (r^2) obtido em cada uma das curvas, nos resultados referentes ao teste de Fisher Snedecor e no estudo da distribuição dos valores normalizados.^{84,88,89}

Desta forma, os vários requisitos de linearidade que foram tidos em conta para a obtenção dos resultados, tiveram como ponto de partida o valor do coeficiente de determinação que deve ter um valor $\geq 0,99$.⁸⁴

O valor do coeficiente de determinação não é, no entanto, o único requisito a ter em conta. A execução do teste de Fisher Snedecor permite avaliar a necessidade de reduzir a gama de concentrações em estudo, através da comparação entre o valor teste obtido (PG) para um dado número de padrões de calibração (n) e o valor tabelado de Fisher Snedecor (F) para um grau de confiança de 95% ou 99%. A função só é considerada como sendo linear no caso de $PG \leq F$.^{84,88,89}

Foi realizado também para cada um dos compostos em estudo, o teste da distribuição dos valores normalizados que permite avaliar a dispersão dos valores obtidos na calibração em relação aos valores óptimos. Alguns autores admitem como critério de aceitação em cromatografia para a análise de compostos orgânicos em concentrações vestigiárias, valores normalizados iguais ou inferiores a 25% do valor experimental com melhor correlação⁹⁹, enquanto que outros admitem uma variação máxima de 15%¹⁰⁰. No caso deste trabalho, a gama de concentrações em estudo foi reduzida por forma a que os valores normalizados variassem na ordem dos 85% a 115%.

No teste de Fisher Snedecor para a maior parte dos compostos em estudo foi utilizado um grau de confiança de 95%. No entanto, para 4 dos compostos (β -Endossulfano, *cis*-Permetrina, *trans*-Permetrina e Cipermetrina isómero 2) optou-se por utilizar um grau de confiança de 99%, pois caso se optasse por 95%, teriam que ser desprezados alguns pontos da recta, o que não se justificava, pois tanto o coeficiente de determinação como o estudo dos valores normalizados davam resultados bastante satisfatórios nestas condições (valores superiores a 0,997 para o coeficiente de determinação e valores normalizados entre 86% a 108%), tal como se verifica na tabela 27.

Os resultados finais obtidos para os diferentes compostos em estudo encontram-se na tabela 27.

Tabela 27 – Parâmetros das curvas de calibração correspondentes à gama de linearidade determinada

Composto	Equação da recta	r ²	n	Teste Fisher Snedecor			Valores normalizados %	Gama de calibração (ppm)
				Valor Teste de Fisher Snedecor (PG)	Valor Tabelado (F)	Grau de confiança		
α - Hexaclorociclo-hexano	$y = 14,57x - 0,0228$	0,9887	9	0,07	5,59	95%	90 - 109	0,0194 - 0,0774
Hexaclorobenzeno	$y = 11,29x - 0,0002$	0,9987	10	2,38	5,59	95%	98 - 103	0,0020 - 0,0237
β - Hexaclorociclo-hexano	$y = 5,189x - 0,0112$	0,9980	10	3,87	5,59	95%	83 - 101	0,0065 - 0,0780
Lindano	$y = 12,76x - 0,0620$	0,9993	10	0,44	5,59	95%	87 - 103	0,0293 - 0,1758
δ - Hexaclorociclo-hexano	$y = 11,50x - 0,0663$	0,9954	7	3,77	7,71	95%	87 - 105	0,0218 - 0,0654
ε - Hexaclorociclo-hexano	$y = 7,434x - 0,0102$	0,9974	12	4,84	5,12	95%	84 - 105	0,0025 - 0,0599
Heptacloro	$y = 8,303x - 0,0031$	0,9974	11	-8,00	5,32	95%	92 - 104	0,0012 - 0,0140
Aldrina	$y = 10,46x - 0,0010$	0,9955	11	0,85	5,32	95%	95 - 108	0,0010 - 0,0119
cis - Heptacloro-epóxido	$y = 18,17x - 0,0006$	0,9961	11	2,79	5,32	95%	93 - 109	0,0003 - 0,0080
<i>o,p'</i> - DDE	$y = 5,651x + 0,0298$	0,9972	11	2,62	5,32	95%	96 - 111	0,0200 - 0,2394
α - Endossulfano	$y = 6,688x + 0,7373$	0,9949	8	0,06	6,61	95%	91 - 111	0,2552 - 0,7655
Dieldrina	$y = 8,264x - 0,0041$	0,9965	11	0,42	5,32	95%	92 - 111	0,0010 - 0,0119
<i>p,p'</i> - DDE	$y = 10,80x + 0,0682$	0,9986	10	0,46	5,59	95%	96 - 111	0,0445 - 0,2668
<i>o,p'</i> - DDD	$y = 5,636x + 0,0539$	0,9925	10	0,99	5,59	95%	98 - 112	0,0457 - 0,2743
Endrina	$y = 6,363x - 0,0009$	0,9900	11	0,02	5,32	95%	90 - 112	0,0015 - 0,0183
β - Endossulfano	$y = 7,076x + 0,4293$	0,9972	8	7,77	13,74	99%	92 - 102	0,1784 - 0,7135

r² – Coeficiente de determinação; n – Número de pontos de calibração; PG – Valor teste de Fisher Snedecor; F – Valor tabelado de Fisher Snedecor.

Tabela 27 (continuação) – Parâmetros das curvas de calibração correspondentes à gama de linearidade determinada

Composto	Equação da recta	r ²	n	Teste Fisher Snedecor			Valores normalizados %	Gama de calibração (ppm)
				Valor teste de Fisher Snedecor (PG)	Valor Tabelado (F)	Grau de confiança		
<i>o,p'</i> - DDT	$y = 4,899x + 0,0102$	0,9990	9	0,91	5,99	95%	99 - 102	0,0437 - 0,2624
<i>p,p'</i> - DDT	$y = 6,965x + 0,0079$	0,9940	10	0,25	5,71	95%	93 - 106	0,0410 - 0,2458
<i>cis</i> - Permetrina	$y = 2,464x + 0,0084$	0,9983	11	7,46	11,26	99%	98 - 108	0,0010 - 0,1261
<i>trans</i> - Permetrina	$y = 1,942x + 0,0084$	0,9983	11	7,46	11,26	99%	92 - 101	0,0133 - 0,1600
Cipermetrina 1	$y = 1,150x - 0,0031$	0,9993	12	0,19	5,12	95%	83 - 108	0,0120 - 0,2869
Cipermetrina 2	$y = 0,948x - 0,0214$	0,9985	8	9,17	16,26	99%	86 - 102	0,0956 - 0,2869
Cipermetrina 3	$y = 0,570x - 0,0093$	0,9989	9	4,89	5,99	95%	87 - 102	0,0717 - 0,2869
Cipermetrina 4	$y = 0,428x - 0,0075$	0,9986	9	4,51	5,99	95%	90 - 107	0,0717 - 0,2869
Fenvalerato 1	$y = 2,867x - 0,0253$	0,9976	11	2,33	5,32	95%	84 - 102	0,0325 - 0,3906
Fenvalerato 2	$y = 0,642x - 0,0015$	0,9971	11	-7,96	5,32	95%	88 - 108	0,0325 - 0,3906
Deltametrina	$y = 3,377x - 0,0018$	0,9943	9	1,97	5,99	95%	90 - 104	0,0061 - 0,0733

r² – Coeficiente de determinação; n – Número de pontos de calibração; PG – Valor teste de Fisher Snedecor; F – Valor tabelado de Fisher Snedecor.

Resultados e discussão

Descreve-se a título de exemplo os vários testes efectuados para um dos compostos em estudo - Lindano. Foi seguida a mesma metodologia para os restantes compostos.

Iniciou-se o estudo da linearidade determinando a recta obtida a partir das áreas relativas (AR) ao padrão interno observadas em função dos 15 níveis de concentração preparados (Figura 24).

Concentração (mg/l)	AR
0,0007	-
0,0015	0,0095
0,0037	0,0251
0,0073	0,0708
0,0147	0,1420
0,0293	0,3070
0,0440	0,4928
0,0586	0,6844
0,0733	0,8818
0,0879	1,0613
0,1026	1,2503
0,1172	1,4384
0,1319	1,6468
0,1465	1,7717
0,1758	2,1851

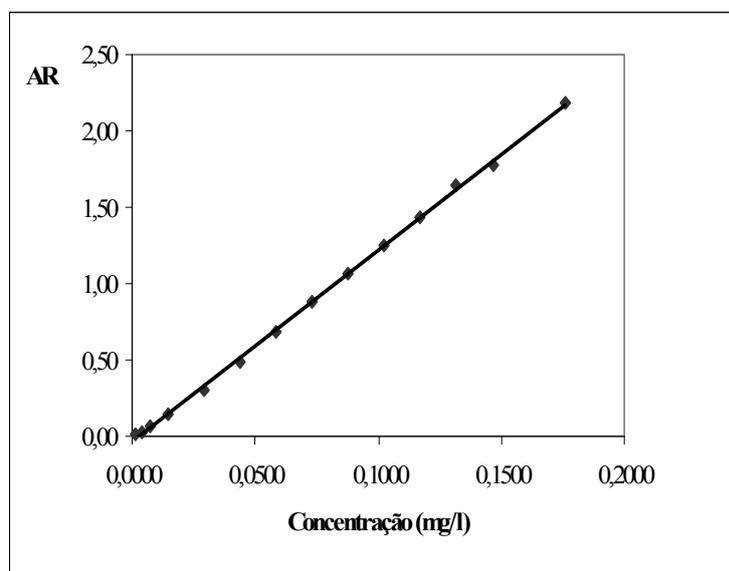


Figura 24 – Curva de calibração (AR vs concentração) obtida após análise de todos os níveis de concentração testados das soluções de Lindano (0,0015 – 0,1758 mg/l) por GC- μ ECD

Determinou-se a forma algébrica da equação da recta dada por:

$$y = a + bx \quad (\text{Equação 6})$$

Sendo:

a - ordenada na origem; b - declive.

Determinou-se também o coeficiente de determinação (r^2).

Assim, para este composto foi obtida inicialmente a equação da recta :
 $y = 12,53x - 0,035$ e $r^2 = 0,9993$

Efectou-se em seguida o teste de Fisher Snedecor, no qual a partir de um conjunto de pares ordenados (AR vs concentração), foi calculada a função de calibração linear (ISO 8466-1) e a função de calibração não linear (ISO 8466-2), assim como os respectivos desvios padrão residuais $S_{y/x}$ e S_{y2} .^{88,89}

$$S_{y/x} = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (y_i - \bar{y}_i)^2}{n-2}} \quad \text{(Equação 7)}$$

$$S_{y2} = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (y_i - \bar{y}_{i2})^2}{n-3}} \quad \text{(Equação 8)}$$

Sendo:

n - número de pontos de calibração;

y_i - sinal obtido para um padrão de determinada concentração;

\bar{y}_i - sinal estimado pela função de calibração linear para um padrão da mesma concentração;

\bar{y}_{i2} - sinal estimado pela função de calibração polinomial do segundo grau para um padrão da mesma concentração.

A função de calibração linear obtida para o Lindano foi :

$$y = 12,53x - 0,0351$$

A função de calibração não linear obtida para o Lindano foi:

$$y = 2,980x^2 + 12,06x - 0,025$$

Tabela 28 – Cálculos intermédios efectuados para a execução do teste de Fisher Snedecor para o composto Lindano para os níveis de concentração testados (0,0015 – 0,1758 mg/l)

Concentração (mg/l)	AR	\bar{y}_i	$(y_i - \bar{y}_i)^2$	\bar{y}_{i2}	$(y_i - \bar{y}_{i2})^2$
0,0015	0,0095	-0,0167	0,00069	-0,008	0,00030
0,0037	0,0251	0,0108	0,00020	0,019	0,00004
0,0073	0,0708	0,0567	0,00020	0,063	0,00006
0,0147	0,1420	0,1485	0,00004	0,152	0,00010
0,0293	0,3070	0,3321	0,00063	0,330	0,00055
0,0440	0,4928	0,5157	0,00053	0,510	0,00031
0,0586	0,6844	0,6993	0,00022	0,691	0,00005
0,0733	0,8818	0,8830	0,00000	0,874	0,00006
0,0879	1,0613	1,0666	0,00003	1,057	0,00001
0,1026	1,2503	1,2502	0,00000	1,242	0,00006
0,1172	1,4384	1,4338	0,00002	1,429	0,00010
0,1319	1,6468	1,6174	0,00086	1,616	0,00094
0,1465	1,7717	1,8010	0,00086	1,805	0,00111
0,1758	2,1851	2,1682	0,00028	2,186	0,00000

A diferença das variâncias (DS^2) foi calculada através da equação:

$$DS^2 = (n-2) \times S_{y/x}^2 - (n-3) \times S_{y2}^2 \quad \text{(Equação 9)}$$

$$DS^2 = 0,00089$$

Resultados e discussão

O valor teste PG foi determinado através da expressão:

$$PG = \frac{DS^2}{S_y^2} \quad (\text{Equação 10})$$
$$PG = 2,67$$

Comparou-se por fim o valor teste PG com o valor tabelado F de acordo com o número de graus de liberdade em causa para um intervalo de confiança de 95% e 99%.

$$F(1,11) 99\% = 9,65$$

$$F(1,11) 95\% = 4,84$$

Como $PG \leq F$ a função de calibração foi considerada como sendo linear para um intervalo de confiança de 95%.

Por fim realizou-se o teste da distribuição dos valores normalizados no qual a partir da equação da recta obtida na regressão linear foram estimadas as AR para diferentes concentrações. Foi calculada a razão entre o valor da área obtida experimentalmente e o valor da área estimada através da regressão linear.

O valor instrumental normalizado (área) foi determinado através da equação:

$$\text{Valor instrumental normalizado (área)} = \frac{\left(\frac{A_i}{C_i}\right) \times (100 \times C_{100})}{A_{100}} \quad (\text{Equação 11})$$

Sendo:

A_i - área correspondente a cada nível de concentração;

C_i - concentração correspondente à área A_i ;

C_{100} - concentração correspondente ao ponto experimental com melhor correlação, ou seja, ponto onde o quociente entre a área experimental e a área da regressão se aproxima mais de 1;

A_{100} - área correspondente à C_{100} .

Tabela 29 – Cálculo dos valores normalizados efectuado para o composto Lindano para a gama de concentrações testada (0,0015 – 0,1758 mg/l)

Concentração (mg/l)	AR experimental	AR estimada	$\frac{AR_{\text{experimental}}}{AR_{\text{estimada}}}$	Valor normalizado
0,0015	0,0095	-0,0167	-0,5675	53,19
0,0037	0,0251	0,0108	2,3234	56,21
0,0073	0,0708	0,0567	1,2485	79,28
0,0147	0,1420	0,1485	0,9562	79,50
0,0293	0,3070	0,3321	0,9244	85,94
0,0440	0,4928	0,5157	0,9555	91,97
0,0586	0,6844	0,6993	0,9786	95,79
0,0733	0,8818	0,8830	0,9987	98,74
0,0879	1,0613	1,0666	0,9951	99,03
0,1026	1,2503	1,2502	1,0001	100,00
0,1172	1,4384	1,4338	1,0032	100,66
0,1319	1,6468	1,6174	1,0182	102,44
0,1465	1,7717	1,8010	0,9837	99,19
0,1758	2,1851	2,1682	1,0078	101,95

AR – área relativa ao padrão interno.

Traçou-se o gráfico de valores normalizados em função do logaritmo da concentração, tal como ilustra a figura 25.

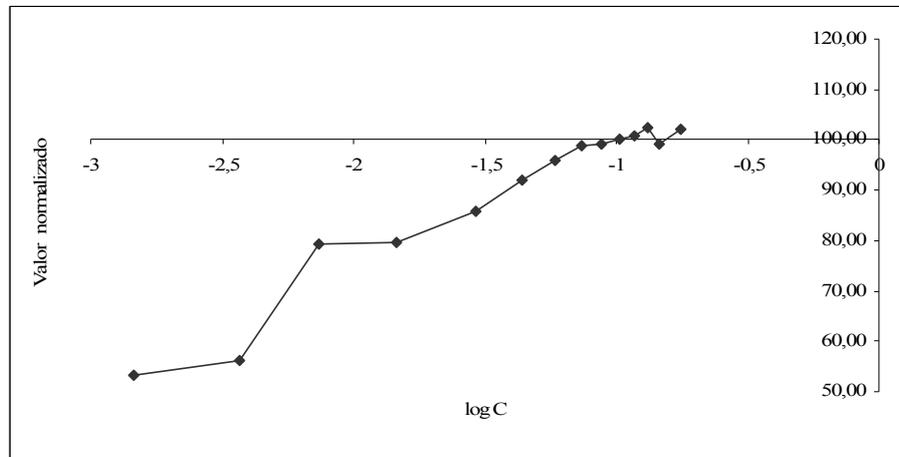
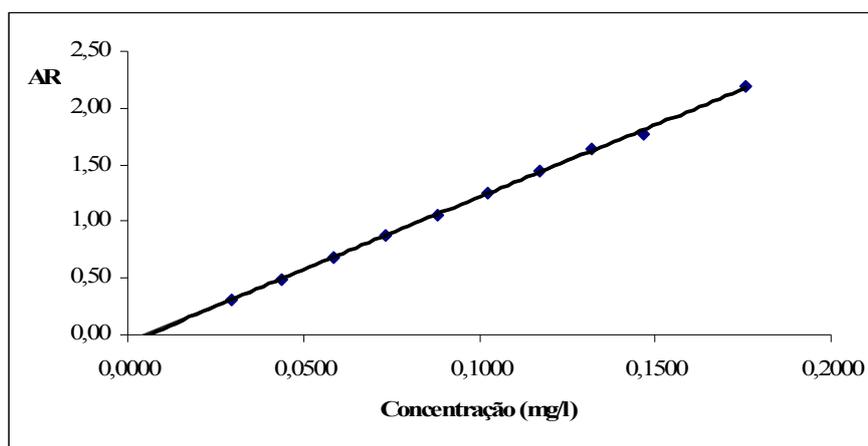


Figura 25 – Curva da distribuição dos valores normalizados para a gama de concentrações testada (0,0015 – 0,1758 mg/l)

Através da análise do gráfico verificou-se que neste caso os dois primeiros pontos apresentam um grande desvio comparativamente aos restantes pontos, devendo ser excluídos.

Foram efectuados novamente todos os testes atrás descritos sem entrar em linha de conta com os dois primeiros pontos e quando se chegou novamente ao estudo dos valores normalizados verificou-se que os dois pontos seguintes apresentavam ainda um desvio superior aos restantes pontos, tendo sido também eliminados.

As figuras 26 e 27 ilustram a curva de calibração obtida com os pontos finais, assim como a distribuição dos valores normalizados.



$$y = 12,76x - 0,0620; r^2 = 0,9993$$

Figura 26 – Curva de calibração (AR vs concentração) obtida após análise das soluções de Lindano correspondentes à gama de linearidade determinada (0,0293 – 0,1758 mg/l) por GC- μ ECD

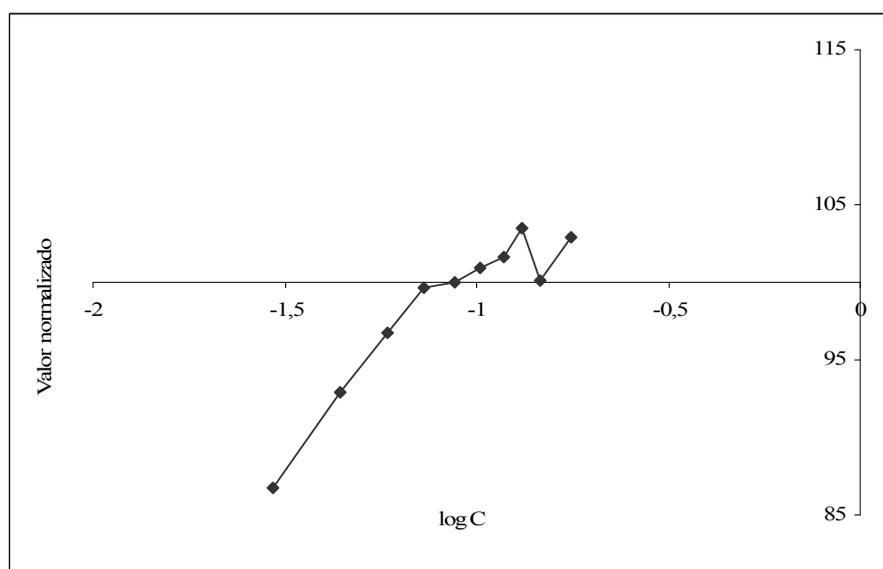


Figura 27 – Curva da distribuição dos valores normalizados para a gama de linearidade determinada (0,0293 – 0,1758 mg/l)

5.3. Estudo da gama de trabalho

Depois de ter sido definido o intervalo de concentrações para o qual a resposta do detector é linear, o passo seguinte foi o de definir a gama de trabalho, através da verificação de que não existem diferenças significativas entre as variâncias dos extremos do intervalo de concentrações da gama de linearidade.⁸⁴

Foi executado o teste de homogeneidade de variâncias, no qual, para cada um dos compostos em estudo, o ponto correspondente ao nível de concentração mais baixo e

o ponto correspondente ao nível de concentração mais elevado da gama de linearidade foram analisados em 10 réplicas independentes.

O teste de F permite verificar se existem diferenças significativas entre as variâncias dos dois níveis de concentrações em estudo, através da comparação entre o valor teste PG e o valor tabelado F, para um determinado grau de confiança.⁸⁴

Foram estudados para cada um dos compostos, diferentes níveis de concentração sucessivamente até ter sido obtida uma homogeneidade de variâncias que é verificada sempre que $PG \leq F$. Desta forma, a gama de linearidade foi reduzida até que se cumprisse este requisito.

É apresentado em seguida um exemplo de todos os cálculos efectuados para o composto Lindano. Os outros compostos foram avaliados seguindo a mesma metodologia de cálculo.

Assim, os possíveis extremos da gama de trabalho para o Lindano são os pontos correspondentes à concentração 0,0293 mg/l e o último ponto (0,1758 mg/l). Foram preparadas e analisadas 10 soluções independentes correspondentes aos níveis de concentração referidos.

Tabela 30 – Valores de AR de 10 soluções independentes de Lindano correspondentes aos níveis de concentração 0,0293 mg/l e 0,1758 mg/l, obtidos após análise por GC- μ ECD

AR obtida para concentração 0,0293 mg/l	AR obtida para concentração 0,1758 mg/l
0,1360	2,3772
0,1233	2,3548
0,1312	2,3781
0,1361	2,4334
0,1251	2,3879
0,1330	2,3409
0,1406	2,3440
0,1268	2,4595
0,1338	2,3840
0,1396	2,3835

Foi determinado o valor teste PG através das equações:

$$PG = \frac{S_{10}^2}{S_1^2} \text{ para } S_{10}^2 > S_1^2 \quad (\text{Equação 12})$$

$$PG = \frac{S_1^2}{S_{10}^2} \text{ para } S_1^2 > S_{10}^2 \quad (\text{Equação 13})$$

Sendo:

S_1 - Desvio padrão do padrão de concentração mais baixa;

S_{10} - Desvio padrão do padrão de concentração mais elevada.

Resultados e discussão

Para os valores estudados obteve-se:

$$s_1^2 = 0,00004$$

$$s_{10}^2 = 0,00139$$

$$PG = \frac{0,00139}{0,00004} = 39,61$$

Comparou-se o valor PG calculado com o valor tabelado da distribuição F de Fisher Snedecor para n-1 graus de liberdade para um intervalo de confiança de 99,5%.

$$F(9; 9; 0,995) = 6,54$$

Como neste caso $PG > F$, logo a diferença entre as variâncias foi significativa, o que implicou que a gama de trabalho fosse reduzida até que se verificasse um valor de $PG \leq F$.

Procedeu-se então à análise do padrão de nível de concentração seguinte (0,0440 mg/l) e do padrão de concentração mais elevada (0,1758 mg/l) e à determinação de PG.

Tabela 31 – Valores de AR de 10 soluções independentes de Lindano correspondentes aos níveis de concentração 0,0440 mg/l e 0,1758 mg/l, obtidos após análise por GC- μ ECD

AR obtida para concentração 0,0440 mg/l	AR obtida para concentração 0,1758 mg/l
0,5593	2,3772
0,5494	2,3548
0,4962	2,3781
0,5353	2,4334
0,5309	2,3879
0,4927	2,3409
0,5297	2,3440
0,5334	2,4595
0,4945	2,3840
0,4852	2,3835

Para os valores estudados obteve-se:

$$s_1^2 = 0,00069$$

$$s_{10}^2 = 0,00139$$

$$PG = \frac{0,00139}{0,00069} = 2,02$$

Como $PG \leq F$ para um intervalo de confiança de 99,5%, a diferença entre as variâncias não é significativa, tendo sido considerada para o Lindano a gama de trabalho de 0,0440 – 0,1758 mg/l.

A tabela 32 indica a gama de trabalho obtida para cada composto em estudo, assim como o resultado do teste de homogeneidade de variâncias.

Tabela 32 – Gama de trabalho para cada um dos compostos em estudo

Composto	Gama de trabalho (ppm)	Teste Homogeneidade de variâncias	
		PG	F
α – Hexaclorociclo-hexano	0,0194 - 0,0774	2,77	6,54
Hexaclorobenzeno	0,0059 - 0,0237	2,95	
β – Hexaclorociclo-hexano	0,0260 - 0,0780	4,81	
Lindano	0,0440 - 0,1758	2,02	
δ – Hexaclorociclo-hexano	0,0218 - 0,0654	1,99	
ϵ – Hexaclorociclo-hexano	0,0200 - 0,0599	6,37	
Heptacloro	0,0035 - 0,0140	1,57	
Aldrina	0,0010 - 0,0119	4,64	
<i>cis</i> – Heptacloro-epóxido	0,0020 - 0,0080	2,95	
<i>o,p'</i> – DDE	0,0598 - 0,2394	3,52	
α – Endossulfano	0,2552 - 0,7655	1,97	
Dieldrina	0,0030 - 0,0119	1,18	
<i>p,p'</i> – DDE	0,0668 - 0,2668	1,36	
<i>o,p'</i> – DDD	0,0685 - 0,2743	1,19	
Endrina	0,0046 - 0,0183	2,13	
β – Endossulfano	0,1784 - 0,7135	1,53	
<i>o,p'</i> – DDT	0,0656 - 0,2624	5,50	
<i>p,p'</i> – DDT	0,0614 - 0,2458	6,32	
<i>cis</i> – Permetrina	0,0105 - 0,1261	1,25	
<i>trans</i> – Permetrina	0,0133 - 0,1600	4,37	
Cipermetrina_1	0,0478 - 0,2869	5,56	
Cipermetrina_2	0,0956 - 0,2869	2,58	
Cipermetrina_3	0,0956 - 0,2869	6,25	
Cipermetrina_4	0,0956 - 0,2869	5,56	
Fenvalerato_1	0,1302 - 0,3906	5,39	
Fenvalerato_2	0,0976 - 0,3906	5,49	
Deltametrina	0,0183 - 0,0733	5,46	

PG - Valor teste de Fisher Snedecor; F - Valor tabelado de Fisher Snedecor para 99,5% de confiança (n=10).

Depois de determinar a gama de trabalho procedeu-se à determinação dos parâmetros associados à regressão linear, tais como a equação da recta e o coeficiente de determinação (r^2) para cada um dos compostos em estudo, tal como indica a tabela 33.

Tabela 33 – Parâmetros das curvas de calibração correspondentes à gama de trabalho para os padrões em estudo

Composto	Equação da recta	r ²	n
α – Hexaclorociclo-hexano	y = 14,57x - 0,0228	0,9887	9
Hexaclorobenzeno	y = 11,29x - 0,0001	0,9982	9
β – Hexaclorociclo-hexano	y = 5,264x - 0,0154	0,9976	7
Lindano	y = 12,74x - 0,0589	0,9991	9
δ – Hexaclorociclo-hexano	y = 11,50x - 0,0663	0,9954	7
ε – Hexaclorociclo-hexano	y = 7,642x - 0,0188	0,9945	8
Heptacloro	y = 8,552x - 0,0055	0,9970	9
Aldrina	y = 10,46x - 0,0010	0,9955	11
cis – Heptacloro-epóxido	y = 18,64x - 0,0032	0,9943	9
<i>o,p'</i> – DDE	y = 5,514x - 0,0531	0,9964	9
α – Endossulfano	y = 6,688x + 0,7373	0,9949	8
Dieldrina	y = 8,275x - 0,0015	0,9939	9
<i>p,p'</i> – DDE	y = 10,82x + 0,0641	0,9982	9
<i>o,p'</i> – DDD	y = 5,506x + 0,0795	0,9917	9
Endrina	y = 6,319x + 0,0796	0,9826	9
β – Endossulfano	y = 7,076x + 0,4293	0,9972	8
<i>o,p'</i> – DDT	y = 4,895x + 0,0111	0,9986	8
<i>p,p'</i> – DDT	y = 6,967x + 0,0075	0,9919	9
cis – Permetrina	y = 2,464x + 0,0084	0,9983	11
trans – Permetrina	y = 1,942x + 0,0084	0,9983	11
Cipermetrina_1	y = 1,156x - 0,0043	0,9992	10
Cipermetrina_2	y = 0,948x - 0,0214	0,9985	8
Cipermetrina_3	y = 0,576x - 0,0106	0,9990	8
Cipermetrina_4	y = 0,432x - 0,0084	0,9985	8
Fenvalerato_1	y = 2,914x - 0,0385	0,9949	8
Fenvalerato_2	y = 0,639x - 0,0005	0,9951	9
Deltametrina	y = 3,402x - 0,0031	0,9899	7

r² – Coeficiente de determinação; n – Número de pontos de calibração.

5.4. Estudo da precisão

5.4.1. Repetibilidade da injeção

A repetibilidade da injeção foi avaliada através da determinação para cada um dos compostos do desvio padrão relativo (DPR) do tempo de retenção (t_R) e das áreas relativas (AR) de 6 injeções consecutivas, tal como está indicado na tabela 34.

Tabela 34 – DPR para os t_R e AR obtidos em 6 injeções consecutivas de solução combinada de padrões

Composto	DPR t_R (%)	DPR AR (%)
α – Hexaclorociclo-hexano	0,007	1,23
Hexaclorobenzeno	0,007	1,65
β – Hexaclorociclo-hexano	0,004	1,06
Lindano	0,009	1,19
δ – Hexaclorociclo-hexano	0,011	0,61
ϵ – Hexaclorociclo-hexano	0,005	0,88
Heptacloro	0,009	0,52
Aldrina	0,006	1,38
<i>cis</i> – Heptacloro-epóxido	0,007	0,92
<i>o,p'</i> – DDE	0,008	1,31
α – Endossulfano	0,009	1,33
Dieldrina	0,003	0,75
<i>p,p'</i> – DDE	0,005	1,44
<i>o,p'</i> – DDD	0,006	1,09
Endrina	0,005	0,66
β – Endossulfano	0,007	1,06
<i>o,p'</i> – DDT	0,007	0,47
<i>p,p'</i> – DDT	0,003	0,83
<i>cis</i> – Permetrina	0,007	1,98
<i>trans</i> – Permetrina	0,005	0,98
Cipermetrina_1	0,006	0,62
Cipermetrina_2	0,005	0,91
Cipermetrina_3	0,010	0,80
Cipermetrina_4	0,005	1,09
Fenvalerato_1	0,005	1,14
Fenvalerato_2	0,006	1,04
Deltametrina	0,009	1,60

DPR t_R (%) - Desvio padrão relativo dos tempos de retenção para $n = 6$;

DPR AR (%) - Desvio padrão relativo das áreas relativas ao padrão interno para $n = 6$.

Os resultados da tabela 34 mostram que os valores de DPR (%) para o t_R variam de 0,003 a 0,011, enquanto que para a AR os valores são da mesma ordem de grandeza para os vários compostos, sendo $\leq 2\%$.

Os valores obtidos são considerados como sendo aceitáveis em cromatografia gasosa e uma vez que não são impostos limites pela Farmacopeia Europeia para estes parâmetros, poderão ser considerados como sendo valores de referência para posteriores aplicações do método analítico em estudo.

5.4.2. Repetibilidade do método

Foi determinada para cada um dos compostos e para cada nível de concentração por interpolação na curva de calibração, a percentagem do valor de concentração obtido em função do valor esperado, assim como o desvio padrão relativo das 9 determinações efectuadas.

A tabela 35 resume os resultados obtidos para cada um dos compostos.

Tabela 35 – Repetibilidade do método para diferentes níveis de concentração

Composto	Padrão mais baixo			Padrão intermédio			Padrão mais elevado		
	C (ppm)	Média %	DPR %	C (ppm)	Média %	DPR %	C (ppm)	Média %	DPR %
	α - Hexaclorociclo-hexano	0,019	83	3,74	0,032	87	1,96	0,077	99
Hexaclorobenzeno	0,006	85	4,47	0,010	98	2,12	0,024	102	1,64
β - Hexaclorociclo-hexano	0,026	95	3,59	0,032	100	2,21	0,078	102	1,49
Lindano	0,044	90	6,58	0,073	93	1,70	0,176	100	1,53
δ - Hexaclorociclo-hexano	0,022	94	2,48	0,027	100	0,68	0,065	105	0,97
ε - Hexaclorociclo-hexano	0,020	98	8,44	0,025	97	6,64	0,060	97	6,93
Heptacloro	0,003	98	2,75	0,006	103	1,76	0,014	100	3,05
Aldrina	0,001	89	15,71	0,005	96	5,16	0,012	104	1,28
<i>cis</i> - Heptacloro-epóxido	0,002	96	3,01	0,003	99	4,78	0,008	100	3,84
<i>o,p'</i> - DDE	0,060	73	2,66	0,100	97	5,13	0,239	101	3,75
α - Endossulfano	0,255	85	7,96	0,319	97	2,46	0,766	102	1,62
Dieldrina	0,003	91	5,80	0,005	97	3,09	0,012	103	1,58
<i>p,p'</i> - DDE	0,067	58	9,58	0,111	99	2,80	0,267	100	1,49
<i>o,p'</i> - DDD	0,069	99	2,35	0,114	95	2,48	0,274	106	2,80
Endrina	0,005	81	5,02	0,008	92	3,63	0,018	90	3,68
β - Endossulfano	0,178	83	5,45	0,297	102	0,64	0,714	102	1,03

C (ppm) - Valor de concentração expresso em ppm para cada um dos compostos. Uma vez que foram efectuadas 3 pesagens independentes para cada um dos compostos, este valor é apenas um valor indicativo da ordem de concentração utilizada, uma vez que corresponde apenas à primeira pesagem efectuada;

Média - Percentagem do valor médio de 9 determinações em função do valor esperado;

DPR % - Desvio padrão relativo das 9 determinações efectuadas.

Tabela 35 (continuação) –Repetibilidade do método para diferentes níveis de concentração

Composto	Padrão mais baixo			Padrão intermédio			Padrão mais elevado		
	C (ppm)	Média %	DPR %	C (ppm)	Média %	DPR %	C (ppm)	Média %	DPR %
	<i>o,p'</i> - DDT	0,066	84	5,57	0,109	97	2,46	0,262	94
<i>p,p'</i> - DDT	0,061	77	6,94	0,102	96	5,36	0,246	92	6,63
<i>cis</i> - Permetrina	0,011	69	15,44	0,052	72	12,54	0,126	70	3,76
<i>trans</i> - Permetrina	0,013	100	15,74	0,067	101	2,23	0,160	100	1,35
Cipemetrina 1	0,048	91	3,37	0,120	99	0,80	0,287	101	2,23
Cipemetrina 2	0,096	101	4,79	0,120	103	1,16	0,287	101	2,78
Cipemetrina 3	0,096	95	4,51	0,120	104	1,26	0,287	102	2,05
Cipemetrina 4	0,096	97	4,73	0,120	105	1,30	0,287	102	2,08
Fenvalerato 1	0,130	102	4,94	0,163	102	6,79	0,391	105	6,85
Fenvalerato 2	0,098	80	7,99	0,163	101	6,64	0,391	107	6,07
Deltametrina	0,018	90	8,54	0,030	98	2,48	0,073	104	3,39

C (ppm) - Valor de concentração expresso em ppm para cada um dos compostos. Uma vez que foram efectuadas 3 pesagens independentes para cada um dos compostos, este valor é apenas um valor indicativo da ordem de concentração utilizada, uma vez que corresponde apenas à primeira pesagem efectuada;

Média - Percentagem do valor médio de 9 determinações em função do valor esperado;

DPR % - Desvio padrão relativo das 9 determinações efectuadas.

Avaliando a dispersão dos resultados nos 3 níveis de concentração estudados, verifica-se que existe uma tendência para esta dispersão ser menor à medida que o nível de concentração aumenta, o que não é surpreendente.

O valor de desvio padrão relativo é para todos os compostos inferior a 10%, excepto para a Aldrina, *cis*-Permetrina, e *trans*-Permetrina, chegando neste último caso a atingir os 16% na concentração mais baixa testada.

Os valores de desvio padrão relativo para os vários compostos variam de 2,35% a 15,71% para o primeiro nível de concentração estudado, de 0,64% a 12,54% para o segundo nível e de 0,97% a 6,93% para o terceiro nível de concentração.

5.4.3. Precisão intermédia

Foi determinada para cada um dos compostos e para cada nível de concentração por interpolação na curva de calibração, a percentagem do valor de concentração obtido em função do valor esperado, assim como o desvio padrão relativo das 9 determinações obtidas em 3 dias diferentes.

A tabela 36 resume os resultados obtidos para cada um dos compostos.

Tabela 36 – Precisão intermédia para diferentes níveis de concentração

Composto	Padrão mais baixo			Padrão intermédio 1			Padrão intermédio 2			Padrão mais elevado		
	C (ppm)	Média %	DPR %	C (ppm)	Média %	DPR %	C (ppm)	Média %	DPR %	C (ppm)	Média %	DPR %
	α -Hexaclorociclo-hexano	0,019	83	2,62	0,032	87	6,16	0,052	93	2,73	0,077	101
Hexaclorobenzeno	0,006	82	5,18	0,010	87	10,47	0,016	85	3,23	0,024	94	6,38
β -Hexaclorociclo-hexano	0,026	91	4,41	0,032	91	6,56	0,052	90	2,57	0,078	97	3,20
Lindano	0,044	88	2,27	0,073	95	4,84	0,117	105	3,54	0,176	106	5,59
δ -Hexaclorociclo-hexano	0,022	93	2,42	0,027	93	5,36	0,044	94	5,30	0,065	104	1,06
ε -Hexaclorociclo-hexano	0,020	93	3,33	0,025	93	4,87	0,040	91	3,91	0,060	97	3,01
Heptacloro	0,003	98	2,78	0,006	107	2,92	0,009	109	1,46	0,014	107	5,09
Aldrina	0,001	85	11,50	0,005	94	3,53	0,008	98	2,55	0,012	103	1,64
<i>cis</i> -Heptacloro- <i>epóxido</i>	0,002	92	6,90	0,003	102	3,03	0,005	104	3,51	0,008	104	6,37
<i>o,p'</i> -DDE	0,060	70	5,46	0,100	86	12,78	0,160	87	2,58	0,239	95	5,62
α -Endossulfano	0,255	77	6,89	0,319	88	7,87	0,510	91	2,97	0,766	96	4,09
Dieldrina	0,003	89	5,12	0,005	101	4,56	0,008	102	2,26	0,012	106	3,27
<i>p,p'</i> -DDE	0,067	55	7,07	0,111	96	5,64	0,178	90	6,89	0,267	100	2,22
<i>o,p'</i> -DDD	0,069	97	6,54	0,114	92	5,55	0,183	106	4,19	0,274	110	2,41
Endrina	0,005	77	8,97	0,008	92	4,15	0,012	98	7,40	0,018	91	3,87
β -Endossulfano	0,178	80	5,16	0,297	95	5,47	0,476	97	2,41	0,714	99	2,56

C (ppm) - Valor de concentração expresso em ppm para cada um dos compostos. Uma vez que foram efectuadas 3 pesagens independentes para cada um dos compostos, este valor é apenas um valor indicativo da ordem de concentração utilizada, uma vez que corresponde apenas à primeira pesagem efectuada;

Média - Percentagem do valor médio de 9 determinações em função do valor esperado;

DPR % - Desvio padrão relativo das 9 determinações efectuadas.

Tabela 36 (continuação) – Precisão intermédia para diferentes níveis de concentração

Composto	Padrão mais baixo			Padrão intermédio 1			Padrão intermédio 2			Padrão mais elevado		
	C (ppm)	Média %	DPR %	C (ppm)	Média %	DPR %	C (ppm)	Média %	DPR %	C (ppm)	Média %	DPR %
	<i>o,p'</i> - DDT	0,066	83	2,91	0,109	91	6,81	0,175	96	3,51	0,262	96
<i>p,p'</i> - DDT	0,061	76	5,89	0,102	88	6,15	0,164	93	2,84	0,246	96	5,15
<i>cis</i> - Permetrina	0,011	53	11,80	0,052	70	2,44	0,084	77	4,67	0,126	84	2,78
<i>trans</i> - Permetrina	0,013	90	13,10	0,067	94	9,74	0,107	107	6,16	0,160	96	4,28
Cipermetrina 1	0,048	90	7,40	0,120	96	4,26	0,191	100	7,46	0,287	106	6,21
Cipermetrina 2	0,096	102	6,16	0,120	98	4,57	0,191	98	8,14	0,287	103	5,93
Cipermetrina 3	0,096	95	7,99	0,120	95	7,63	0,191	94	7,71	0,287	101	3,59
Cipermetrina 4	0,096	98	5,84	0,120	96	7,54	0,191	95	6,83	0,287	100	5,86
Fenvalerato 1	0,130	104	6,55	0,163	103	5,27	0,260	92	8,23	0,391	104	10,09
Fenvalerato 2	0,098	75	8,91	0,163	86	12,58	0,260	91	7,35	0,391	108	10,46
Deltametrina	0,018	88	7,57	0,030	95	5,81	0,049	105	11,38	0,073	100	3,91

C (ppm) - Valor de concentração expresso em ppm para cada um dos compostos. Uma vez que foram efectuadas 3 pesagens independentes para cada um dos compostos, este valor é apenas um valor indicativo da ordem de concentração utilizada, uma vez que corresponde apenas à primeira pesagem efectuada;

Média - Percentagem do valor médio de 9 determinações em função do valor esperado;

DPR % - Desvio padrão relativo das 9 determinações efectuadas.

Os resultados observados são semelhantes aos encontrados no estudo da repetibilidade. Verifica-se, tal como era expectável, uma maior dispersão de resultados, uma vez que estas determinações foram efectuadas em 3 dias distintos. Comparativamente aos resultados obtidos para a precisão, existem mais compostos para os quais o desvio padrão relativo é superior a 10%, atingindo um valor máximo de 13%.

Os valores de desvio padrão relativo para os vários compostos, variam de 2,27% a 13,10% para o primeiro nível de concentração estudado, de 2,44% a 12,78% para o segundo nível, de 1,46% a 11,38% para o terceiro nível e de 1,06% a 10,46% para o último nível de concentração.

5.5. Estudo dos limites analíticos

Para efectuar o estudo dos limites analíticos efectuou-se uma primeira abordagem que consistiu na sua determinação através do desvio padrão residual da recta de calibração, já que para métodos analíticos que envolvam calibrações lineares, esta é uma das formas possíveis para a obtenção destes valores.

Foram determinados os limites de detecção (LD) e limites de quantificação (LQ) para cada um dos compostos através das expressões seguintes:

$$LD = \frac{3,3 \times S_{y/x}}{b} \quad (\text{Equação 14})$$

$$LQ = \frac{10 \times S_{y/x}}{b} \quad (\text{Equação 15})$$

Sendo:

$S_{y/x}$ - desvio padrão residual da curva de calibração;

b - declive.

A tabela 37 indica os valores de LD e LQ expressos em ppm obtidos para cada pesticida em estudo.

Tabela 37 – Limites analíticos obtidos através das curvas de calibração para os vários compostos

Composto	Gama de trabalho (ppm)	LD (ppm)	LQ (ppm)
α – Hexaclorociclo-hexano	0,0194 - 0,0774	0,0071	0,0216
Hexaclorobenzeno	0,0059 - 0,0237	0,0009	0,0026
β – Hexaclorociclo-hexano	0,0260 - 0,0780	0,0032	0,0096
Lindano	0,0293 - 0,1758	0,0045	0,0137
δ – Hexaclorociclo-hexano	0,0218 - 0,0654	0,0035	0,0107
ϵ – Hexaclorociclo-hexano	0,0200 - 0,0599	0,0035	0,0107
Heptacloro	0,0035 - 0,0140	0,0006	0,0018
Aldrina	0,0010 - 0,0119	0,0008	0,0025
<i>cis</i> – Heptacloro-epóxido	0,0020 - 0,0080	0,0005	0,0016
<i>o,p'</i> – DDE	0,0598 - 0,2394	0,0124	0,0376
α – Endossulfano	0,2552 - 0,7655	0,0435	0,1319
Dieldrina	0,0030 - 0,0119	0,0008	0,0024
<i>p,p'</i> – DDE	0,0668 - 0,2668	0,0099	0,0300
<i>o,p'</i> – DDD	0,0685 - 0,2743	0,0217	0,0657
Endrina	0,0046 - 0,0183	0,0021	0,0064
β – Endossulfano	0,1784 - 0,7135	0,0350	0,1061
<i>o,p'</i> – DDT	0,0656 - 0,2624	0,0088	0,0265
<i>p,p'</i> – DDT	0,0614 - 0,2458	0,0191	0,0579
<i>cis</i> – Permetrina	0,0105 - 0,1261	0,0052	0,0158
<i>trans</i> – Permetrina	0,0133 - 0,1600	0,0066	0,0200
Cipermetrina_1	0,0478 - 0,2869	0,0108	0,0329
Cipermetrina_2	0,0956 - 0,2869	0,0108	0,0329
Cipermetrina_3	0,0956 - 0,2869	0,0072	0,0218
Cipermetrina_4	0,0956 - 0,2869	0,0088	0,0268
Fenvalerato_1	0,1302 - 0,3906	0,0222	0,0674
Fenvalerato_2	0,0976 - 0,3906	0,0235	0,0714
Deltametrina	0,0183 - 0,0733	0,0071	0,0216

LD – Limite de Detecção; LQ – Limite de Quantificação.

Os valores de LD obtidos através das curvas de calibração variam entre 0,0005 e 0,0435 ppm, enquanto que para o LQ os valores variam de 0,0016 a 0,1319 ppm, sendo o *cis*-Heptacloro-epóxido o composto que apresenta valores mais baixos e o α -Endossulfano o composto para o qual foram determinados valores mais elevados de LQ e LD.

Como é possível observar para os vários compostos, os LQ obtidos através das curvas de calibração apresentam valores que normalmente são inferiores ou estão próximos do ponto inferior da gama de trabalho pelo que este ponto foi considerado como sendo experimentalmente o LQ, tal como é indicado na tabela 38.

Para a determinação do LD experimental, foram preparadas e analisadas soluções padrão em 5 dias independentes, tal como está descrito na parte experimental, por forma a determinar a razão entre o sinal e o ruído por comparação com a dos brancos com o objectivo de determinar a concentração mínima para a qual o analito pode ser detectado com confiança. Foi aceite uma razão sinal/ruído de 3:1.

Resultados e discussão

A tabela 38 indica os valores de LD e LQ obtidos experimentalmente.

Tabela 38 – Limites analíticos obtidos experimentalmente para os vários compostos

Composto	LD experimental (ppm)	LQ experimental (ppm)
α – Hexaclorociclo-hexano	0,0016	0,0194
Hexaclorobenzeno	0,0010	0,0059
β – Hexaclorociclo-hexano	0,0032	0,0260
Lindano	0,0015	0,0293
δ – Hexaclorociclo-hexano	0,0027	0,0218
ϵ – Hexaclorociclo-hexano	0,0025	0,0200
Heptacloro	0,0012	0,0035
Aldrina	0,0005	0,0010
<i>cis</i> – Heptacloro-epóxido	0,0007	0,0020
<i>o,p'</i> – DDE	0,0020	0,0598
α – Endossulfano	0,0032	0,2552
Dieldrina	0,0010	0,0030
<i>p,p'</i> – DDE	0,0056	0,0668
<i>o,p'</i> – DDD	0,0023	0,0685
Endrina	0,0015	0,0046
β – Endossulfano	0,0030	0,1784
<i>o,p'</i> – DDT	0,0022	0,0656
<i>p,p'</i> – DDT	0,0051	0,0614
<i>cis</i> – Permetrina	0,0053	0,0105
<i>trans</i> – Permetrina	0,0067	0,0133
Cipermetrina_1	0,0120	0,0478
Cipermetrina_2	0,0239	0,0956
Cipermetrina_3	0,0239	0,0956
Cipermetrina_4	0,0478	0,0956
Fenvalerato_1	0,0081	0,1302
Fenvalerato_2	0,0325	0,0976
Deltametrina	0,0061	0,0183

LD – Limite de Detecção; **LQ** – Limite de Quantificação.

Os valores de LD obtidos experimentalmente variam entre 0,0005 e 0,0478 ppm para a Aldrina e para o 4º isômero da Cipermetrina, respectivamente. No que diz respeito ao LQ experimental, os seus valores variam entre 0,0010 ppm para a Aldrina e 0,2552 ppm para o α -Endossulfano.

Os valores obtidos poderão ser considerados como sendo valores de referência para posteriores aplicações do método analítico em estudo, uma vez que não são indicados na Farmacopeia valores de referência para os limites analíticos.

5.6. Ensaio de recuperação

A exactidão do método analítico foi estudada através da determinação da percentagem de recuperação (% Rec) dos vários compostos a partir da adição de solução combinada de padrões de referência em 3 níveis de concentração a 3 matrizes distintas, tendo sido a matriz fortificada sujeita a todo o processo de extracção e purificação descrito anteriormente.

As tabelas 39A, B e C resumem os resultados obtidos.

Tabela 39A – Percentagem de recuperação na matriz Ginkgo biloba, para diferentes níveis de concentração

Composto	Matriz – Ginkgo biloba					
	Nível fortificação 1		Nível fortificação 2		Nível fortificação 3	
	Padrão adicionado C (ppm)	% Rec	Padrão adicionado C (ppm)	% Rec	Padrão adicionado C (ppm)	% Rec
α – Hexaclorociclo-hexano	0,0229	120	0,0344	109	0,0459	105
Hexaclorobenzeno	0,0060	135	0,0091	115	0,0121	100
β – Hexaclorociclo-hexano	0,0280	115	0,0420	104	0,0560	104
ϵ – Hexaclorociclo-hexano	0,0408	88	0,0612	87	0,0815	91
Lindano	0,0212	128	0,0318	112	0,0424	127
δ – Hexaclorociclo-hexano	0,0200	126	0,0300	114	0,0400	110
Heptacloro	0,0038	24	0,0057	28	0,0075	46
Aldrina	0,0042	35	0,0063	41	0,0085	53
<i>cis</i> – Heptacloro-epóxido	0,0017	108	0,0025	94	0,0033	75
<i>o,p'</i> – DDE	0,0797	95	0,1195	94	0,1594	97
α – Endossulfano	0,2279	97	0,3419	102	0,4558	107
Dieldrina	0,0034	120	0,0051	122	0,0068	134
<i>p,p'</i> – DDE	0,0781	80	0,1171	78	0,1561	71
<i>o,p'</i> – DDD	0,0743	104	0,1115	101	0,1487	105
Endrina	0,0034	101	0,0052	104	0,0069	132
β – Endossulfano	0,2234	106	0,3351	106	0,4468	109
<i>o,p'</i> – DDT	0,0759	103	0,1138	94	0,1517	92
<i>p,p'</i> – DDT	0,0759	117	0,1139	102	0,1518	97
<i>cis</i> – Permetrina	0,0281	75	0,0422	67	0,0562	60
<i>trans</i> – Permetrina	0,0369	122	0,0554	114	0,0738	99
Cipermetrina_1	0,0836	114	0,1254	104	0,1672	92
Cipermetrina_2	0,0836	117	0,1254	100	0,1672	87
Cipermetrina_3	0,0836	109	0,1254	99	0,1672	95
Cipermetrina_4	0,0836	252	0,1254	170	0,1672	142
Fenvalerato_1	0,1106	112	0,1659	95	0,2212	87
Fenvalerato_2	0,1106	140	0,1659	109	0,2212	111
Deltametrina	0,0382	114	0,0573	103	0,0764	80

C (ppm) - Valor da concentração do padrão adicionado expresso em ppm;
% Rec - % de Recuperação obtida.

Tabela 39B – Percentagem de recuperação na matriz Valeriana, para diferentes níveis de concentração

Composto	Matriz - Valeriana					
	Nível fortificação 1		Nível fortificação 2		Nível fortificação 3	
	Padrão adicionado C (ppm)	% Rec	Padrão adicionado C (ppm)	% Rec	Padrão adicionado C (ppm)	% Rec
α – Hexaclorociclo-hexano	0,0229	80	0,0344	81	0,0459	87
Hexaclorobenzeno	0,0060	151	0,0091	97	0,0121	120
β – Hexaclorociclo-hexano	0,0280	106	0,0420	97	0,0560	100
ε – Hexaclorociclo-hexano	0,0408	81	0,0612	83	0,0815	85
Lindano	0,0212	101	0,0318	100	0,0424	96
δ – Hexaclorociclo-hexano	0,0200	109	0,0300	103	0,0400	104
Heptacloro	0,0038	66	0,0057	45	0,0075	51
Aldrina	0,0042	143	0,0063	73	0,0085	77
<i>cis</i> – Heptacloro-epóxido	0,0017	121	0,0025	75	0,0033	120
<i>o,p'</i> – DDE	0,0797	88	0,1195	92	0,1594	95
α – Endossulfano	0,2279	90	0,3419	94	0,4558	107
Dieldrina	0,0034	124	0,0051	120	0,0068	130
<i>p,p'</i> – DDE	0,0781	66	0,1171	66	0,1561	76
<i>o,p'</i> – DDD	0,0743	87	0,1115	87	0,1487	94
Endrina	0,0034	126	0,0052	125	0,0069	123
β – Endossulfano	0,2234	100	0,3351	103	0,4468	112
<i>o,p'</i> – DDT	0,0759	98	0,1138	104	0,1517	102
<i>p,p'</i> – DDT	0,0759	102	0,1139	103	0,1518	106
<i>cis</i> – Permetrina	0,0281	87	0,0422	79	0,0562	83
<i>trans</i> – Permetrina	0,0369	109	0,0554	109	0,0738	101
Cipermetrina_1	0,0836	112	0,1254	110	0,1672	104
Cipermetrina_2	0,0836	128	0,1254	126	0,1672	109
Cipermetrina_3	0,0836	127	0,1254	128	0,1672	114
Cipermetrina_4	0,0836	137	0,1254	125	0,1672	108
Fenvalerato_1	0,1106	95	0,1659	96	0,2212	86
Fenvalerato_2	0,1106	100	0,1659	100	0,2212	98
Deltametrina	0,0382	99	0,0573	100	0,0764	93

C (ppm) - Valor da concentração do padrão adicionado expresso em ppm;

% Rec - % de Recuperação obtida.

Tabela 39C – Percentagem de recuperação na matriz Sene, para diferentes níveis de concentração

Composto	Matriz - Sene					
	Nível fortificação 1		Nível fortificação 2		Nível fortificação 3	
	Padrão adicionado C (ppm)	% Rec	Padrão adicionado C (ppm)	% Rec	Padrão adicionado C (ppm)	% Rec
α – Hexaclorociclo-hexano	0,0229	76	0,0344	88	0,0459	77
Hexaclorobenzeno	0,0060	98	0,0091	117	0,0121	97
β – Hexaclorociclo-hexano	0,0280	106	0,0420	106	0,0560	97
ϵ – Hexaclorociclo-hexano	0,0408	82	0,0612	90	0,0815	81
Lindano	0,0212	108	0,0318	106	0,0424	99
δ – Hexaclorociclo-hexano	0,0200	111	0,0300	110	0,0400	100
Heptacloro	0,0038	38	0,0057	54	0,0075	67
Aldrina	0,0042	46	0,0063	58	0,0085	57
<i>cis</i> – Heptacloro-epóxido	0,0017	94	0,0025	104	0,0033	31
<i>o,p'</i> – DDE	0,0797	90	0,1195	94	0,1594	92
α – Endossulfano	0,2279	88	0,3419	101	0,4558	99
Dieldrina	0,0034	128	0,0051	127	0,0068	105
<i>p,p'</i> – DDE	0,0781	64	0,1171	78	0,1561	80
<i>o,p'</i> – DDD	0,0743	89	0,1115	95	0,1487	94
Endrina	0,0034	128	0,0052	134	0,0069	122
β – Endossulfano	0,2234	100	0,3351	109	0,4468	105
<i>o,p'</i> – DDT	0,0759	101	0,1138	104	0,1517	99
<i>p,p'</i> – DDT	0,0759	114	0,1139	107	0,1518	100
<i>cis</i> – Permetrina	0,0281	81	0,0422	87	0,0562	84
<i>trans</i> – Permetrina	0,0369	114	0,0554	119	0,0738	116
Cipermetrina 1	0,0836	117	0,1254	116	0,1672	110
Cipermetrina 2	0,0836	149	0,1254	136	0,1672	124
Cipermetrina 3	0,0836	142	0,1254	131	0,1672	124
Cipermetrina 4	0,0836	150	0,1254	136	0,1672	126
Fenvalerato 1	0,1106	100	0,1659	96	0,2212	91
Fenvalerato 2	0,1106	103	0,1659	103	0,2212	98
Deltametrina	0,0382	105	0,0573	99	0,0764	78

C (ppm) - Valor da concentração do padrão adicionado expresso em ppm;
% Rec - % de Recuperação obtida.

A Farmacopeia Europeia refere que através da execução da metodologia descrita são obtidos valores de recuperação para os vários compostos que oscilam entre 70% e 110%.³³ No entanto, para alguns dos compostos em estudo e dependendo do nível de fortificação, não foi sempre possível obter experimentalmente estes valores para as matrizes analisadas.

Durante o estudo da exactidão verificou-se por vezes a existência de picos interferentes com t_R próximo de alguns dos compostos em estudo.

Assim, verificou-se a existência de um pico próximo do composto Heptacloro nas três matrizes analisadas.

No estudo da matriz Sene, verificou-se a existência de um interferente próximo do composto Aldrina nos três 3 níveis de fortificação e do composto *cis*-Heptacloro-epóxido apenas no nível de fortificação mais elevado.

No que diz respeito à Ginkgo biloba verificou-se um interferente próximo do 4º isómero da Cipermetrina.

A existência de interferentes que apresentavam um tempo de retenção muito próximo de alguns dos compostos em estudo, impossibilitou a determinação inequívoca da sua percentagem de recuperação.

Não entrando em consideração com os compostos onde se verificou a existência de interferentes da matriz, onde ocorreu alguma dificuldade na integração dos picos e conseqüentemente no cálculo da sua percentagem de recuperação, foi possível concluir que a percentagem de recuperação dos vários compostos em estudo varia consoante o tipo de matriz analisada, tendo sido obtidos valores entre 35% a 140% no caso da Ginkgo biloba, 66% e 151% no caso da Valeriana e entre 64 a 150% no caso do Sene.

Os valores de exactidão indicados na Farmacopeia Europeia³³ são comuns aos indicados noutros documentos, nomeadamente na Norma Portuguesa NP EN 12393-1 de 2002⁴². No entanto, esta norma refere que a média de recuperação de replicados deve encontrar-se na gama de 70% a 110%, com um desvio padrão relativo menor ou igual a 20% mas ressalva que em determinadas circunstâncias, dependendo dos pesticidas, dos seus níveis e matrizes, esta gama pode não ser conseguida.

O facto dos valores obtidos se encontrarem por vezes afastados do intervalo desejado, poderá dever-se ao tipo de matrizes testadas, sendo necessário um estudo mais aprofundado para avaliar a exactidão do método analítico.

6. Análise de amostras

Foram analisadas amostras de Ginkgo biloba, Valeriana e Sene. Para cada amostra foi efectuada a sua preparação em triplicado e injectada em triplicado no sistema cromatográfico GC- μ ECD onde foi efectuada a quantificação dos compostos em estudo. Foi efectuada em seguida uma confirmação no sistema cromatográfico GC-MS.

Para as 3 amostras analisadas, todos os pesticidas estudados apresentam-se abaixo do limite de detecção do método.

As figuras 28, 29 e 30 ilustram os cromatogramas obtidos para as várias amostras às quais foi adicionado o padrão interno (Etião). Os restantes picos observados são inerentes às próprias matrizes.

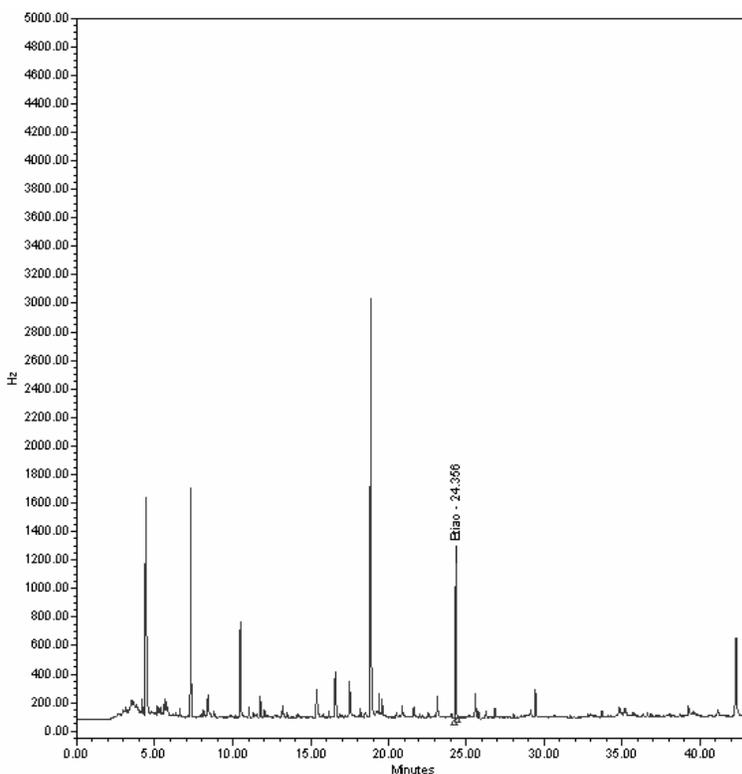


Figura 28 – Cromatograma obtido no GC- μ ECD de amostra de Ginkgo biloba com o padrão interno Etião, sendo os restantes picos pertencentes ao perfil do extracto

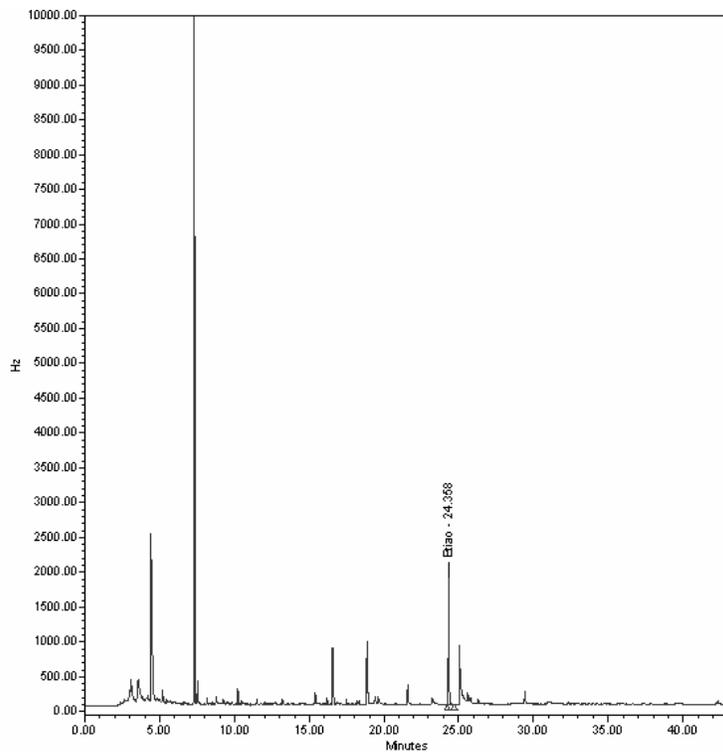


Figura 29 – Cromatograma obtido no GC- μ ECD de amostra de Valeriana com o padrão interno Etião, sendo os restantes picos pertencentes ao perfil do extracto

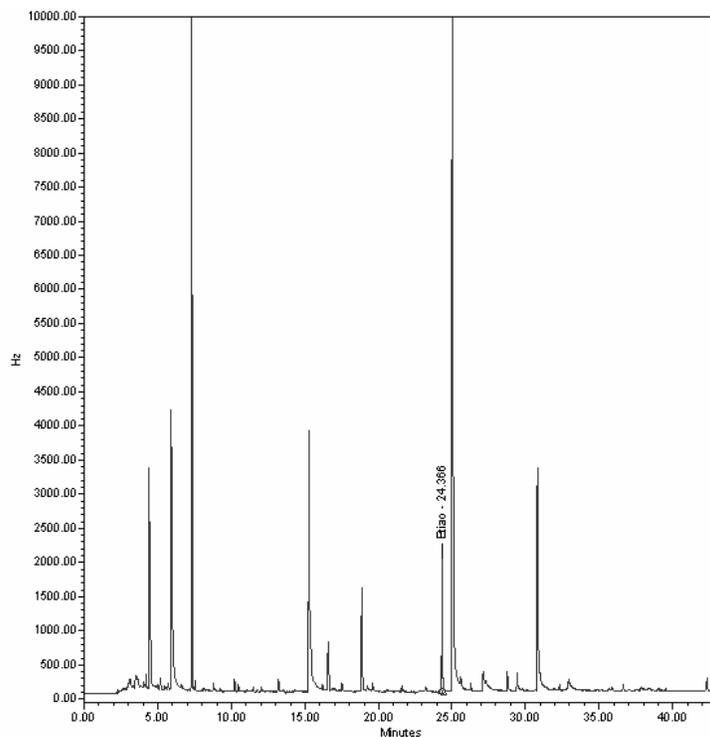


Figura 30 – Cromatograma obtido no GC- μ ECD de amostra de Sene com o padrão interno Etião, sendo os restantes picos pertencentes ao perfil do extracto

Tal como foi anteriormente referido, as amostras em estudo foram também analisadas no GC-MS.

Foi efectuado o método em SIM, onde foram pesquisados os iões característicos de cada composto e determinada a sua abundância relativa, por forma a que tenha sido possível o cálculo dos factores de resposta obtidos pela divisão da abundância do ião mais intenso característico do composto a pesquisar pelos restantes iões.

Assim, efectuando o método em SIM foram detectados determinados picos que saiam a t_R muito próximos dos compostos em estudo. Nestes casos, foram determinados os factores de resposta para os compostos em causa e efectuou-se a sua comparação com os valores anteriormente obtidos aquando da injeção de solução combinada de padrões nas mesmas condições (ver tabela 20).

No que diz respeito a critérios de aceitação para a tolerância máxima recomendada para a abundância relativa dos iões neste tipo de metodologia, o documento SANCO/10232/2006 ⁴⁵ que fornece orientações relativamente à monitorização de resíduos de pesticidas na União Europeia recomenda os valores indicados na tabela 40.

Tabela 40 – Tolerância máxima recomendada para a abundância relativa dos iões utilizando o método de GC-MS ⁴⁵

Abundância relativa (% relativamente ao ião mais abundante)	Tolerância
> 50%	± 20%
> 20% a 50 %	± 25%
> 10% a 20 %	± 30%
≤ 10%	± 50%

A tabela 41 indica os factores de resposta obtidos para os para os vários compostos nas amostras em estudo.

Resultados e discussão

Tabela 41 – Análise das amostras em GC-MS, modo SIM e determinação dos factores de resposta dos valores de m/z característicos nos picos com t_R muito próximos dos compostos em estudo

Composto a pesquisar	Amostra 1 Ginkgo biloba			Amostra 2 Valeriana			Amostra 3 Sene		
	α	Valores de m/z característicos	Factor	α	Valores de m/z característicos	Factor	α	Valores de m/z característicos	Factor
α -Hexaclorociclo-hexano	0,47	183 / 183 183 / 111 183 / 219	- - -	0,47	183 / 183 183 / 111 183 / 219	1,000 0,297 6,103			
β -Hexaclorociclo-hexano	0,52	181 / 181 181 / 111 181 / 219	1,000 0,017 2869,8	0,52	181 / 181 181 / 111 181 / 219	1,000 0,006 7,113	0,52	181 / 181 181 / 111 181 / 219	1,000 0,021 3,534
Lindano							0,52	181 / 181 181 / 111 181 / 219	1,000 0,014 0,074
ϵ - Hexaclorociclo-hexano				0,59	183 / 183 183 / 147 183 / 219	- - -	0,59	183 / 183 183 / 147 183 / 219	1,000 - 0,914
Aldrina				0,71	263 / 263 263 / 66 263 / 293	1,000 0,030 2,788			
Dieldrina				0,90	263 / 263 263 / 277 263 / 345	1,000 0,206 0,934			
Endrina	0,94	317 / 317 317 / 193 317 / 263 317 / 345	1,000 0,028 0,053 2,232	0,94	317 / 317 317 / 193 317 / 263 317 / 345	1,000 0,132 0,396 1,333			
β - Endossulfano				0,96	195 / 195 195 / 159 195 / 237	- - -			
Etião (padrão interno)	1,00	231 / 231 231 / 153 231 / 384	1,000 1,822 6,383	1,00	231 / 231 231 / 153 231 / 384	1,000 1,880 6,670	1,00	231 / 231 231 / 153 231 / 384	1,000 1,871 6,615
<i>cis</i> - Permetrina	1,32	183 / 183 183 / 127 183 / 163	1,000 0,111 0,023	1,33	183 / 183 183 / 127 183 / 163	1,000 0,311 298,0			
Cipermetrina_2							1,42	163 / 163 163 / 181 163 / 207	1,000 87,75 37,55

α – Tempo de retenção relativo, **Factor** – Razão entre a abundância do ião mais intenso pelos restantes iões.

Como é possível observar através da comparação dos valores indicados na tabela 41 com os da tabela 20, os factores de resposta obtidos nas amostras apresentam diferenças relevantes comparativamente aos valores obtidos através da injeção da solução padrão. Desta forma, através do método de GC-MS em modo SIM foi possível efectuar uma confirmação rápida relativamente à identidade dos picos, reforçando a conclusão de que nas amostras analisadas os pesticidas pesquisados apresentam-se abaixo do limite de detecção do método analítico utilizado.

IV. Conclusões e perspectivas futuras

O método indicado na Farmacopeia Europeia, após uma cuidadosa optimização, demonstrou ser adequado para análise de pesticidas organoclorados e piretróides nas matrizes estudadas de medicamentos à base de plantas contendo Valeriana, Sene e Ginkgo biloba.

Os resultados referentes à validação do método analítico permitiram a obtenção de dados que servirão como referência para futuras utilizações desta metodologia, uma vez que a Farmacopeia é omissa relativamente a critérios de aceitação para a maior parte dos parâmetros de validação estudados.

Desta forma, verificou-se que o intervalo de linearidade varia de 0,0003 ppm a 0,7655 ppm, enquanto que a gama de trabalho se situa entre 0,0010 ppm e 0,7655 ppm consoante o composto em estudo.

O método apresenta limites de detecção que variam entre 0,0005 ppm e 0,0478 ppm para a Aldrina e para o 4º isómero da Cipermetrina, respectivamente, enquanto que os valores do limite de quantificação obtidos experimentalmente variam entre 0,0010 ppm para a Aldrina e 0,2552 ppm para o α -Endossulfano, o que são considerados adequados para os níveis de concentração em causa.

A repetibilidade do método é aceitável para os três níveis de concentração estudados, variando os valores de desvio padrão relativo entre 2% e 16% para o primeiro nível de concentração, entre 1% e 12% para o segundo nível e entre 1% e 7% para o terceiro nível de concentração estudado.

No que diz respeito ao estudo da exactidão do método analítico, a percentagem de recuperação dos vários compostos nas três matrizes analisadas saiu por vezes fora do intervalo de 70% a 110%, indicado pela Farmacopeia Europeia³³, variando os valores obtidos consoante o composto ou o nível de concentração em causa. Foram obtidos valores de exactidão entre 35% a 140% no caso da Ginkgo biloba, 66% e 151% no caso da Valeriana e entre 64 a 150% no caso do Sene.

Os valores de exactidão indicados na Farmacopeia Europeia são comuns aos indicados noutros documentos, nomeadamente na Norma Portuguesa NP EN 12393-1 de 2002 relativa a considerações gerais para métodos multi-resíduos para a determinação de resíduos de pesticidas por cromatografia em fase gasosa em alimentos não gordos. No entanto, esta norma refere que a média de recuperação de replicados deve encontrar-se na gama de 70% a 110%, com um desvio padrão relativo menor ou igual a 20% mas ressalva que esta gama pode não ser conseguida, dependendo este facto dos pesticidas em estudo, dos seus níveis de concentração e das matrizes em causa.⁴²

O documento SANCO/10232/2006 que permite fornecer linhas orientativas relativamente à monitorização de resíduos de pesticidas na União Europeia, refere ainda que os valores de recuperação para determinações individuais variam normalmente entre 60% e 140% e que resultados elevados de recuperação obtidos de uma forma consistente deverão ser investigados.⁴⁵

Conclusões e perspectivas futuras

Desta forma, é necessário um estudo da percentagem de recuperação dos vários compostos noutra tipo de matrizes para que seja possível tirar uma conclusão mais aprofundada relativamente à exactidão do método analítico em causa.

O método utilizado de Cromatografia Gasosa acoplado à Espectrometria de Massa permitiu efectuar uma confirmação rápida dos vários compostos sempre que surgiram dúvidas relativamente à identidade do pico.

No que diz respeito à amostras analisadas, estas demonstraram não possuir nenhum dos pesticidas estudados acima do limite de detecção do método analítico. No entanto, existe a necessidade de estudar um número mais elevado de amostras, nomeadamente aquelas que apresentem um maior impacto na saúde pública para que seja possível tirar uma conclusão relativa à presença de pesticidas organoclorados e piretróides em medicamentos à base de plantas que se encontrem no mercado.

Uma vez que a Farmacopeia Europeia apresenta igualmente uma metodologia para a classe de pesticidas organofosforados, haverá posteriormente todo o interesse em estudar esta metodologia no mesmo âmbito em que foi estudada para as classes dos pesticidas organoclorados e piretróides.

A metodologia utilizada apresentou contudo limitações, nomeadamente o seu elevado tempo de análise na fase de extracção e purificação, pelo que houve a necessidade de procura de métodos alternativos que para além de apresentarem uma maior rapidez e simplicidade de execução, apresentassem também uma redução da quantidade de solventes utilizados e consequentemente um menor custo.

O método alternativo estudado para a preparação de amostra (QuEChERS) demonstrou não ser tão eficiente como o método clássico de extracção referido na Farmacopeia Europeia para as matrizes analisadas.⁶⁷

Desta forma, foi possível concluir que embora o método indicado na Farmacopeia Europeia seja adequado para a pesquisa de resíduos de pesticidas nas matrizes em estudo, a sua aplicação requer cuidados especiais e o uso de técnicas adequadas na fase de extracção a fim de maximizar os factores de recuperação e a sua repetibilidade.

V. Bibliografia e referências bibliográficas

1. Farinha A., Matias P., Reis L., 1994. 1º Estudo sobre Plantas Mediciniais nas Farmácias Portuguesas. *Laboratório de Estudos Farmacêuticos*, **1**, 10-16.
2. Zuin V. G., Vilegas, J. H. Y., 2000. Pesticides Residues in Medicinal Plants and Phytomedicines. *Phytotherapy Research*, **14**, 73-88.
3. Chan K., 2003. Some aspects of toxic contaminants in herbal medicines. *Chemosphere*, **52**, 1361-1371.
4. Prontuário Terapêutico online.
<http://www.infarmed.pt/prontuario/framecapitulos.html>.
5. Pereira da Silva, A., 1998. Plantas do Simposium Terapêutico na Prática Clínica, Hugin Editores Lda.
6. Witchl M., 1994. Herbal Drugs and Phytopharmaceuticals, Norman Grainger Bisset Ed., CRC Press, Medpharm Scientific Publishers Stuttgart.
7. Bicchi C., Cordero C., Iori C., Rubiolo P., Sandra P., Yariwake J. H., Zuin V. G., 2003. SBSE-GC-ECD/FDP in the Analysis of Pesticide Residues in *Passiflora alata* Dryander Herbal Teas. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **51**, 27-33.
8. Huie C. W., 2002. A review of modern sample-preparation techniques for the extraction and analysis of medicinal plants. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, **373**, 23-30.
9. Directiva 2004/24/CE do Parlamento Europeu e do Conselho de 31 de Março de 2004 que altera em relação os medicamentos tradicionais à base de plantas a Directiva 2001/83/CE que estabelece um código comunitário relativo aos medicamentos para uso humano. *Jornal Oficial da União Europeia*, L136/85 a 136/90.
10. Helliwell K., 2006. Herbal Reference Standards. *Pharmeuropa* **18**, **2**, 235-238.
11. Busse W., 2000. The significance of quality for efficacy and safety of herbal medicinal products. *Drug Information Journal*, **34**, 15-23.
12. Decreto-Lei nº 176/2006 de 30 de Agosto. *Diário da República 1ª série* Nº 167 de 30 de Agosto de 2006.

13. EMEA (European Agency for the Evaluation of Medicinal Products), 2005. CPMP/QWP/2820/00 Rev 1 EMEA/CVMP/815/00 Rev 1. Guideline on specifications: test procedures and acceptance criteria for herbal substances, herbal preparations and herbal medicinal products/traditional herbal medicinal products.
14. EPA (U.S. Environmental Protection Agency). <http://www.epa.gov/>.
15. Ware G., Whitane D., 2004. The Pesticide Book, 6th Edition, Meister Publication.
16. Jones J. M., 1992. Food Safety, Eagan Press.
17. Carreño J., Rivas A., Granada A., Lopez-Espinosa M. J., Mariscal M., Olea N., Olea-Serrano F., 2007. Exposure of young men to organochlorine pesticides in Southern Spain. *Environmental Research*, **103**, 55-61.
18. López R., Goñi F., Etxandia A., Millán E., 2007. Determination of organochlorine pesticides and polychlorinated biphenyls in human serum using headspace solid-phase microextraction and gas chromatography-electron capture detection. *Journal of Chromatography B*, **846**, 298-305.
19. Derouiche A., Driss M. R., Morizur J., Taphanel M., 2007. Simultaneous analysis of polychlorinated biphenyls and organochlorine pesticides in water by headspace solid-phase microextraction with gas chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, **1138**, 231-243.
20. Watson D. H., 2001. Food Chemical Safety, Volume 1: Contaminants, Woodhead Publishing Limited.
21. Sharif Z., Man Y. B. C., Hamid N. S. A., Keat C. C., 2006. Determination of organochlorine and pyrethroid pesticides in fruit and vegetables using solid phase extraction clean-up cartridges. *Journal of Chromatography A*, **1127**, 254-261.
22. Gfrerer M., Lankmayr E., 2005. Screening, optimization and validation of microwave-assisted extraction for the determination of persistent organochlorine pesticides. *Analytica Chimica Acta*, **533**, 203-211.
23. Yi X., Lu Y., 2005. Multiresidue Determination of Organophosphorus Pesticides in Ginkgo Leaves by Accelerated Solvent Extraction and Gas Chromatography with Flame Photometric Detection. *Journal of AOAC International*, **88**, 729-735.
24. EMEA (European Agency for the Evaluation of Medicinal Products), 2001. CPMP/QWP/2819/00 EMEA/CVMP/814/99. Note for guidance on quality of herbal medicinal products (formerly EMEA/HMPWP/9/99).
25. Farmacopeia Portuguesa VIII 2005 – 2.8.13 “Resíduos de Pesticidas”.

26. Cazes J., 2001. Encyclopedia of Chromatography – Pesticide Analysis by Gas Chromatography, Marcel Dekker, Inc.
27. Leung K. S., Chan K., Chan C., Lu G., 2005. Systematic Evaluation of Organochlorine Pesticide Residues in Chinese Materia Medica. *Phytotherapy Research*, **19**, 514-518.
28. Zuin V. G., Yariwake J. H., Bicchi C., 2003. Fast supercritical fluid extraction and high-resolution gas chromatography with electron-capture and flame photometric detection for multiresidue screening of organochlorine and organophosphorus pesticides in Brazil's medicinal plants. *Journal of Chromatography A*, **985**, 159-166.
29. Ho W., Hsieh S., 2001. Solid phase microextraction associated with microwave assisted extraction of organochlorine pesticides in medicinal plants. *Analytica Chimica Acta*, **428**, 111-120.
30. World Health Organization, 1998. Quality control methods for medicinal plant materials – Determination of pesticide residues.
31. EMEA (European Agency for the Evaluation of Medicinal Products), 1996. CPMP/ICH/281/95 - ICH Topic Q 2 B Validation of Analytical Procedures: Methodology - Note for Guidance on Validation of Analytical Procedures: Methodology.
32. EMEA (European Agency for the Evaluation of Medicinal Products), 1998. CVMP/VICH/591/98 - VICH Topic GL2 (Validation: Methodology) - Guideline on Validation of Analytical Procedures Methodology.
33. European Pharmacopoeia 5th Edition 2005 – 2.8.13 “Pesticides residues”.
34. British Pharmacopoeia 2007 – Appendix XI L. “Pesticide Residues”.
35. USP (The United States Pharmacopeia, The National Formulary) USP29/NF 24, 2006. “General Method for Pesticide Residues Analysis”.
36. Directiva 76/895/CEE do Conselho, de 23 de Novembro de 1976 relativa à fixação de teores máximos de resíduos de pesticidas nas e sobre as frutas e produtos hortícolas.
37. Directiva 90/642/CEE do Conselho, de 27 de Novembro de 1990 relativa à fixação de limites máximos de resíduos de pesticidas nos e sobre determinados produtos de origem vegetal, incluindo frutas e produtos hortícolas.
38. Kabelitz L., 2005. Pesticide residues in medicinal drugs and their preparations. *Pharmeuropa* **17**, **1**, 40-47.
39. Kabelitz L., Sievers H., 2004. Contaminants of medicinal and food herbs with a view to EU regulations. *Innovations in Food Technology*, 25-27.

Bibliografia e referências bibliográficas

40. SANCO/825/00 rev7 2004 - Guidance document on residue analytical methods. http://ec.europa.eu/food/plant/protection/resources/guide_doc_825-00_rev7_en.pdf.
41. Codex Alimentarius Commission, 2002. Joint FAO/WHO Food Standards Programme - Codex Committee on Pesticide Residues – German Comments on CL 2001/29 PR; Methods of Analysis for the Determination of Pesticide Residues.
42. IPQ (Instituto Português da Qualidade), 2003. NP EN 12393-1:2002. Alimentos não gordos – Métodos multi-resíduos para determinação de resíduos de pesticidas por cromatografia em fase gasosa, Parte 1: Considerações gerais.
43. EPA (U. S. Environmental Protection Agency), 1996. Method 3600C – Cleanup.
44. IPQ (Instituto Português da Qualidade), 2003. NP EN 12393-3:2002. Alimentos não gordos – Métodos multi-resíduos para determinação de resíduos de pesticidas por cromatografia em fase gasosa, Parte 3: Determinação e ensaios de confirmação.
45. Comissão Europeia, 2006. SANCO/10232/2006 - Quality Control Procedures for Pesticide Residues Analysis. http://ec.europa.eu/food/plant/resources/qualcontrol_en.pdf.
46. IPQ (Instituto Português da Qualidade), 2003. NP EN 12393-2:2002. Alimentos não gordos. Métodos multi-resíduos para determinação de resíduos de pesticidas por cromatografia em fase gasosa. Parte 2: Métodos de extracção e de purificação.
47. Sanghi R., Kannamkumarath S. S., 2004. Comparison of Extraction Methods by Soxhlet, Sonicator, and Microwave in the Screening of Pesticide Residues from Solid Matrices. *Journal of Analytical Chemistry*, **59**, 1032-1036.
48. Bandoniene D., Gfrerer M., Lankmayr E., 2004. Comparative study of turbulent solid-liquid extraction methods for the determination of organochlorine pesticides. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*, **61**, 143-153.
49. Rissato S. R., Galhiane M. S., Almeida M. V., Gerenutti M., Apon B. M., 2007. Multiresidue determination of pesticides in honey samples by gas chromatography-mass spectrometry and application in environmental contamination. *Food Chemistry*, **101**, 1719-1726.
50. EPA (U. S. Environmental Protection Agency), 2005 U.S. EPA Contract Laboratory Program, Statement of Work for Organic Analysis, Multimedia, Multi-Concentration SOMO 1.1- Exhibit D Pest.
51. Farmacopeia Portuguesa VIII 2005 – 2.2.30 “Cromatografia de exclusão”.
52. Hicks M. R., Haven M. C., Schenken J. S., McWhorter C. A. M., 1987. Laboratory Instrumentation, Third Edition, J. B. Lippincott Company.

53. Restek, 1999. A Guide to Preparing and Analyzing Chlorinated Pesticides, Restek Technical Guide.
[http://www.chromspec.com/pdf/lit/RK28%20-%20\(59892\).pdf](http://www.chromspec.com/pdf/lit/RK28%20-%20(59892).pdf).
54. Skoog D., Leary J., 1992. Principles of Instrumental Analysis, 4th Edition, Saunders College Publishing.
55. EPA (U. S. Environmental Protection Agency), 1994. Method 3640A – Gel-Permeation Cleanup.
56. López-Mesas M., Crespi M., Brach J., Mullender J. P., 2000. Analysis of pesticides in lanolin by gel permeation and gas chromatography. *Analisis*, **28**, 159-162.
57. Nardelli V., Palermo C., Centonze D., 2004. Rapid multiresidue extraction method of organochlorinated pesticides from fish feed. *Journal of Chromatography A*, **1034**, 33-40.
58. EPA (U. S. Environmental Protection Agency), 1996. Method 3630C – Silica Gel Cleanup.
59. Ciola R., 1998. Fundamentos da Cromatografia a Líquido de Alto Desempenho – HPLC. Editora Edgard Blücher Ltda.
60. Kuet A. C. L., Seng L., 2004. Solid-phase Extraction Cleanup Method for the Determination of Organophosphorus Pesticides in Vegetables, *Malaysian Journal of Chemistry*, **6**, 29-38.
61. Lino C. M., Silveira M. I. N., 1997. Extraction and clean-up methods for the determination of organochlorine pesticide residues in medicinal plants. *Journal of Chromatography A*, **769**, 275-283.
62. Zang W., Chu X., Cai H., An J., Li C., 2006. Simultaneous determination of 109 pesticides in unpolished rice by a combination of gel permeation chromatography and Florisil column purification, and gas chromatography/mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, **20**, 609-617.
63. Tan G. H., Tang N. N., 2005. Determination of Organophosphorous Pesticide Residues in Selected Fruits by Gas Chromatography - Mass Spectrometry. *Malaysian Journal of Chemistry*, **7**, 49-56.
64. Zuin V. G., Yariwake J. H., Bicchi C., 2003. Fast supercritical fluid extraction and high-resolution gas chromatography with electron-capture and flame photometric detection for multiresidue screening of organochlorine and organophosphorus pesticides in Brazil's medicinal plants. *Journal of Chromatography A*, **985**, 159-166.

65. Chen Y., Ling Y., 2000. An Overview of Supercritical Fluid Extraction in Chinese Herbal Medicine: from Preparation to Analysis. *Journal of Food and Drug Analysis*, **8**, 235-247.
66. Komatsu E., Vaz J. M., 2004. Otimização dos parâmetros de extração para determinação multiresíduo de pesticidas em amostras de água empregando microextração em fase sólida, *Quimica Nova*, **27**, 720-724.
67. Anastassiades M., Lehotay S. J., Stajnbaher D., Schenck F. J., 2003. Fast and Easy Multiresidue Method Employing Acetonitrile Extraction/Partitioning and “Dispersive Solid-Phase Extraction” for Determination of Pesticide Residues in Produce, *Journal of AOAC International*, **86**, 412-431.
68. Campillo N., Penãlver R., Hernández-Córdoba M., 2007. Pesticide analysis in herbal infusions by solid-phase microextraction and gas chromatography with atomic emission detection. *Talanta*, **71**, 1417-1423.
69. Juan-Garcia A., Mañes J., Font G., Picó Y., 2004. Evaluation of solid-phase extraction and stir bar sorptive extraction for the determination of fungicide residues at low- μgkg^{-1} levels in grapes by liquid chromatography-mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, **1050**, 119-127.
70. Zuin V. G., Lopes A. L., Yariwake J. H., Augusto F., 2004. Application of a novel sol-gel polydimethylsiloxane-poly(vinyl alcohol) solid-phase microextraction fiber for gas chromatographic determination of pesticides residues in herbal infusions. *Journal of Chromatography A*, **1056**, 21-26.
71. Dórea H. S., Lopes W. G., 2004. Aplicação da técnica de dispersão da matriz em fase sólida (DMFS) na análise de pesticidas em quiabo por CG-EM, *Quimica Nova*, **27**, 892-896.
72. Zhao C., Hao G., Li H., Chen Y., 2002. Supercritical fluid extraction for the separation of organochlorine pesticides residue in *Angelica sinensis*. *Biomedical Chromatography*, **16**, 441-445.
73. Lehotay S. J., 2005. “Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged, and Safe Approach for Determining Pesticide Residues”, in *Methods in Biotechnology, Pesticide Protocols*, J. L. Martinez-Vidal & G. Frenich, Humana Press Inc., New York.
74. Trinh A., 2005. New Custom “Dispersive” SPE Products for Pesticide and Acrylamide Analysis”, *Supelco Reporter*, **23.4**, 3-4.
75. Lehotay S. J., Mastovská K., 2005. Evaluation of Two Fast and Easy Methods for Pesticide Residue Analysis in Fatty Food Matrixes, *Journal of AOAC International* **88**, 630-638.

76. Lehotay S. J., Mastovská K., Lightfield A. R., 2005. Use of Buffering and Other Means to Improve Results of Problematic Pesticides in a Fast and Easy Method for Residue Analysis of Fruits and Vegetables, *Journal of AOAC International*, **88**, 615-629.
77. Stenerson K., Wolford R., Shimelis O., 2006. Extraction and Analysis of Agricultural Pesticides from Oranges Using “QuEChERS” Method. *Supelco Reporter*, **24.3**, 3-5.
78. Farmacopeia Portuguesa VIII 2005 – 2.2.28 “Cromatografia em fase gasosa”.
79. EPA (U. S. Environmental Protection Agency), 2000. Method 8081B – Organochlorine Pesticides by Gas Chromatography.
80. Agilent 6890 Series Gas Chromatography - Operating Manual, Volume 3 – Detectors, 2000. Agilent Technologies, Inc.
81. Chang I. L., Klee M. S., Murphy J., 1998. Validation Analysis of EPA CLP Target Organochlorine Pesticides with the Agilent 6890 Series GC and Micro-ECD. *Agilent Technology*, Publication Number 5966-3742E.
82. Agilent Technologies – Most Sensitive ECD on the market – HP6890 Micro-ECD: Greater linear range, lower MDLs.
<http://www.chem.agilent.com/cag/peak/peak2-97/article6.html>.
83. Farmacopeia Portuguesa VIII 2005 – 2.2.43 “Espectrometria de massa”.
84. Relacre (Associação de Laboratórios Acreditados de Portugal), 2000. Guia Relacre 13: Validação de métodos internos de ensaio em análise química, Relacre, Lisboa.
85. Lino C. M., Silveira M. I. N., 2001. Validação de metodologias analíticas. *Revista Portuguesa de Farmácia*, **3**, 101-107.
86. John Wiley & Sons Inc, Wiley Registry 7th Edition/ NIST 2005 Mass Spectral Library.
87. Agilent, HP Pesticide Mass Spectral Library.
88. ISO 8466-1:1990 (International Organization for Standardization), 1990. Water quality – Calibration and evaluation of analytical methods and estimation of performance characteristics. Part 1: Statistical evaluation of the linear calibration function.
89. ISO 8466-2:2001 (International Organization for Standardization), 2001. Water quality – Calibration and evaluation of analytical methods and estimation of performance characteristics. Part 2: Calibration strategy for non-linear calibration functions.

Bibliografia e referências bibliográficas

90. Supelco, 1997. Capillary GC Inlet Liner Selection Guide. Bulletin 899A.
<http://www.sigmaaldrich.com/Graphics/Supelco/objects/11100/11002.pdf>.
91. Reedy V., 1997. Optimizing Split/Splitless Flows in Capillary Gas Chromatography, **36**, 1, 4-7
http://www.uhl.uiowa.edu/OLDnewsroom/hotline/1997/1997_07/labcert.xml.
92. Instrumental Chemistry, 2007.
<http://www.instrumentalchemistry.com>.
93. Wohleb R., Okiro M., 2004. Minimizing Injection Port Breakdown in Organohalide Pesticide Analysis. *Environmental – Advertising Supplement* , **39**, 37.
94. Restek, 1999. Minimizing Breakdown of Chlorinated Pesticides Using Siltek™ - Deactivated GC Accessories. *Restek environmental* - Applications note 59111.
<http://www.restekcoatings.com/restek/images/external/59111.pdf>.
95. Restek, 2000. Siltek™ Deactivation Delivers Inertness to Analyte Breakdown and Reactivity, and Durability to Physical and Chemical Challenges. *Restek environmental* - Applications note 59113.
<http://www.restekcoatings.com/restek/images/external/59113.pdf>.
96. Chaves das Neves H. J., e Freitas A. M. C., 1996. Introdução à Cromatografia Gás-Líquido de Alta Resolução, Dias de Sousa, Lda.
97. Agilent Technologies - Pesticide Elution Order Using Low Bleed Phases.
http://www.chem.agilent.com/cag/cabu/pesticide_order.htm.
98. Farmacopeia Portuguesa VIII 2005 – 2.2.46 “Técnicas de separação cromatográfica”.
99. Almeida C., 2001. Especificação orgânica em águas de consumo humano: fenol, benzeno e derivados. Tese de Doutoramento, FFUL, Lisboa.
100. Simões N.M.G., 2004. Fenol e clorofenóis em águas para consumo humano: optimização do método de análise por SPME-GC/MS. Dissertação de Mestrado, FFUL, Lisboa
101. Database & Internet Searching Chemfinder.com.
<http://chemfinder.cambridgesoft.com>.
102. Merck & Co, 1985. “The Merck Index”, 10th Edition, Merck Research Laboratories Division of Merck & Co, New Jersey, USA.
103. Compendium of Pesticide Common Names.
<http://www.alanwood.net/pesticides/index.html>.

Anexos

Anexo I

Propriedades dos pesticidas pesquisados e dos padrões internos utilizados

Tabela 42A - Propriedades dos pesticidas organoclorados e piretróides pesquisados. ^{101,102,103}

Nome	Estrutura molecular	Nº de CAS	Fórmula molecular	Peso Molecular
α - Hexaclorociclo-hexano		319-84-6	$C_6H_6Cl_6$	290,83
Hexaclorobenzeno		118-74-1	C_6Cl_6	284,78
β - Hexaclorociclo-hexano		319-85-7	$C_6H_6Cl_6$	290,83
Lindano		58-89-9	$C_6H_6Cl_6$	290,83
δ - Hexaclorociclo-hexano		319-86-8	$C_6H_6Cl_6$	290,83
ϵ - Hexaclorociclo-hexano		6108-10-7	$C_6H_6Cl_6$	290,83
Heptacloro		76-44-8	$C_{10}H_5Cl_7$	373,32

Tabela 42A (continuação) - Propriedades dos pesticidas organoclorados e piretróides pesquisados.^{101,102,103}

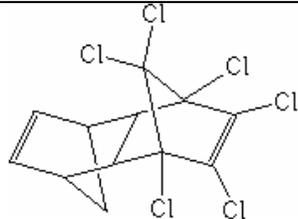
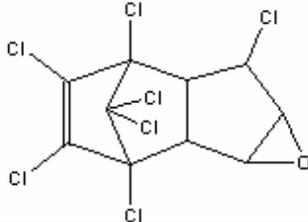
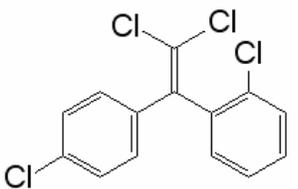
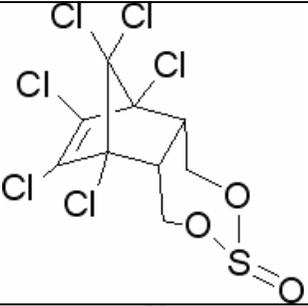
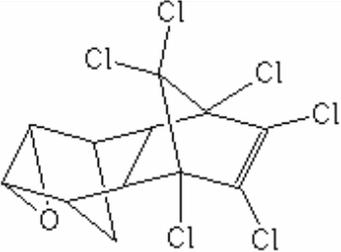
Nome	Estrutura molecular	Nº de CAS	Fórmula molecular	Peso Molecular
Aldrina		309-00-2	C ₁₂ H ₈ Cl ₆	364,91
<i>cis</i> - Heptacloro-epóxido		1024-57-3	C ₁₀ H ₅ Cl ₇ O	389,32
<i>o,p'</i> - DDE		3424-82-6	C ₁₄ H ₈ Cl ₄	318,03
α - Endossulfano		959-98-8	C ₉ H ₆ Cl ₆ O ₃ S	406,92
Dieldrina		60-57-1	C ₁₂ H ₈ Cl ₆ O	380,91

Tabela 42A (continuação) - Propriedades dos pesticidas organoclorados e piretróides pesquisados.^{101,102,103}

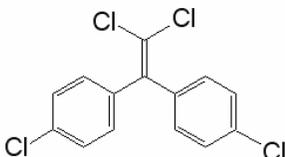
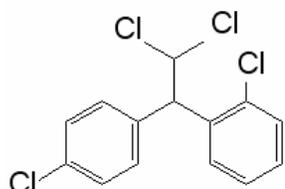
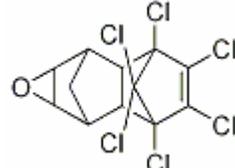
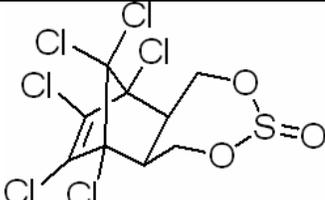
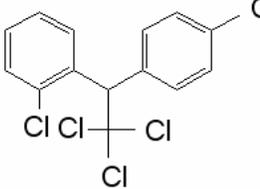
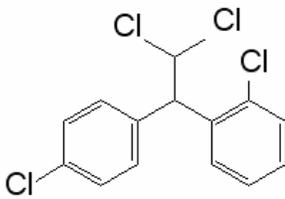
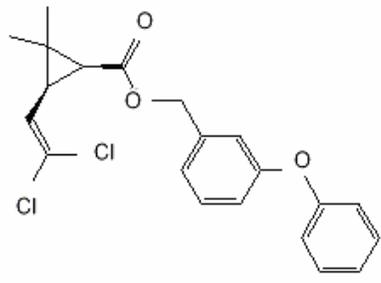
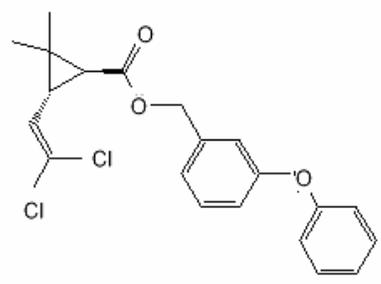
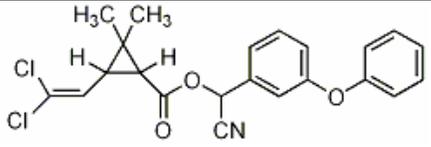
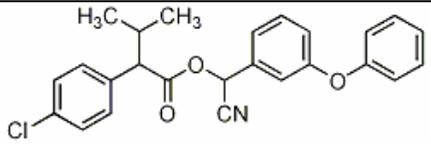
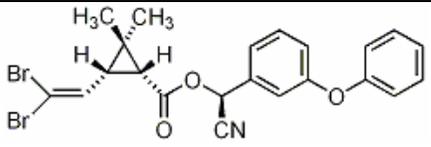
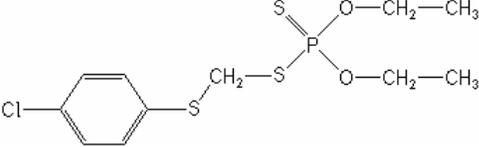
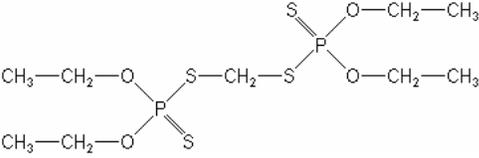
Nome	Estrutura molecular	Nº de CAS	Fórmula molecular	Peso Molecular
<i>p,p'</i> - DDE		72-55-9	C ₁₄ H ₈ Cl ₄	316,50
<i>o,p'</i> - DDD		53-19-0	C ₁₄ H ₁₀ Cl ₄	320,04
Endrina		72-20-8	C ₁₂ H ₈ Cl ₆ O	380,91
β - Endossulfano		33213-65-9	C ₉ H ₆ Cl ₆ O ₃ S	406,92
<i>o,p'</i> - DDT		789-02-6	C ₁₄ H ₉ Cl ₅	354,49
<i>p,p'</i> - DDT		50-29-3	C ₁₄ H ₉ Cl ₅	354,49

Tabela 42A (continuação) - Propriedades dos pesticidas organoclorados e piretróides pesquisados.^{101,102,103}

Nome	Estrutura molecular	Nº de CAS	Fórmula molecular	Peso Molecular
<i>cis</i> - Permetrina		61949-76-6	C ₂₁ H ₂₀ Cl ₂ O ₃	391,29
<i>trans</i> - Permetrina		61949-77-7	C ₂₁ H ₂₀ Cl ₂ O ₃	391,29
Cipermetrina		52315-07-8	C ₂₂ H ₁₉ Cl ₂ NO ₃	416,30
Fenvalerato		51630-58-1	C ₂₅ H ₂₂ ClNO ₃	419,91
Deltametrina		52918-63-5	C ₂₂ H ₁₉ Br ₂ NO ₃	505,20

Anexo I

Tabela 42B - Propriedades dos padrões internos utilizados. ^{101,102,103}

Nome	Estrutura molecular	Nº de CAS	Fórmula molecular	Peso Molecular
Carbofenotíão		786-19-6	$C_{11}H_{16}ClO_2PS_3$	342,85
Etião		563-12-2	$C_9H_{22}O_4P_2S_4$	384,46

Anexo II

Fórmulas utilizadas para a determinação dos parâmetros cromatográficos ^{14,54}

Factor de capacidade (K)

$$K = \frac{t_R - t_M}{t_M} \quad (\text{Equação 16})$$

t_R - tempo de retenção ou distância (ou volume) sobre a linha de base entre o ponto de injeção e a perpendicular baixada a partir do máximo do pico correspondente ao componente considerado;

t_M - tempo morto ou distância (ou volume) sobre a linha de base entre o ponto de injeção e a perpendicular baixada a partir do máximo do pico correspondente a um componente não retido.

Número de pratos teóricos (n)

$$n = 5,54 \left(\frac{t_R}{W_h} \right)^2 \quad (\text{Equação 17})$$

t_R - tempo de retenção ou distância (ou volume) sobre a linha de base entre o ponto de injeção e a perpendicular baixada a partir do máximo do pico correspondente ao componente considerado;

W_h - largura do pico a meia altura.

Número de pratos teóricos efectivos (N)

$$N = 5,54 \left(\frac{t'_R}{W_h} \right)^2 \quad (\text{Equação 18})$$

$$\text{sendo: } t'_R = t_R - t_M \quad (\text{Equação 19})$$

t'_R - tempo de retenção ajustado;

t_R - tempo de retenção ou distância (ou volume) sobre a linha de base entre o ponto de injeção e a perpendicular baixada a partir do máximo do pico correspondente ao componente considerado;

t_M - tempo morto ou distância (ou volume) sobre a linha de base entre o ponto de injeção e a perpendicular baixada a partir do máximo do pico correspondente a um componente não retido;

W_h - largura do pico a meia altura.

Sendo a relação entre N e n:

$$N = n \left(\frac{K}{1 + K} \right)^2 \quad (\text{Equação 20})$$

n - Número de pratos teóricos;
K - Factor de capacidade.

Factor de simetria (A_s)

$$A_s = \frac{W_{0,05}}{2d} \quad (\text{Equação 21})$$

$W_{0,05}$ - largura do pico a um vigésimo da sua altura;
d - distância entre a perpendicular baixada a partir do máximo do pico e o ponto localizado no ramo ascendente do mesmo pico a um vigésimo da sua altura.

Resolução (R) ^{j)}

$$R = \frac{1,18(t_{R2} - t_{R1})}{W_{h1} + W_{h2}} \quad (\text{Equação 22})$$

para $t_{R2} > t_{R1}$

t_{R1} e t_{R2} - tempos de retenção ou distâncias sobre a linha de base entre o ponto de injeção e as perpendiculares baixadas a partir dos máximos de dois picos adjacentes;
 W_{h1} e W_{h2} - larguras dos picos a meia altura.

Tempo de retenção relativo não ajustado(α)

$$\alpha = \frac{t_{R2}}{t_{R1}} \quad (\text{Equação 23})$$

t_{R2} - tempo de retenção do pico de interesse;
 t_{R1} - tempo de retenção do pico de referência (padrão interno).

^{j)} Outros autores consideram o valor de 2 em vez de 1,18 na fórmula para a determinação da resolução. ⁵⁴