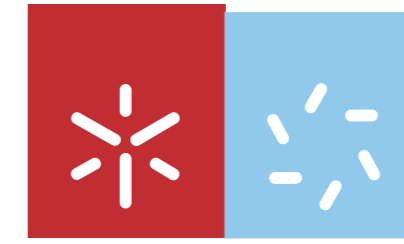


Sara Sofia Marques Fernandes
**Desenvolvimento de um método de análise
de Pesticidas na Indústria Vitivinícola**

UMinho | 2010

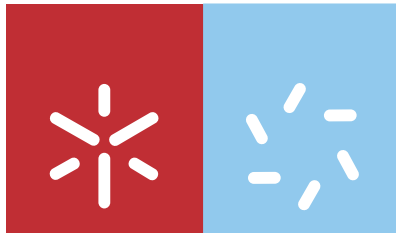


Universidade do Minho
Escola de Ciências

Sara Sofia Marques Fernandes

**Desenvolvimento de um método de análise
de Pesticidas na Indústria Vitivinícola**

Julho de 2010



Universidade do Minho

Escola de Ciências

Sara Sofia Marques Fernandes

Desenvolvimento de um método de análise de Pesticidas na Indústria Vitivinícola

Dissertação de Mestrado em Química
Área de Especialização em Técnicas de Caracterização
e Análise Química

Trabalho efectuado sob a orientação do
Professor Doutor Pier Parpot
e da
Dra. Isabel Araújo

É AUTORIZADA A REPRODUÇÃO PARCIAL DESTA TESE APENAS PARA EFEITOS DE INVESTIGAÇÃO, MEDIANTE DECLARAÇÃO ESCRITA DO INTERESSADO, QUE A TAL SE COMPROMETE;

Universidade do Minho, ___/___/_____

Assinatura: _____

Esta dissertação, embora seja um trabalho individual, foi realizada com contributos de natureza diversa, e é por essa razão que desejo expressar os meus sinceros agradecimentos.

Em primeiro lugar, gostaria de manifestar o meu reconhecimento aos meus orientadores, o Professor Doutor Pier Parpot da Universidade do Minho e a Dra. Isabel Araújo da Empresa Vinalia, pelo apoio, ensinamentos, sugestões relevantes e disponibilidade.

Ao Departamento de Química da Universidade do Minho pelo acolhimento e disponibilização do Laboratório e todo o material necessário para a realização deste projecto.

À Empresa Vinalia que disponibilizou as amostras para análise.

A todos os Professores que foram meus mentores ao longo do ano curricular do Mestrado, que através das suas lições me transmitiram conhecimentos essenciais e motivação para a realização deste trabalho.

Às minhas amigas Joana e Juliana pela amizade e apoio nos momentos bons e menos bons.

Aos meus colegas de Mestrado e de Laboratório, que sempre me acompanharam e apoiaram, em especial a Marta pelo ânimo dado.

Aos funcionários do Departamento e Técnicos, pelo apoio prestado.

À minha família pelo apoio, paciência, compreensão e incentivo sempre presentes.

Muito obrigado a todos.

Resumo

Foi desenvolvido um método de análise de multi-resíduos de pesticidas em vinhos brancos, por microextração em fase sólida / cromatografia em fase gasosa / espectrometria de massa. A análise foi realizada utilizando cromatografia em fase gasosa com detector de espectrometria de massa com ionização por impacto electrónico e com aquisição de dados em *Full Scan* e *MS/MS*. Foi obtida boa resolução cromatográfica para todos os compostos com um tempo total de análise cromatográfica de 35 minutos. Os pesticidas foram extraídos das amostras por microextração em fase sólida usando uma fibra polimérica de *PDMS* 100 μm . A adição de um sal, temperatura e tempo de extração foram os parâmetros estudados para a otimização de condições de extração. Os melhores resultados foram obtidos sem adição de sal, com 30 minutos de imersão, a 35 °C. As curvas de calibração resultaram em respostas lineares para todos os pesticidas, para *Full Scan* e *MS/MS*. Os Limites de Quantificação obtidos para *Full Scan* estão compreendidos entre 0,08-1,31 ppm, enquanto para *MS/MS* estão entre os 0,01-0,03 ppm, dependendo de cada composto.

A melhoria do método de aquisição para *MS/MS* não foi efectuada para todos os pesticidas, devido a uma avaria no instrumento *GC-MS*. A análise de amostras de vinho branco, e a monitorização dos níveis de pesticidas durante o processo de formação do vinho, também não foi possível.

Abstract

A multi-residue solid-phase microextraction / gas chromatography / mass spectrometry detection method for pesticide analysis in white wines was developed. Analysis was performed using capillary gas chromatography with electron impact mass spectrometry detection in Full Scan and MS/MS acquisition mode. Good resolution of all compounds was achieved with a run time of 35 minutes. The pesticides were extracted from the samples using solid-phase microextraction on a polymeric fiber PDMS 100 μm . Salt addition, extraction temperature and extraction time were the parameters studied in order to optimize the extraction conditions. The best results were obtained with no salt addition, 30 minutes immersion, at 35 °C. Calibration curves of extracted standards gave linear responses for all the pesticides under Full Scan and *MS/MS* acquisition mode. Quantification limits between 0,08-1,31 ppm were obtained with Full Scan acquisition mode, and from 0,01 to 0,03 ppm under MS/MS acquisition mode, depending on each pesticide analyte.

The improvement of the analysis parameters for the MS/MS acquisition mode was not achieved for all pesticides, due to some technical problems related to the GC-MS instrument. Wine samples analysis and the monitoring of pesticides levels during vinification were also not possible.

Agradecimentos	II
Resumo	III
Abstract	IV
Índice	V
Abreviaturas	IX
Índice de Figuras	X
Índice de Tabelas	XV
Capítulo I – Introdução	18
1. O Vinho.....	19
1.1. Definição.....	19
1.2. Introdução Histórica.....	19
1.3. Produção do Vinho.....	20
1.3.1. Colheita.....	20
1.3.2. Esmagamento.....	20
1.3.3. Fermentação.....	20
1.3.4. Tratamentos Pós-Fermentação.....	21
1.4. Bebida.....	21
1.4.1. Classificação dos Vinhos.....	21
1.4.2. Análise de Rotina.....	22
1.4.3. Constituintes da Matriz.....	23
2. Os Pesticidas.....	26
2.1. Introdução.....	26
2.2. Doenças e Parasitas da Videira.....	28
2.3. Aplicação e Degradação.....	29
2.4. Revisão Bibliográfica dos Pesticidas de Interesse.....	30
Capítulo II – Técnicas Analíticas	32
1. Técnicas Analíticas Utilizadas neste Trabalho.....	33
1.1. Microextração em Fase Sólida.....	33
1.2. Cromatografia de Fase Gasosa.....	35

1.2.1. Instrumentação.....	35
1.2.2. Eficiência de Separação.....	37
1.2.3. Interpretação de um Cromatograma.....	38
1.3. Espectrometria de Massa.....	39
1.4. Cromatografia de Fase Gasosa acoplada à Espectrometria de Massa.....	43
1.5. Curva de Calibração.....	44
2. Revisão Bibliográfica.....	46
2.1. Extracção.....	46
2.1.1. Extracção Líquido-Líquido.....	46
2.1.2. Extracção em Fase Sólida.....	46
2.1.3. Microextracção em Fase Sólida.....	46
2.2. Análise e Detecção.....	55
2.3. Estudos de Casos.....	56
Capítulo III – Parte Experimental.....	57
1. Reagentes.....	58
2. Instrumentação.....	59
3. Preparação de Soluções.....	60
3.1. Estudos Prévios.....	60
3.1.1. SPME-GC-MS.....	60
3.1.2. LC-MS.....	61
3.2. Optimização das Condições de Extracção.....	62
3.2.1. Estudo do Ajuste da Força Iónica.....	62
3.2.2. Estudo da Temperatura e Tempo de Extracção.....	63
3.3. Análise Quantitativa.....	64
3.3.1. Método <i>Full Scan</i>	64
3.3.2. Método <i>MS/MS</i>	67
4. Procedimentos.....	70
4.1. Acondicionamento e Limpeza Térmica da Fibra de Microextracção.....	70
4.2. Extracção.....	70
4.2.1. Estudos prévios SPME-GC-MS e Estudo do Ajuste da Força Iónica.....	70
4.2.2. Estudo da Temperatura de Extracção.....	70

4.2.3. Estudo do Tempo de Extracção.....	71
4.2.4. Análise Quantitativa.....	71
5. Condições de Análise.....	72
5.1. Estudos Prévios.....	72
5.1.1. GC-MS.....	72
5.1.2. LC-MS.....	72
5.2. Condições de Análise utilizadas para a construção das Rectas de Calibração em <i>GC-MS</i>	73
5.2.1. Método <i>Full Scan</i>	73
5.2.2. Método <i>AMD</i>	74
5.2.3. Método <i>MS/MS</i>	75
Capítulo IV – Apresentação e Discussão dos Resultados.....	76
1. Condições Experimentais.....	77
2. Pesticidas de Interesse.....	79
2.1. Pesticida Ciprodinil.....	79
2.2. Pesticida Metalaxil.....	82
2.2.1. GC-MS.....	82
2.2.2. LC-MS.....	83
2.3. Pesticida Folpete.....	84
2.4. Pesticida Benalaxil.....	85
2.5. Pesticida Iprovalicarbe.....	87
2.6. Pesticida Pirimetanil.....	89
2.7. Pesticida Dieldrine.....	91
3. Estudos Prévios.....	93
3.1. <i>SPME-GC-MS(PE)</i>	93
3.2. <i>SPME-GC-MS(PI)</i>	94
3.3. <i>LC-MS</i>	95
3.4. Conclusões.....	96
4. Optimização das Condições de Extracção.....	97
4.1. Estudo do efeito da Força Iónica da Solução.....	97
4.2. Estudo do efeito da Temperatura de Extracção.....	98

4.3. Estudo do efeito do Tempo de Extração.....	99
4.4. Conclusões.....	100
5. Rectas de Calibração.....	102
5.1. Pesticida Ciprodinil.....	104
5.2. Pesticida Metalaxil.....	105
5.3. Pesticida Folpete.....	106
5.4. Pesticida Benalaxil.....	107
5.5. Pesticida Iprovalicarbe.....	108
5.6. Pesticida Pirimetanil.....	109
Capítulo V – Conclusão.....	110
Bibliografia.....	113
Anexos.....	118
Anexo I – Frases de Risco.....	119
Anexo II – Frases de Segurança	121
Anexo III - Fórmulas Matemáticas	123
Anexo IV – Instruções de Funcionamento do <i>GC-MS</i>	125
Anexo V – Instruções de Funcionamento do <i>LC-MS</i>	128

LMR – Limite Máximo Recomendado

SPE – *Solid Phase Extraction* – Extração em Fase Sólida

SPME – *Solid Phase Microextraction* – Microextração em Fase Sólida

GC – *Gas Chromatography* – Cromatografia Gasosa

MS – *Mass Spectrometry* – Espectrometria de Massa

LC – *Liquid Chromatography* – Cromatografia Líquida

HPLC – *High Performance Liquid Chromatography* - Cromatografia Líquida de Alta Performance

PDMS - Polidimetilsiloxano

PA - Poliacrilato

CW – carvão activado grafitizado

DVB – resina poliestireno-divinilbenzeno

ECD – *ElectroChemical Detector* – Detector ElectroQuímico

NPD – *Nitrogen Phosphorous Detector* – Detector de Azoto e Fósforo

EI – *Electron Impact* – Impacto Electrónico

CI – *Chemical Ionization* – Ionização Química

RPCI – *Reduced Pressure Chemical Ionization* – Ionização Química a Pressão Reduzida

APCI – *Atmosferic Pressure Chemical Ionization* – Ionização Química à Pressão Atmosférica

ECNI – *Electronic Capture with Negative Ionization* – Captura Electrónica com Ionização Negativa

FI – *Field Ionization* – Ionização de Campo

rpm – rotações por minuto

Capítulo I - Introdução

Figura 1.	Ácidos presentes nos vinhos: ácido sulfuroso (a), carbónico (b), tartárico (c), málico (d), cítrico (e), láctico (f), succínico (g) e acético (h).....	24
Figura 2.	Aldeídos e Cetonas presentes no vinho: Acetaldeído (a), Furfural (b), β -damascenona (c) e a β -ionona (d).....	24
Figura 3.	Compostos fenólicos relevantes no vinho: ácido benzóico (a), ácido vanílico (b), gálico (c), ácido ferúlico (d), ácido cafeico (e), siringaldeído (f), quercetina (g) e catequina (h).....	25

Capítulo II – Técnicas Analíticas

Figura 4.	Dispositivo de Microextração em Fase Sólida.....	33
Figura 5.	Esquema de um Cromatógrafo de fase gasosa.....	36
Figura 6.	Varição da Resolução e do Tempo de Retenção com o Factor de Capacidade.....	38
Figura 7.	Exemplo de um cromatograma obtido por análise de uma mistura comercial de pesticidas por Cromatografia Gasosa.....	39
Figura 8.	Diagrama de um Espectrómetro de Massa que mostra os vários componentes funcionais.....	40
Figura 9.	Diagrama dos componentes de uma fonte de ionização por impacto electrónico.....	40
Figura 10.	Figura ilustrativa das superfícies internas de um analisador de massas do tipo <i>Ion Trap</i>	41
Figura 11.	Diagrama de estabilidade de mathieu para analisadores de massa do tipo <i>Ion Trap</i>	41
Figura 12.	Exemplo de Espectro de Massa de um Pesticida.....	42
Figura 13.	Esquema representativo dos 4 tipos de agitação estudados: agitação nula (a), agitação magnética (b), vibração da fibra (c) e célula de fluxo (d).....	49
Figura 14.	Esquema da montagem para uma célula de fluxo utilizada para efectuar o estudo do efeito da agitação.....	50
Figura 15.	Efeito da velocidade de agitação na extração de pesticidas.....	50
Figura 16.	Varição das áreas dos picos cromatográficos para os pesticidas estudados com o tempo de extração.....	51
Figura 17.	Influência da quantidade de etanol na eficiência de extração.....	53
Figura 18.	Efeito de diferentes concentrações de sal (ajustador da força iónica) na eficiência de extração.....	54

Capítulo III – Parte Experimental**Capítulo IV – Apresentação e Discussão dos Resultados**

Figura 19. Cromatograma obtido pela análise do solvente utilizado durante este trabalho (Água/Etanol 12 %) – linha de base.....	77
Figura 20. Cromatograma obtido pela análise de uma amostra de vinho com as condições experimentais iniciais.....	78
Figura 21. Cromatograma obtido pela análise de uma amostra de vinho com as condições experimentais melhoradas.....	78
Figura 22. Cromatograma de um vinho fortificado com Ciprodinil, onde inicialmente se identificou o mesmo pesticida (<i>GC-MS Full</i>).....	80
Figura 23. Espectro de massa obtido para o composto eluído no pico anteriormente destacado (Figura 22.) – Ciprodinil (cima); e Espectro de massa presente na Biblioteca de espectros de massa para o mesmo composto (baixo).....	80
Figura 24. Mecanismo de Fragmentação sugerido para o composto Ciprodinil.....	80
Figura 25. Cromatograma de um vinho fortificado com Ciprodinil, onde inicialmente se identificou o mesmo pesticida (<i>GC-MS/MS</i>).....	81
Figura 26. Espectro de massa obtido para o composto eluído no pico anteriormente destacado (Figura 25.) – Ciprodinil.....	81
Figura 27. Mecanismo de Fragmentação sugerido para os novos picos obtidos por <i>MS/MS</i> para o composto Ciprodinil.....	81
Figura 28. Cromatograma de um vinho fortificado com Metalaxil, onde inicialmente se identificou o mesmo pesticida (<i>GC-MS Full</i>).....	82
Figura 29. Espectro de massa obtido para o composto eluído no pico anteriormente destacado (Figura 28.) – Metalaxil (cima); e Espectro de massa presente na Biblioteca de espectros de massa para o mesmo composto (baixo).....	82
Figura 30. Mecanismo de Fragmentação sugerido para o composto Metalaxil.....	82
Figura 31. Cromatograma de um vinho fortificado com Metalaxil, onde inicialmente se identificou o mesmo pesticida (<i>GC-MS/MS</i>).....	83
Figura 32. Espectro de massa obtido para o composto eluído no pico anteriormente destacado (Figura 32.) – Metalaxil.....	83
Figura 33. Mecanismo de Fragmentação sugerido para alguns dos novos picos obtidos por <i>MS/MS</i> para o composto Metalaxil.....	83

Figura 34. Cromatograma de uma mistura comercial de pesticidas com um pico destacado que foi identificado como pertencendo ao pesticida Metalaxil.....	84
Figura 35. Espectro de massa obtido para o composto eluído no pico anteriormente destacado (Figura 34.) – Metalaxil.....	84
Figura 36. Cromatograma de um vinho fortificado com Folpete, onde inicialmente se identificou o mesmo pesticida (<i>GC-MS Full</i>).....	84
Figura 37. Espectro de massa obtido para o composto eluído no pico anteriormente destacado (Figura 36.) – Folpete (cima); e Espectro de massa presente na Biblioteca de espectros de massa para o mesmo composto (baixo).....	84
Figura 38. Mecanismo de Fragmentação sugerido para o composto Folpete.....	85
Figura 39. Cromatograma de um vinho fortificado com Folpete, onde inicialmente se identificou o mesmo pesticida (<i>GC-MS/MS</i>).....	85
Figura 40. Espectro de massa obtido para o composto eluído no pico anteriormente destacado (Figura 40.) – Folpete.....	85
Figura 41. Cromatograma de um vinho fortificado com Benalaxil, onde inicialmente se identificou o mesmo pesticida (<i>GC-MS Full</i>).....	86
Figura 42. Espectro de massa obtido para o composto eluído no pico anteriormente destacado (Figura 41.) – Benalaxil (cima); e Espectro de massa presente na Biblioteca de espectros de massa para o mesmo composto (baixo).....	86
Figura 43. Mecanismo de Fragmentação sugerido para o composto Benalaxil.....	86
Figura 44. Cromatograma de um vinho fortificado com Benalaxil, onde inicialmente se identificou o mesmo pesticida (<i>GC-MS/MS</i>).....	87
Figura 45. Espectro de massa obtido para o composto eluído no pico anteriormente destacado (Figura 44.) – Benalaxil.....	87
Figura 46. Mecanismo de Fragmentação sugerido para um dos novos picos obtidos por <i>MS/MS</i> para o composto Benalaxil.....	87
Figura 47. Cromatograma de um vinho fortificado com Iprovalicarbe, onde inicialmente se identificou o mesmo pesticida (<i>GC-MS Full</i>).....	88
Figura 48. Espectro de massa obtido para o composto eluído no pico anteriormente destacado (Figura 47.) – Iprovalicarbe.....	88
Figura 49. Mecanismo de Fragmentação sugerido para o composto Iprovalicarbe.....	88
Figura 50. Cromatograma de um vinho fortificado com Iprovalicarbe, onde inicialmente se identificou o mesmo pesticida (<i>GC-MS/MS</i>).....	89

Figura 51. Espectro de massa obtido para o composto eluído no pico anteriormente destacado (Figura 50.) – Iprovalicarbe.....	89
Figura 52. Mecanismo de Fragmentação sugerido para um dos novos picos obtidos por <i>MS/MS</i> para o composto Iprovalicarbe.....	89
Figura 53. Cromatograma de um vinho fortificado com Pirimetanil, onde inicialmente se identificou o mesmo pesticida (<i>GC-MS Full</i>).....	90
Figura 54. Espectro de massa obtido para o composto eluído no pico anteriormente destacado (Figura 53.) – Pirimetanil.....	90
Figura 55. Mecanismo de Fragmentação sugerido para o composto Pirimetanil.....	90
Figura 56. Cromatograma de um vinho fortificado com Pirimetanil, onde inicialmente se identificou o mesmo pesticida (<i>GC-MS/MS</i>).....	90
Figura 57. Espectro de massa obtido para o composto eluído no pico anteriormente destacado (Figura 56.) – Pirimetanil.....	90
Figura 58. Mecanismo de Fragmentação sugerido para o pico base obtido por <i>MS/MS</i> para o composto Pirimetanil.....	91
Figura 59. Cromatograma de uma solução padrão de pesticida Dieldrine (<i>GC-MS Full</i>).....	91
Figura 60. Espectro de massa obtido para o composto eluído no pico anteriormente destacado (Figura 59.) – Dieldrine (cima); e Espectro de massa presente na Biblioteca de espectros de massa para o mesmo composto (baixo).....	91
Figura 61. Mecanismo de Fragmentação sugerido para o pico base obtido para o composto Dieldrine.....	92
Figura 62. Recta de Calibração para o pesticida Metalaxil construída pelo método <i>SPME-GC-MS(PE)</i>	93
Figura 63. Recta de Calibração para o pesticida Metalaxil construída pelo método <i>SPME-GC-MS(PI)</i>	94
Figura 64. Recta de Calibração para o pesticida Metalaxil construída pelo método <i>LC-MS(PE)</i>	95
Figura 65. Resultados obtidos no estudo do efeito da Força Iónica da solução para o conjunto de pesticidas.....	98
Figura 66. Resultados obtidos no estudo do efeito da temperatura de extracção para o conjunto de pesticidas.....	99
Figura 67. Resultados obtidos no estudo do efeito de tempo de extracção para o conjunto de pesticidas.....	100
Figura 68. Rectas de calibração obtida para o pesticida Ciprodinil pelo método <i>SPME-GC-MS(PE)</i>	104

Figura 69. Recta de calibração obtida para o pesticida Metalaxil pelo método <i>SPME-GC-MS(PE)</i> (<i>Full Scan</i>).....	105
Figura 70. Recta de calibração obtida para o pesticida Folpete pelo método <i>SPME-GC-MS(PE)</i>	106
Figura 71. Recta de calibração obtida para o pesticida Benalaxil pelo método <i>SPME-GC-MS(PE)</i>	107
Figura 72. Recta de calibração obtida para o pesticida Iprovalicarbe pelo método <i>SPME-GC-MS(PE)</i> (<i>Full Scan</i>).....	108
Figura 73. Recta de calibração obtida para o pesticida Pirimetanil pelo método <i>SPME-GC-MS(PE)</i>	109

Capítulo I - Introdução

Tabela 1.	Características dos compostos de acção pesticidas utilizados neste trabalho.....	31
-----------	--	----

Capítulo II – Técnicas Analíticas

Tabela 2.	Guia para a quantificação de analitos em <i>SPME</i>	35
Tabela 3.	Para cada pesticida, os valores representam a razão das áreas dos picos obtidos com fibras de revestimentos poliméricos diferentes (extracção efectuada por imersão directa da fibra em 3 mL de uma solução padrão 100 µg/L em água, em agitação magnética, durante 20 minutos) e as áreas do pico correspondente obtido por injecção directa de 1 µL de uma solução padrão 100 µg/L em acetona.....	47
Tabela 4.	Variacão das áreas dos picos obtidas com revestimentos de diferentes espessuras, nas condições acima indicadas.....	48
Tabela 5.	Tempos de equilíbrio obtidos (min) para os pesticidas estudados sob diferentes condições de agitação.....	49
Tabela 6.	Variacão das áreas dos picos cromatográficos para os pesticidas estudados com a temperatura de extracção.....	52
Tabela 7.	Resumo de alguns métodos reportados para a análise de multi-resíduos de pesticidas em vinhos.....	56

Capítulo III – Parte Experimental

Tabela 8.	Características dos Pesticidas estudados, dos compostos e solventes utilizados.....	58
Tabela 9.	Características da Solução-Mãe Metalaxil para estudos prévios por <i>GC-MS</i>	60
Tabela 10.	Preparação das Soluções Padrão para estudos prévios por <i>GC-MS</i>	61
Tabela 11.	Características da Solução-Mãe de Metalaxil para estudos prévios por <i>LC-MS</i>	61
Tabela 12.	Características das Soluções Padrão de Metalaxil para estudos prévios por <i>LC-MS</i>	62
Tabela 13.	Características das soluções padrão preparadas a partir de padrões e preparados comerciais de pesticidas na forma de sólido para o estudo do Ajuste da Força Iónica.....	62
Tabela 14.	Características das soluções padrão preparadas a partir de preparados comerciais de pesticidas na forma de líquido para o estudo do Ajuste da Força Iónica.....	63

Tabela 15.	Características das soluções padrão preparadas a partir de padrões e preparados comerciais de pesticidas na forma de sólido para o estudo da Temperatura e do Tempo de Extração.....	64
Tabela 16.	Características das soluções padrão preparadas a partir de preparados comerciais de pesticidas na forma de líquido para o estudo da Temperatura e do Tempo de Extração.....	64
Tabela 17.	Preparação das Soluções-Mãe dos Pesticidas em estudo para a construção das Rectas de Calibração pelo método <i>Full Scan</i>	65
Tabela 18.	Preparação das Soluções Padrão do Pesticida Ciprodinil para construção da recta de calibração pelo método <i>Full Scan</i>	65
Tabela 19.	Preparação das Soluções Padrão do Pesticida Metalaxil para construção da recta de calibração pelo método <i>Full Scan</i>	65
Tabela 20.	Preparação das Soluções Padrão do Pesticida Folpete para construção da recta de calibração pelo método <i>Full Scan</i>	66
Tabela 21.	Preparação das Soluções Padrão do Pesticida Benalaxil para construção da recta de calibração pelo método <i>Full Scan</i>	66
Tabela 22.	Preparação das Soluções Padrão do Pesticida Iprovalicarbe para construção da recta de calibração pelo método <i>Full Scan</i>	66
Tabela 23.	Preparação das Soluções Padrão do Pesticida Pirimetanil para construção da recta de calibração pelo método <i>Full Scan</i>	67
Tabela 24.	Preparação das Soluções-Mãe dos Pesticidas em estudo para a construção das Rectas de Calibração pelo método <i>MS/MS</i>	67
Tabela 25.	Preparação das Soluções Padrão do Pesticida Ciprodinil para construção da recta de calibração pelo método <i>MS/MS</i>	68
Tabela 26.	Preparação das Soluções Padrão do Pesticida Folpete para construção da recta de calibração pelo método <i>MS/MS</i>	68
Tabela 27.	Preparação das Soluções Padrão do Pesticida Benalaxil para construção da recta de calibração pelo método <i>MS/MS</i>	68
Tabela 28.	Preparação das Soluções Padrão do Pesticida Pirimetanil para construção da recta de calibração pelo método <i>MS/MS</i>	69

Tabela 29.	Parâmetros de identificação utilizados nas análises efectuadas pelo método <i>Full Scan</i>	74
Tabela 30.	Parâmetros escolhidos para a optimização das condições de ionização para as análises a efectuar pelo método <i>MS/MS</i>	74
Tabela 31.	Parâmetros escolhidos para as análises efectuadas pelo método <i>MS/MS</i>	75
Tabela 32.	Parâmetros de identificação utilizados nas análises efectuadas pelo método <i>MS/MS</i> .	75

Capítulo IV – Apresentação e Discussão dos Resultados

Tabela 33.	Condições de Análise iniciais pelo método <i>SPME-GC-MS</i>	77
Tabela 34.	Condições de Análise melhoradas pelo método <i>SPME-GC-MS</i>	78
Tabela 35.	Resultados obtidos no estudo prévio do pesticida Metalaxil por <i>SPME-GC-MS(PE)</i>	93
Tabela 36.	Resultados obtidos no estudo prévio do pesticida Metalaxil por <i>SPME-GC-MS(PI)</i>	94
Tabela 37.	Resultados obtidos no estudo prévio do pesticida Metalaxil por <i>LC-MS(PE)</i>	95
Tabela 38.	Resultados obtidos no estudo do efeito da Força Iónica da solução para cada pesticida.....	97
Tabela 39.	Resultados obtidos no estudo do efeito da temperatura de extracção para cada pesticida.....	98
Tabela 40.	Resultados obtidos no estudo do efeito do tempo de extracção para cada pesticida.....	99
Tabela 41.	Concentração dos pesticidas de interesse presente nas soluções padrão analisadas por <i>GC-MS Full</i> e respectiva média das áreas dos picos cromatográficos obtidos (2 réplicas para o pesticida Benalaxil e 3 réplicas para os restantes).....	102
Tabela 42.	Concentração dos pesticidas de interesse presente nas soluções padrão analisadas por <i>GC-MS/MS</i> e respectiva média das áreas dos picos cromatográficos obtidos (3 réplicas).....	103

Capítulo I

Introdução

1. O Vinho

1.1. Definição

O vinho é o produto obtido pela vinificação/fermentação alcoólica, total ou parcial de uvas frescas, provenientes de vários tipos de castas (*Vitis Vinifera*), cujos bagos são esmagados, prensados ou transformados por outros processos tecnológicos permitidos por lei. É composto de: água, álcool etílico, ácidos orgânicos fixos (ácido tartárico), ácidos orgânicos voláteis (ácido acético), sais, glicerina (que confere a macieza e o aveludado), taninos, matéria corante, matérias minerais e azotadas, e vitaminas. Bebida adequada ao consumo, apresenta aromas frutados e perfumados ^[1].

Na União Europeia, o vinho é, legalmente, definido como o produto obtido, exclusivamente, por fermentação parcial ou total de uvas frescas, inteiras ou esmagadas ou de mostos ^[2].

A palavra vinho tem origem etimológica no latim, *vinum*, que tanto pode significar "vinho" como "videira", e é, genericamente, uma bebida alcoólica produzida por fermentação do sumo de uva ^[3].

1.2. Introdução Histórica ^[4, 5]

O vinho possui uma longínqua importância histórica e remonta a diversos períodos da humanidade. Do ponto de vista histórico, é impossível precisar a sua origem, pois o vinho nasceu antes da escrita. Os enólogos dizem que a bebida surgiu por acaso, talvez por um punhado de uvas amassadas esquecidas num recipiente, que sofreram posteriormente os efeitos da fermentação. Mas o cultivo das videiras para a produção do vinho só foi possível aquando da Sedentarização.

A introdução da produção vinícola em Portugal continua encoberta por questões ainda não resolvidas em termos de investigação. A primeira referência à produção vinícola em Portugal é de 989, segundo o Livro de *Datas do Convento de Fiães*, sendo a região Douro a mais antiga região demarcada no mundo.

Os vinhos portugueses sempre se caracterizaram por uma grande variedade de uvas autóctones, devido às diferenças de solo e clima, o que lhes confere características únicas para cada região.

Um dos vinhos portugueses mais célebres e de grande exportação é o Vinho do Porto.

1.3. Produção de Vinho

1.3.1. Colheita ^[6]

A qualidade da uva tem enorme influência sobre o produto final, o vinho. Por isso a colheita deve ser realizada no tempo certo. Uma colheita antes do tempo resulta em um vinho desequilibrado, com baixa concentração de açúcar e, conseqüentemente, de álcool. Se a colheita for tardia, a uva produzirá um vinho rico em álcool, mas com pouca acidez. Os factores fundamentais que influem na colheita são o clima (temperatura, humidade, etc), e o solo.

1.3.2. Esmagamento ^[6]

O esmagamento das uvas era feito com os pés, tradição mantida até hoje em algumas regiões. O esmagamento da uva produzirá uma mistura de sumo, grainhas, película e polpa que será chamado de mosto.

1.3.3. Fermentação ^[7]

É a parte mais complexa e importante do processo da produção do vinho. Existem várias etapas na fermentação: a fermentação alcoólica/tumultuosa, que dura poucos dias, e onde ocorre grande libertação de dióxido de carbono e o aumento da temperatura que por sua vez acelera a transformação do açúcar em álcool; e a fermentação maloláctica/lenta, onde esta começa a diminuir de intensidade devido à diminuição da presença do açúcar, e onde se verifica a diminuição da acidez.

1.3.4. Tratamentos Pós-Fermentação ^[7, 8]

Todos os vinhos são sujeitos a um período de maturação antes de serem engarrafados. Este processo envolve a remoção de partículas e matéria coloidal, e o vinho sofre uma série de mudanças para manter ou melhorar os seus atributos sensoriais. Os ajustamentos do vinho tentam corrigir algumas deficiências encontradas nas uvas e problemas que se desenvolveram na fermentação:

- Acidez e pH: A correcção da acidez e do pH pode ser feita em qualquer altura durante a vinificação; no entanto, obtêm-se melhores resultados após a fermentação. O uso do ácido tartárico tem um efeito significativo no pH, enquanto o ácido málico afecta mais a acidez total.
- Açúcar: Os vinhos podem ser adoçados pela adição de mosto concentrado, mas só em certas circunstâncias.
- Aroma: Muitos aromas da uva (terpenos, norisoprenóides, fenóis voláteis) encontram-se em complexos glicosídicos não voláteis. Estes podem ser libertados por hidrólise ácida ou enzimática.
- Cor: Algumas variedades possuem baixo teor em taninos, o que torna necessário a adição de taninos enológicos para formarem ligações com as antocianinas e estabilizarem a cor.

1.4. Bebida

1.4.1. Classificação de Vinhos ^[9]

Existem cinco tipos distintos de vinhos:

- os vinhos tintos, que podem ser obtidos através das uvas tintas ou das tintureiras (aquelas em que a polpa também possui pigmentos);
- os brancos, que podem ser obtidos através de uvas brancas ou de uvas tintas desde que as cascas dessas uvas não entrem em contacto com o mosto e que essas não sejam tintureiras;
- os rosés, que podem ser feitos de duas maneiras: misturando-se o vinho tinto com o branco ou diminuindo o tempo de maceração (contacto do mosto com as cascas) durante a vinificação do vinho tinto.

- os espumantes, são vinhos que passam por uma segunda fermentação alcoólica, que pode ser na garrafa, chamado de método tradicional, ou em auto-claves (tanques isobarmétricos). Ambas as formas de vinificação fazem a fermentação em recipiente fechado incorporando assim dióxido de carbono ao líquido e dando origem às borbulhas.
- e os vinhos fortificados, que são aqueles que a fermentação alcoólica é interrompida pela adição de aguardente. De acordo com o momento da interrupção, e da uva que está sendo utilizada, ficará mais ou menos doce. O grau alcoólico final dos vinhos fortificados fica entre 19-22 % vol. Os mais famosos são o Vinho do Porto (Portugal), o Vinho da Madeira (Portugal), o Xerez (Espanha) e o Marsala (Sicília).

Em Portugal existe um tipo de vinho específico, o *Vinho Verde*, que pode ser tinto ou branco, mas devido à sua maior acidez, entre outras características, pode ser considerado como uma categoria à parte.

1.4.2. Análises de Rotina ^[9, 10]

A análise de uvas e vinhos, assim como de mostos, é um processo de rotina nas empresas de hoje. A partir destas análises tenta-se prever qual a melhor altura para fazer a vindima, controla-se a produção de um vinho, procede-se à correcção de algum desequilíbrio num constituinte do mosto ou vinho, faz-se o controlo de qualidade de um vinho ou avalia-se a salubridade do produto. Todos estes passos são importantes e por isso uma empresa deve ter um laboratório de análise, assim como qualquer vitivicultor deve ter o seu pequeno laboratório para que possa avaliar como decorre a vinificação. Assim, as análises físicas, químicas, microbiológicas e sensoriais tornaram-se fundamentais para a indústria vinícola. Com estes processos tenta-se aumentar a qualidade do produto, reduzir os desperdícios e conservar o vinho por um período de tempo mais extenso. As análises são realizadas desde o esmagamento e prensagem da uva, durante toda a fermentação e todos os processos subsequentes até ao engarrafamento, e mesmo depois, durante o envelhecimento do vinho. Os propósitos da realização das análises são diversos, podendo ter o intuito de detectar falsificações ou fraudes, detectar a presença de produtos proibidos, determinar quantidades de alguns componentes de forma a verificar se estão dentro do regime legal imposto ou então para que se possa efectuar uma correcção e, finalmente, para avaliar a qualidade geral do vinho.

Diversos constituintes, tais como o etanol, o dióxido de enxofre ou ácidos, estão sujeitos a um controlo legal e portanto, as respectivas determinações são bastante frequentes. Já a componente ácida de um

vinho pode ser alvo de correcções durante a vinificação (tanto para acidificar como para desacidificar), pelo que as determinações dos constituintes ácidos têm de ser realizadas para detectar qualquer desequilíbrio. Outro componente que pode ser também alvo de correcções é o açúcar do vinho (sacarose).

Finalmente, a qualidade geral de um vinho é avaliada por análises dos quatro tipos acima referidos: físicas, químicas, microbiológicas e sensoriais. Isto porque o conceito "qualidade" envolve diferentes aspectos, tais como o aspecto visual do vinho, o paladar, o aroma ou até relativamente à capacidade de conservação e envelhecimento durante um longo período de tempo.

A determinação de pesticidas em vinhos, assim como em outros produtos alimentares, enquadra-se na avaliação da presença de produtos proibidos. A sua proibição deve-se à suposição ou comprovação da toxicidade deste tipo de produtos para a saúde dos seres vivos. Para isso existem limites máximos de resíduos legalmente estabelecidos para os pesticidas. Eles vão variando consoante os produtos alimentares em questão. Por outro lado, a aplicação dos pesticidas nas culturas está sujeita a medidas preventivas para que não permaneçam nos produtos alimentares até ao momento de estes serem consumidos.

1.4.3. Constituintes da Matriz ^[7, 8]

A matriz do vinho é complexa, uma vez que este é constituído por uma variedade muito grande de compostos.

O constituinte predominante das uvas e do vinho é a água, e assim sendo, esta estabelece as características básicas do vinho, assim como, o facto de serem as substâncias hidrossolúveis constituintes do vinho aquelas que têm um papel mais significativo.

No vinho, também, estão presentes álcoois. O etanol é o álcool mais importante, e embora esteja presente em pequenas quantidades na uva, a fonte primária deste composto encontra-se na fermentação. Sob condições normais de fermentação, a percentagem de etanol no vinho pode ser acumulada até 14-15 %, no entanto, níveis superiores podem ser atingidos através da adição de açúcar durante a fermentação. Outro álcool presente no vinho é o metanol, no entanto, este encontra-se presente em quantidades muito pequenas. Mesmo assim, este composto é alvo de preocupação devido à sua transformação em formaldeído, e posteriormente, em ácido fórmico (substâncias tóxicas para o sistema nervoso central). A quantidade de metanol presente no vinho quando este foi produzido legitimamente, não atinge valores que depois do seu metabolismo originem níveis tóxicos de formaldeído e ácido fórmico.

No que respeita aos ácidos, os mais importantes são os ácidos tartárico, málico e cítrico (provenientes da uva), os ácidos láctico, succínico e acético (provenientes da fermentação) e os ácidos carbónico e sulfuroso (provenientes dos gases dissolvidos).

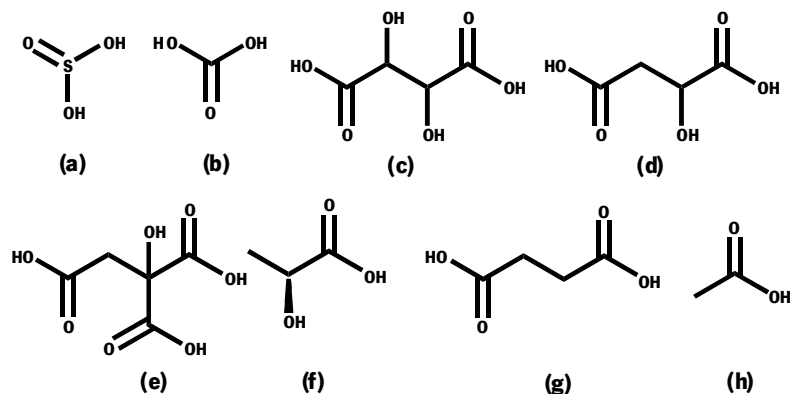


Figura 1. Ácidos presentes nos vinhos: ácido sulfuroso (a), carbónico (b), tartárico (c), málico (d), cítrico (e), láctico (f), succínico (g) e acético (h).

Por reacção dos ácidos com os álcoois, formam-se os ésteres. Os ésteres mais comuns presentes no vinho são os derivados do ácido acético e do etanol.

As uvas produzem alguns aldeídos importantes, como o acetaldeído, que é o aldeído que mais se encontra no vinho ($\approx 90\%$ dos aldeídos constituintes), e é um dos produtos secundários da fermentação. Outros aldeídos presentes são o furfural e aldeídos fenólicos.

Poucas são as cetonas encontradas nas uvas, mas estas resistem à fermentação.

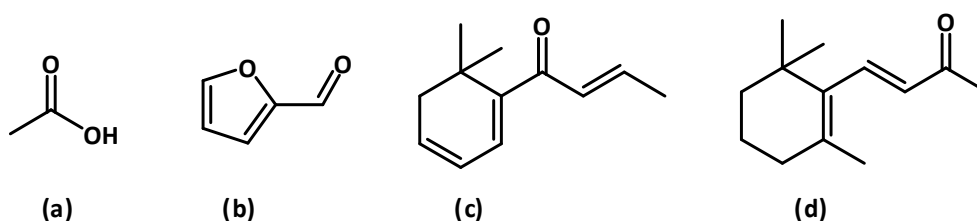


Figura 2. Aldeídos e Cetonas presentes no vinho: Acetaldeído (a), Furfural (b), β -damascenona (c) e a β -ionona (d).

Os hidrocarbonetos são pouco solúveis em água, logo eles não têm influência directa no vinho. No entanto, produtos da degradação dos hidrocarbonetos podem produzir aromas importantes.

Os fenóis são compostos de muita importância para as características de qualidade do vinho tinto, e, também, do branco, embora neste último, estes compostos estejam presentes em menor quantidade. Podem afectar a aparência do vinho, o gosto, o aroma e as propriedades anti-microbianas. Os compostos mais encontrados são: o ácido benzóico, ácido vanílico, ácido gálico, ácido ferúlico, ácido cafeico, benzaldeído, vanilina e siringaldeído (do tipo não flavonóides); quercetina, antocianinas e catequina (do tipo flavonóides).

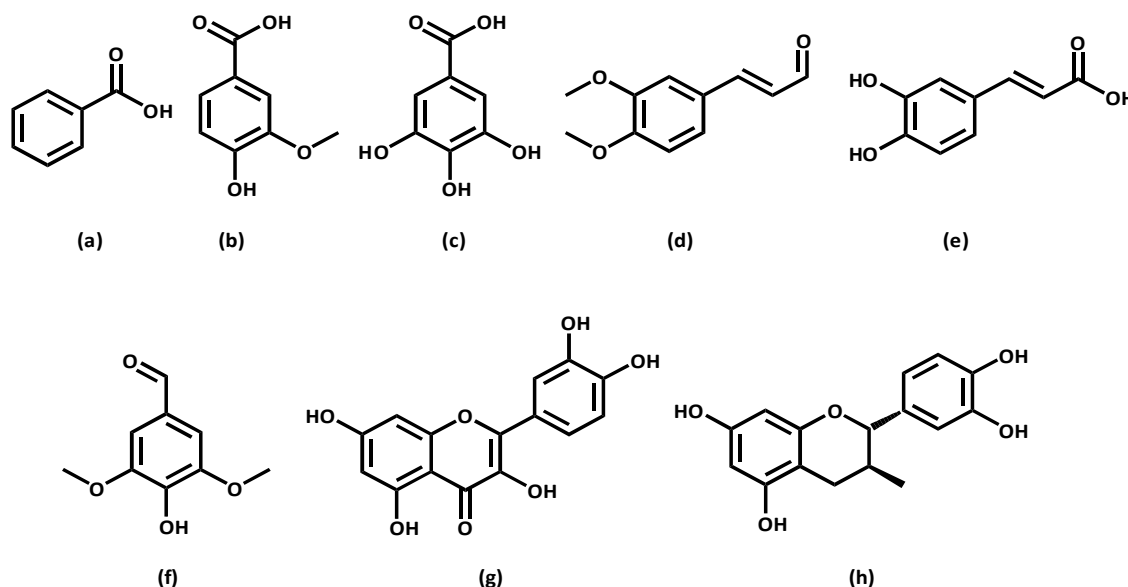


Figura 3. Compostos fenólicos relevantes no vinho: ácido benzóico (a), ácido vanílico (b), gálico (c), ácido ferúlico (d), ácido cafeico (e), siringaldeído (f), quercetina (g) e catequina (h).

Muitos compostos nitrogenados são encontrados nas uvas e nos vinhos. Estes compostos incluem formas inorgânicas como a amónia e nitratos, e formas orgânicas como aminas, amidas, aminoácidos, proteínas e ácidos nucleicos^[6].

No que respeita aos compostos sulfurados, os mais significativos são os sulfitos inorgânicos, a cisteína, a tiamina e a biotina^[7].

O vinho também contém gases dissolvidos, sendo os mais importantes: o dióxido de carbono que se gera durante o metabolismo das leveduras, e se liberta durante a fermentação; e o oxigénio que só começa a aparecer em concentrações significativas durante o processo de esmagamento das uvas, e possibilita as leveduras de sintetizar compostos essenciais como ácidos gordos insaturados. Outro gás dissolvido presente é o dióxido de enxofre^[7].

Muitos elementos minerais são encontrados nas uvas e nos vinhos como o potássio, o enxofre, o cálcio, o cloro e o sódio^[7].

2. Os Pesticidas

2.1. Introdução

Os pesticidas, são substâncias ou misturas de substâncias que têm como objectivo impedir, destruir, repelir ou mitigar qualquer praga. Um pesticida pode ser uma substância de natureza química ou um agente biológico (como um vírus ou uma bactéria) que actua sobre as pragas que estejam a destruir uma plantação, espalhando doenças, incomodando pessoas, etc. É utilizada contra diversas formas de seres vivos, tais como: insectos, ervas daninhas, moluscos, pássaros, mamíferos, peixes e micróbios. Não são necessariamente substâncias venenosas, porém quase sempre são tóxicas ^[11].

Os pesticidas são classificados de acordo com as pragas que eles atacam: Acaricidas, para o controle de ácaros; Bactericidas, para o controle de bactérias; Fungicidas, para o controle de fungos; Herbicidas, para o controle de ervas daninhas; Insecticidas para o controle de insectos; Nematicidas, para o controle de vermes; Rodenticidas, para o controle de ratos e outros tipos de roedores; e Moluscicidas, para o controle de moluscos. Eles também podem ser classificados em: orgânicos de síntese, como carbamatos, nitrogenados, clorados, fosforados e clorofosforados; inorgânicos, à base de arsénio, tálio, bário, azoto, fósforo, cádmio, ferro, selénio, chumbo, cobre, mercúrio e zinco; e botânicos: à base de nicotina, piretrina, sabadina e rotenona.

^[12, 13] Anualmente, cerca de 30-50 % da produção mundial de alimentos é destruída ou consumida por pragas (insectos, mamíferos, aves, bactérias, fungos, vírus e ervas daninhas). As maiores perdas ocorrem nas regiões tropicais e subtropicais, onde os agricultores muitas vezes produzem mais de uma colheita por ano, o que pode permitir um grande aumento populacional de pragas; e onde os Invernos não são rigorosos, não sendo portanto um factor que limite o número de espécimes que sobrevive a essa estação. Mesmo nos países mais avançados tecnologicamente, cerca de 40 % da produção é perdida por causa da acção das mais diversas pestes, apesar das enormes quantias gastas para o controlo dessas pragas. A necessidade de proteger as colheitas de ataques de pragas vem desde os tempos em que o Homem iniciou o cultivo do solo. Inicialmente porque necessitava do alimento, e mais recentemente também por razões económicas. Nesse sentido, começou a procurar-se substâncias e práticas agrícolas que diminuíssem ou até eliminassem os danos causados por essas pragas.

Na segunda metade do século XX deu-se a grande explosão da utilização de pesticidas na agricultura. A descoberta dos pesticidas organoclorados trouxe riqueza, por terem custos de produção relativamente baixos que permitiu a sua utilização em massa, sem pensar nas consequências ambientais. Também a introdução de novas filosofias de cultivo trouxeram diferentes visões sobre a aplicação de pesticidas. Assim, a chamada Revolução Verde, iniciada nos anos 40, trouxe novas políticas agrícolas, que visavam

a produção intensiva de alimentos, sem olhar a meios. Uma das vertentes dessa filosofia era a aplicação de grandes quantidades de produtos químicos de forma a não permitir a intervenção das pragas nas culturas. No entanto, verificou-se um acréscimo de ataques das pestes, nomeadamente, no cultivo de campos sem rotação, e após utilização intensiva de fertilizantes e da rega.

Ao longo do tempo, o número de pesticidas que se encontram disponíveis para utilização tem vindo a aumentar uma vez que os novos compostos são de aplicação cada vez mais específica. O controlo dos pesticidas em alimentos é muito importante e tem recebido muita atenção nos últimos anos devido ao uso incorrecto e excessivo destas substâncias.

A utilização comum de pesticidas na produção de uvas tem levado à presença de resíduos destas substâncias em vinhos comercialmente disponíveis para consumo público. Actualmente, existe um grande interesse em determinar resíduos de pesticidas presentes em vinhos para controlo de qualidade destes, pois podem parar ou diminuir a velocidade de fermentação, ter um efeito negativo no metabolismo das leveduras, e ser potencialmente perigosos para a saúde pública.

É aceite que caso se respeitem as dosagens de pesticidas permitidas e o intervalo mínimo entre a aplicação destas substâncias e a colheita das uvas, a quantidade de resíduos de pesticidas vai diminuir de tal modo que os níveis presentes no vinho comercialmente disponível que são esperados são inferiores àqueles que podem provocar os problemas já indicados. Contudo, nem sempre as normas são respeitadas e torna-se necessário monitorizar os níveis de resíduos de pesticidas em vinhos.

Para um controlo eficaz, a quantificação de resíduos presente nos vinhos é comparada com os limites máximos de resíduos legislados (LMR) para cada substância. Esses LMR, tanto quanto o conhecimento científico permite afirmar, asseguram, com alguma segurança, a saúde do consumidor e a qualidade do vinho.

Assim, torna-se necessário o desenvolvimento de métodos analíticos apropriados para a análise de multi-resíduos de pesticidas em vinhos ^[14, 15].

2.2. Doenças e Parasitas da Videira ^[12]

Nesta parte é feita uma breve descrição de algumas doenças e parasitas mais comuns da videira e que podem ser tratadas com a aplicação dos pesticidas que são objecto de estudo neste trabalho.

- Aranhico vermelho: São minúsculos acarídeos parasitas da vinha que provocam importantes estragos. Os ovos deste parasita abrem e libertam lavas na Primavera, que sofrem várias transformações em 5 a 20 dias, para chegarem ao estado adulto. Larvas e seres adultos atacam as folhas para se alimentarem com o suco celular; o desenvolvimento da vegetação é travado, e por vezes dá-se o desavinho. A folhagem fica com um aspecto geral cinzento-plúmbeo. Os acarídeos, visíveis na face inferior, picam as folhas. Eles prejudicam a fotossíntese, activam a respiração e causam um murchar prematuro da folhagem, e uma má maturação das uvas.
- Cigarrinha Verde ou Cicadela: Esta praga era, até aos anos 80, ocasional em algumas vinhas do Sul do país, contudo, nos últimos anos tem-se expandido a outras regiões vinícolas com grande incidência. As picadas que estes insectos causam na página inferior das folhas, liberta uma saliva tóxica para o seu interior interrompendo a circulação da seiva. As folhas enrolam para a página inferior, tomam uma cor amarelada nas castas brancas e avermelhada nas castas tintas, ficando apenas verdes as nervuras.
- Míldio da videira: O míldio é uma doença originária da América, e que é causado por um fungo, sendo há um século uma das principais doenças da vinha, que ataca todos os órgãos verdes da videira. A doença manifesta-se nas folhas pelo aparecimento de manchas translúcidas e oleosas na página superior. Nas castas tintas as folhas tomam uma coloração avermelhada. À medida que a doença avança, acabam por aparecer necroses nas folhas. Durante a floração pode ocorrer a destruição das inflorescências. Os cachos e os bagos evidenciam também a doença por se tornarem castanhos e acabando por engelhar, secar e quebrar ao mínimo contacto. A queda das folhas afecta o teor de açúcar das uvas.
- Podridão cinzenta: É causada por um fungo que pode afectar todos os órgãos herbáceos da videira, mas é nos cachos que se verifica maiores danos. Os maiores prejuízos ocorrem nos períodos da floração e do fecho dos cachos até à vindima. Estes traduzem-se em perdas quantitativas e qualitativas da produção. Afecta também a produção de plantas de videira nos viveiros. As folhas atacadas apresentam manchas vermelho-acastanhadas, com o aspecto de queimaduras. Estes sintomas são visíveis na altura da poda. Os cachos são sensíveis à doença em todas as fases do seu desenvolvimento.
- Flavescência Dourada ^[16]: Trata-se de uma doença específica da vinha causada por um fitoplasma originária da América do Norte, e propaga-se por meio de uma cicadela. Na Europa, esta doença foi,

primeiramente identificada em França, tendo, posteriormente, progredido para outros países. Esta doença provoca descoloração das folhas com enrolamento para a página inferior acompanhado de amarelecimento nas castas brancas e vermelhão nas castas tintas e as folhas tornam-se duras e quebradiças. Tem como consequência a perda de produção e de qualidade, pois os cachos das videiras afectadas secam ou não amadurecem.

2.3. Aplicação e Degradação ^[17, 18, 19, 20]

A prática mais comum de aplicação de pesticidas é seguir um protocolo estabelecido de modo a que o agricultor aplique os produtos fitoquímicos sem que as pragas tenham realmente afectado as culturas, tentando actuar preventivamente. As quantidades de produtos aplicados são variáveis, o que leva a desperdícios financeiros porque a aplicação dos produtos pode ser desnecessária e originar problemas ambientais. Esta filosofia de aplicação não é a mais acertada pois não previne o aparecimento de pragas, exige dispêndio financeiro desnecessário, e aumenta a probabilidade de contaminação de solos e culturas.

A Revolução Verde, outra filosofia de aplicação, é um processo tecnológico que tem como objectivo o aumento da eficiência dos processos agrícolas para aumentar a produtividade. As tecnologias introduzidas são de duas áreas distintas: o cultivo de novas variedades de plantas e o desenvolvimento de novas técnicas agrícolas. As técnicas desenvolvidas foram o uso extensivo de fertilizantes químicos, irrigação, o uso de maquinaria pesada, e o uso de pesticidas. Obteve-se um grande sucesso com estas técnicas, uma vez que a agricultura conseguia ultrapassar o crescimento da população. No entanto, tem vindo a ser substituída pela agricultura integrada ou pela agricultura orgânica ou biológica porque havia muita perda de biodiversidade e da qualidade alimentar, dependência de combustíveis fósseis, poluição e degradação dos solos.

A filosofia de aplicação que, actualmente, se verifica ser mais eficaz e menos controversa é a Protecção Integrada. Esta tem como objectivo a utilização de métodos seguros, minimizando os efeitos secundários, e a diminuição do uso de pesticidas, conciliando as exigências económicas, ecológicas e toxicológicas de uma forma social e ambientalmente sustentável. Para além de fornecer informações sobre a aplicação dos produtos fitoquímicos, também informa sobre: os procedimentos para a instalação e para a fase de produção de uma vinha, focando aspectos climatéricos, fertilização e aplicação de outros produtos correctores de deficiências; selecção dos cultivadores; manutenção do solo; poda e condução da vinha; intervenções necessárias na vinha; e rega. A técnica assenta em 5 pontos principais: a prevenção cultural para garantir o bom desenvolvimento fitossanitário das culturas, como a correcta

localização da plantação, a selecção do material vegetativo utilizado, e aplicação de fertilizações equilibradas; o diagnóstico da situação, como a correcta identificação das pestes quer seja fungos, doenças ou infestantes; a estimativa de risco, que engloba a avaliação quantitativa das pestes e a análise da influência de certos factores nos prejuízos que possam causar; o nível económico de ataque, que se define como a intensidade de ataque de uma peste a que se deve aplicar medidas limitativas ou de combate para impedir que se corra o risco de prejuízos; e a selecção dos meios de protecção, que implica o conhecimento correcto das características dos produtos, nomeadamente a sua acção sobre as pestes, doses de utilização, épocas de aplicação, esquemas de tratamento, toxicidade, persistência e intervalos de segurança.

Os compostos de acção pesticida, como muitos outros compostos sofrem degradação, transformando-se em outras substâncias. Existem vários factores que podem provocar a degradação de um pesticida, entre eles encontram-se as condições atmosféricas, a presença de microorganismos e as condições do meio. No que respeita às condições atmosféricas, a presença de água pode provocar a hidrólise dos compostos, a presença de luz induz a fotodecomposição, e as altas temperaturas favorece a decomposição térmica. As bactérias e fungos podem metabolizar os pesticidas, transformando-os em outros compostos. E as condições do meio como vão sendo alteradas durante a produção do vinho, provocando uma mudança de meio para os pesticidas, pode desencadear uma série de novas reacções de decomposição. As mudanças das condições do meio mais acentuadas originam a diminuição do conteúdo de açúcares, e o aumento da quantidade de etanol presente.

A diminuição da concentração de pesticidas durante o processo de fermentação foi verificada por análises de várias amostras de mosto recolhidas ao longo da fermentação e no fim desta.

2.4. Revisão Bibliográfica dos Pesticidas Utilizados

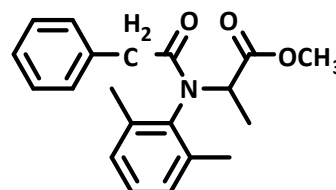
Seguidamente, irá ser descrita uma revisão bibliográfica sobre os compostos de acção pesticida que irão ser utilizados no decorrer deste trabalho, assim como o pesticida utilizado como padrão interno nos estudos prévios (Dieldrine) ^[21, 22].

Tabela 1. Características dos compostos de acção pesticida utilizados neste trabalho.**Benalaxil***methyl 2-(N-(2,6-dimethylphenyl)-2-phenylacetamido)propanoate*M(C₂₀H₂₃NO₃) = 325,402 g/mol

R 50/53; S 60-61

Acção Fungicida

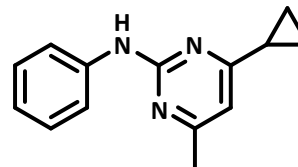
LMR = 0,27 ppm

**Ciprodinil***4-cyclopropyl-6-methyl-N-phenylpyrimidin-2-amine*M(C₁₄H₁₅N₃) = 225,298 g/mol

R 36/38-43; S 26-36

Acção Fungicida

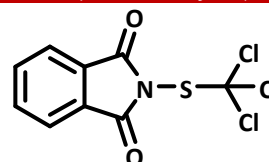
LMR = 1,33 ppm

**Folpete***2-(trichloromethylthio)isoindoline-1,3-dione*M(C₉H₄Cl₃NO₂S) = 296,558 g/mol

R 20-36-40-43-50; S 36/37-46-61

Acção Fungicida

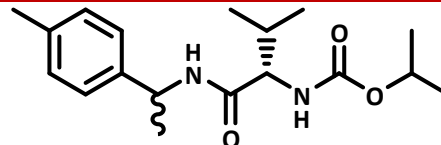
LMR = 6,67 ppm

**Iprovalicarbe***(S)-isopropyl 3-methyl-1-oxo-1-(1-p-tolylethylamino)butan-2-ylcarbamate*M(C₁₈H₂₈N₂O₃) = 320,427 g/mol

R 36/38-43; S 26-36

Acção Fungicida

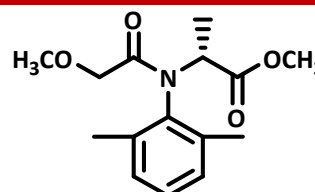
LMR = 1,33 ppm

**Metalaxil***methyl-N-methoxyacetyl-N-2,6-xylyl-D-alaninate*M(C₁₅H₂₁NO₄) = 279,330 g/mol

R 25-50/53; S 45-60-61

Acção Fungicida

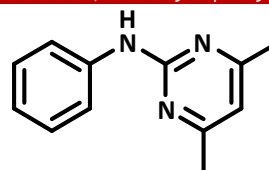
LMR = 1,33 ppm

**Pirimetanil***4,6-dimethyl-N-phenylpyrimidin-2-amine*M(C₁₂H₁₃N₃) = 199,252 g/mol

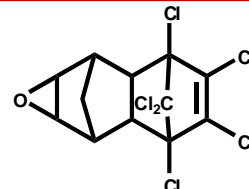
R 51/53; S 60

Acção Fungicida

LMR = 6,67 ppm

**Dieldrine***(1aR,2R,2aS,3S,6R,6aR,7S,7aS)-3,4,5,6,9,9-hexachloro-1a,2,2a,3,6,6a,7,7a-octahydro-2,7:3,6-dimethanonaphtho[2,3-b]oxirene*M(C₁₂H₈Cl₆O) = 380,910 g/mol

R 25-27-40-48; S 22-36-37-45



Nota: Nos Regulamentos consultados os LMR são definidos em mg de Pesticida em 1 Kg de Uvas, no entanto, são aqui apresentados em mg de Pesticida em 1 L de Vinho (ppm), tendo em conta que 1 Kg de Uvas corresponde a 0,750 L de Vinho.

Capítulo II

Técnicas Analíticas

1. Técnicas Analíticas Utilizadas neste Trabalho

1.1. Microextração em fase sólida ^[23]

A microextração em fase sólida (*SPME*) é uma técnica de extração e/ou pré-concentração, proposta no início dos anos 90, especialmente adequada para métodos de análise química onde a Cromatografia em fase Gasosa (*GC*) ou Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (*HPLC*) serão empregues para a posterior separação, detecção, identificação e quantificação dos analitos presentes na amostra.

O dispositivo para *SPME* consiste num pedaço de fibra de sílica fundida com 10 mm ou 20 mm de comprimento e diâmetro até cerca de 160 μm , recoberta com filmes até 100 μm de espessura de adsorventes poliméricos como *PDMS* (polidimetilsiloxano) e *PA* (poliacrilato), ou de dispersões de sólidos adsorventes como Carboxen (*CW* - carvão activo grafitizado) ou *DVB* (resina poliestireno-divinilbenzeno) em aglutinantes poliméricos. Essa fibra recoberta com adsorvente é colada na ponta de um microtubo de aço inox adaptado a uma agulha hipodérmica, formando o conjunto de fibra para *SPME*. Para uso, o conjunto de fibra é montado em um aplicador semelhante a uma microseringa convencional: pressão no êmbolo desse aplicador faz com que o microtubo com a fibra de sílica presa corra no interior da agulha hipodérmica, expondo a fibra coberta com adsorvente.

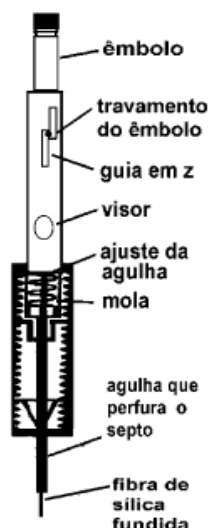


Figura 4. Dispositivo de Microextração em Fase Sólida.

A operação de extração em *SPME* pode ser feita no modo de imersão directa ou pela técnica de *headspace*. Para extrações no modo de imersão directa, a fibra adsorvente é imersa em amostras líquidas ou gasosas. Já no segundo caso, mais adequado para extração de analitos de volatilidade

moderada a alta e para amostras sólidas, suspensões ou materiais de origem biológica (matrizes muito complexas), a fibra é exposta ao *headspace* da amostra (fase vapor em contacto com uma porção dessa amostra lacrada num recipiente confinado). Independentemente do modo operacional, espécies químicas presentes na amostra são retidas pelo filme que recobre a fibra até ser atingido um equilíbrio entre as fases, quando idealmente a massa das espécies sorvidas pela fibra é proporcional à sua concentração original na amostra.

Imediatamente após a extracção, a fibra é recolhida no interior da agulha hipodérmica do dispositivo e exposta ao interior do injector aquecido de um cromatógrafo de fase gasosa, ou ao solvente, em uma interface própria, de um cromatógrafo de fase líquida. Os analitos extraídos são dessorvidos directamente no sistema cromatográfico, onde ocorrerá sua separação e detecção.

Em relação a técnicas como extracção líquido-líquido convencional ou extracção em fase sólida, a técnica de *SPME* dispensa o uso de solventes orgânicos extractores. Dada a sua rapidez e simplicidade toda a operação é reduzida a duas etapas simples, de extracção e de dessorção. É de fácil mecanização/automatização e de custo operacional relativamente baixo, uma vez que os dispositivos comerciais para sua aplicação são consideravelmente dispendiosos, mas reutilizáveis. A maior desvantagem da técnica de *SPME*, em adição ao alto custo dos conjuntos de fibra, é a dependência pronunciada entre as massas extraídas e as condições operacionais como temperatura e tempo de extracção.

Os métodos de extracção mais tradicionais tentam remover por completo os analitos de interesse da amostra, mas a técnica de *SPME* não opera desta forma. Com a Microextracção em Fase Sólida a quantidade de analito adsorvido pela fibra é proporcional à sua concentração desde que as condições experimentais sejam cuidadosamente controladas. A possibilidade de utilizar a *SPME* quantitativamente antes de se atingir um equilíbrio entre a amostra e a fibra permite preparação de amostras mais rápidas e económicas, no entanto a melhor opção é esperar que se atinja o equilíbrio. A escolha do método para a construção de uma curva de calibração depende da matriz da amostra, nomeadamente a sua complexidade, e o método de extracção utilizado (imersão ou *headspace*) [24, 25, 26].

Tabela 2. Guia para a quantificação de analitos em *SPME*.

			Método de Quantificação Recomendado			
Matriz	Extracção		Padrão Externo	Padrão Interno	Adição Padrão	
Gasosa	Simple	<i>Headspace</i>	√			
	Complexa	<i>Headspace</i>	√	√		
Líquida	Simple	<i>Headspace</i>	√			
		Imersão	√	√		
	Complexa	<i>Headspace</i>			√	√
		Imersão			√	√
Sólida	Simple	<i>Headspace</i>		√	√	
	Complexa	<i>Headspace</i>			√	

1.2. Cromatografia de Fase Gasosa ^[27, 28]

A Cromatografia em fase Gasosa (*GC*) é uma técnica de separação e análise de misturas de substâncias voláteis. A amostra é introduzida no injector, vaporizada, e arrastada por uma fase móvel - gás inerte. O fluxo de gás com a amostra vaporizada passa por uma coluna que contém uma fase estacionária, onde ocorre a separação dos componentes da mistura de acordo com as diferentes afinidades que estes apresentam em relação à fase estacionária.

Os componentes separados saem da coluna juntamente com o gás de arraste a tempos diferentes e passam por um detector que gera um sinal eléctrico proporcional à quantidade de substância eluída. O registo deste sinal ao longo do tempo constitui o cromatograma. O tempo de retenção de cada componente, é o tempo desde a injeção da amostra até este alcançar o detector.

1.2.1. Instrumentação de Cromatografia em Fase Gasosa

- Fase Móvel: gás quimicamente inerte que tem como função arrastar os componentes da mistura a analisar; os gases mais utilizados são N₂, He, Ar, e H₂.
- Injector: A amostra é introduzida recorrendo ao uso de uma “seringa” que perfura um septo (disco de borracha), de modo a se encontrar numa câmara aquecida a uma temperatura acima dos pontos de ebulição dos compostos que se pretendem analisar. Se a amostra contém uma grande quantidade de analito que se pretende determinar (mais de 0,1 %), a injeção deve ser feita em

modo *split*, isto é, em modo de divisor de fluxo, permitindo que somente uma pequena parte do vapor entre na coluna, sendo o restante vapor desprezado; se, no entanto, o analito a determinar se apresenta em quantidades residuais (menos de 0,01 %), a injeção deve ser feita em modo *splitless*, isto é, sem divisor de fluxo, de modo que todo o vapor entra na coluna. Estes modos de injeção tornam-se necessários, não só pelas razões acima descritas, mas também, porque diferentes colunas possuem diferentes capacidades para a amostra, e dependendo do detector vai ser necessário mais ou menos amostra para obter um sinal adequado.

- Fase Estacionária: pode estar contida em colunas capilares ou empacotadas dependendo da quantidade da amostra que se pretende injectar ou da resolução pretendida. É devido às diferentes afinidades que o composto que constitui a fase estacionária estabelece com cada componente de uma mistura, que estes são separados, e eluidos a tempos de retenção diferentes. A coluna encontra-se contida num forno com temperatura programável, que permite melhorar a separação dos componentes de uma mistura, uma vez que a temperatura afecta o tempo de retenção.
- Detector: dispositivo que traduz uma propriedade física num sinal que indica e quantifica os componentes separados pela coluna. O detector deve responder rapidamente com boa reprodutibilidade a uma grande variedade de compostos, apresentar um limite de linearidade alto, e limites de quantificação muito baixos. Os detectores mais comuns são o detector de condutividade térmica, ionização de chama, captura electrónica, e espectrometria de massa.

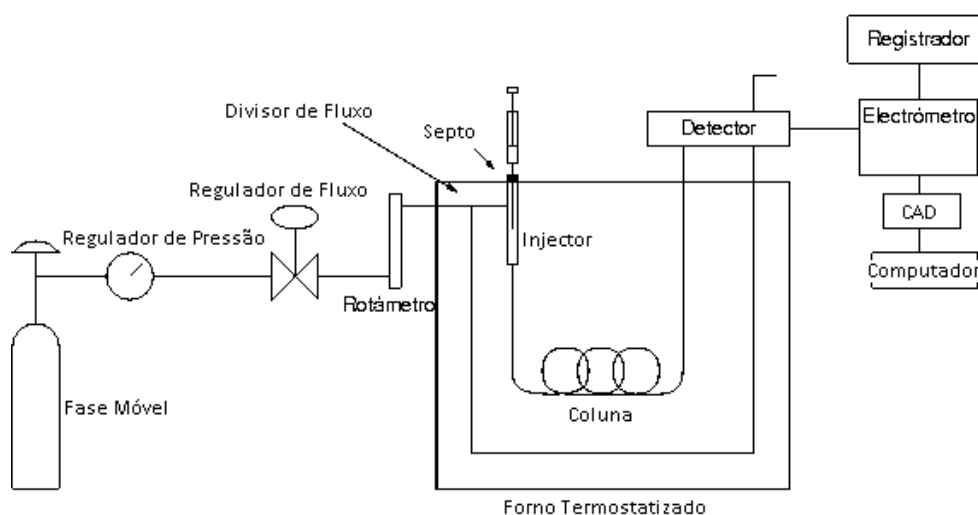


Figura 5. Esquema de um Cromatógrafo de Fase Gasosa.

1.2.2. Eficiência da Separação

- Resolução: um cromatograma possui boa resolução quando se verifica que os picos se encontram bem separados uns dos outros. O soluto em movimento através de uma coluna cromatográfica tende a dispersar-se (de acordo com uma distribuição gaussiana), e quanto maior o tempo de retenção deste composto, mais largo será o pico que origina. A resolução de um pico em relação a outro é definida como:

$$R = \frac{2\Delta t_r}{W_A + W_B}$$

Equação 1. Resolução do pico cromatográfico. Em que Δt_r é o intervalo de tempo que separa os picos, e W é a largura de cada pico.

- Altura do Prato teórico: é uma medida da eficiência da coluna e considera a coluna dividida em secções ou pratos, em cada um dos quais se supõe uma rápida partição dos solutos entre as fases de modo que o equilíbrio seja atingido antes da passagem da fase móvel para o prato seguinte (considera-se constante o coeficiente de partição de cada soluto ao longo da coluna). A altura do prato teórico é uma constante de proporcionalidade entre a variância do pico e a distância que ela percorreu. Como estes pratos não são reais em cromatografia, considera-se a altura do prato teórico como um termo que relaciona a largura do pico com a distância percorrida (quanto menor a altura do prato teórico, menor a largura do pico).

$$H = \frac{L}{N} = \frac{\sigma^2}{L}$$

Equação 2. Altura do prato teórico na coluna cromatográfica. Em que H é a altura do prato teórico, L é o comprimento da coluna, N é o número de pratos teóricos, e σ^2 é a variância do pico.

- A natureza da coluna e a velocidade de fluxo afectam a altura do prato teórico, sendo esta influência relacionada matematicamente.

$$H = A + \frac{B}{u} + C_s u + C_m u$$

Equação 3. Equação de Van-Deemter. Em que H é a altura do prato teórico, A é o coeficiente de caminhos múltiplos (em colunas capilares $A=0$), B é o coeficiente de difusão longitudinal, u é a velocidade linear das moléculas da fase móvel, C_s é o coeficiente de transporte de massa na fase estacionária, e C_m é o coeficiente de transporte de massa na fase móvel.

Para a optimização da performance da coluna – resolução e tempo de retenção – deve-se ter em conta principalmente o factor de capacidade que depende da relação entre a quantidade de analito na fase estacionária e a fase móvel. De um modo geral um maior factor de capacidade melhora a resolução, mas só quando está compreendido entre 1 e 5 é que se obtém tempos de retenção pequenos.

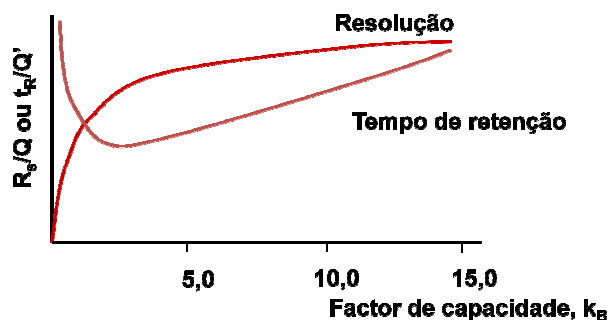


Figura 6. Variação da resolução e do tempo de retenção com o factor de capacidade.

1.2.3. Como interpretar um cromatograma

Depois da análise de uma mistura por Cromatografia Gasosa obtém-se um cromatograma que é necessário interpretar. Os principais dados que se deve ter em atenção são a linha de base, os picos cromatográficos, os tempos de retenção de cada pico, assim como a área, a altura e largura destes.

A identificação de cada pico cromatográfico pode ser feita tendo em conta dados obtidos sobre o tempo de retenção dos compostos, utilizando padrões; pela adição de padrão que resulta num aumento da área do respectivo pico; ou utilizando técnicas auxiliares como a Espectrometria de Massa.

A quantificação de cada composto pode ser feita através da utilização de padrões externos ou internos, conforme for mais apropriado; e pela altura ou área do respectivo pico. A medida da altura do pico não é muito utilizada devido à possibilidade do pico ser pequeno, possuir uma resolução deficiente, haver flutuações da linha de base, e diminuir ligeiramente com o tempo de retenção.

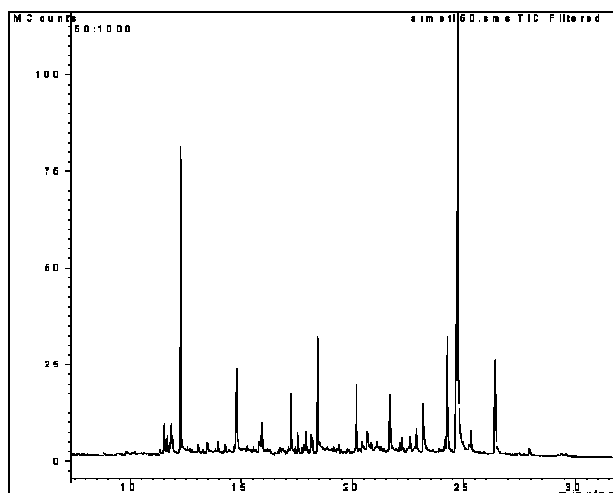


Figura 7. Exemplo de um cromatograma obtido por análise de uma mistura comercial de pesticidas por Cromatografia Gasosa.

A Figura 7 representa um cromatograma de uma mistura comercial de pesticidas. Como podemos verificar a linha de base não possui flutuações observáveis; a mistura é composta por várias substâncias para além dos dois pesticidas que contém, cada uma delas é eluída a um tempo de retenção específico nas condições utilizadas, e corresponde a um pico cromatográfico; a área dos picos de interesse pode ser integrada pelo *software* do equipamento e utilizada para a quantificação dos compostos aos quais esses picos correspondem.

1.3. Espectrometria de Massa ^[20, 27, 28]

A Espectrometria de Massa é uma técnica analítica muito utilizada, e fornece informações sobre a massa molecular do composto, a fórmula molecular e detalhes estruturais da molécula; tem grande amplitude de aplicação pois é um sistema de detecção de grande universalidade no que respeita aos analitos (qualquer classe de compostos, qualquer tipo de amostra), necessita de uma quantidade de amostra muito pequena pois tem limites de detecção muito pequenos.

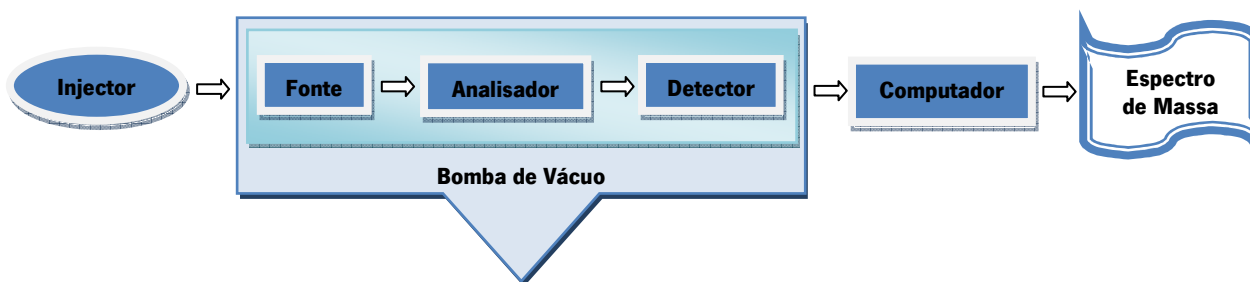
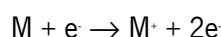


Figura 8. Diagrama de um Espectrômetro de Massa que mostra os vários componentes funcionais ^[27].

O espectrômetro de massa é constituído por um sistema de vácuo, uma fonte de electrões, um analisador de massa (exemplo: *Ion Trap*), um detector de iões e um amplificador de sinal. A entrada da amostra é mantida a temperaturas elevadas (até 400 °C), para se assegurar de que a amostra se encontra na fase gasosa. Seguidamente, a amostra passa para a câmara de ionização (exemplo: impacto electrónico), onde um feixe de electrões é acelerado, de modo a que estes colidam com as moléculas da amostra, formando-se o ião molecular, M^+ .



Posteriormente o ião molecular fragmenta-se de modo a se tornar mais estável.

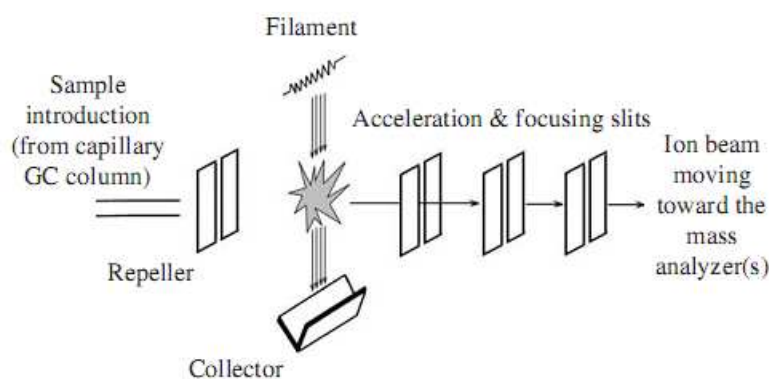


Figura 9. Diagrama dos componentes de uma fonte de ionização por impacto electrónico ^[27].

Os iões entram para o analisador e são “capturados” pela acção de três eléctrodos: um eléctrodo anelar que aplica uma radiofrequência, e os eléctrodos de entrada e saída que aplicam uma diferença de potencial. É originado um campo magnético tridimensional que consegue “capturar” os iões, tendo estes uma trajectória oscilante estável. O movimento dos iões está dependente da diferença de potencial e radiofrequência aplicada, e se se aplicar radiofrequências variáveis, os iões são ejectados segundo a sua relação massa-carga individual.

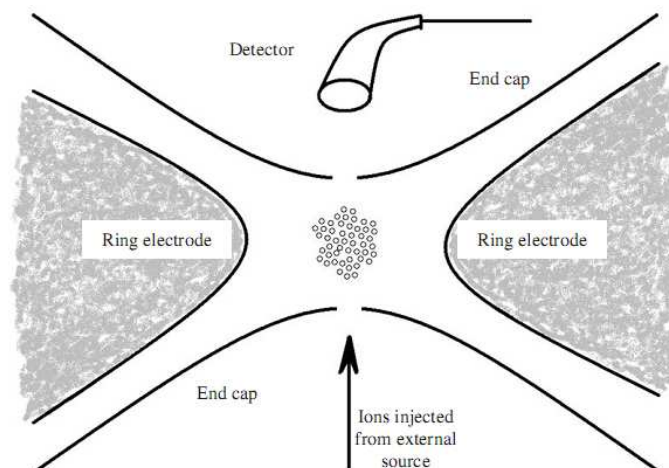


Figura 10. Figura ilustrativa das superfícies internas de um analisador de massas do tipo *Ion Trap* ^[27].

Como já foi referido, as forças que actuam sobre os iões “capturados” resultam numa oscilação tridimensional, cujo movimento pode ser descrito por soluções das equações de *Mathieu*. A estabilização da trajectória dos iões é determinada pelos parâmetros de *Mathieu*, a_z e q_z , que representam regiões do espaço onde os iões são estáveis dentro do analisador – zona sombreada da Figura 11 – para dados valores de potenciais e frequência angular ^[27].

$$a_z = -\frac{16eU}{m(r_0^2 + 2z_0^2)\Omega^2} \quad q_z = \frac{8eV}{m(r_0^2 + 2z_0^2)\Omega^2}$$

Equação 4. Equações de Mathieu. A variável U representa a diferença de potencial dos eléctrodos de entrada e saída, V é a voltagem da radiofrequência, Ω é a frequência angular do eléctrodo anelar, $2z$ é a distância entre os eléctrodos de entrada e saída, r é o raio do eletrodo anelar, e m é a massa do ião.

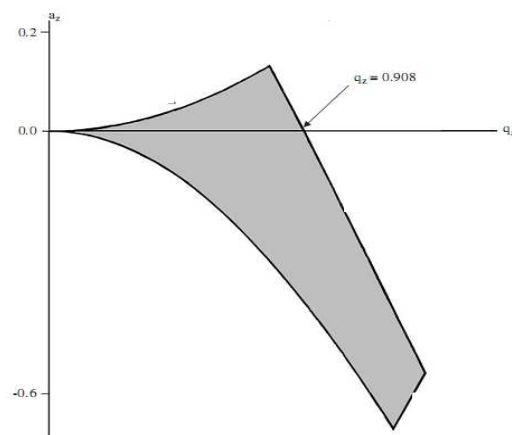


Figura 11. Diagrama de estabilidade de Mathieu para analisadores de massa do tipo *Ion Trap* ^[27].

Se se aumentar a voltagem da radiofrequência do eléctrodo anelar, enquanto se mantém a diferença de potencial dos eléctrodos de entrada e saída a 0 V ($a_z=0$), os iões são ejetados quando se atinge $q_z=0,908$.

Para a detecção dos iões, os potenciais são alterados para desestabilizar a movimentação dos iões, o que resulta na ejeção destes pelo eléctrodo de saída. Os iões são, normalmente, ejetados por ordem crescente de relação massa-carga através de uma mudança gradual dos potenciais.

Esta distribuição é denominada por Espectro de Massa, que consiste num gráfico de barras onde se representa a abundância relativa dos iões em função da sua relação massa-carga; e é característica de cada composto nas condições definidas.

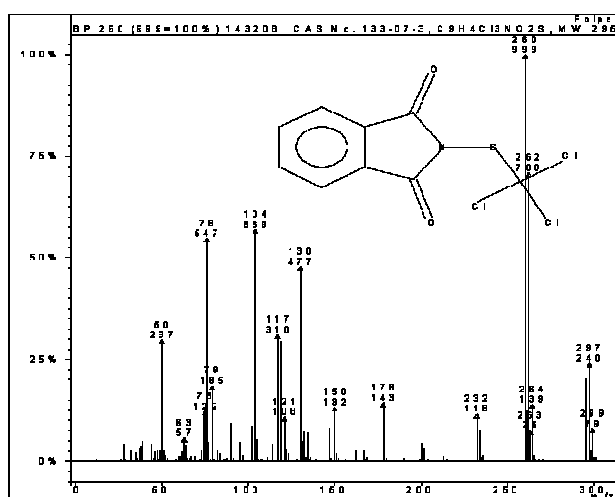


Figura 12. Exemplo de Espectro de Massa de um Pesticida.

Uma análise por espectrometria de massa pede uma amostra pura que posteriormente é volatilizada, pois de outro modo a interpretação dos espectros obtidos torna-se complicada, se não impossível.

A Espectrometria de Massa possui um sistema *MS/MS*. Devido a este sistema um ião precursor é seleccionado numa primeira fase (ião mais abundante no espectro de massa do composto de interesse), é sujeito a nova fragmentação, e depois todos os iões resultantes são analisados e detectados. Este sistema elimina quaisquer interferências que possam existir, e é muito utilizado para a quantificação de compostos quando a espectrometria de massa é utilizada como método detector.

1.4. Cromatografia de Fase Gasosa Acoplada à Espectrometria de Massa

A Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrometria de Massa é uma combinação de duas técnicas microanalíticas: uma de separação e outra de identificação, respectivamente. Este acoplamento tem várias vantagens. Primeiramente, separam-se os componentes de uma mistura complexa por Cromatografia Gasosa para que os espectros de massa dos compostos individuais possam ser obtidos para objectivos qualitativos. Em segundo, fornece informação quantitativa desses mesmos compostos. Uma vez que é necessário a volatilidade da amostra para a Cromatografia Gasosa, as técnicas de ionização para a Espectrometria de Massa estão restritas àquelas que requerem analitos na fase gasosa. Estas técnicas são a ionização electrónica (*EI*), ionização química (*CI*), ionização química a pressão reduzida ou a pressão atmosférica (*R/APCI*), captura electrónica com ionização negativa (*ECNI*) e a ionização de campo (*FI*)^[28].

Interface:

A ligação *GC-MS* limita-se à inserção directa do extremo de saída da coluna cromatográfica na entrada da fonte de ionização do espectrómetro. No entanto, esta deve conciliar a diferença de pressão em que os dois instrumentos operam (*GC* – sob pressão; *MS* - vácuo), permitir transferência total dos compostos eluídos, não contribuir para a largura da banda e não interagir quimicamente com a amostra^[20].

O acoplamento *GC-MS* ultrapassa algumas limitações causadas pela utilização de cada técnica individualmente. Por exemplo, na utilização da Espectrometria de Massa numa amostra contaminada, obtém-se uma sobreposição de vários espectros de massa, o que dificulta a interpretação. Por outro lado, a análise de uma amostra impura por *GC-MS*, separa as impurezas do analito de interesse e permite obter o espectro de massa de cada componente, individualmente. A utilização de Cromatografia Gasosa pode conduzir a resultados questionáveis devido a ambiguidades na identificação de compostos baseando-se somente no tempo de retenção dos compostos, no entanto, o acoplamento com a espectrometria de massa permite obter um espectro que confirma a identidade do composto eluído. A utilização do sistema *MS/MS* acoplado à Cromatografia Gasosa ainda nos fornece mais certeza uma vez que são eliminadas quaisquer interferências de compostos que possam co-eluir com o analito de interesse, e permite obter limites de detecção muito mais baixos.^[28] Outras vantagens deste acoplamento é a possibilidade de obter cromatogramas pelo método *SIM* (*Single Ion Monitoring*) em que o espectrómetro de massa só detecta iões com relação massa/carga compreendida no intervalo definido, o que elimina a maior parte das interferências.

1.5. Construção da Curva de Calibração

Método do Padrão Externo

O método do padrão externo compara a resposta do detector obtida com uma amostra com as respostas obtidas com soluções padrão de concentração bem conhecida. Preparam-se soluções padrão cuja concentração do analito de interesse é bem conhecida e abranja a gama de concentração de analito esperada na amostra, e obtém-se as respectivas respostas do detector. Posteriormente constrói-se uma regressão linear da resposta do detector em função da concentração de analito correspondente, o que permite calcular a concentração de analito de interesse na amostra através da resposta que amostra provoca no detector utilizando a equação da recta.

$$A_x = b[X] + a$$

Equação 5. Cálculo da concentração do analito pelo método do padrão interno.

Método Padrão Interno

O método do padrão interno é muito utilizado em Química Analítica. Consiste em adicionar uma quantidade conhecida de um composto aos padrões, e às amostras. A curva de calibração é construída a partir das razões das áreas em função das razões das concentrações. Através da recta obtida, a concentração de analito desconhecida na amostra é determinada por interpolação.

$$\frac{A_x}{[X]} = F \frac{A_p}{[P]}$$

Equação 6. Cálculo da concentração do analito pelo método do padrão interno. Em que A_x é a área do sinal do analito, $[X]$ é a concentração do analito, A_p é a área do sinal do padrão interno, $[P]$ é a concentração do padrão interno, e F é a razão entre os respectivos factores de resposta.

O padrão interno deve ser um composto estável, com as mesmas características do analito, mas que possua diferente tempo de retenção (não convém que seja muito diferente).

O método do padrão interno é útil para análises em que a quantidade de amostra introduzida, ou o sinal obtido variam ligeiramente para cada análise devido a razões difíceis de controlar.

Método da Adição Padrão

O método da Adição Padrão é utilizado para determinar a concentração do analito numa amostra desconhecida por comparação da resposta obtida para essa amostra, com um conjunto de respostas obtidas por adição sucessiva de uma quantidade conhecida do mesmo analito essa mesma amostra. A quantidade de analito na amostra é calculada a partir da evolução do sinal analítico; isto é, a concentração do analito é obtida por extrapolação no gráfico, onde se representa a resposta obtida em função da concentração de analito adicionada à amostra desconhecida. Este método pode ser aplicado à maioria das técnicas analíticas e é utilizado maioritariamente para resolver problemas de efeitos de matriz.

$$[X]_i = \frac{R_i \times [X]_{ad} \times \frac{V_{ad}}{V_t}}{R_f - R_i \times \frac{V_i}{V_t}}$$

Equação 7. Cálculo da concentração do analito pelo método do padrão interno. Em que $[X]_i$ representa a concentração de analito na amostra desconhecida inicial, R_i é a resposta obtida para a amostra inicial, $[X]_{ad}$ é a concentração da solução padrão adicionada em analito de interesse, V_{ad} é o volume de solução padrão adicionado, V_t é o volume final da amostra, R_f é a resposta obtida para a amostra fortificada, e V_i é o volume de amostra inicial.

2. Revisão Bibliográfica

2.1. Extracção

A extracção de pesticidas a partir de várias matrizes, incluindo o vinho, para posterior análise, pode ser efectuada por vários métodos de extracção. Seguidamente, apresentar-se-ão alguns procedimentos e optimização de procedimentos para extracção de pesticidas reportados, utilizando as metodologias mais usuais.

2.1.1. Extracção em Fase Sólida ^[15]

Outro método possível para a extracção de pesticidas, é a extracção em fase sólida. Num dos procedimentos reportados, a extracção em fase sólida é efectuada em cartuchos contendo 500 mg de C-18. Primeiramente, lavar o cartucho com 3 mL de acetato de etilo, seguido por 3 mL de etanol 96 %, e finalmente, duas vezes por 3 mL de etanol 10 %. Passar pelo cartucho 0,5 mL de uma amostra de vinho, e deixar secar durante 1 hora, sob vácuo. Eluir os pesticidas adsorvidos com 2 mL de acetato de etilo. O cartucho pode ser recondicionado até 10 vezes, lavando, alternadamente, com etanol 10 % e água, e armazenando-o em etanol 10 %.

2.1.2. Microextracção em Fase Sólida

A técnica de *SPME* é a mais utilizada para extracção de pesticidas. Em consequência, existem muitos artigos que reportam procedimentos de extracção por esta técnica e estes foram submetidos a muitos estudos de modo a serem optimizados.

Estudo do Tipo de Fibra ^[29]:

Como existem vários tipos de revestimentos poliméricos utilizados em *SPME*, torna-se necessário comparar o desempenho de todos eles no que respeita à extracção de pesticidas. As razões das áreas dos picos obtidas por *SPME* e por injeção directa de uma solução foram utilizadas para avaliar o desempenho da fibra na extracção de pesticidas, e apresentam-se na Tabela 3.

Tabela 3. Para cada pesticida, os valores representam a razão das áreas dos picos obtidos com fibras de revestimentos poliméricos diferentes (extracção efectuada por imersão directa da fibra em 3 mL de uma solução padrão 100 µg/L em água, em agitação magnética, durante 20 minutos) e as áreas do pico correspondente obtido por injeção directa de 1 µL de uma solução padrão 100 µg/L em acetona.

Pesticida	PDMS	PA	CW-DVB	PDMS-DVB
Diazinão	262	117	179	312
Fenitrotião	165	183	247	385
Fentião	302	248	310	341
Quinalfos	202	178	241	305
Triazofos	92	180	283	312
Fosalona	277	275	272	438
Pirazofos	229	228	264	414

Embora a fibra *PDMS-DVB* se tenha mostrado a mais eficaz, prefere-se a fibra de *PDMS* porque para além de apresentar boa performance na extracção, possui maior robustez e permite a análise de uma maior gama de concentrações.

Estudo da Espessura da Fibra ^[14]:

As fibras para *SPME* são comercializadas em várias espessuras. Para escolher aquela que possui um melhor desempenho na extracção de pesticidas foi efectuado um estudo onde se comparou as áreas dos picos de cada pesticida obtidos com uma fibra de 7 µm *PDMS* e outra de 100 µm *PDMS*. O procedimento de extracção para o estudo consistiu na imersão directa da fibra em 3 mL de uma amostra de vinho fortificado com vários pesticidas, a 20 °C. Os resultados obtidos encontram-se na Tabela 4.

Tabela 4. Variação das áreas dos picos obtidas com revestimentos de diferentes espessuras, nas condições acima indicadas.

Pesticida	Área do Pico Cromatográfico	
	7 μm PDMS	100 μm PDMS
Mevinfos E	390	522
Diazinão	-	398
Dimetoato	148	1908
Lindano	581	8489
Flufenoxurão	995	3439
Heptacloro	9447	11915
Paratião-metilo	108	2131
Malatião	59	698
Diclofluanida	77	2814
Endossulfão	8131	11437
Dieldrine	9346	11898
Azinfos-metilo	1369	7761
Fosalona	160	5287

Como esperado, a fibra de 100 μm apresenta um melhor desempenho para todos os pesticidas analisados, uma vez que a superfície de adsorção é maior.

Estudo do Efeito da Agitação ^{[30, 31]:}

A extracção pela técnica de *SPME* baseia-se no equilíbrio estabelecido entre a quantidade de analito presente em solução e na fibra. Logo, a difusão do analito representa um parâmetro importante de extracção, uma vez que interfere na acumulação de analito na fibra. Assim, o tempo que se demora a atingir o equilíbrio, isto é, o tempo depois do qual a quantidade de analito extraído permanece constante, também é afectado. O tempo que se demora a atingir o equilíbrio foi estudado empregando diferentes técnicas de agitação da solução: agitação nula, agitação magnética da solução, vibração da fibra, e célula de fluxo. As condições de extracção foram as mesmas para todas as extracções, com excepção do método de agitação.

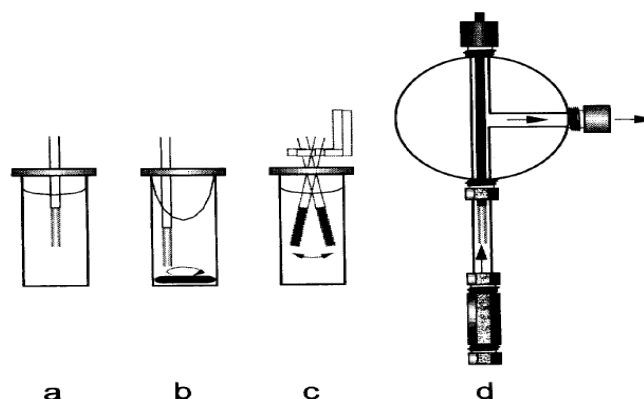


Figura 13. Esquema representativo dos 4 tipos de agitação estudados: agitação nula (a), agitação magnética (b), vibração da fibra (c) e célula de fluxo (d).

Tabela 5. Tempos de equilíbrio obtidos (min) para os pesticidas estudados sob diferentes condições de agitação.

Pesticida	Tempo de Equilíbrio (min)						
	$V_{\text{amostra}} = 1,4 \text{ mL}$			$V_{\text{amostra}} = 12 \text{ mL}$			$V_{\text{amostra}} = 10 \text{ mL}$
	Ag.Nula	Ag.Magnética	Vibração	Ag.Nula	Ag.Magnética	Vibração	Fluxo
Simetrine	60	30	30	80	25	40	30
Ametrine	>120	35	30	>120	30	50	30
Prometrine	>120	30	35	>120	30	80	35
Terbutrine	>120	30	35	>120	50	80	35
Paratião	>120	30	20	>120	35	35	25

Mostra-se que a agitação é, de facto, importante para a extracção, uma vez que quando a solução está estática durante a extracção, o equilíbrio demora cerca de 2 horas a ser atingido. O método de vibração da fibra adequa-se muito bem quando o volume da solução é pequeno, onde se atinge o equilíbrio em 35 minutos; frente a 80 minutos para soluções de maior volume. Para amostras de volume maior a agitação magnética mostra-se mais eficaz, atingindo-se o equilíbrio para a maior parte dos compostos em 30 minutos. Isto deve-se, provavelmente, ao facto de se formar um vortex na solução. Quanto à célula de fluxo, esta também mostrou ser eficaz para um volume de solução de 10 mL, atingindo-se o equilíbrio em 35 minutos. No entanto, a montagem da célula é elaborada (Figura 14) e torna-se desnecessária, uma vez que com a agitação magnética se obtêm resultados semelhantes.

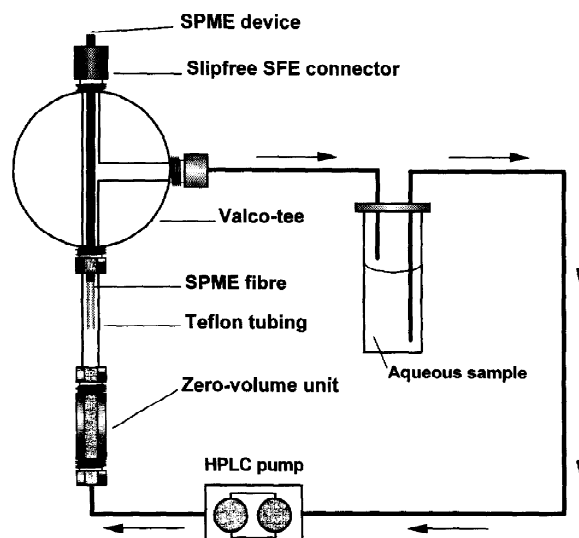


Figura 14. Esquema da montagem para uma célula de fluxo utilizada para efectuar o estudo do efeito da agitação.

Conclui-se assim, que para a maioria dos pesticidas estudados a agitação magnética deve ser utilizada em soluções com volumes próximos dos 10 mL, enquanto a vibração da fibra deve ser empregue para soluções com volume próximo de 1 mL.

Na utilização de agitação magnética durante as extracções, tornou-se necessário fazer um estudo sobre o efeito da velocidade rotacional da barra magnética. As condições de extracção foram as mesmas para as extracções, com excepção da velocidade de rotação da barra magnética. Os resultados obtidos encontram-se graficamente representados na Figura 15.

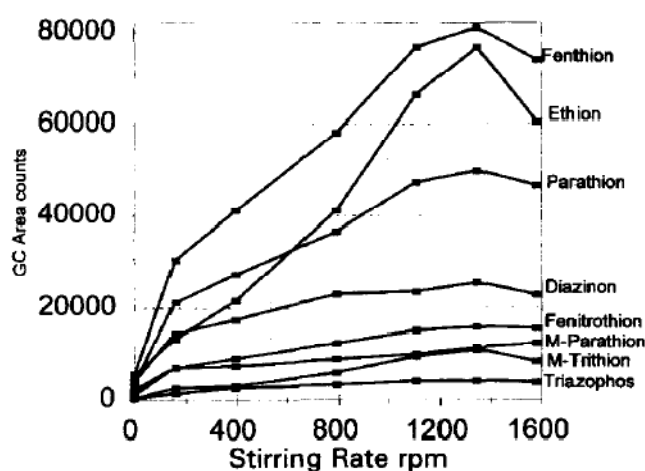


Figura 15. Efeito da velocidade de agitação na extração de pesticidas.

As curvas representadas mostram que a agitação magnética a partir de velocidades rotacionais grandes a quantidade de analito extraído diminui, isto deve-se, provavelmente, ao facto de a barra magnética começar a vibrar e originar uma agitação disforme e com muita velocidade.

Estudo do Efeito da Posição da Fibra ^[30]:

A fibra não deve ser posicionada no centro do vortex formado pela agitação magnética, mas sim mais próximo das paredes do frasco de amostras, uma vez que é aí que o transporte de massa é maior.

Estudo do Tempo de Extracção ^[14]:

Um factor a ser estudado para a construção de um procedimento de extracção adequado, é o tempo durante o qual a fibra se encontra imersa na solução padrão ou na amostra. O procedimento de extracção para o estudo consistiu na imersão directa de uma fibra 100 μm PDMS em 3 mL de uma amostra de vinho fortificado com vários pesticidas, a 45 °C. Este procedimento foi repetido várias vezes, alterando o tempo de imersão da fibra. Os resultados obtidos encontram-se representados na Figura 12 na forma de um gráfico onde se mostra a variação das áreas dos picos para cada pesticida em função do tempo de extracção.

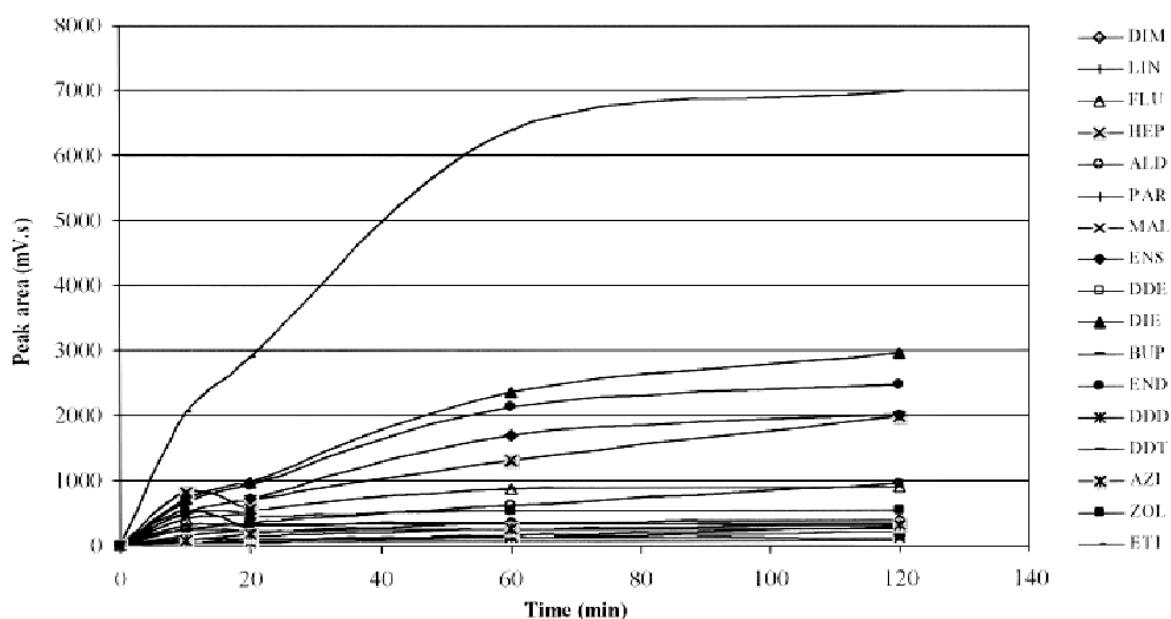


Figura 16. Variação das áreas dos picos cromatográficos para os pesticidas estudados com o tempo de extracção.

Considerando um compromisso entre o tempo total de análise e o tempo de extracção, considera-se que o tempo de extracção de 30 minutos seria adequado.

Estudo da Temperatura de Extracção ^[14]:

Também se efectuaram estudos sobre a temperatura à qual se deve efectuar a extracção, uma vez que este parâmetro influencia as constantes de partição entre a fase líquida e a fibra. Analisou-se 3 mL de uma amostra de vinho fortificada com 19 pesticidas, por imersão de uma fibra 100 μm PDMS durante 30 minutos às temperaturas de 20 °C e de 45 °C. As áreas dos picos obtidos para os pesticidas foram analisadas e encontram-se descritas na Tabela 6.

Tabela 6. Variação das áreas dos picos cromatográficos para os pesticidas estudados com a temperatura de extracção.

Pesticida	20 °C	45 °C
Diazinão	951	637
Dimetoato	1102	979
Lindano	1529	1031
Flufenoxurão	2222	2699
Heptacoloro	4921	6663
Aldrine	3318	5270
Paratião-metilo	956	532
Malatião	425	245
Diclofluanida	4476	2297
Endossulfão	2951	3426
Dieldrine	4183	5015
Buprofezine	610	872
Endrine	3564	4314
Etião	5504	6114
Azinfos-metilo	281	333
Fosalona	1007	835

Para 11 dos 19 pesticidas analisados as áreas dos respectivos picos aumentam. Os restantes pesticidas apresentam uma diminuição nas áreas dos respectivos picos, mas esta não é muito acentuada. Considera-se que à temperatura de 45 °C a extracção de pesticidas é melhorada.

Estudo do Efeito da Quantidade de Etanol presente ^[32]:

De modo a analisar o efeito da matriz do vinho na extracção, assumiu-se que o etanol, sendo um dos maiores constituintes do vinho, influenciaria no coeficiente de afinidade do pesticida entre a solução aquosa e a fibra. Procedeu-se à extracção de alguns pesticidas, em que só se variou a quantidade de etanol presente na solução (0, 5, 10 e 15 % - percentagem máxima de etanol em vinhos). Os resultados deste estudo encontram-se na Figura 17.

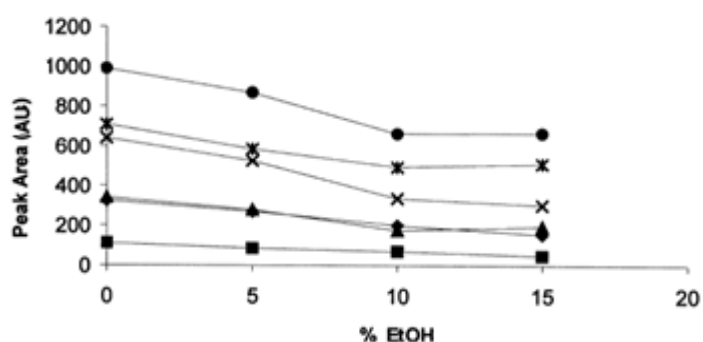


Figura 17. Influência da quantidade de etanol na eficiência de extracção.

Verificou-se que a eficiência da extracção diminuía quando na solução se aumenta a percentagem de etanol. A redução de quantidade de analito extraída é mais significativa entre os 0 e 10 %, enquanto esta é quase nula entre os 10 e os 15 %. Para os padrões deve ser utilizada uma percentagem de etanol entre 10 a 12 %, uma vez que estes valores são os mais próximos da maioria das matrizes do vinho, e não apresentam variações significativas na quantidade de analito extraído.

Estudo do Efeito da Força Iónica da Solução ^[33]:

Um dos parâmetros relacionados com a matriz também estudado foi a força iónica da solução. Procedeu-se à extracção de alguns pesticidas em que só se variou a quantidade do sal iónico. As soluções padrão foram preparadas com uma solução aquosa contendo 10, 20, 30 ou 40 % (p/p) NaCl. Os resultados obtidos foram comparados com os resultados obtidos para uma solução padrão de controlo (0 % NaCl).

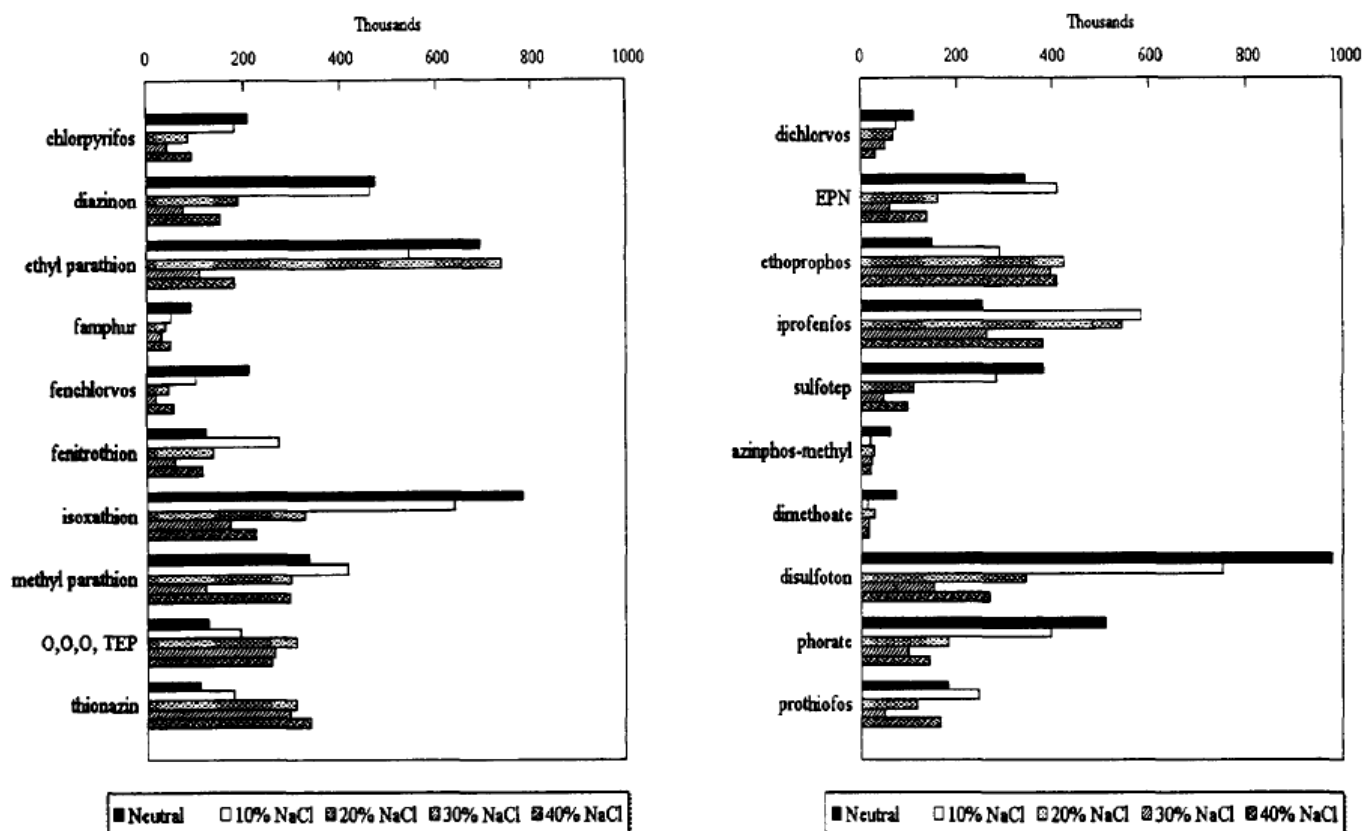


Figura 18. Efeito de diferentes concentrações de sal (ajustador da força iónica) na eficiência de extracção de vários pesticidas.

Era esperado que a adição de um sal como o NaCl, provocasse uma diminuição da solubilidade dos analitos na fase aquosa, o que favoreceria o transporte de massa para a fibra, e melhoraria a eficiência da extracção. Em geral, verificou-se que um aumento da força iónica causa tanto uma diminuição como um aumento da quantidade de analito extraído. Outro sal também estudado foi o $MgSO_4$ [34], obtendo-se resultados semelhantes.

Conclui-se que a quantidade de analito extraído aumenta ou diminui com a adição do sal ajustador de força iónica, dependendo da sua solubilidade e polaridade. Assim, o efeito da força iónica deve ser tido em conta quando se tem interesse em um só analito ou grupo de compostos muito semelhantes.

Estudo do Efeito do pH da Amostra [35]:

Outro parâmetro referente à matriz estudado foi o pH da solução. Para avaliar o efeito deste parâmetro na eficiência da extracção, analisaram-se soluções sob as mesmas condições, com excepção do pH, que se variou de 4 a 11, por adição de quantidades adequadas de solução tampão (ácido acético/acetato de sódio para pH ácido, hidróxido de sódio para pH alcalino).

Concluiu-se que variar o pH de 4 a 11 não altera significativamente a eficiência de extracção dos analitos.

Estudo de outros Efeitos de Matriz ^[14]:

É considerado que outros constituintes da matriz do vinho tenham efeitos na eficiência da extracção, como açúcares, tartaratos e fenóis, uma vez que a matriz do vinho branco é diferente da matriz do vinho tinto, e se obtém diferentes resultados quando se aplica o mesmo procedimento de extracção de pesticidas nos dois tipos de vinho.

Estudo do Efeito da Temperatura na Dessorção ^[36]:

A temperatura de dessorção da fibra no injector foi estudada, repetindo o procedimento com temperatura de 250, 270 e 290 °C. Verificou-se que a temperatura óptima de dessorção para a fibra era de 270 °C.

Estudo do Efeito do Tempo de Dessorção ^[36]:

O tempo de dessorção, também foi estudado, de modo a obter um valor óptimo que corresponde à máxima resposta do detector para todos os compostos. Foi testada uma gama de tempo de 1 a 5 minutos. Verificou-se que 4 minutos eram suficiente para a dessorção dos pesticidas estudados. No entanto, este valor pode ser alterado conforme os analitos a analisar.

2.2. Análise e Detecção

No que respeita aos métodos de análise, os mais utilizados são a Cromatografia Líquida de Alta Performance e a Cromatografia Gasosa, no entanto, também se utiliza a Cromatografia Líquida. O detector maioritariamente preferido é o Espectrómetro de Massa uma vez que este pode detectar uma gama de compostos mais universal, em relação a outros detectores que também podem ser utilizados (*ECD*, *NPD*). Estes métodos apresentam parâmetros de validação muito bons como o desvio padrão, limite de detecção, recuperação e linearidade. Alguns métodos de análise serão seguidamente reportados.

2.3. Estudos de Caso

A análise de multi-resíduos de pesticidas em vinhos é um tema que, de algum tempo para cá, se encontra reportado na literatura. Seguidamente vão ser apresentados alguns métodos já utilizados, assim como os limites de detecção e a precisão alcançados por eles.

Tabela 7. Resumo de alguns métodos reportados para a análise de multi-resíduos de pesticidas em vinhos.

Método de Extração	Método Cromatográfico	Método Detector	LDD	Precisão	Ref.
<i>SPME (PDMS 100 µm)</i> Imersão directa 3 mL amostra 30 min, 45 °C, agitação Dessorção: 3 min, 250 °C	<i>GC (HP5890)</i> Coluna HP-PAS 25mx0,32mmx25µm Ar-Metano (95:5) 1,35 mL/min P.T.: 80°C durante 2 min; 40°C/min; 212°C durante 7 min; 6°C/min; 252°C durante 1 min; 5°C/min; 280°C durante 2 min	<i>ECD</i> ⁶³ Ni	0,30-13 ppb	6-19,7 %	[14]
<i>SPE (C-18 500 mg)</i> Lavagem: 3 mL de Acetato de Etilo, 3 mL de Etanol 96%, 2x3 mL de Etanol 10 % 0,5 mL de amostra 1 hora de secagem sob vácuo Eluição com 2 mL de Acetato de Etilo	<i>GC (HP5890)</i> Coluna DB-5 30mx0,25mmx0,25µm He 1 mL/min P.T.: 70°C durante 0,5 min; 10°C/min; 270°C durante 0,1min; 25°C/min; 290°C durante 2 min	<i>MS (HP5972)</i> Voltagem EM = 400V	2-5 ppb	3-17,7 %	[15]
<i>SPME (PDMS 100 µm)</i> Imersão directa 30 mL amostra sat. MgSO ₄ 30 min, t.a., agitação Dessorção: 3 min, 250 °C	<i>GC (HP5890)</i> Coluna HP-5-MS 30mx0,25mmx0,20µm He 7 psi P.T.: 80°C durante 5 min; 5°C/min; 250°C durante 10 min	<i>MS (HP5971)</i> EI = 70eV	1,8-3 ppb	2-18 %	[36]

Capítulo III

Parte Experimental

1. Reagentes

Os pesticidas estudados foram o Ciprodinil, Folpete, Metalaxil, Benalaxil, Iprovalicarbe, Pirimetanil, e Clorpirifos; tendo, as respectivas misturas comerciais, sido obtidas através da Empresa Técnica Agrícola, com exceção do pesticida Ciprodinil que foi fornecido pela *Fluka*. O pesticida utilizado como padrão interno foi o Dieldrine que foi obtido também pela *Fluka*. Os solventes utilizados foram o Etanol fornecido pela *Panreac*, água ultra-pura obtida num sistema de Ultra-Purificação *Millipore*, Metanol e Ácido Acético fornecidos pela *LabScan* posteriormente micro-filtrados através de uma membrana de acetato de celulose de 0,45 μm . Para o estudo do ajuste da força iónica dos padrões foi utilizado Sulfato de Magnésio anidro fornecido pela *Panreac*. As amostras de vinho foram obtidas no mercado local e irão permanecer não identificadas ao longo deste trabalho. As características dos compostos e solventes fornecidos encontram-se especificadas na Tabela 8.

Tabela 8. Características dos Pesticidas estudados, dos compostos e solventes utilizados.

	Fórmula Molecular	Massa Molecular (g/mol)	Nome Comercial	Percentagem constituinte (m/m)%	Frases de Risco	Frases de Segurança
Etanol	$\text{C}_2\text{H}_6\text{O}$	46,07	<i>Ethanol</i>	p.a.	11	7-16
Metanol	CH_4O	31,99	<i>Methanol</i>	p.a.	11-23/24/25-39	7-16-36/37-45
Ácido Acético	$\text{C}_2\text{H}_4\text{O}_2$	59,98	<i>Acetic Acid</i>	p.a.	36/38	26
Dieldrine	$\text{C}_{12}\text{H}_8\text{Cl}_6\text{O}$	308,91	<i>Dieldrine</i>	98,9	25-27-40-48	22-36-37-45
Ciprodinil	$\text{C}_{14}\text{H}_{15}\text{N}_3$	225,29	<i>Cyprodinil</i>	99,8	25-50/53	45-60-61
Folpete	$\text{C}_9\text{H}_4\text{Cl}_3\text{NO}_2\text{S}$	296,56	<i>SidecarF</i>	48,0	20-36-40-43-50	36/37-46-61
Metalaxil	$\text{C}_{15}\text{H}_{21}\text{NO}_4$	279,33	<i>Armetil 50</i>	10,0	25-50/53	45-60-61
Benalaxil	$\text{C}_{20}\text{H}_{23}\text{NO}_2$	325,40	<i>SidecarF</i>	3,75	50/53	60-61
Iprovalicarbe	$\text{C}_{18}\text{H}_{28}\text{N}_2\text{O}_3$	320,43	<i>Melody</i>	9,0	36/38-43	26-36
Pirimetanil	$\text{C}_{12}\text{H}_{13}\text{N}_3$	199,25	<i>Scala</i>	37,2	51/53	60
Clorpirifos	$\text{C}_9\text{H}_{11}\text{Cl}_3\text{NO}_3\text{PS}$	350,59	<i>Pirifos 48</i>	44,0	25-50/53	45-60-61
Sulfato de Magnésio	MgSO_4	120,37	<i>Magnesium Sulphate anhydrous</i>	97,0	22-24-25	36-37

2. Instrumentação

- Balança Analítica *Precisa* 40SM-200A ($\pm 0,00001$ g);
- Aparelho de Ultra-Sons Ultrasonic Cleaner da *Fungilab*;
- Aparelho de purificação de água Millipore de $0,22 \mu\text{m}$ da *Millipark*, onde se obtém água ultra-purificada, com $18,2 \text{ M}\Omega\cdot\text{cm}$;
- Material de vidro diverso de classe A: balões volumétricos de $10,00\pm 0,04$ mL, $50,00\pm 0,06$ mL, $100,0\pm 0,1$ mL, $250,00\pm 0,15$ mL e $500,00\pm 0,25$ mL; pipeta volumétrica de $10,00\pm 0,04$ mL; pipetas graduadas $1,000\pm 0,007$ mL, $2,00\pm 0,01$ mL, $5,00\pm 0,03$ mL e $25,0\pm 0,1$ mL; e *vials* de capacidade volumétrica de 15 mL.
- Uma Placa de Aquecimento com Agitação Magnética *Heidolf MR2002*;
- Dispositivos de Microextração em Fase Sólida de suporte manual com fibra recoberta com *PDMS* $100 \mu\text{m}$;
- Cromatógrafo de Fase Gasosa *VARIAN 4000 Performance* com uma coluna CP8944 VF-5ms 30 m *L.* x $0,25$ mm *I.D.* x $0,39$ mm *O.D.* e com espessura de filme $0,25 \mu\text{m}$, acoplado a um Espectrómetro de Massa (detector) do tipo *Ion Trap* e que foi operado no modo de ionização de impacto electrónico (*EI*) na opção *Full Scan* e *MS/MS*. Nas condições experimentais, o software apresenta uma biblioteca de espectros de massa NIST/EPA/NIH (Nist 05) e NIST MassSpectral Search Program (version 2.0d);
- Equipamento de *HPLC* com bomba e amostrador automático *Finigan Surveyor*, equipado com uma coluna cromatográfica *Teruo Electron Corporation, Hypersil GOLD* (dimensões – $100\times 4,6$ mm e partículas de enchimento de $5 \mu\text{m}$) e acoplado a um Espectrómetro de Massa (detector) do tipo *Linear Ion Trap* e que foi operado no modo de ionização por *electrospray (ESI)* na opção *Full Scan*.

3. Preparação de Soluções

3.1. Estudos Prévios

3.1.1. SPME-GC-MS

a) Soluções-Mãe de Pesticida Metalaxil e Dieldrine

Solução Mãe de Pesticida Metalaxil: Pesou-se 37,5 mg de preparado comercial *Armetil 50*, que foi transferido para um balão volumétrico de 500,00 mL, e dissolvido em 60,0 mL de Etanol. Perfez-se o volume com Água ultra-pura de modo a obter um solvente hidroalcoólico 12 % em Etanol.

Solução Mãe de Pesticida Dieldrine (Padrão Interno): Pesou-se 20,20 mg de Dieldrine, que foi transferido para um balão volumétrico de 500,00 mL, e dissolvido em 60,0 mL de Etanol. Perfez-se o volume com Água ultra-pura de modo a obter um solvente hidroalcoólico 12 % em Etanol.

Tabela 9. Características da Solução-Mãe Metalaxil para estudos prévios por *GC-MS*.

m "ARMETIL 50" (mg)	V Solução (L)	[Metalaxil] (ppm)
37,51 ± 0,01	0,50000 ± 0,00025	7,500 ± 0,004
m Dieldrine (mg)	V Solução (L)	[Dieldrine] (ppm)
20,20 ± 0,01	0,50000 ± 0,00025	40,0 ± 0,2

b) Soluções Padrão

As soluções padrão foram preparadas por diluição das soluções mãe descritas anteriormente.

Tabela 10. Preparação das Soluções Padrão para estudos prévios por *GC-MS*.

Padrão	V final (mL)	V_i (mL) (Dieldrine)	V_i (mL) (ARMETIL 50)	[Dieldrine] (ppm)	[Metalaxil] (ppm)
1	100,0±0,1	1,25±0,02	1,70±0,02	0,505±0,008	0,130±0,002
2	100,0±0,1	1,25±0,02	2,70±0,04	0,505±0,008	0,202±0,003
3	100,0±0,1	1,25±0,02	5,00±0,04	0,505±0,008	0,375±0,003
4	100,0±0,1	1,25±0,02	10,00±0,02	0,505±0,008	0,750±0,001
5	100,0±0,1	1,25±0,02	20,0±0,1	0,505±0,008	1,500±0,008
6	100,0±0,1	1,25±0,02	33,3±0,2	0,505±0,008	2,50±0,02
7	100,0±0,1	1,25±0,02	66,70±0,15	0,505±0,008	5,00±0,01

3.1.2. LC-MS**a)** Solução Mãe de Pesticida Metalaxil

Pesou-se 10,10 mg de preparado comercial Armetil 50, que foi transferido para um balão volumétrico de 100,00 mL, e dissolvido em 12,0 mL de Metanol. Perfez-se o volume com Água ultra-pura de modo a obter um solvente hidroalcoólico 12 % em Metanol.

Tabela 11. Características da Solução-Mãe de Metalaxil para estudos prévios por *LC-MS*.

m Armetil 50 (mg)	m Metalaxil (mg)	V Solução (L)	[Metalaxil] (ppm)
10,10±0,01	1,010±0,001	0,1000±0,0001	10,1±0,1

b) Soluções Padrão

As soluções padrão foram preparadas por diluição das soluções mãe descritas anteriormente.

Tabela 12. Características das Soluções Padrão de Metalaxil para estudos prévios por *LC-MS*.

Padrão	V _i (mL)	V _i (mL) (Sol. Mãe)	[Metalaxil] _f (ppm)
1	10,00±0,04	1,60±0,03	1,60±0,03
2	10,00±0,04	2,20±0,03	2,20±0,03
3	10,00±0,04	2,70±0,03	2,70±0,04
4	10,00±0,04	3,20±0,03	3,20±0,05
5	10,00±0,04	4,30±0,03	4,30±0,05

3.2. Optimização das Condições de Extração

3.2.1. Estudo do Ajuste da Força Iónica

Preparou-se 250,00 mL de solução padrão para cada pesticida a ser estudado.

Os pesticidas Ciprodinil, Folpete, Metalaxil e Pirimetanil foram inicialmente dissolvidos em 30,00 mL de Etanol, e posteriormente fez-se o volume com Água ultra-pura. Os restantes pesticidas, Benalaxil e Iprovalicarbe foram dissolvidos em Água ultra-pura, de seguida adicionou-se 30,00 mL de Etanol, e fez-se o volume com Água ultra-pura.

Para os pesticidas cujas preparações comerciais se encontram na forma líquida foram preparadas soluções mãe, e posteriormente por diluição é que foram preparadas as soluções padrão.

Tabela 13. Características das soluções padrão preparadas a partir de padrões e preparados comerciais de pesticidas na forma de sólido para o estudo do Ajuste da Força Iónica.

Pesticida	m (mg)	m Pesticida (mg)	V _f (L)	Concentração (ppm)
Ciprodinil		1,35±0,01	0,25000±0,00015	5,40±0,04
Metalaxil	13,51±0,01	1,35±0,01	0,25000±0,00015	5,40±0,04
Folpete	11,25±0,01	5,40±0,05	0,25000±0,00015	21,60±0,07
Benalaxil	32,67±0,01	1,23±0,01	0,25000±0,00015	4,92±0,04
Iprovalicarbe	12,51±0,01	1,13±0,01	0,25000±0,00015	4,52±0,04

Tabela 14. Características das soluções padrão preparadas a partir de uma solução comercial de pesticida por diluições sucessivas para o estudo do Ajuste da Força Iônica.

Pesticida	$C_{inicial}$ (ppm)	$V_{inicial1}$ (mL)	V_{final1} (mL)	C_{final1} (ppm)	$V_{inicial2}$ (mL)	V_{final2} (mL)	C_{final2} (ppm)
Pirimetanil	400000	0,0100±0,0001	100,0±0,1	40,0±0,4	31,2±0,2	250,0±0,15	4,99±0,06

Para o estudo das soluções sem adição de ajustador de força iônica ($MgSO_4$), foram transferidos 3x10,00 mL de solução para os *vials*. Este processo foi repetido para todos os pesticidas a serem estudados.

Para o estudo das soluções com uma determinada concentração de ajustador de força iônica, pesou-se uma massa o mais próxima possível de 0,30000 g de $MgSO_4$ que foram transferidos para um balão volumétrico de 50,00 mL. Perfez-se o volume com solução padrão de pesticida e dissolveu-se o sal com o auxílio de um aparelho de ultra-sons, obtendo-se assim, uma concentração de 0,05 M de ajustador de força iônica. Posteriormente foram transferidos 3x10,00 mL de solução para os *vials*. Este processo foi repetido para todos os pesticidas a serem estudados.

Para o estudo das soluções saturadas em ajustador de força iônica, tomou-se cerca de 70 mL de solução para um copo e adicionou-se $MgSO_4$, gradualmente, até estar saturada (pequenas quantidades de cada vez, com intervalos de tempo para garantir a solubilidade/saturação). Filtrou-se a solução por gravidade, e posteriormente foram transferidos 3x10,00 mL de solução para os *vials*. Este processo foi repetido para todos os pesticidas a serem estudados.

3.2.2. Estudo da Temperatura e do Tempo de Extração

Preparou-se 100,00 mL de solução padrão para cada pesticida a ser estudado.

Os pesticidas Ciprodinil, Folpete, Metalaxil e Pirimetanil foram inicialmente dissolvidos em 12,00 mL de Etanol, e posteriormente perfez-se o volume com Água ultra-pura. Os restantes pesticidas, Benalaxil e Iprovalicarbe foram dissolvidos em Água ultra-pura, de seguida adicionou-se 12,00 mL de Etanol, e perfez-se o volume com Água ultra-pura.

Para os pesticidas cujas preparações comerciais se encontram na forma líquida foram preparadas soluções mãe, e posteriormente por diluição é que foram preparadas as soluções padrão.

Tabela 15. Características das soluções padrão preparadas a partir de padrões e preparados comerciais de pesticidas na forma de sólido para o estudo da Temperatura e do Tempo de Extração.

Pesticida	m (mg)	m Pesticida (mg)	V _i (L)	Concentração (ppm)
Ciprodinil		0,54±0,01	0,1000±0,0001	5,4±0,1
Metalaxil	5,41±0,01	0,54±0,01	0,1000±0,0001	5,40±0,01
Folpete	4,50±0,01	2,16±0,05	0,1000±0,0001	21,60±0,04
Benalaxil	13,07±0,01	0,490±0,004	0,1000±0,0001	4,901±0,006
Iprovalicarbe	5,01±0,01	0,451±0,009	0,1000±0,0001	4,51±0,01

Tabela 16. Características das soluções padrão preparadas a partir de uma solução comercial de pesticida por diluições sucessivas para o estudo da Temperatura e do Tempo de Extração.

Pesticida	C _{inicial} (ppm)	V _{inicial1} (mL)	V _{final1} (mL)	C _{final1} (ppm)	V _{inicial2} (mL)	V _{final2} (mL)	C _{final2} (ppm)
Pirimetanil	400000	0,0100±0,0001	100,0±0,1	40,0±0,4	12,5±0,1	100,0±0,1	5,00±0,05

Para cada pesticida, transferiram-se 6x10,00 mL de solução para os *vials*.

3.3. Análise Quantitativa

3.3.1. Método *Full Scan*

Preparou-se 100,00 mL de Solução-Mãe para cada pesticida a ser estudado.

Os pesticidas Ciprodinil, Folpete, Metalaxil e Pirimetanil foram inicialmente dissolvidos em 12,00 mL de Etanol, e posteriormente fez-se o volume com Água ultra-pura. Os restantes pesticidas, Benalaxil e Iprovalicarbe foram dissolvidos em Água ultra-pura, de seguida adicionou-se 12,00 mL de Etanol, e fez-se o volume com Água ultra-pura.

Tabela 17. Preparação das Soluções-Mãe dos Pesticidas em estudo para a construção das Rectas de Calibração pelo método *Full Scan*.

Composto	V final (mL)	m (mg)	V (mL)	m Composto (mg)	[Composto], (ppm)
Ciprodinil	100,0±0,1			1,13±0,01	11,3±0,1
Folpete	100,0±0,1	2,08±0,01		1,00±0,05	10,00±0,09
Metalaxil	100,0±0,1	5,08±0,01		0,51±0,01	5,080±0,001
Benalaxil	100,0±0,1	13,48±0,01		0,506±0,004	5,1±0,1
Iprovalicarbe	100,0±0,1	5,74±0,01		0,516±0,009	5,2±0,1
Pirimetanil	100,0±0,1		0,0100±0,0001		40,0±0,4

Tabela 18. Preparação das Soluções Padrão do Pesticida Ciprodinil para construção da recta de calibração pelo método *Full Scan*.

Padrão	V final (mL)	V inicial Solução Mãe (mL)	[Ciprodinil] (ppm)
1	100,0±0,1	0,440±0,004	0,0497±0,0006
2	100,0±0,1	0,880±0,008	0,099±0,001
3	100,0±0,1	1,770±0,009	0,200±0,002
4	50,00±0,06	1,770±0,009	0,400±0,004
5	50,00±0,06	3,54±0,02	0,800±0,008
6	50,00±0,06	5,30±0,05	1,198±0,008
7	50,00±0,06	9,30±0,05	2,10±0,02

Tabela 19. Preparação das Soluções Padrão do Pesticida Metalaxil para construção da recta de calibração pelo método *Full Scan*.

Padrão	V final (mL)	V inicial Solução Mãe (mL)	[Metalaxil] (ppm)
1	100,0±0,1	1,00±0,03	0,051±0,001
2	100,0±0,1	2,00±0,03	0,102±0,002
3	100,0±0,1	4,00±0,03	0,204±0,002
4	50,00±0,06	4,00±0,03	0,406±0,004
5	50,00±0,06	8,00±0,06	0,813±0,006
6	50,00±0,06	12,00±0,06	1,219±0,006
7	50,00±0,06	21,00±0,06	2,134±0,007

Tabela 20. Preparação das Soluções Padrão do Pesticida Folpete para construção da recta de calibração pelo método *Full Scan*.

Padrão	V final (mL)	V inicial Solução Mãe (mL)	[Folpete] (ppm)
1	100,0±0,1	0,500±0,005	0,0500±0,0005
2	100,0±0,1	1,00±0,01	0,100±0,001
3	100,0±0,1	2,00±0,01	0,2000±0,0008
4	50,00±0,06	2,50±0,02	0,500±0,004
5	50,00±0,06	4,90±0,02	0,980±0,006
6	50,00±0,06	14,70±0,05	2,94±0,01
7	50,00±0,06	34,3±0,1	6,86±0,03

Tabela 21. Preparação das Soluções Padrão do Pesticida Benalaxil para construção da recta de calibração pelo método *Full Scan*.

Padrão	V final (mL)	V inicial Solução Mãe (mL)	[Benalaxil] (ppm)
1	100,0±0,1	0,990±0,009	0,050±0,001
2	100,0±0,1	1,400±0,007	0,071±0,001
3	100,0±0,1	2,00±0,01	0,102±0,002
4	50,00±0,06	2,00±0,01	0,204±0,004
5	50,00±0,06	4,00±0,02	0,408±0,008
6	50,00±0,06	5,00±0,05	0,50±0,01
7	50,00±0,06	9,90±0,05	1,01±0,02

Tabela 22. Preparação das Soluções Padrão do Pesticida Iprovalicarbe para construção da recta de calibração pelo método *Full Scan*.

Padrão	V final (mL)	V inicial Solução Mãe (mL)	[Iprovalicarbe] (ppm)
1	100,0±0,1	1,00±0,03	0,052±0,002
2	100,0±0,1	2,00±0,03	0,104±0,003
3	100,0±0,1	4,00±0,03	0,208±0,004
4	50,00±0,06	4,00±0,03	0,416±0,008
5	50,00±0,06	8,00±0,06	0,86±0,02
6	50,00±0,06	12,00±0,06	1,30±0,02
7	50,00±0,06	21,00±0,06	2,27±0,04

Tabela 23. Preparação das Soluções Padrão do Pesticida Pirimetanil para construção da recta de calibração pelo método *Full Scan*.

Padrão	V final (mL)	V inicial Solução Mãe (mL)	[Pirimetanil] (ppm)
1	100,0±0,1	0,125±0,001	0,0500±0,0006
2	100,0±0,1	0,250±0,003	0,100±0,001
3	100,0±0,1	0,500±0,005	0,200±0,003
4	50,00±0,06	0,625±0,006	0,500±0,007
5	50,00±0,06	1,30±0,03	1,04±0,03
6	50,00±0,06	3,80±0,03	3,04±0,04
7	50,00±0,06	8,75±0,05	7,04±0,08

3.3.2. Método *MS/MS*

Preparou-se 100,00 mL de Solução-Mãe para cada pesticida a ser estudado.

Os pesticidas Ciprodinil, Folpete, Metalaxil e Pirimetanil foram inicialmente dissolvidos em 12,00 mL de Etanol, e posteriormente perpez-se o volume com Água ultra-pura. Os restantes pesticidas, Benalaxil e Iprovalicarbe foram dissolvidos em Água ultra-pura, de seguida adicionou-se 12,00 mL de Etanol, e perpez-se o volume com Água ultra-pura.

Tabela 24. Preparação das Soluções-Mãe dos Pesticidas em estudo para a construção das Rectas de Calibração pelo método *MS/MS*.

Composto	V final (mL)	m (mg)	V (mL)	m Composto (mg)	[Composto], (ppm)
Ciprodinil	100,0±0,1			1,19±0,01	11,9±0,1
Folpete	100,0±0,1	2,35±0,01		1,128±0,005	11,28±0,02
Benalaxil	100,0±0,1	2,35±0,01		0,088±0,001	0,88±0,05
Pirimetanil	100,0±0,1		0,0100±0,0001		40,0±0,4

Tabela 25. Preparação das Soluções Padrão do Pesticida Ciprodinil para construção da recta de calibração pelo método *MS/MS*.

Padrão	V final (mL)	V inicial Solução Mãe (mL)	[Ciprodinil] (ppm)
1	100,0±0,1	0,080±0,001	0,0095±0,0001
2	100,0±0,1	0,170±0,002	0,0202±0,0003
3	100,0±0,1	0,250±0,003	0,0298±0,0004
4	50,00±0,06	0,170±0,002	0,0404±0,0006
5	50,00±0,06	0,250±0,003	0,0596±0,0008
6	50,00±0,06	0,335±0,003	0,080±0,001
7	50,00±0,06	0,420±0,004	0,100±0,001

Tabela 26. Preparação das Soluções Padrão do Pesticida Folpete para construção da recta de calibração pelo método *MS/MS*.

Padrão	V final (mL)	V inicial Solução Mãe (mL)	[Folpete] (ppm)
1	100,0±0,1	0,440±0,004	0,0497±0,0005
2	100,0±0,1	0,710±0,007	0,0802±0,0009
3	100,0±0,1	1,30±0,03	0,147±0,003
4	50,00±0,06	1,30±0,03	0,294±0,006
5	50,00±0,06	2,20±0,03	0,498±0,008
6	50,00±0,06	3,10±0,03	0,700±0,008
7	50,00±0,06	4,40±0,03	0,994±0,008

Tabela 27. Preparação das Soluções Padrão do Pesticida Benalaxil para construção da recta de calibração pelo método *MS/MS*.

Padrão	V final (mL)	V inicial Solução Mãe (mL)	[Benalaxil] (ppm)
1	100,0±0,1	0,440±0,004	0,0040±0,0004
2	100,0±0,1	0,710±0,007	0,0064±0,0004
3	100,0±0,1	1,30±0,03	0,012±0,001
4	50,00±0,06	1,30±0,03	0,023±0,002
5	50,00±0,06	2,20±0,03	0,040±0,004
6	50,00±0,06	3,10±0,03	0,056±0,006
7	50,00±0,06	4,40±0,03	0,079±0,008

Tabela 28. Preparação das Soluções Padrão do Pesticida Pirimetanil para construção da recta de calibração pelo método *MS/MS*.

Padrão	V final (mL)	V inicial Solução Mãe (mL)	[Pirimetanil] (ppm)
1	100,0±0,1	0,025±0,001	0,0100±0,0004
2	100,0±0,1	0,100±0,001	0,0400±0,0006
3	100,0±0,1	0,175±0,002	0,070±0,001
4	50,00±0,06	0,125±0,001	0,100±0,001
5	50,00±0,06	0,165±0,002	0,132±0,002
6	50,00±0,06	0,200±0,002	0,160±0,002
7	50,00±0,06	0,250±0,003	0,200±0,002

4. Procedimentos

4.1. Acondicionamento e Limpeza Térmica da Fibra de Microextracção

A fibra de microextracção utilizada neste trabalho deve ser acondicionada e limpa termicamente expondo a mesma ao injector do Cromatógrafo de Fase Gasosa aquecido a 250 °C durante 30 minutos. O método foi definido em modo split com um *ratio* elevado de modo a reduzir substancialmente a quantidade de impurezas que entram para a coluna, e depois do acondicionamento/limpeza térmica deve-se aumentar a temperatura do forno de modo a remover algum contaminante.

4.2. Extracção

4.2.1. *SPME-GC-MS* e Estudo da Força Iónica

Transferiu-se 10,00 mL de solução para um *vial*, que posteriormente foi fechado e colocado num banho a 45 °C. Iniciou-se a agitação da solução a 750 rpm e esperou-se que a temperatura se igualasse. Inseriu-se o dispositivo de *SPME* através do septo da tampa do *vial* e mergulhou-se a fibra na solução de modo a que esta se encontre afastada do vortex originado pela agitação. Esperou-se 30 minutos. Recolheu-se a fibra e retirou-se o dispositivo de *SPME*.

4.2.2. Estudo da Temperatura de Extracção

Transferiu-se 10,00 mL de solução para um *vial*, que posteriormente foi fechado e colocado num banho a 25, 35, 45 ou 55 °C, conforme a temperatura de extracção a ser estudada. Iniciou-se a agitação da solução a 750 rpm e esperou-se que a temperatura se igualasse. Inseriu-se o dispositivo de *SPME* através do septo da tampa do *vial* e mergulhou-se a fibra na solução de modo a que esta se encontre afastada do vortex originado pela agitação. Esperou-se 30 minutos. Recolheu-se a fibra e retirou-se o dispositivo de *SPME*.

4.2.3. Estudo do Tempo de Extração

Transferiu-se 10,00 mL de solução para um *vial*, que posteriormente foi fechado e colocado num banho a 35 °C. Iniciou-se a agitação da solução a 750 rpm e esperou-se que a temperatura se igualasse. Inseriu-se o dispositivo de *SPME* através do septo da tampa do *vial* e mergulhou-se a fibra na solução de modo a que esta se encontre afastada do vortex originado pela agitação. Esperou-se 20, 30 ou 40 minutos, conforme o tempo de extração a ser estudado. Recolheu-se a fibra e retirou-se o dispositivo de *SPME*.

4.2.4. Análise Quantitativa

Transferiu-se 10,00 mL de solução padrão para um *vial*, que posteriormente foi fechado e colocado num banho a 35 °C. Iniciou-se a agitação a 750 rpm e esperou-se que a temperatura se igualasse. Inseriu-se o dispositivo de *SPME* através do septo da tampa do *vial* e mergulhou-se a fibra na solução de modo a que esta se encontre afastada do vortex originado pela agitação. Esperou-se 30 minutos. Recolheu-se a fibra e retirou-se o dispositivo de *SPME*.

5. Condições de Análise

5.1. Estudos Prévios

5.1.1. GC-MS

- a) Método GC-MS 1:** as primeiras condições de análise para o método GC-MS utilizadas foram:

Fase Móvel: He 1 mL/min;

Injector: 270 °C, em modo *splitless*;

Programa de Temperatura: 80 °C durante 1 min, 10 °C/min até 270 °C, 270 °C durante 15 min;

Análise de Massa: 0-2 min *EI off*, 2-40 min *EI Auto-Full*, *Mass Range* 50-1000 m/z;

Corrente de Ionização: 10 µAmps.

- b) Método GC-MS 2:** as condições otimizadas de análise para o método GC-MS utilizadas foram:

Fase Móvel: He 1 mL/min;

Injector: 270 °C, em modo *splitless*;

Programa de Temperatura: 80 °C durante 1 min, 8 °C/min até 270 °C, 270 °C durante 10 min;

Análise de Massa: 0-2 min *EI off*, 2-35 min *EI Auto-Full*, *Mass Range* 50-1000 m/z;

Corrente de Ionização: 10 µAmps.

5.1.2. LC-MS

- a) Método LC-MS 1:** as primeiras condições de análise para o método LC-MS utilizadas foram:

Eluente: 50 % Metanol (com Ácido Acético 1 %) + 50 % Água (com Ácido Acético 1 %), no modo isocrático;

Fluxo do eluente: 0,300 mL/min;

Volume Injectado: 25 µL;

Análise de Massa: 0-1 min *ESI off*, 1-40 min *ESI Auto-Full*, Polaridade Positiva;

Mass Range 50-1000 m/z;

Temperatura do Capilar: 300 °C;

Fluxo de Gás Auxiliar: 15 mL/min;

Fluxo de Gás de Varrimento: 5 mL/min;

Fluxo de Gás de Cortina: 70 mL/min;
Potencial da Fonte: 5 kV;
Potencial do Capilar: 41 V;
Corrente da Fonte: 100 mA.

b) Método *LC-MS 2*: as condições de análise optimizadas para o método LC-MS utilizadas foram:

Eluente: 80 % Metanol (com Ácido Acético 1 %) + 20 % Água (com Ácido Acético 1 %), no modo isocrático;
Fluxo do eluente: 0,400 mL/min;
Volume Injectado: 25 µL;
Análise de Massa: 0-1 min *ESI off*, 1-25 min *ESI Auto-Full*, Polaridade Positiva;
Mass Range 50-1000 m/z;
Temperatura do Capilar: 300 °C;
Fluxo de Gás Auxiliar: 15 mL/min;
Fluxo de Gás de Varrimento: 5 mL/min;
Fluxo de Gás de Cortina: 70 mL/min;
Potencial da Fonte: 5 kV;
Potencial do Capilar: 41 V;
Corrente da Fonte: 100 mA.

5.2. Condições de Análise utilizadas para a construção das Rectas de Calibração em *GC-MS*

5.2.1. Método *Full Scan*

O método de análise *GC-MS* utilizado foi o Método *GC-MS 2* descrito em **5.1.b**:

Tabela 29. Parâmetros de identificação utilizados nas análises efectuadas pelo método *Full Scan*.

Composto	Tempo de Retenção (min)	Pico Base (m/z)	Outros Picos (m/z)
Ciprodinil	19,5	225	226
Metalaxil	17,8	206	160
Folpete	20,1	260	130
Benalaxil	22,7	148	91
Iprovalicarbe	21,1	134	116
Pirimetanil	16,5	198	199

5.2.2. Método AMD

A optimização das condições de ionização foi realizada para cada composto individualmente, para uma corrente de ionização de 20 μ Amps e *Excitation Storage Levels* calculados automaticamente pelo *software* para o parâmetro de Mathieu *q value* = 0,4 uma vez que, segundo o manual de instruções do equipamento, este valor proporciona os melhores resultados para a obtenção de iões filhos para a maioria dos compostos.

Tabela 30. Parâmetros escolhidos para a optimização das condições de ionização para as análises a efectuar pelo método *MS/MS*.

Composto	Precursor Ion (m/z)	Ionization Storage Level (m/z)	Isolation Window (m/z)	WaveForm Type	Excitation Storage Level (m/z)	Excitation Amplitude (V)
Ciprodinil	225	35	3,0	<i>Ressonant</i>	99,1	0,10-1,00
Ciprodinil	225	35	3,0	<i>Ressonant</i>	99,1	1,10-2,00
Metalaxil	206	35	3,0	<i>Ressonant</i>	90,7	0,10-1,00
Folpete	260	35	3,0	<i>Ressonant</i>	114,5	0,10-1,00
Benalaxil	148	35	3,0	<i>Ressonant</i>	65,2	0,10-1,00
Iprovalicarbe	134	35	3,0	<i>Ressonant</i>	59,0	0,10-1,00
Pirimetanil	198	35	3,0	<i>Ressonant</i>	87,2	0,10-1,00

5.2.3. Método *MS/MS*

Método *GC-MS/MS* 1: As condições de análise para o método *GC-MS/MS* utilizadas foram:

Fase Móvel: He 1 mL/min;

Injector: 270 °C, em modo *splitless*;

Programa de Temperatura: 80 °C durante 1 min, 8 °C/min até 270 °C, 270 °C durante 10 min;

Análise de Massa: 0-2 min *El off*, 2-35 min *El MS/MS*, *Mass Range* 50-1000 m/z;

Corrente de Ionização: 20 µAmps.

Tabela 31. Parâmetros escolhidos para as análises efectuadas pelo método *MS/MS*.

Composto	Precursor Ion (m/z)	Ionization Storage Level (m/z)	Isolation Window (m/z)	WaveForm Type	Excitation Storage Level (m/z)	Excitation Amplitude (V)	Product Ion Start Mass (m/z)	Product Ion End Mass (m/z)
Ciprodinil	225	35	3,0	<i>Ressonant</i>	99,1	1,60	99	235
Metalaxil	206	35	3,0	<i>Ressonant</i>	90,7	0,40	115	216
Folpete	260	35	3,0	<i>Ressonant</i>	114,5	0,60	115	270
Benalaxil	148	35	3,0	<i>Ressonant</i>	65,2	0,44	115	158
Iprovalicarbe	134	35	3,0	<i>Ressonant</i>	59,0	0,36	73	144
Pirimetanil	198	35	3,0	<i>Ressonant</i>	87,2	0,80	115	208

Tabela 32. Parâmetros de identificação utilizados nas análises efectuadas pelo método *MS/MS*.

Composto	Tempo de Retenção (min)	Pico Base (m/z)	Outros Picos (m/z)
Ciprodinil	19,0	208	209; 222
Metalaxil	17,3	162	132; 207
Folpete	19,6	232	262; 200
Benalaxil	22,2	133	149; 119
Iprovalicarbe	20,6	93	134; 135
Pirimetanil	15,9	183	197; 157

Nota: Para as análises pelo método *MS/MS* os tempos de retenção são ligeiramente diferentes devido a uma mudança necessária no equipamento, nomeadamente, a eliminação de uma válvula da interface *GC-MS* que foi retirada devido ao seu mal funcionamento.

Capítulo IV

Apresentação e Discussão dos Resultados

1. Condições Experimentais

Tendo em conta os métodos reportados na literatura, construiu-se um método de análise inicial com as condições especificadas na Tabela 33.

Tabela 33. Condições de Análise iniciais pelo método *SPME-GC-MS*.

Condições de Extração	Condições Cromatográficas
<i>SPME PDMS</i> 100 μm ;	Método <i>GC-MS</i> 1
10,00 mL de Solução Padrão degaseificada,	
Saturada em MgSO_4 , 30 min a 45°C.	

Primeiramente foi efectuada uma extracção e análise do solvente (Água/Etanol 12 %), para verificação da linha de base. Obteve-se uma linha de base adequada, como se pode verificar pela Figura 19, e prosseguiu-se com o trabalho.

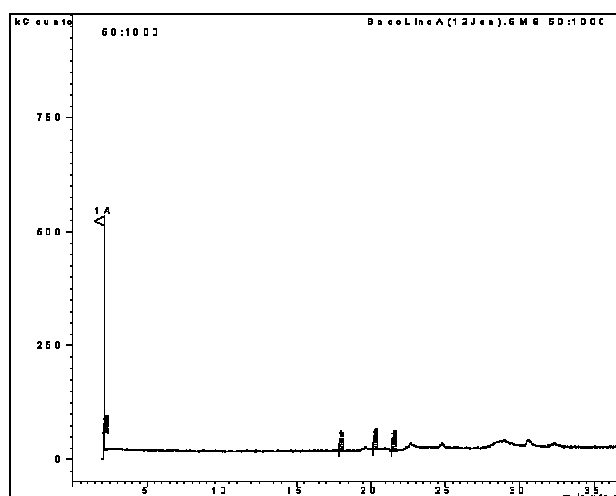


Figura 19. Cromatograma obtido pela análise do solvente utilizado durante este trabalho (Água/Etanol 12 %) – linha de base.

Procedeu-se à extracção e análise de amostras de vinhos e verificou-se que com as condições cromatográficas utilizadas existiam algumas co-eluições de compostos, e que para tempos de retenção maiores a 25 minutos não havia eluição de compostos (Figura 20). Verificou-se, também que, no caso de amostras de vinho, a fibra não deve ser retirada do injector ao fim de 3 minutos, como descrito na maioria de trabalhos desenvolvidos e publicados. Optou-se por não se retirar a fibra durante os primeiros 15 minutos para garantir que todos os compostos eram dessorvidos.

Fizeram-se algumas modificações às condições de análise, nomeadamente ao programa de temperatura do forno, de modo a melhorar a separação de compostos. As novas condições de análise estão especificadas na Tabela 34.

Tabela 34. Condições de Análise melhoradas pelo método SPME-GC-MS.

Condições de Extração	Condições Cromatográficas
SPME PDMS 100 μ m; 10,00 mL de Solução Padrão desgaseificada, Saturada em MgSO ₄ , 30 min a 45°C.	Método GC-MS 2

Procedeu-se à análise do mesmo vinho pelo novo método e verificou-se que as co-eluições existentes eram desprezáveis. Assim prosseguiu-se o trabalho com estas condições.

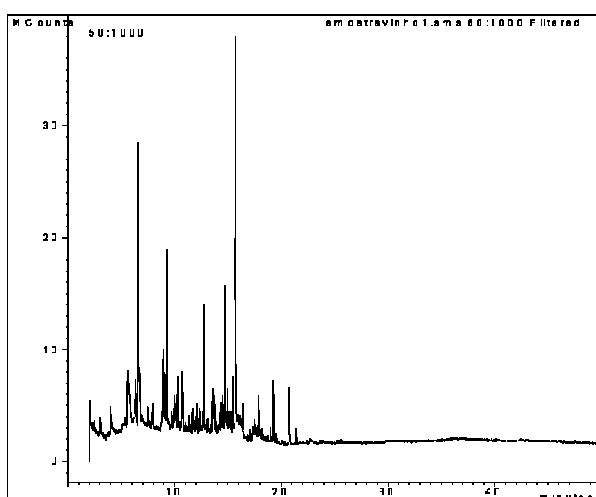


Figura 20. Cromatograma obtido pela análise de uma amostra de vinho com as condições experimentais iniciais.

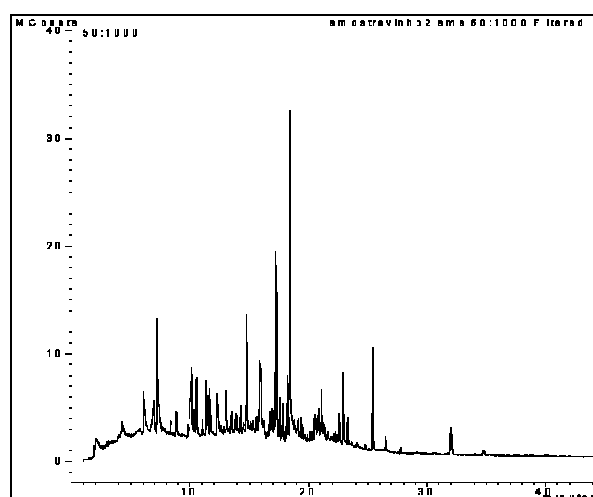


Figura 21. Cromatograma obtido pela análise de uma amostra de vinho com as condições experimentais melhoradas.

2. Pesticidas de Interesse

Inicialmente, foi obtida uma lista de compostos de acção pesticida com interesse para analisar. Após uma pequena pesquisa bibliográfica sobre estes, verificou-se que nem todos poderiam ser submetidos a este estudo por terem forma polimérica. Posteriormente, decidiu-se, por razões de limitação de tempo, utilizar para este estudo, os restantes pesticidas presentes nessa mesma lista e que estariam presentes em amostras de vinho.

Para decidir os pesticidas a estudar, foram analisadas 6 amostras de vinhos brancos diferentes.

Após análise dos picos cromatográficos de cada cromatograma obtido a partir das amostras de vinho branco foram identificados os 6 pesticidas utilizados neste estudo: Ciprodinil, Folpete, Metalaxil, Benalaxil, Iprovalicarbe e Pirimetanil. A atribuição dos picos foi realizada de acordo com a biblioteca de espectros e/ou confirmada pela análise dos respectivos espectros de massa. Para alguns picos presentes nos espectros de massa dos compostos foi sugerido um possível mecanismo de fragmentação com o apoio de um programa informático "*Mass Frontier 1.0*" fornecido pela *Thermo LQX*.

Foi necessário utilizar um padrão interno para a realização de alguns estudos, tendo sido escolhido o pesticida Dieldrine para tal finalidade.

Procedeu-se à optimização das condições de ionização de modo a poder analisar-se o composto pelo método *MS/MS*. A optimização foi realizada para um *q value* = 0,4 uma vez que, segundo o manual de intruções do equipamento, este valor proporciona os melhores resultados para a obtenção de iões filhos para a maioria dos compostos.

2.1. Pesticida Ciprodinil

O Pesticida Ciprodinil foi identificado em uma das amostras de vinho analisadas. A atribuição dos picos foi realizada de acordo com bibliografia consultada e confirmada pela análise dos respectivos espectros de massa e pela biblioteca de espectros disponível no *software*, tendo, este pesticida, sido identificado pela presença de iões com *m/z* 225 e 224.

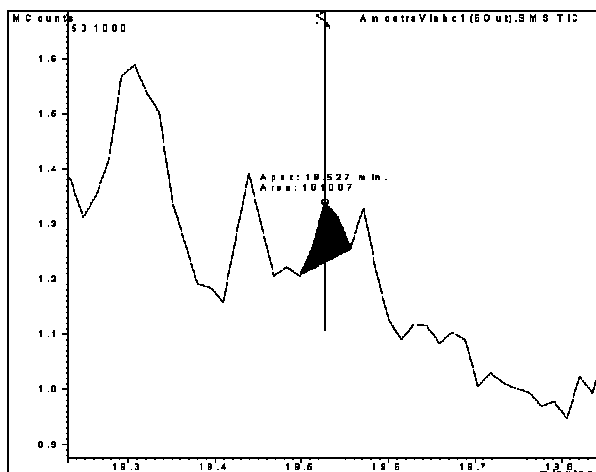


Figura 22. Cromatograma de um vinho fortificado com Ciprodinil, onde inicialmente se identificou o mesmo pesticida (*GC-MS Full*).

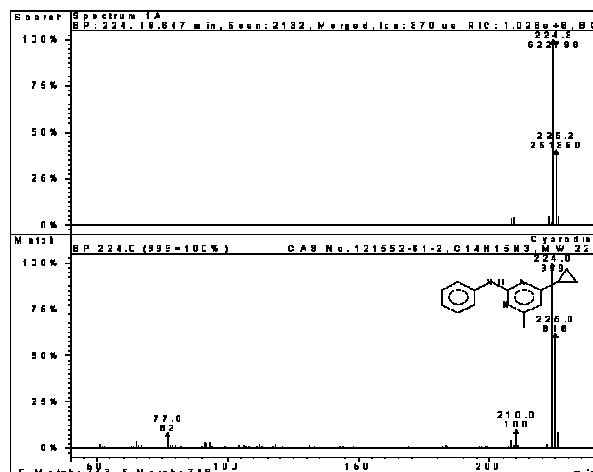


Figura 23. Espectro de massa obtido para o composto eluído no pico anteriormente destacado (Figura 22.) – Ciprodinil (cima); e Espectro de massa presente na Biblioteca de espectros de massa para o mesmo composto (baixo).

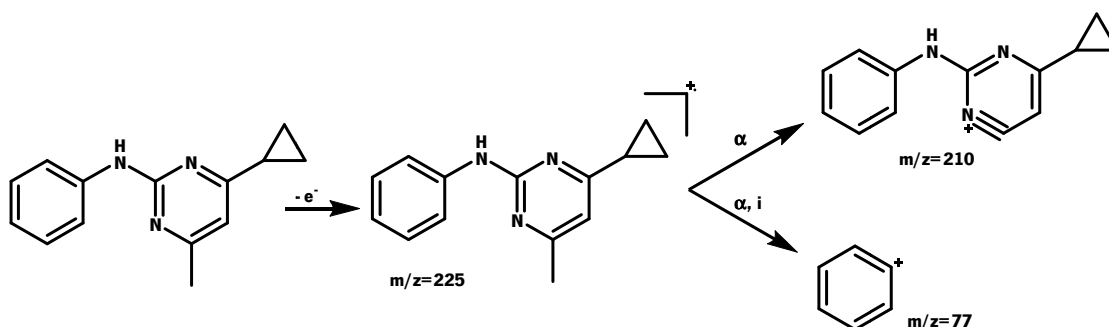


Figura 24. Mecanismo de Fragmentação sugerido para o composto Ciprodinil.

Na otimização das condições de ionização, o *software* calculou, automaticamente, o *Excitation Storage Level*, e depois de uma série de análises (*AMD*) verificou-se que a *Excitation Amplitude* óptima para o Ciprodinil é 1,60 V.

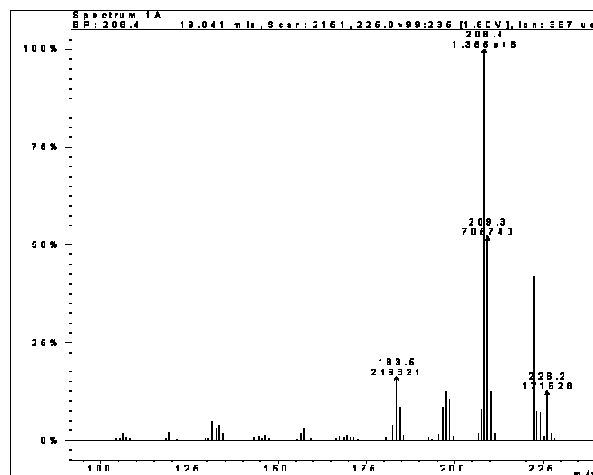
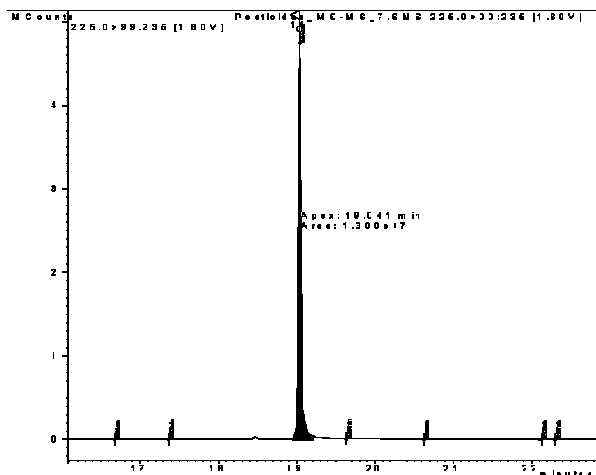


Figura 25. Cromatograma de um vinho fortificado com Ciprodinil, onde inicialmente se identificou o mesmo pesticida (*GC-MS/MS*).

Figura 26. Espectro de massa obtido para o composto eluído no pico anteriormente destacado (Figura 25.) – Ciprodinil.

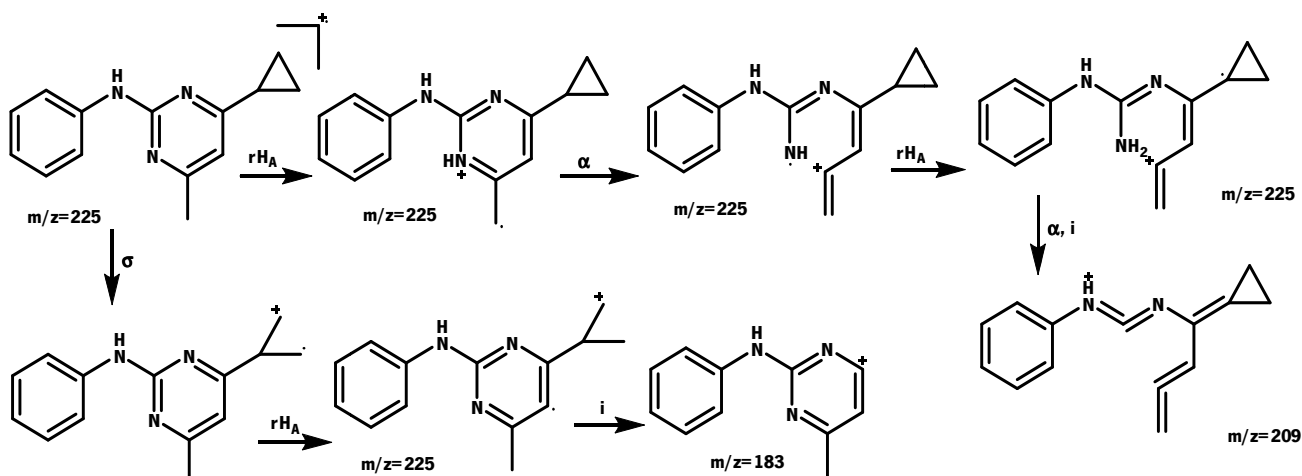


Figura 27. Mecanismo de Fragmentação sugerido para os novos picos obtidos por *MS/MS* para o composto Ciprodinil.

2.2. Pesticida Metalaxil

2.2.1. GC-MS

O Pesticida Metalaxil foi identificado em uma das amostras de vinho analisadas. A atribuição dos picos foi realizada de acordo com bibliografia consultada e confirmada pela análise dos respectivos espectros de massa e pela biblioteca de espectros disponível no *software*, tendo, este pesticida, sido identificado pela presença de iões com m/z 206 e 160.

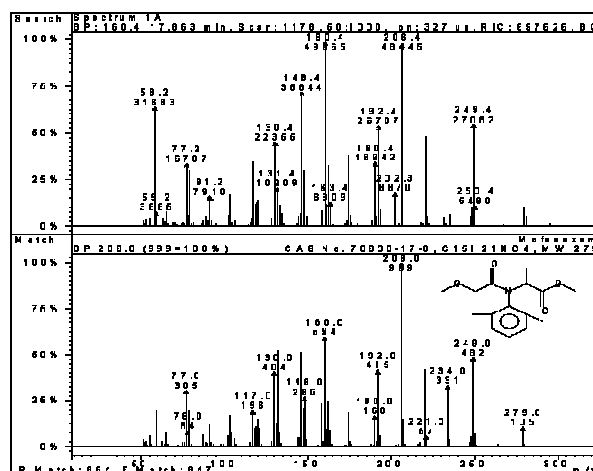
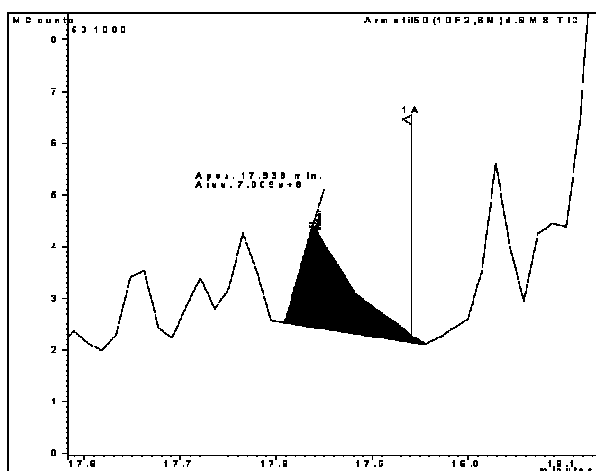


Figura 28. Cromatograma de um vinho fortificado com Metalaxil, onde inicialmente se identificou o mesmo pesticida (*GC-MS Full*).

Figura 29. Espectro de massa obtido para o composto eluído no pico anteriormente destacado (Figura 28.) – Metalaxil (cima); e Espectro de massa presente na Biblioteca de espectros de massa para o mesmo composto (baixo).

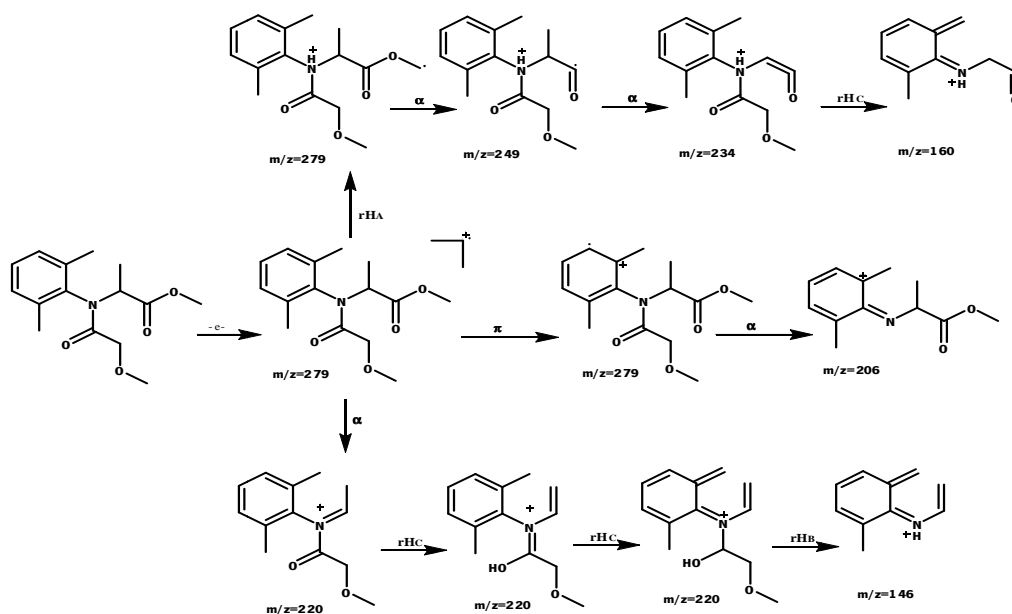


Figura 30. Mecanismo de Fragmentação sugerido para o composto Metalaxil.

Na otimização das condições de ionização, o *software* calculou o *Excitation Storage Level*, e depois de uma série de análises (*AMD*) verificou-se que a *Excitation Amplitude* óptima para o Metalaxil é 0,40 V.

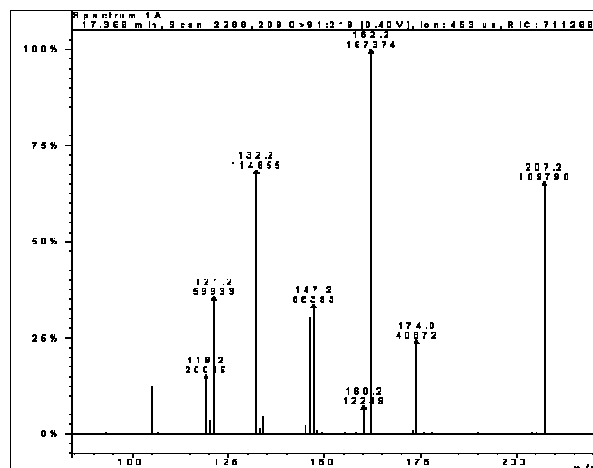
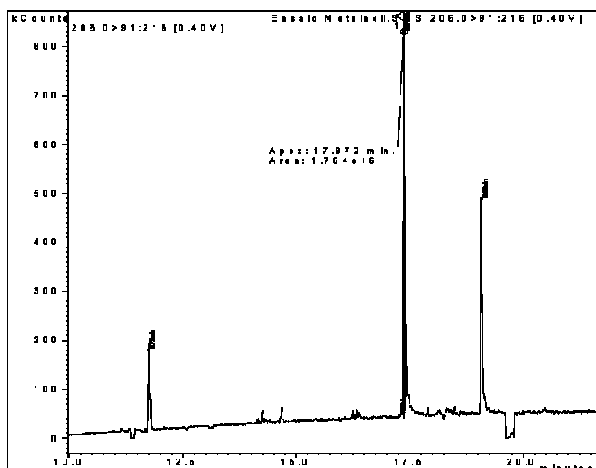


Figura 31. Cromatograma de um vinho fortificado com Metalaxil, onde inicialmente se identificou o mesmo pesticida (*GC-MS/MS*).

Figura 32. Espectro de massa obtido para o composto eluído no pico anteriormente destacado (Figura 31.) – Metalaxil.

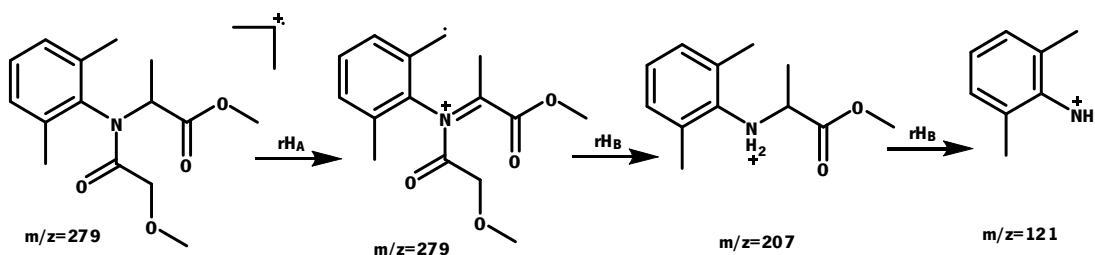


Figura 33. Mecanismo de Fragmentação sugerido para alguns dos novos picos obtidos por *MS/MS* para o composto Metalaxil.

2.2.2. LC-MS

O Pesticida Metalaxil foi identificado em uma das amostras de vinho analisadas. A atribuição dos picos foi realizada de acordo com a análise do respectivo espectro de massa, tendo, este pesticida, sido identificado pela presença de iões com $m/z\ 280 \Rightarrow [M+H]^+$. O composto de interesse foi co-eluído com outros compostos desconhecidos os quais não foi possível serem separados.

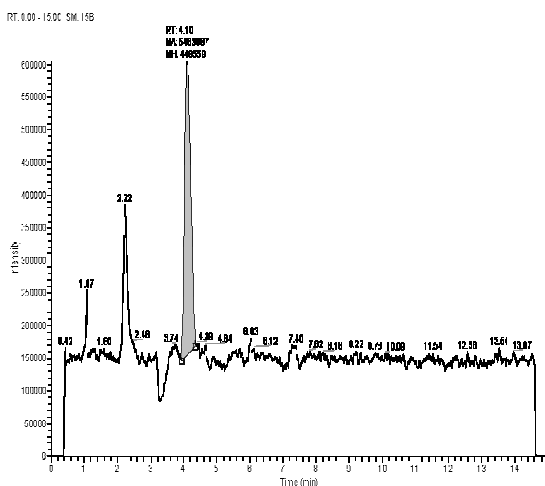


Figura 34. Cromatograma de uma mistura comercial de pesticidas com um pico destacado que foi identificado como pertencendo ao pesticida Metalaxil.

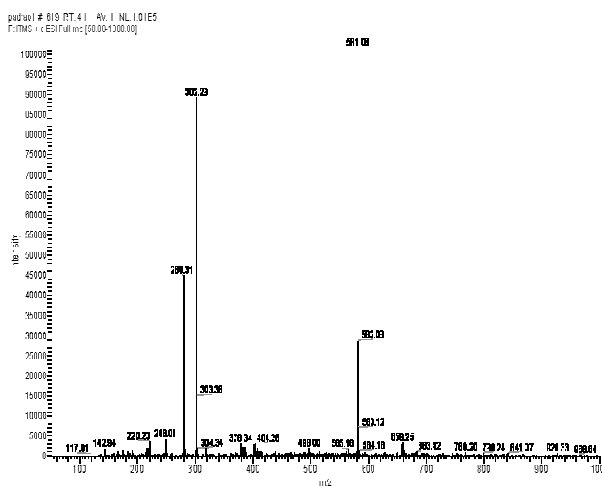


Figura 35. Espectro de massa obtido para o composto eluído no pico anteriormente destacado (Figura 34.) – Metalaxil.

2.3. Pesticida Folpete

O Pesticida Folpete foi identificado em uma das amostras de vinho analisadas. A atribuição dos picos foi realizada de acordo com bibliografia consultada e confirmada pela análise dos respectivos espectros de massa e pela biblioteca de espectros disponível no *software*, tendo, este pesticida, sido identificado pela presença de íões com m/z 260 e 130.

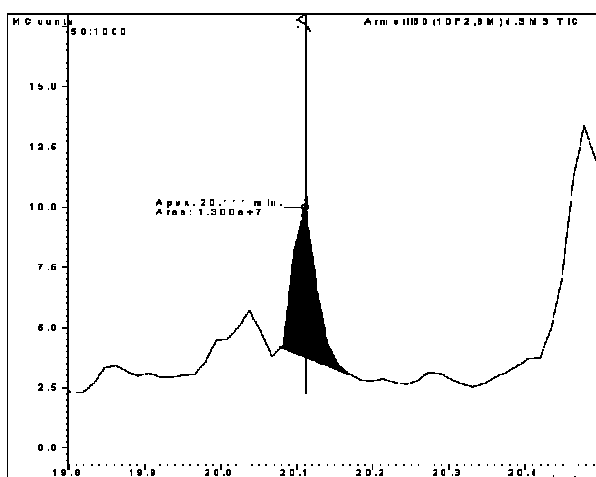


Figura 36. Cromatograma de um vinho fortificado com Folpete, onde inicialmente se identificou o mesmo pesticida (*GC-MS Full*).

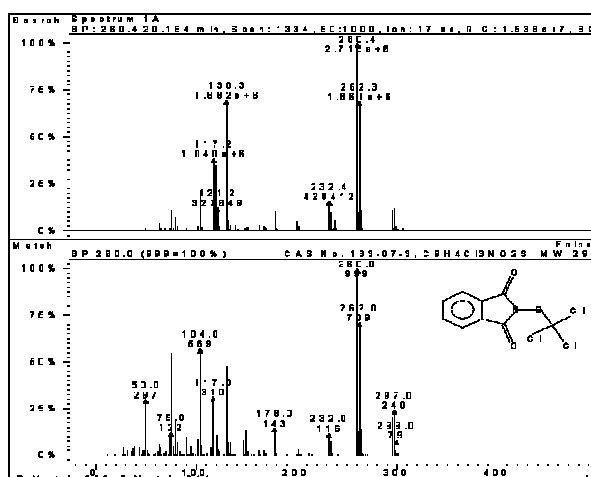


Figura 37. Espectro de massa obtido para o composto eluído no pico anteriormente destacado (Figura 36.) –Folpete (cima); e Espectro de massa presente na biblioteca de espectros de massa para o mesmo composto (baixo).

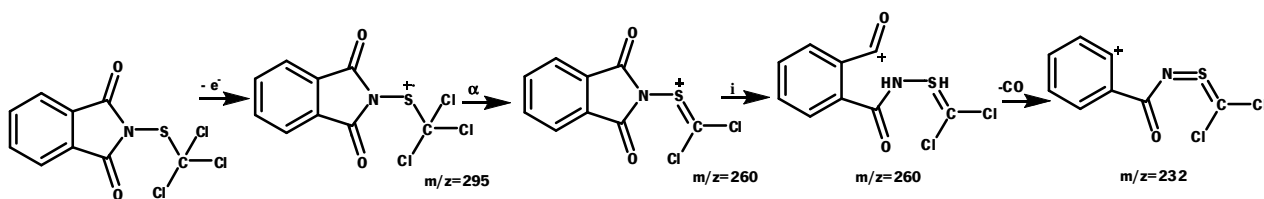


Figura 38. Mecanismo de Fragmentação sugerido para o composto Folpete.

Na otimização das condições de ionização, o *software* calculou o *Excitation Storage Level*, e depois de uma série de análises (*AMD*) verificou-se que a *Excitation Amplitude* óptima para o Folpete é 0,60 V.

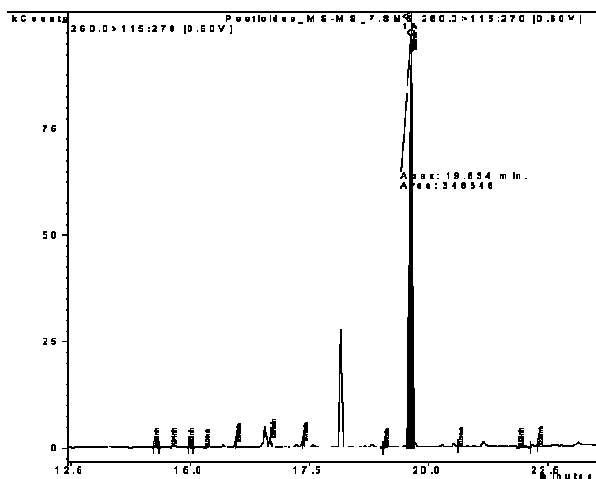


Figura 39. Cromatograma de um vinho fortificado com Folpete, onde inicialmente se identificou o mesmo pesticida (*GC-MS/MS*).

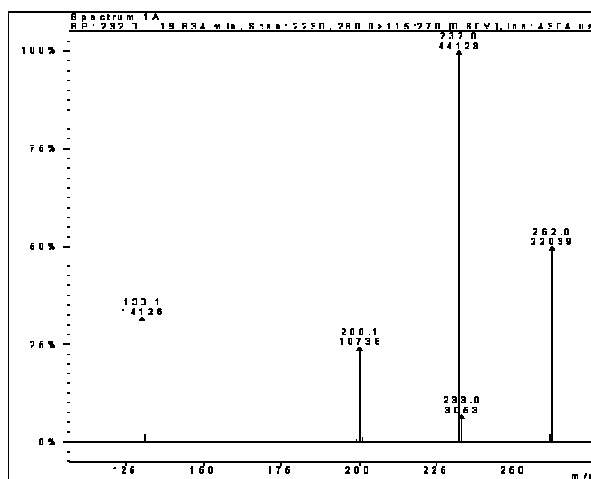


Figura 40. Espectro de massa obtido para o composto eluído no pico anteriormente destacado (Figura 39.) – Folpete.

O mecanismo de fragmentação pelo qual se origina o pico base do espectro de massa da Figura 40 já foi representado anteriormente na Figura 38.

2.4. Pesticida Benalaxil

O Pesticida Benalaxil foi identificado em três das amostras de vinho analisadas. A atribuição dos picos foi realizada de acordo com bibliografia consultada e confirmada pela análise dos respectivos espectros de massa e pela biblioteca de espectros disponível no *software*, tendo, este pesticida, sido identificado pela presença de iões com m/z 148 e 91.

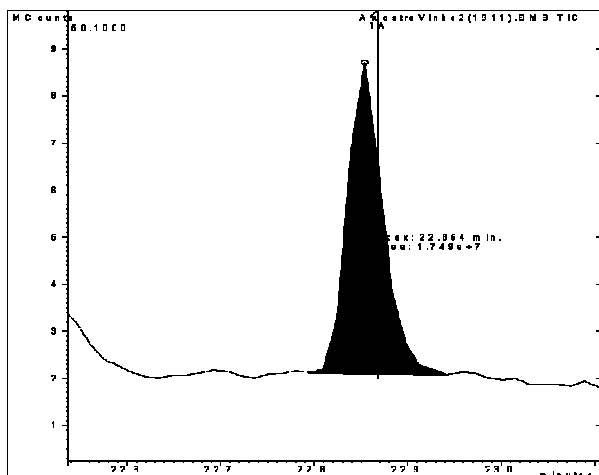


Figura 41. Cromatograma de um vinho fortificado com Benalaxil, onde inicialmente se identificou o mesmo pesticida (*GC-MS Full*).

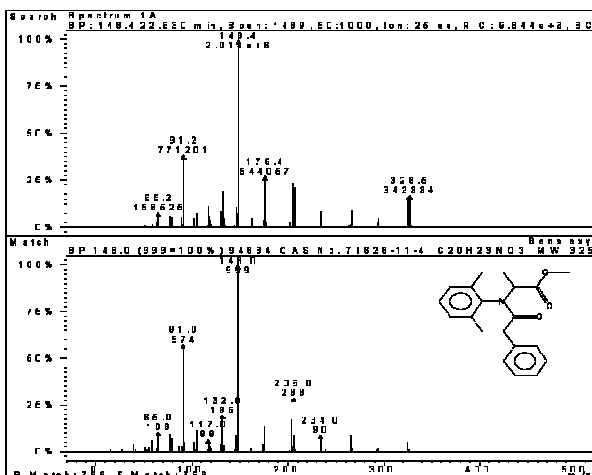


Figura 42. Espectro de massa obtido para o composto eluído no pico anteriormente destacado (Figura 41.) – Benalaxil (cima); e Espectro de massa presente na Biblioteca de espectros de massa para o mesmo composto (baixo).

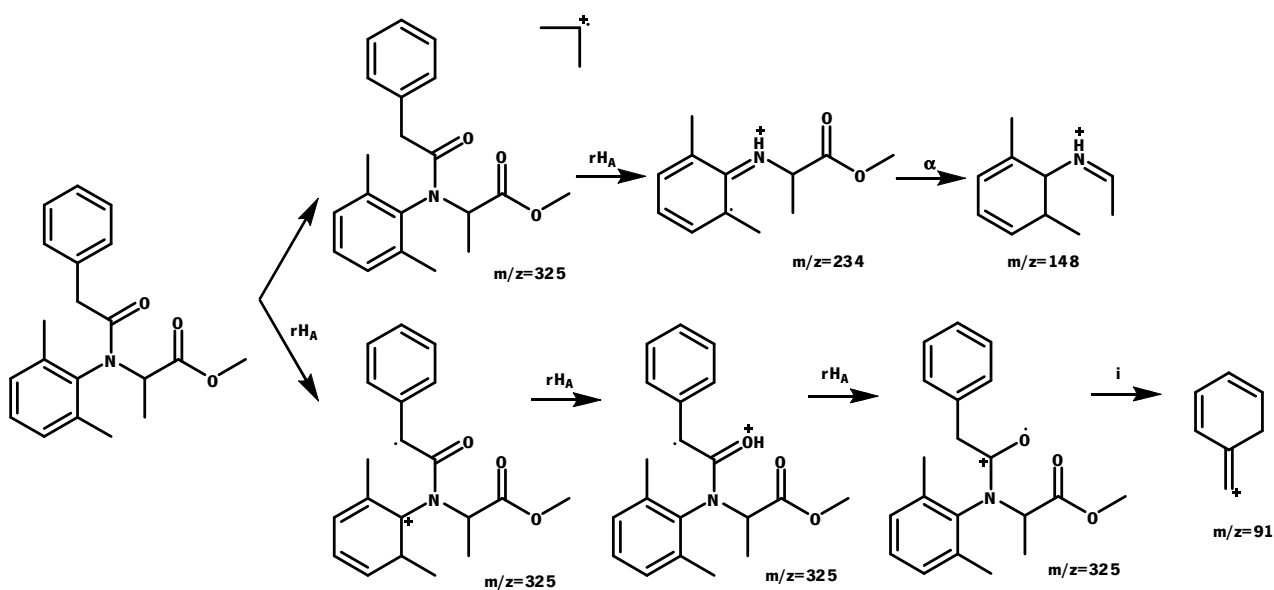


Figura 43. Mecanismo de Fragmentação sugerido para o composto Benalaxil.

Na optimização das condições de ionização, o *software* calculou o *Excitation Storage Level*, e depois de uma série de análises (*AMD*) verificou-se que a *Excitation Amplitude* óptima para o Benalaxil é 0,44 V.

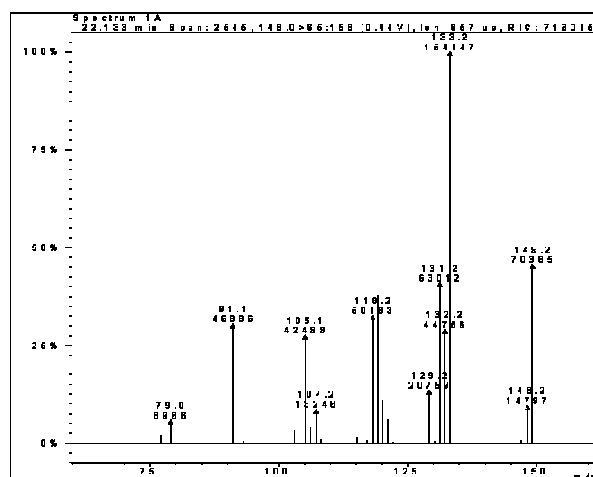
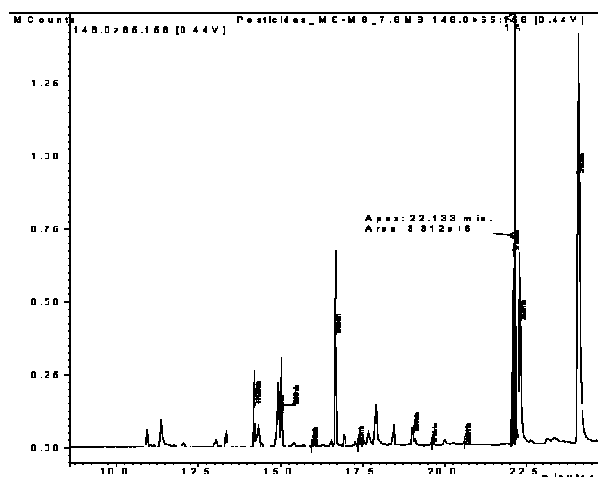


Figura 44. Cromatograma de um vinho fortificado com Benalaxil, onde inicialmente se identificou o mesmo pesticida (*GC-MS/MS*).

Figura 45. Espectro de massa obtido para o composto eluído no pico anteriormente destacado (Figura 44.) – Benalaxil.

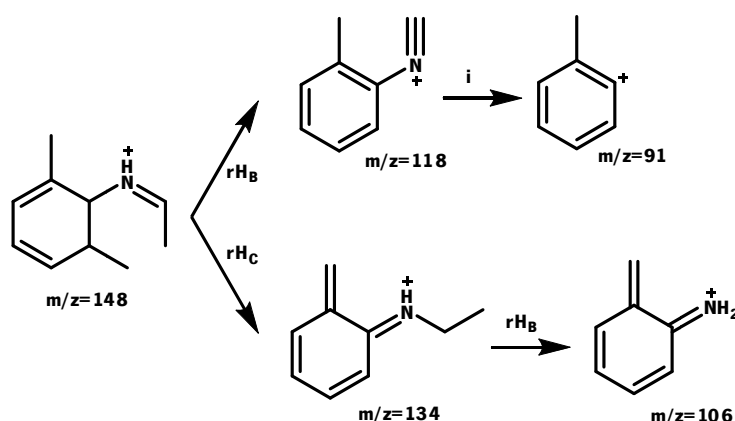


Figura 46. Mecanismo de Fragmentação sugerido para um dos novos picos obtidos por *MS/MS* para o composto Benalaxil.

2.5. Pesticida Iprovalicarbe

O Pesticida Iprovalicarbe foi identificado em uma das amostras de vinho analisadas. A atribuição dos picos foi realizada de acordo com bibliografia consultada e confirmada pela análise dos respectivos espectros de massa, tendo, este pesticida, sido identificado pela presença de íões com m/z 134 e 116.

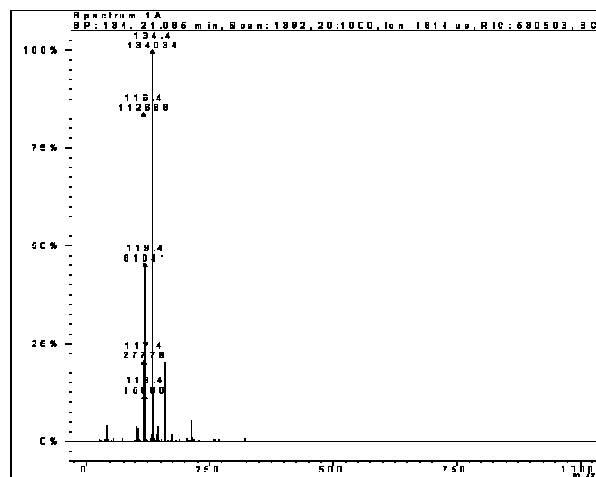
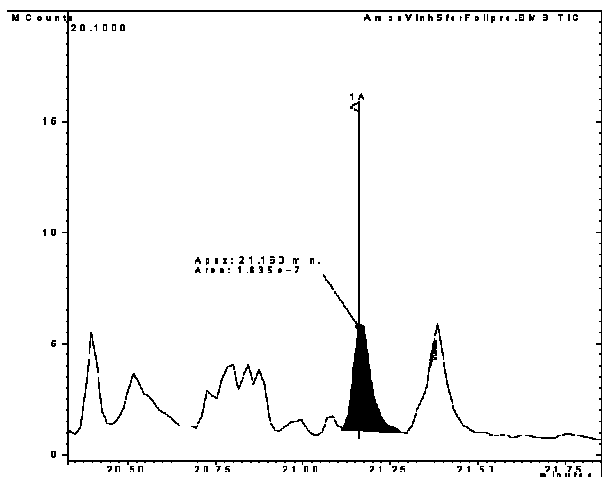


Figura 47. Cromatograma de um vinho fortificado com Iprovalicarbe, onde inicialmente se identificou o mesmo pesticida (*GC-MS Full*).

Figura 48. Espectro de massa obtido para o composto eluído no pico anteriormente destacado (Figura 47.) – Iprovalicarbe.

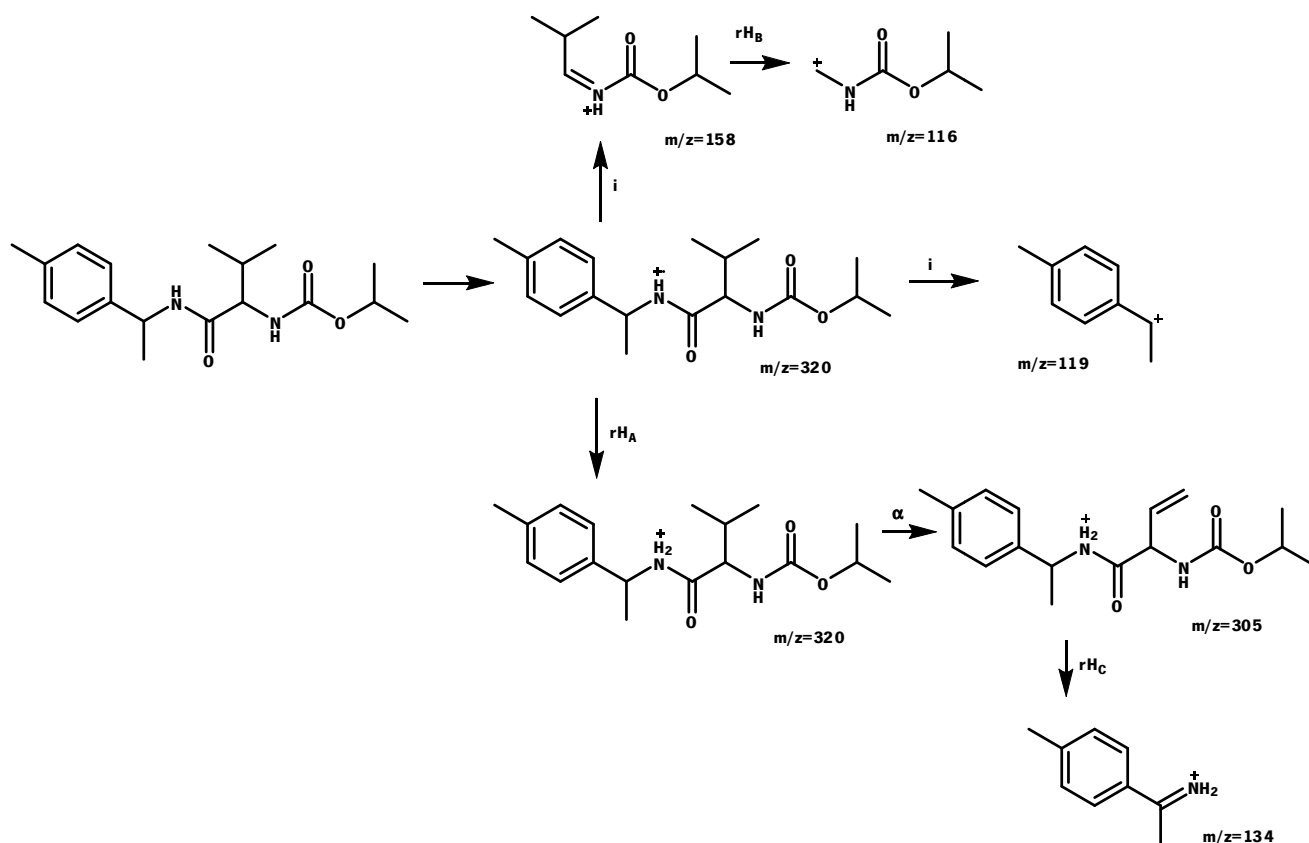


Figura 49. Mecanismo de Fragmentação sugerido para o composto Iprovalicarbe.

Na optimização das condições de ionização, o *software* calculou o *Excitation Storage Level*, e depois de uma série de análises (*AMD*) verificou-se que a *Excitation Amplitude* óptima para o Iprovalicarbe é 0,36 V.

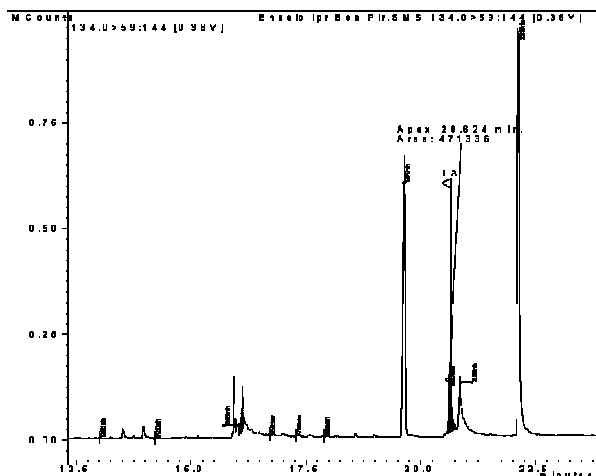


Figura 50. Cromatograma de um vinho fortificado com Iprovalicarbe, onde inicialmente se identificou o mesmo pesticida (*GC-MS/MS*).

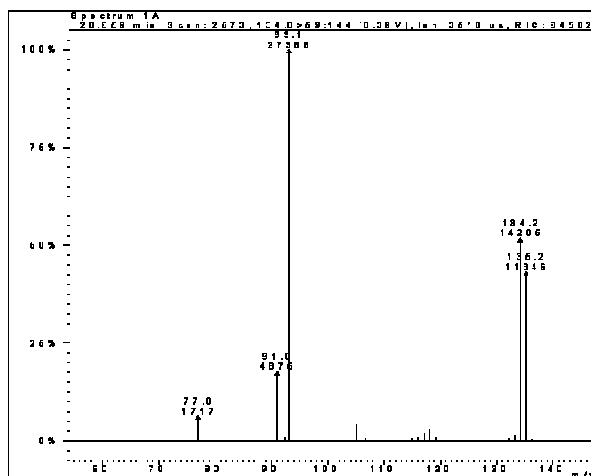


Figura 51. Espectro de massa obtido para o composto eluído no pico anteriormente destacado (Figura 46.) – Iprovalicarbe.

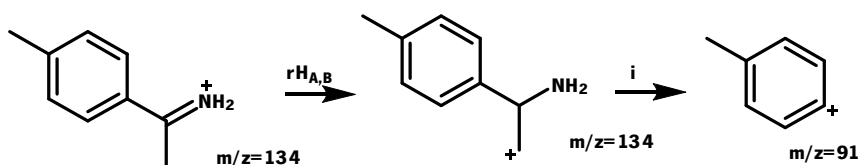


Figura 52. Mecanismo de Fragmentação sugerido para um dos novos picos obtidos por *MS/MS* para o composto Iprovalicarbe.

2.6. Pesticida Pirimetanil

O Pesticida Pirimetanil foi identificado em cinco das amostras de vinho analisadas. A atribuição dos picos foi realizada de acordo com bibliografia consultada e confirmada pela análise dos respectivos espectros de massa, tendo, este pesticida, sido identificado pela presença de iões com m/z 198 e 199.

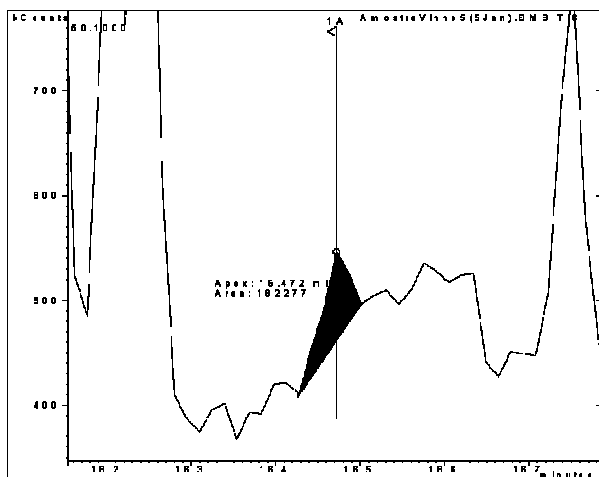


Figura 53. Cromatograma de um vinho fortificado com Pirimetanil, onde inicialmente se identificou o mesmo pesticida (*GC-MS Full*).

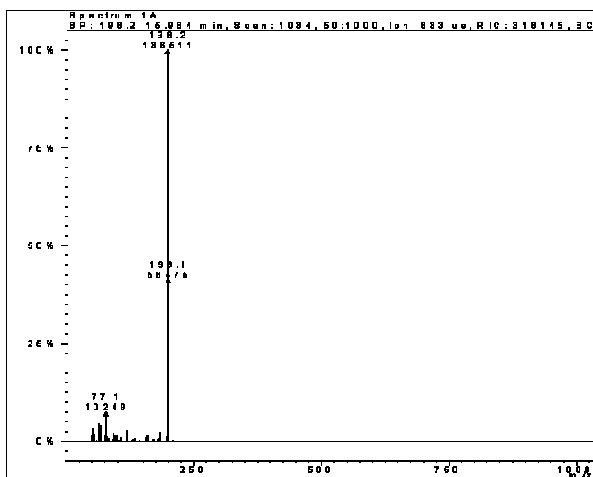


Figura 54. Espectro de massa obtido para o composto eluído no pico anteriormente destacado (Figura 53.) – Pirimetanil.

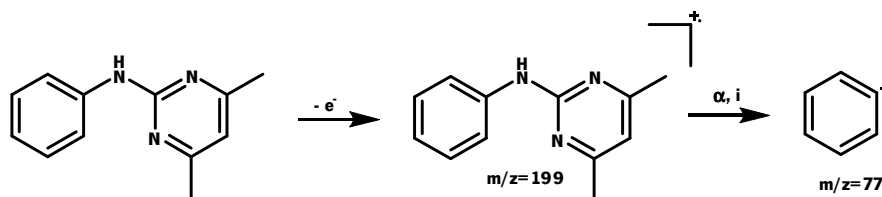


Figura 55. Mecanismo de Fragmentação sugerido para o composto Pirimetanil.

Na otimização das condições de ionização, o *software* calculou o *Excitation Storage Level*, e depois de uma série de análises (*AMD*) verificou-se que a *Excitation Amplitude* óptima para o Pirimetanil é 0,80 V.

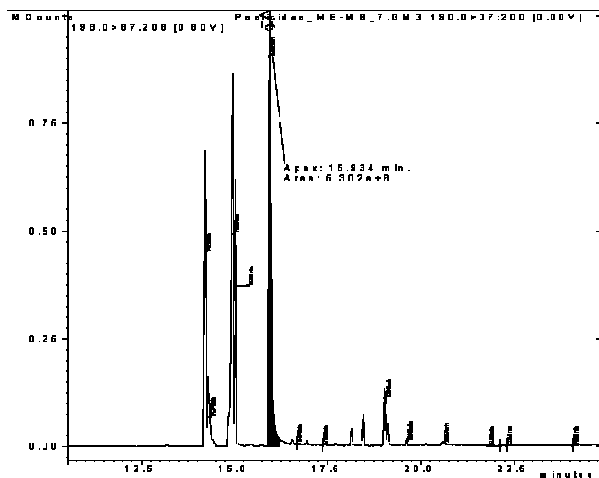


Figura 56. Cromatograma de um vinho fortificado com Pirimetanil, onde inicialmente se identificou o mesmo pesticida (*GC-MS/MS*).

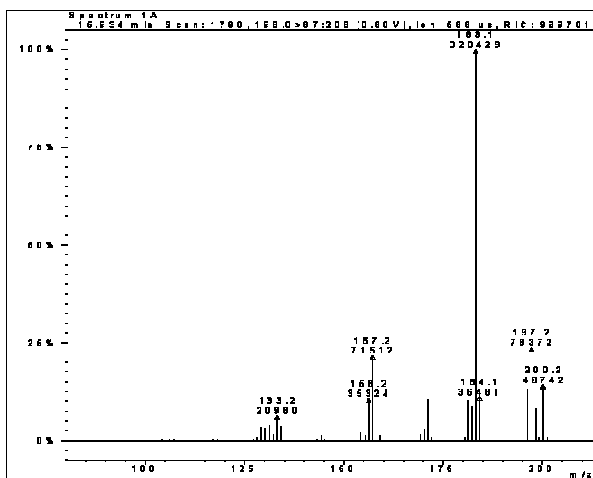


Figura 57. Espectro de massa obtido para o composto eluído no pico anteriormente destacado (Figura 56.) – Pirimetanil.

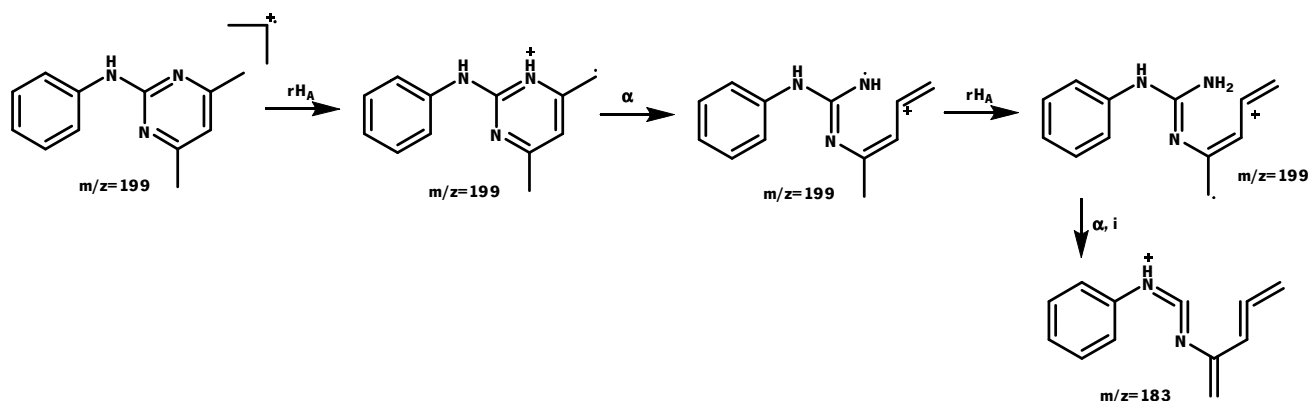


Figura 58. Mecanismo de Fragmentação sugerido para o pico base obtido por *MS/MS* para o composto Pirimetanil.

2.7. Pesticida Dieldrine

O Pesticida Dieldrine foi utilizado como padrão interno neste estudo. A atribuição dos picos foi realizada de acordo com bibliografia consultada e confirmada pela análise dos respectivos espectros de massa e pela biblioteca de espectros disponível no software, tendo, este pesticida, sido identificado pela presença de iões com m/z 279, 264 e 81. Este composto é eluído aos 21,4 minutos, o que significa que não há co-eluição com o pesticida (Metalaxil) para o qual este foi utilizado como padrão interno.

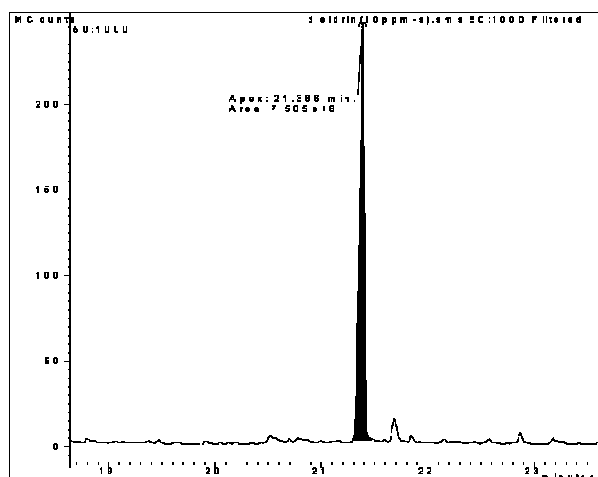


Figura 59. Cromatograma de uma solução padrão de pesticida Dieldrine (*GC-MS Full*).

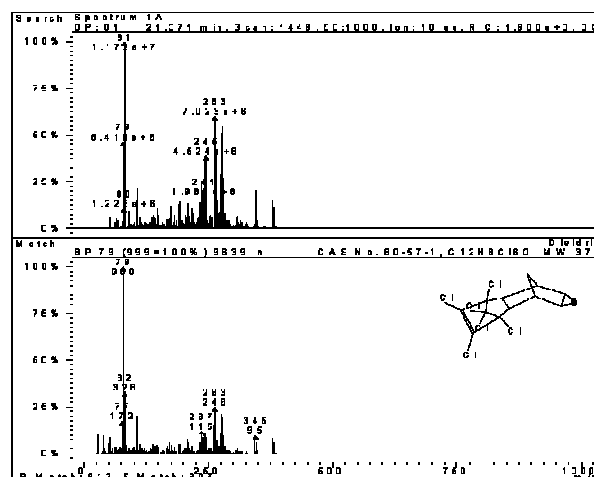


Figura 60. Espectro de massa obtido para o composto eluído no pico anteriormente destacado (Figura 59) – Dieldrine (cima); e Espectro de massa presente na Biblioteca de espectros de massa para o mesmo composto (baixo).

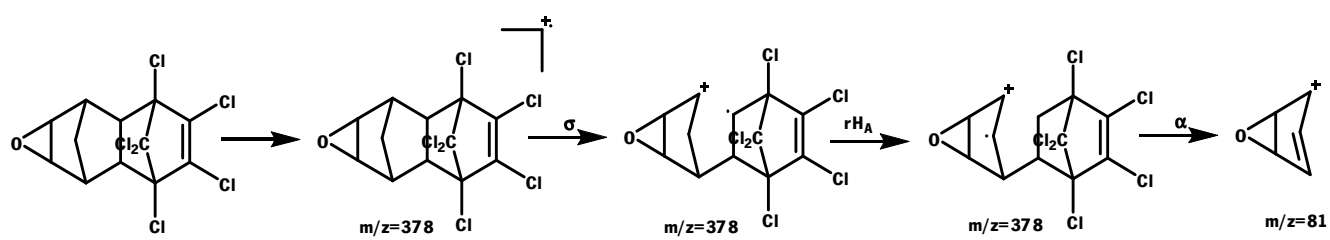


Figura 61. Mecanismo de Fragmentação sugerido para o pico base obtido para o composto Dieldrine.

3. Estudos Prévios

Antes de se proceder ao desenvolvimento do método analítico propriamente dito, fizeram-se alguns estudos com um dos pesticidas de interesse (Metalaxil), nomeadamente a comparação entre o uso do método *GC-MS* e *LC-MS*, e a utilização da técnica do padrão externo ou padrão interno na construção da recta de calibração. As condições experimentais já foram descritas anteriormente (Capítulo III, 3.1).

3.1. *SPME-GC-MS (PE)*

O primeiro estudo a ser efectuado foi o pesticida Metalaxil por *SPME-GC-MS* em que a recta de calibração foi construída pelo método do padrão externo, e foram obtidos os resultados apresentados na Folha de Cálculo 1. Com este tratamento de resultados obteve-se uma correlação linear com um coeficiente de 0,9978 e limites de detecção e quantificação inferiores ao limite máximo de resíduo para o pesticida em estudo em vinho.

Tabela 35. Resultados obtidos no estudo prévio do pesticida Metalaxil por *SPME-GC-MS(PE)*.

[Metalaxil] ppm	Média das Áreas Cromatográficas	
0,130±0,002	(1±1)×10 ⁴	Regressão Linear A = (1,98±0,06)×10 ⁶ c - (5±1)
0,202±0,003	(2±2)×10 ⁴	
0,375±0,003	(6±3)×10 ⁴	R² = 0,9978
0,750±0,001	(6±2)×10 ⁵	LDD = 0,198 ppm (Metalaxil)
1,500±0,008	(2,6±0,6)×10 ⁶	LDQ = 0,660 ppm (Metalaxil)
2,50±0,02	(4,19±0,07)×10 ⁶	LMR = 1,33 ppm (Metalaxil)
5,00±0,01	(9±1)×10 ⁶	

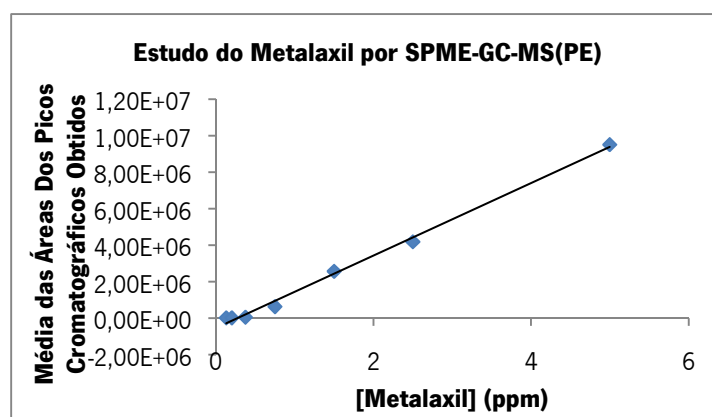


Figura 62. Recta de calibração obtida para o pesticida Metalaxil pelo método *SPME-GC-MS(PE)*.

3.2. SPME-GC-MS (PI)

O estudo foi repetido para o mesmo pesticida, no entanto, a recta de calibração foi construída pelo método do padrão interno, tendo sido escolhido para padrão interno o pesticida Dieldrine. Os resultados obtidos encontram-se na Folha de Cálculo 2. Com este tratamento de resultados obteve-se uma correlação linear com um coeficiente de 0,9943 e limite de detecção inferior ao limite máximo de resíduo para o pesticida em estudo em vinho, no entanto, o limite de quantificação obtido é superior ao LMR.

Tabela 36. Resultados obtidos no estudo prévio do pesticida Metalaxil por *SPME-GC-MS(PI)*.

[Metalaxil] ppm	[Dieldrine] ppm	[M]/[D]	Média da relação entre as Áreas Cromatográficas A_m/A_b	Regressão Linear
0,130±0,002	0,505±0,008	0,257±0,006	$(4±4) \times 10^{-5}$	$A_m/A_b = (2,9±0,3) \times 10^{-6} [M]/[D] - (1±1)$ $R^2 = 0,9943$ LDD = 0,667 ppm (Metalaxil) LDQ = 2,225 ppm (Metalaxil) LMR = 1,33 ppm (Metalaxil)
0,202±0,003	0,505±0,008	0,400±0,009	$(6±5) \times 10^{-5}$	
0,375±0,003	0,505±0,008	0,74±0,01	$(1,7±0,9) \times 10^{-4}$	
0,750±0,001	0,505±0,008	1,49±0,02	$(2,1±0,7) \times 10^{-3}$	
1,500±0,008	0,505±0,008	2,97±0,05	$(6±3) \times 10^{-3}$	
2,50±0,02	0,505±0,008	4,95±0,09	$(1,1±0,7) \times 10^{-2}$	
5,00±0,01	0,505±0,008	9,9±0,2	$(2,8±0,5) \times 10^{-2}$	

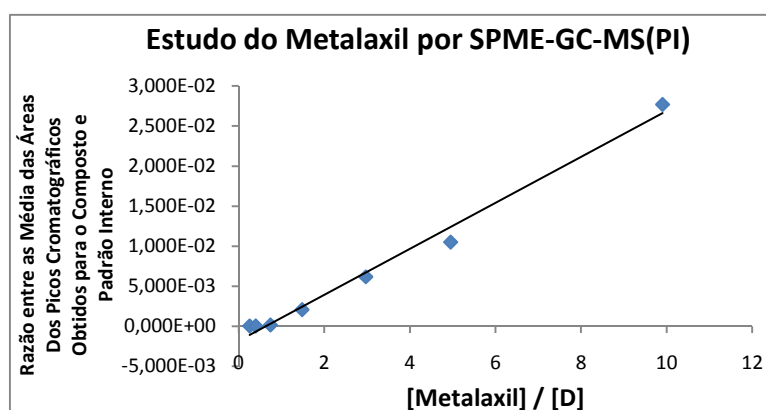


Figura 63. Recta de calibração obtida para o pesticida Metalaxil pelo método *SPME-GC-MS(PI)*.

3.3. LC-MS (PE)

O mesmo estudo foi também efectuado pela técnica *LC-MS*. A recta de calibração foi construída pelo método do padrão externo e os resultados obtidos podem ser verificados na Folha de Cálculo 3. Com este método e tratamento de resultados obteve-se uma correlação linear com um coeficiente de 0,9892 e limite de detecção inferior ao limite máximo de resíduo para o pesticida em estudo em vinho, no entanto, o limite de quantificação obtido é superior ao LMR.

Tabela 37. Resultados obtidos no estudo prévio do pesticida Metalaxil por *LC-MS(PE)*.

[Metalaxil] ppm	Média das Áreas Cromatográficas	
1,60±0,03	(4,1±0,5)×10 ⁶	Regressão Linear $A = (1, 8±0,2) \times 10^6 c - (8±4)$
2,20±0,03	(4,73±0,09)×10 ⁶	
2,70±0,04	(5,56±0,08)×10 ⁶	R² = 0,9892
3,20±0,05	(6,41±0,08)×10 ⁶	LDD = 0,757 ppm (Metalaxil)
4,30±0,05	(8,9±0,1)×10 ⁶	LDQ = 2,523 ppm (Metalaxil)
		LMR = 1,33 ppm (Metalaxil)

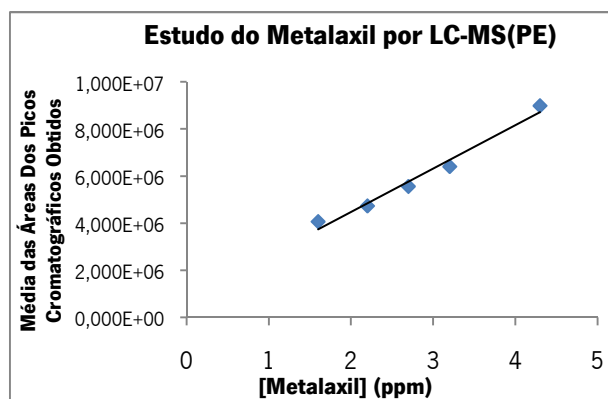


Figura 64. Recta de calibração obtida para o pesticida Metalaxil pelo método *LC-MS(PE)*.

3.4. Conclusões

Comparando os resultados obtidos pela técnica de *GC-MS* com os obtidos por *LC-MS*, verifica-se que, apesar de a gama de trabalho não ser a mesma (devido ao facto de a relação sinal/ruído por *LC-MS* ser maior comparando com o método *GC-MS*) na Cromatografia Gasosa, se obtém um melhor coeficiente de correlação e limites de detecção e quantificação menores.

Sendo este método para aplicação em vinhos, isto é, amostras líquidas e ligeiramente complexas, a curva de calibração deveria, teoricamente, ser construída pelo método da adição padrão, no entanto, este método não foi estudado uma vez que é mais demorado, dispendioso, há um aumento do erro final pois a concentração é calculada por extrapolação e os métodos utilizados apresentam resultados melhores.

No que respeita aos estudos efectuados por *GC-MS* verifica-se que o método do padrão externo origina melhores resultados, tendo sido este método implementado no desenvolvimento do método analítico (*SPME-GC-MS(PE)*). É muito comum a utilização do método do padrão interno em *GC-MS* de forma a minimizar o erro que advém da incerteza do volume que é realmente injectado a altas temperaturas, no entanto como a injeção é realizada por fenómenos de dessorção dos compostos de uma fibra polimérica a temperaturas altas, este problema não é muito relevante.

4. Optimização das Condições de Extracção

Uma vez que as condições analíticas já foram optimizadas, é a vez das condições de extracção serem submetidas ao mesmo processo. As variáveis estudadas foram o ajuste da força iónica da solução, a temperatura e o tempo de extracção, tendo estas sido optimizadas uma a uma, e tratadas como independentes entre si. A preparação das soluções e as condições experimentais utilizadas já foram descritas anteriormente (Capítulo III, 3.2.).

4.1. Estudo do efeito da Força Iónica da Solução

Para estudar o efeito da força iónica da solução na extracção, prepararam-se, para cada pesticida, soluções padrão com a mesma concentração de composto de interesse, mas com concentrações diferentes de ajustador de força iónica, MgSO₄. Efectuaram-se 3 réplicas para cada pesticida e para cada concentração de ajustador de força iónica, e trataram-se os resultados de modo a concluir sobre qual a melhor condição.

Tabela 38. Resultados obtidos no estudo do efeito da Força Iónica da solução para cada pesticida.

Composto	Média das Áreas dos Picos Cromatográficos ± Desvio Padrão		
	[MgSO ₄] = 0 M	[MgSO ₄] = 0,05 M	[MgSO ₄] = sat.
Ciprodinil	(2,9±0,1)x10 ⁸	(4,0±0,4)x10 ⁸	(3,05±0,08)x10 ⁸
Metalaxil	(6,9±0,2)x10 ⁶	(7,2±0,2)x10 ⁶	(7,5±0,3)x10 ⁶
Folpete	(1,4±0,7)x10 ⁹	(5,3±0,9)x10 ⁷	não detectado
Benalaxil	(1,33±0,09)x10 ⁶	(1,79±0,05)x10 ⁸	(2,36±0,04)x10 ⁸
Iprovalicarbe	(2,8±0,1)x10 ⁷	(2,70±0,01)x10 ⁷	(3,26±0,04)x10 ⁷
Pirimetanil	(4,35±0,02)x10 ⁸	(4,83±0,05)x10 ⁸	(6,74±0,07)x10 ⁸
Somatório	(2,3±0,5)x10 ⁹	(1,2±0,2)x10 ⁹	(1,2±0,2)x10 ⁹

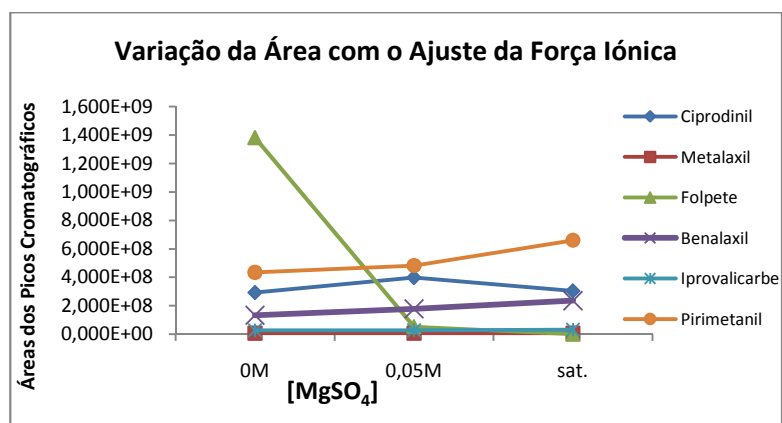


Figura 65. Resultados obtidos no estudo do efeito da Força Iônica da solução para o conjunto de pesticidas.

4.2. Estudo do efeito da Temperatura de Extração

Para o estudo do efeito da temperatura de extração também se efectuaram 3 réplicas para cada pesticida e para cada temperatura estudada. Uma vez que já se verificou que se não se efectuar ajuste de força iônica as extrações são melhor sucedidas, não se procedeu mais à adição do sal ajustador de força iônica.

Tabela 39. Resultados obtidos no estudo do efeito da temperatura de extração para cada pesticida.

Composto	Média das Áreas dos Picos Cromatográficos ± Desvio Padrão			
	T = 25°C	T = 35°C	T = 45°C	T = 55°C
Ciprodinil	(6,15±0,06)x10 ⁸	(3,6±0,1)x10 ⁸	(2,9±0,1)x10 ⁸	(2,1±0,1)x10 ⁸
Metalaxil	(6,55±0,04)x10 ⁶	(6,9±0,1)x10 ⁶	(6,9±0,1)x10 ⁶	(5,3±0,7)x10 ⁶
Folpete	(2,51±0,09)x10 ⁹	(2,84±0,04)x10 ⁹	(1,4±0,7)x10 ⁹	(2±1)x10 ⁸
Benalaxil	(1,8±0,7)x10 ⁸	(1,83±0,03)x10 ⁸	(1,33±0,09)x10 ⁸	(1,19±0,02)x10 ⁸
Iprovalicarbe	(2,87±0,04)x10 ⁷	(3,2±0,1)x10 ⁷	(2,7±0,1)x10 ⁷	(2,47±0,09)x10 ⁷
Pirimetanil	(1,38±0,08)x10 ⁸	(1,41±0,04)x10 ⁸	(4,35±0,02)x10 ⁸	(9,3±0,1)x10 ⁷
Somatório	(3,5±0,9)x10 ⁹	(4±1)x10 ⁹	(2,3±0,5)x10 ⁹	(6,8±0,9)x10 ⁸

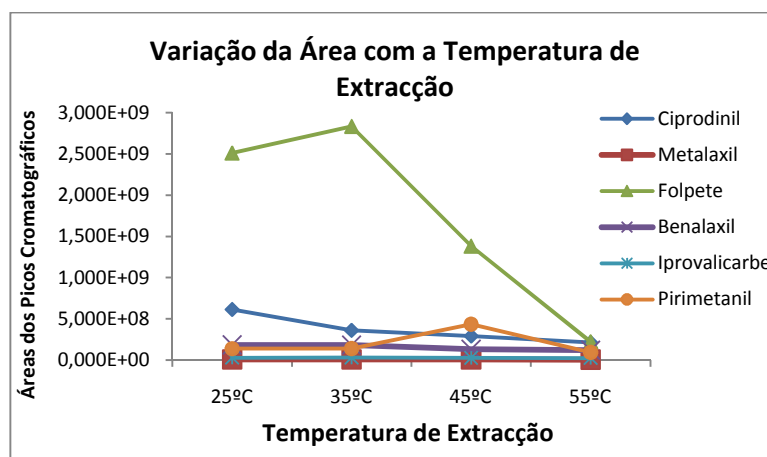


Figura 66. Resultados obtidos no estudo do efeito da temperatura de extração para o conjunto de pesticidas.

4.3. Estudo do efeito do Tempo de Extração

O estudo do efeito do tempo de extração foi efectuado do mesmo modo que os dois estudos anteriores. Uma vez que já se concluiu qual a temperatura à qual a extração é mais eficaz, este estudo foi realizado à temperatura de 35 °C.

Tabela 40. Resultados obtidos no estudo do efeito do tempo de extração para cada pesticida.

Composto	Média das Áreas dos Picos Cromatográficos ± Desvio Padrão		
	t = 20 min	t = 30 min	t = 40 min
Ciprodinil	$(4,8 \pm 0,9) \times 10^8$	$(3,6 \pm 0,1) \times 10^8$	$(5,3 \pm 0,2) \times 10^8$
Metalaxil	$(6,5 \pm 0,2) \times 10^6$	$(7,0 \pm 0,1) \times 10^6$	$(7,2 \pm 0,2) \times 10^6$
Folpete	$(2,44 \pm 0,08) \times 10^9$	$(2,8 \pm 0,4) \times 10^9$	$(2,5 \pm 0,4) \times 10^9$
Benalaxil	$(1,48 \pm 0,04) \times 10^8$	$(1,83 \pm 0,03) \times 10^8$	$(1,48 \pm 0,09) \times 10^8$
Iprovalicarbe	$(2,21 \pm 0,06) \times 10^7$	$(3,20 \pm 0,1) \times 10^7$	$(2,4 \pm 0,2) \times 10^7$
Pirimetanil	$(1,14 \pm 0,09) \times 10^8$	$(1,41 \pm 0,03) \times 10^8$	$(1,09 \pm 0,04) \times 10^7$
Somatório	$(2,7 \pm 0,2) \times 10^9$	$(4 \pm 1) \times 10^9$	$(3,2 \pm 0,9) \times 10^9$

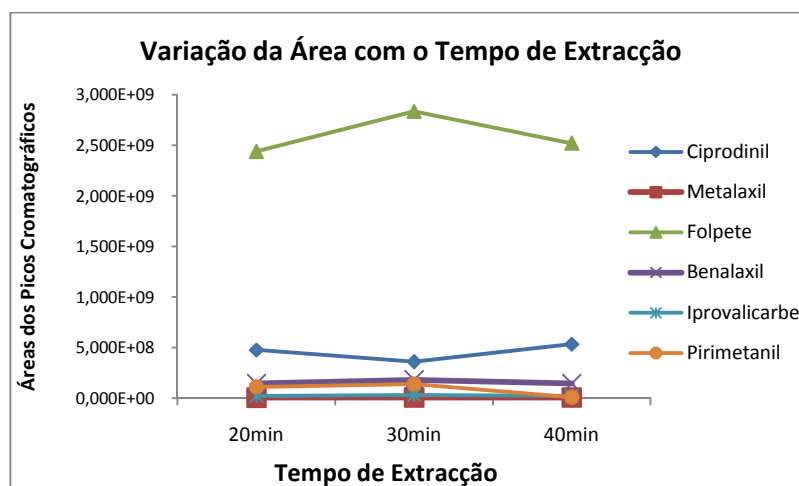


Figura 67. Resultados obtidos no estudo do efeito de tempo de extração para o conjunto de pesticidas.

4.4. Conclusões

Com o tratamento dos resultados obtidos e para as variáveis estudadas, verifica-se que as condições de extração ótimas para o conjunto de todos os pesticidas estudados não são as mesmas para todos os pesticidas individualmente. No estudo do efeito da força iônica da solução tanto se observa aumento das áreas dos picos cromatográficos como diminuições e oscilações, dependendo do pesticida, assim como no estudo da temperatura e tempo de extração. No entanto, verificou-se que as variáveis estudadas tinham um efeito muito significativo no pesticida Folpete, ao qual se decidiu dar maior importância.

A adição de um sal, é uma variável que se começou a estudar relativamente há pouco tempo e pode melhorar a eficiência de extração através do aumento da força iônica da solução, o que provoca uma diminuição na solubilidade dos analitos, aumentando o transporte de massa destes para a fibra e melhorando a eficiência de extração ^[33]. O aumento da força iônica faz diminuir a solubilidade dos analitos menos polares, favorecendo a eficiência de extração destes. Esta observação é consistente com os resultados obtidos, uma vez que no estudo aqui realizado o analito mais polar – Folpete – foi aquele em que a eficiência de extração foi mais prejudicada com a adição de Sulfato de Magnésio. Tendo em conta todo o conjunto de pesticidas, verifica-se que a adição de um sal ajustador de força iônica da solução é prejudicial para a eficiência de extração.

A temperatura de extração é muito importante para a quantificação de amostras, sendo necessário que esta seja constante durante todo o processo e entre réplicas para assegurar a precisão. Para temperaturas baixas a eficiência de extração é diminuída uma vez que a superfície de adsorção pode não estar activada, e para temperaturas for muito elevada os analitos podem volatilizar para o *headspace*

do *via*, havendo um deslocamento do equilíbrio no sentido inverso, e provocando a libertação do analito de interesse da fibra ^[25]. Tal foi verificado no estudo realizado, para temperaturas mais baixas e mais altas.

O tempo de extracção é outra variável importante uma vez que é necessário algum tempo para que se atinja um equilíbrio entre a fase líquida e a fibra, variando para cada composto. O comportamento esperado seria um aumento da eficiência com o tempo de extracção até que a partir de um certo tempo (tempo de equilíbrio) esta se torne constante. No entanto, segundo alguns casos reportados, um aumento excessivo do tempo de extracção tem um efeito negativo, o que se verificou neste trabalho para tempos maiores a 30 minutos. Uma possível explicação para esta observação é o facto de outras substâncias presentes na solução e que também apresentam afinidade com a fibra extractora entrarem em competição com o analito de interesse, fazendo com que este seja dessorvido da fibra ^[38, 39].

As variações quadráticas da eficiência de extracção em função da temperatura ou do tempo de extracção obtidas, foram já verificadas como sendo as variações esperadas para este tipo de estudo em vários trabalhos reportados ^[38, 39].

A escolha das condições optimizadas de extracção foi realizada segundo um compromisso devido ao grande efeito que as variáveis estudadas têm no pesticida Folpete. Estas condições são aquelas que favorecem o conjunto: 30 minutos de extracção, a 35 °C, e sem adição de sal ajustador de força iónica.

5. Rectas de Calibração

A análise quantitativa dos pesticidas estudados foi efectuada pelo método do padrão externo. Na Tabela 41 e 42 apresentam-se as soluções padrão, por ordem de injeção, com a respectiva concentração do composto de interesse e médias das áreas dos picos cromatográficos obtidos (3 réplicas).

As concentrações das soluções padrão utilizadas para análise pelo método Full Scan foram escolhidas de modo a que a menor origine um pico bem visível e identificável, e a maior fosse semelhante à concentração máxima permitida por legislação (LMR).

Tabela 41. Concentração dos pesticidas de interesse presente nas soluções padrão analisadas por *GC-MS Full Scan* e respectiva média das áreas dos picos cromatográficos obtidos (2 réplicas para o pesticida Benalaxil, 3 réplicas para os restantes).

[Ciprodinil] ppm	Média das Áreas Cromatográficas	[Metalaxil] ppm	Média das Áreas Cromatográficas	[Folpete] ppm	Média das Áreas Cromatográficas
0,0497±0,0006	(7±1)×10 ⁶	0,051±0,001	(2,4±0,3)×10 ⁵	0,0500±0,0005	(1,48±0,06)×10 ⁴
0,099±0,001	(9,1±0,5)×10 ⁶	0,102±0,002	(8,7±0,2)×10 ⁵	0,100±0,001	(3,30±0,09)×10 ⁴
0,200±0,002	(1,9±0,2)×10 ⁷	0,204±0,002	(2,25±0,07)×10 ⁴	0,2000±0,0008	(5,4±0,4)×10 ⁴
0,400±0,004	(3,5±0,2)×10 ⁷	0,406±0,004	(4,3±0,1)×10 ⁴	0,500±0,004	(1,8±0,1)×10 ⁵
0,800±0,008	(5,9±0,2)×10 ⁷	0,813±0,006	(9,1±0,3)×10 ⁴	0,980±0,006	(8,0±0,6)×10 ⁵
1,198±0,008	(8,7±0,3)×10 ⁷	1,219±0,006	(1,28±0,04)×10 ⁵	2,94±0,01	(3,2±0,2)×10 ⁶
2,10±0,02	(1,52±0,03)×10 ⁸	2,134±0,007	(2,4±0,2)×10 ⁵	6,86±0,03	(9,7±0,1)×10 ⁶
[Benalaxil] ppm	Média das Áreas Cromatográficas	[Iprovalicarbe] ppm	Média das Áreas Cromatográficas	[Pirimetanil] ppm	Média das Áreas Cromatográficas
0,050±0,001	(1,35±0,08)×10 ⁶	0,052±0,002	(9,3±0,4)×10 ²	0,0500±0,0006	(5,0±0,6)×10 ⁵
0,071±0,001	(1,8±0,2)×10 ⁶	0,104±0,003	(5,7±0,9)×10 ⁴	0,100±0,001	(1,2±0,2)×10 ⁶
0,102±0,002	(2,60±0,1)×10 ⁶	0,208±0,004	(1,27±0,09)×10 ⁵	0,200±0,003	(2,2±0,2)×10 ⁶
0,204±0,004	(4,3±0,2)×10 ⁶	0,416±0,008	(2,7±0,2)×10 ⁵	0,500±0,007	(6,2±0,3)×10 ⁶
0,408±0,008	(7,5±0,4)×10 ⁶	0,86±0,02	(5,3±0,2)×10 ⁵	1,04±0,03	(1,21±0,03)×10 ⁷
		1,30±0,02	(7,6±0,7)×10 ⁵	3,04±0,04	(3,30±0,03)×10 ⁷
		2,27±0,04	(1,26±0,03)×10 ⁶	7,04±0,08	(6,20±0,05)×10 ⁷

Tabela 42. Concentração dos pesticidas de interesse presente nas soluções padrão analisadas por *GC-MS/MS* e respectiva média das áreas dos picos cromatográficos obtidos (3 réplicas).

[Ciprodinil] ppm	Média das Áreas Cromatográficas	[Folpete] ppm	Média das Áreas Cromatográficas
0,0095±0,0001	(2,81±0,05)×10 ⁵	0,0497±0,0005	(1,2±0,1)×10 ⁴
0,0202±0,0003	(6±2)×10 ⁵	0,0802±0,0009	(3±1)×10 ⁴
0,0298±0,0004	(9,4±0,8)×10 ⁵	0,147±0,003	(9±3)×10 ⁴
0,0404±0,0006	(1,15±0,02)×10 ⁶	0,294±0,006	(4±1)×10 ⁴
0,0596±0,0008	(1,8±0,2)×10 ⁶	0,498±0,008	(7±2)×10 ⁴
0,080±0,001	(2,36±0,02)×10 ⁶	0,700±0,008	(1,2±0,3)×10 ⁵
0,100±0,001	(3,0±0,3)×10 ⁶	0,994±0,008	(2,6±0,3)×10 ⁵
[Benalaxil] ppm	Média das Áreas Cromatográficas	[Pirimetanil] ppm	Média das Áreas Cromatográficas
0,0040±0,0004	(5,0±0,7)×10 ⁴	0,0100±0,0004	(1,5±0,3)×10 ⁵
0,0064±0,0004	(8±1)×10 ⁴	0,0400±0,0006	(5,0±0,2)×10 ⁵
0,012±0,001	(1,41±0,06)×10 ⁵	0,070±0,001	(7,5±0,2)×10 ⁵
0,023±0,002	(3,2±0,5)×10 ⁵	0,100±0,001	(1,1±0,3)×10 ⁶
0,040±0,004	(5±1)×10 ⁵	0,132±0,002	(1,48±0,05)×10 ⁶
0,056±0,006	(7±2)×10 ⁵	0,160±0,002	(1,7±0,2)×10 ⁶
0,079±0,008	(10±2)×10 ⁵	0,200±0,002	(2,08±0,06)×10 ⁶

A partir dos valores apresentados (Tabela 41 e 42) foi possível construir as rectas de calibração para cada pesticida que se pretende analisar. As equações das rectas foram obtidas segundo o método dos mínimos quadrados e estão representadas sob a forma $y=(b\pm tsb)+(a\pm tsa)$, tendo cada parâmetro sido calculado de acordo com as fórmulas matemáticas apresentadas no Anexo II, assim como os erros associados para 95 % de confiança.

As soluções utilizadas para a análise por *MS/MS* não são de concentração equivalente às utilizadas para a análise por *Full Scan*, uma vez a optimização das condições de fragmentação foram realizadas com soluções de concentração pequena, e para concentrações maiores as mesmas condições não eram eficazes. Para a análise das amostras, se for necessário, deve-se proceder a diluições para não extrapolar valores no gráfico obtido.

5.1. Pesticida Ciprodinil

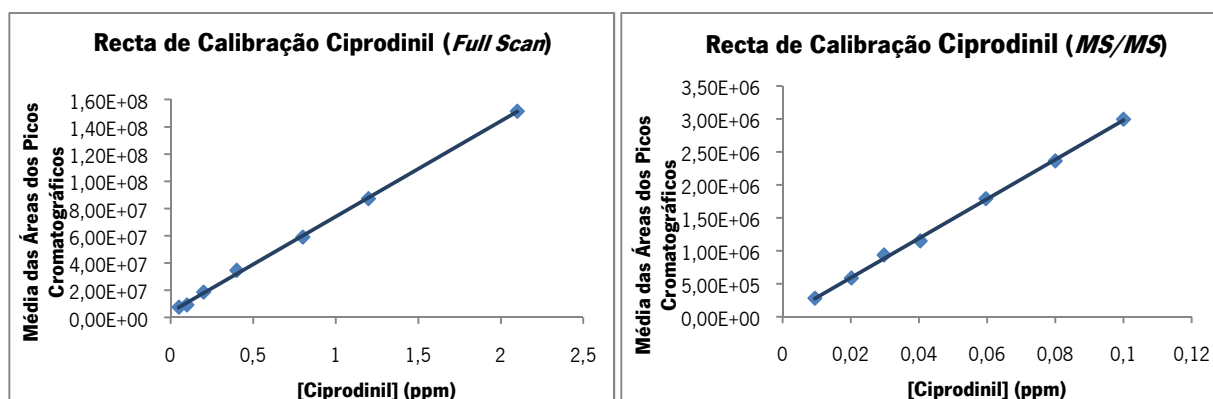


Figura 68. Rectas de calibração obtida para o pesticida Ciprodinil pelo método *SPME-GC-MS(PE)*.

Teste de Mandel: Linear

$$A = (7,01 \pm 0,08) \times 10^7 c + (4,0 \pm 0,8) \times 10^6$$

$$R^2 = 0,9996$$

$$\text{LDD} = 0,04 \text{ ppm}$$

$$\text{LDQ} = 0,12 \text{ ppm}$$

$$S = (7,01 \pm 0,08) \times 10^7$$

Teste de Mandel: Linear

$$A = (2,98 \pm 0,04) \times 10^7 c - (0,2 \pm 2) \times 10^4$$

$$R^2 = 0,9995$$

$$\text{LDD} = 0,002 \text{ ppm}$$

$$\text{LDQ} = 0,01 \text{ ppm}$$

$$S = (2,98 \pm 0,04) \times 10^7$$

Para o método *Full Scan*, verificou-se pelo teste de Mandel que a tendência dos pontos experimentais é linear. Assim, obteve-se uma regressão linear com coeficiente de correlação de 0,9996, limite de detecção de 0,04 ppm, e limite de quantificação de 0,12 ppm que é menor que o limite máximo de resíduo permitido (1,33 ppm).

Para o método *MS/MS*, verificou-se que a tendência também é linear. A regressão linear obtida está associada a um coeficiente de correlação de 0,9995, que é muito semelhante ao obtido pelo primeiro método. Foi possível uma melhoria dos limites de detecção e quantificação de 20 e 12 vezes, respectivamente; enquanto se verificou uma pequena perda de sensibilidade que pode ser devida à diferença de gama de trabalho.

5.2. Pesticida Metalaxil

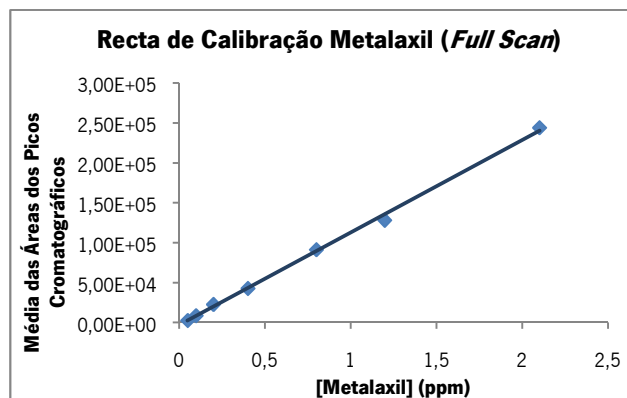


Figura 69. Recta de calibração obtida para o pesticida Metalaxil pelo método *SPME-GC-MS(PE) (Full Scan)*.

Teste de Mandel: Linear

$$A = (1,16 \pm 0,02) \times 10^5 c - (3 \pm 2) \times 10^3$$

$$R^2 = 0,9991$$

$$\text{LDD} = 0,06 \text{ ppm}$$

$$\text{LDQ} = 0,18 \text{ ppm}$$

$$S = (1,16 \pm 0,02) \times 10^5$$

Para o método *Full Scan*, verificou-se pelo teste de Mandel que a tendência dos pontos experimentais é linear. Assim, obteve-se uma regressão linear com coeficiente de correlação de 0,9991, limite de detecção de 0,06 ppm, e limite de quantificação de 0,18 ppm que é menor que o limite máximo de resíduo permitido (1,33 ppm).

Não foi possível a melhoria das condições com o método *MS/MS*, devido a avaria do Instrumento.

5.3. Pesticida Folpete

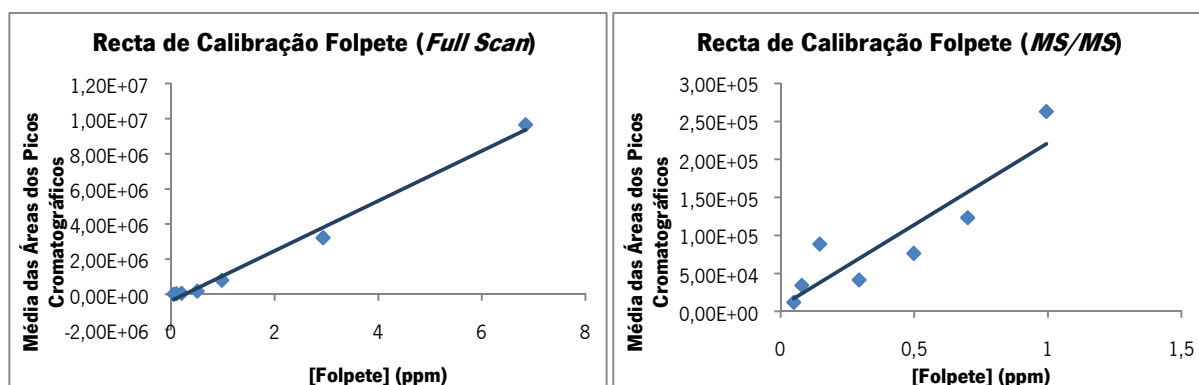


Figura 70. Recta de calibração obtida para o pesticida Folpete pelo método *SPME-GC-MS(PE)*.

Teste de Mandel: Linear

$$A = (1,42 \pm 0,06) \times 10^6 c - (4 \pm 2) \times 10^5$$

$$R^2 = 0,9955$$

$$LDD = 0,36 \text{ ppm}$$

$$LDQ = 1,22 \text{ ppm}$$

$$S = (1,42 \pm 0,06) \times 10^6$$

Para o método *Full Scan*, verificou-se pelo teste de Mandel que a tendência dos pontos experimentais é linear. Assim, obteve-se uma regressão linear com coeficiente de correlação de 0,9955, limite de detecção de 0,36 ppm, e limite de quantificação de 1,22 ppm que é menor que o limite máximo de resíduo permitido (6,67 ppm).

Para o método *MS/MS*, verificou-se uma dispersão irregular dos pontos experimentais, talvez devido a um erro na preparação das soluções ou degradação das mesmas. Não foi possível repetir estes pontos experimentais devido a uma avaria do Instrumento.

5.4. Pesticida Benalaxil

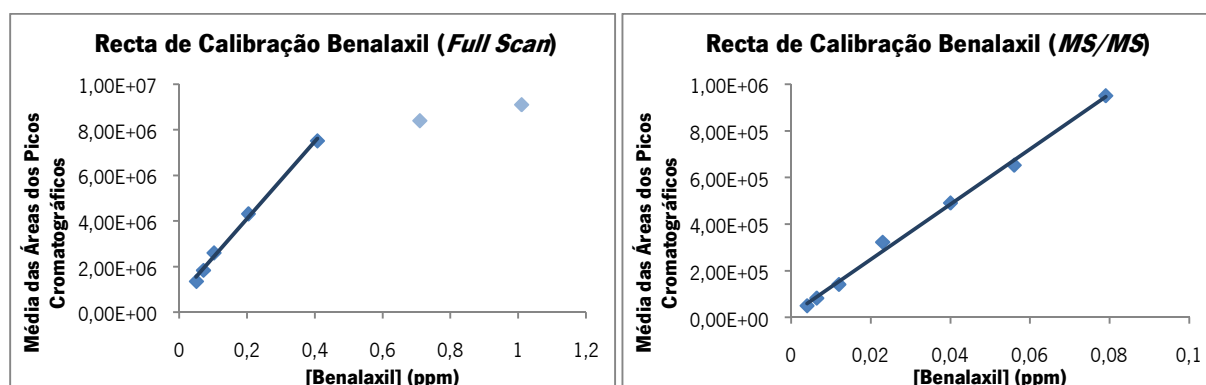


Figura 71. Recta de calibração obtida para o pesticida Benalaxil pelo método *SPME-GC-MS(PE)*.

Teste de Mandel: Linear (rejeição dos dois pontos de maior concentração)

$$A = (1,70 \pm 0,06) \times 10^7 c + (7 \pm 1) \times 10^5$$

$$R^2 = 0,9979$$

$$LDD = 0,02 \text{ ppm}$$

$$LDQ = 0,08 \text{ ppm}$$

$$S = (1,70 \pm 0,06) \times 10^7$$

Teste de Mandel: Linear

$$A = (1,18 \pm 0,03) \times 10^7 c - (1 \pm 1) \times 10^4$$

$$R^2 = 0,9983$$

$$LDD = 0,003 \text{ ppm}$$

$$LDQ = 0,01 \text{ ppm}$$

$$S = (1,18 \pm 0,03) \times 10^7$$

Para o método *Full Scan*, verificou-se pelo teste de Mandel que a tendência dos pontos experimentais não é linear, no entanto, tendo em conta somente os cinco pontos experimentais de menor concentração e área, esta torna-se linear. Deve-se desprezar os restantes pontos, uma vez que a diferença entre os pontos experimentais e os pontos interpolados na recta para a mesma concentração é superior ao dobro da estimativa do desvio padrão dos pontos experimentais à recta de regressão ($y_{exp} - y_{int} > 2s_{y/x}$). Conclui-se que existe perda de linearidade do método para concentrações superiores a 0,4 ppm. Assim, obteve-se uma regressão linear com coeficiente de correlação de 0,9979, limite de detecção de 0,02 ppm, e limite de quantificação de 0,08 ppm que é menor que o limite máximo de resíduo permitido (0,27 ppm). Estes resultados foram obtidos com apenas duas réplicas para cada ponto experimental, uma vez que as restantes réplicas foram rejeitadas pelo teste de Grubbs, e se verificou impossível a adição de novas réplicas por avaria do Instrumento.

Para o método *MS/MS*, verificou-se que a tendência é linear. A regressão linear obtida está associada a um coeficiente de correlação de 0,9983, que é muito semelhante ao obtido pelo primeiro método. Foi possível uma melhoria dos limites de detecção e quantificação de 7 e 8 vezes, respectivamente; enquanto se verificou uma pequena perda de sensibilidade que pode ser devida à diferença de gama de trabalho.

5.5. Pesticida Iprovalicarbe

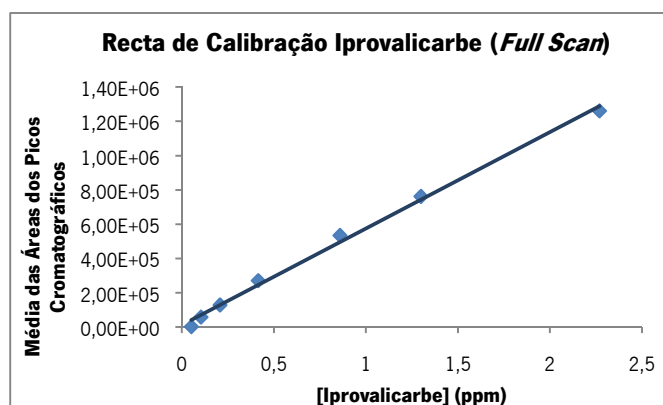


Figura 72. Recta de calibração obtida para o pesticida Iprovalicarbe pelo método *SPME-GC-MS(PE) (Full Scan)*.

Teste de Mandel: Linear

$$A = (5,6 \pm 0,2) \times 10^5 c + (1 \pm 1) \times 10^4$$

$$R^2 = 0,9980$$

$$LDD = 0,09 \text{ ppm}$$

$$LDQ = 0,30 \text{ ppm}$$

$$S = (5,6 \pm 0,2) \times 10^5$$

Para o método *Full Scan*, verificou-se pelo teste de Mandel que a tendência dos pontos experimentais é linear. Assim, obteve-se uma regressão linear com coeficiente de correlação de 0,9980, limite de detecção de 0,09 ppm, e limite de quantificação de 0,30 ppm que é menor que o limite máximo de resíduo permitido (1,33 ppm).

Não foi possível a melhoria das condições com o método *MS/MS*, devido a avaria do Instrumento.

5.6. Pesticida Pirimetanil

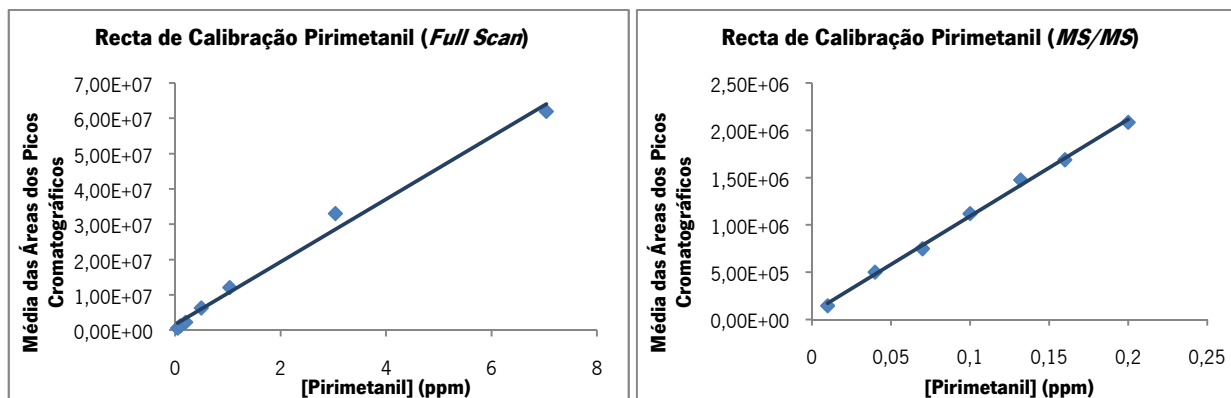


Figura 73. Recta de calibração obtida para o pesticida Pirimetanil pelo método *SPME-GC-MS(PE)*.

Teste de Mandel: Linear

$$A = (8,8 \pm 0,4) \times 10^6 c + (1 \pm 1) \times 10^6$$

$$R^2 = 0,9951$$

$$\text{LDD} = 0,39 \text{ ppm}$$

$$\text{LDQ} = 1,31 \text{ ppm}$$

$$S = (8,8 \pm 0,4) \times 10^6$$

Teste de Mandel: Linear

$$A = (1,02 \pm 0,03) \times 10^7 c + (7 \pm 3) \times 10^4$$

$$R^2 = 0,9987$$

$$\text{LDD} = 0,008 \text{ ppm}$$

$$\text{LDQ} = 0,03 \text{ ppm}$$

$$S = (1,02 \pm 0,03) \times 10^7$$

Para o método *Full Scan*, verificou-se pelo teste de Mandel que a tendência dos pontos experimentais é linear, obtendo-se uma regressão com coeficiente de correlação de 0,9951, limite de detecção de 0,39 ppm, e limite de quantificação de 1,31 ppm que é menor que o limite máximo de resíduo permitido (6,67 ppm).

Para o método *MS/MS*, verificou-se que a tendência é linear. A regressão linear obtida está associada a um coeficiente de correlação de 0,9987, que é superior ao obtido pelo primeiro método. Foi possível uma melhoria dos limites de detecção e quantificação de 49 e 44 vezes, respectivamente; enquanto se verificou um aumento da sensibilidade do método.

Capítulo V

Conclusão

Este trabalho foi efectuado com a finalidade de estabelecer um método de análise de multi-resíduos de pesticidas por *SPME-GC-MS* para posterior implementação na análise de vinhos brancos.

Em primeiro lugar, foi realizada a optimização das condições experimentais cromatográficas em GC, onde se utilizaram amostras de vinho para estabelecer o programa de separação. Ao fim de algumas tentativas chegou-se às condições que permitem a separação dos compostos presentes na matriz do vinho e que ficam retidos na fibra de extracção.

Seguidamente, foi feito um levantamento dos pesticidas com interesse para analisar. Para tal foram analisadas várias amostras de vinho branco, onde após extenso estudo dos respectivos cromatogramas foi possível identificar vários pesticidas, como: o Ciprodinil, o Metalaxil, o Folpete, o Benalaxil, o Iprovalicarbe e o Pirimetanil. Estes pesticidas foram obtidos na forma quase pura ou na forma de mistura comercial, e caracterizados pelo tempo de retenção e pelo espectro de massa. Os mecanismos pelos quais os compostos estudados podem fragmentar também foram estudados, embora não se tenha conseguido concluir sobre todos os picos de interesse para alguns compostos.

Foram realizados estudos prévios de modo a poder comparar diferentes métodos de análise, nomeadamente: *SPME-GC-MS(PE)*, *SPME-GC-MS(PI)* e *LC-MS*. Foi necessário fazer uma optimização das condições experimentais para *LC-MS*. Segundo os resultados obtidos foi possível concluir que os melhores resultados para o pesticida estudado eram obtidos com a utilização do método *SPME-GC-MS(PE)*.

Após ter o método cromatográfico optimizado, seguiu-se para a optimização das condições de extracção. As variáveis estudadas foram aquelas que, segundo a pesquisa bibliográfica, pareceram ser as mais importantes, como a adição de um sal para ajuste da força iónica, a temperatura e o tempo de extracção. A optimização foi feita a uma variável de cada vez e os resultados foram tratados como se estas fossem independentes umas das outras. Concluiu-se que as condições que originavam uma maior soma das áreas dos picos cromatográficos de cada composto era a extracção sem ajuste da força iónica, durante 30 minutos a 35 °C.

Proseguiu-se com a construção das rectas de calibração. Para o composto Ciprodinil obteve-se uma regressão linear com coeficiente de correlação 0,9996, limite de detecção de 0,04 ppm e limite de quantificação de 0,12 ppm para o modo de aquisição *Full Scan*. Foi realizado uma melhoria pela utilização do método de aquisição *MS/MS* para este composto, onde se obteve um limite de detecção de 0,002 ppm e limite de quantificação de 0,01 ppm, que é muito semelhante a resultados reportados para o mesmo método (LDQ = 0,013 ppm) ^[40].

Para o composto Metalaxil obteve-se uma regressão linear com coeficiente de correlação 0,9991, limite de detecção de 0,06 ppm e limite de quantificação de 0,18 ppm para o modo de aquisição *Full Scan*, que é bastante superior a resultados reportados para o mesmo método (LDQ = 0,04 ppm) ^[40].

Para o composto Folpete obteve-se uma regressão linear com coeficiente de correlação 0,9955, limite de detecção de 0,36 ppm e limite de quantificação de 1,22 ppm para o modo de aquisição *Full Scan*, que é um pouco superior a resultados reportados para o mesmo método (LDQ = 1,00ppm) ^[41].

Para o composto Benalaxil obteve-se uma regressão linear com coeficiente de correlação 0,9979, limite de detecção de 0,02 ppm e limite de quantificação de 0,08 ppm para o modo de aquisição *Full Scan*. Foi realizado uma melhoria pela utilização do método de aquisição *MS/MS* para este composto, onde se obteve um limite de detecção de 0,003 ppm e limite de quantificação de 0,01 ppm, que é também o resultado reportado para o mesmo método (LDQ = 0,01ppm) ^[40].

Para o composto Iprovalicarbe obteve-se uma regressão linear com coeficiente de correlação 0,9980, limite de detecção de 0,09 ppm e limite de quantificação de 0,30 ppm para o modo de aquisição *Full Scan*, que é superior a resultados reportados para o mesmo método (LDQ = 0,1 ppm) ^[41].

Para o composto Pirimetanil obteve-se uma regressão linear com coeficiente de correlação 0,9951, limite de detecção de 0,39 ppm e limite de quantificação de 1,31 ppm para o modo de aquisição *Full Scan*. Foi realizado uma melhoria pela utilização do método *MS/MS* para este composto, onde se obteve um limite de detecção de 0,008 ppm e limite de quantificação de 0,03 ppm, que é superior aos resultados reportados para o mesmo método (LDQ = 0,012 ppm) ^[40].

Devido a algumas avarias no Instrumento *GC-MS*, o seguimento deste trabalho foi impossibilitado, pois era o plano melhorar as condições de análise para o método *MS/MS* para todos os compostos de interesse, e analisar várias amostras de vinho de modo a identificar e quantificar os pesticidas estudados.

Bibliografia

- [1] Instituto da Vinha e do Vinho (www.ivv.min-agricultura.pt);
- [2] Regulamento (CE) n°1493/1999;
- [3] Encyclopedia Britannica Online, Wine;
- [4] “*World’s Earliest Wine*”, *Arqueology*, vol.49 (1996);
- [5] “*Wine: A Scientific Exploration*”, Merton Sandler, Roger Pinder, CRC Press, pg.66;
- [6] “*Nem leigo nem expert – Manual básico do mundo do vinho*”, RUSSO, Didi, Ativa/M. Editorial gráfica, 34, São Paulo, 2005;
- [7] “*Enología Practica: Conocimiento y elaboración del vino*”, Alfredo González Salgueiro, 3ª Edição, Ediciones Mundi-Prensa, 1989;
- [8] “*Wine Science: Principles & Applications*”, Ronald S. Jackson, 3rd Edition, Elsevier, 2008;
- [9] “*Le Vin – De l’analyse à l’elaboration*”, D. Delanoe, C. Maillard, D. Maisondieu, Tradução de R. Casquilho, Publicações Europa-América, Lda, Mem Martins, 1989;
- [10] “*Methods for analysis of musts and wines*”, M.A. Amerine, C.S. Ough, 2ª Edição, John Wiley & Sons Inc., Davis, 1988;
- [11] What is a pesticide?, U.S. E.P.A. definitions;
- [12] Bayer Crop Science Portugal (www.agro.bayer.com.pt/internet/asp/default.asp);
- [13] Human Impacts on Ecosystems, Oregon State University (oregonstate.edu/instruction/bi301/agpeptic.htm);
- [14] M. Correia, C. Delerue, A. Alves, *Journal of Chromatography A*, vol.889 (2000) pg.59-67;
- [15] G.J. Soleas, J. Yan, K. Hom, D.M. Goldberg, *Journal of Chromatography A*, vol.882 (2000) pg.205-212;
- [16] João Garrido, A Flavesçência Dourada da Vinha – Uma nova preocupação na Região dos vinhos verdes, Estação Vitivinícola Amândio Galhano, 9 de Abril de 2008;
- [17] Bayer Crop Sciences, Manual da Protecção Integrada da Vinha, Lisboa 2003;
- [18] Direcção Geral de Protecção de Culturas, Instituto Nacional de Investigação Agrária, Produção Integrada da Vinha, DGPC, Oeiras 2000;
- [19] U.S. E.P.A., Integrated Pest Management (IPM) and Food Production (<http://www.epa.gov/pesticides/factsheets/ipm.htm>);

- [20] “*Estudo da Eliminação de pesticidas ao longo da produção de um vinho*”, Hugo Alexandre Dias Ferreira de Oliveira e Silva, Dissertação para Mestrado em Química, Faculdade de Ciências da Universidade do Porto, 2004;
- [21] Regulamento (CE) n°149/2008;
- [22] Regulamento (CE) n°839/2008;
- [23] “*Solid Phase Microextraction: Theory and Practice*”, J.Pawliszyn, Wiley-VCH, Inc., 1997;
- [24] *Supelco Bulletins* 923;
- [25] *Supelco Bulletins* 928;
- [26] *Supelco Bulletins* 929;
- [27] “Comprehensive Analytical Chemistry 47”, S. Ahuja, N. Jespersion, Elsevier, 2006];
- [28] “*Determinação de pesticidas nos vegetais por cromatografia gasosa – espectrometria de massa*”, Liliana de Jesus Maia, Relatório de Estágio Curricular, Departamento de Química, Universidade do Minho, 2008;
- [29] A.L.Simplicio, L.V. Boas, *Journal of Chromatography A*, vol.883 (1999) pg.35-42;
- [30] R. Eisert, J. Pawliszyn, *Journal of Chromatography A*, vol.776 (1997) pg.293-303;
- [31] I. Valor, J. Moltó, D. Apraiz, G. Font, *Journal of Chromatography A*, vol.767 (1997) pg.195-203;
- [32] S. Millán, M. Sampedro, N. Unceta, M. Goicolea, E. Rodriguez, R. Barrio, *Journal of Chromatography A*, vol.995 (2003) pg.135-142;
- [33] S. Magdic, A. Boyd-Boland, K. Jinno, J.B. Pawliszyn, *Journal of Chromatography A*, vol.736 (1996) pg.219-228;
- [34] R. Otero, C. Ruiz, B. Grande, J. Gándara, *Journal of Chromatography A*, vol.942 (2002) pg.41-52
- [35] A. Boyd-Boland, J. Pawliszyn, *Journal of Chromatography A*, vol.704 (1995) pg.163-172;
- [36] J. Beltran, F.J. Lopez, O. Cepria, F. Hernandez, *Journal of Chromatography A*, vol.808 (1998) pg.257-263;
- [37] J. Beltran, F.J. López, F. Hernández, *Journal of Chromatography A*, vol.885 (2000) pg.389-404;
- [38] K. Sukola, J. Koziel, F. Augusto, J. Pawlisyn, *Analytical Chemistry*, vol.73 (2001) pg.13-18;
- [39] T. Sérot, C. Lafficher, *Food Chemistry*, vol.82 (2003) pg.513-519;
- [40] G.-F. Pang, C.-L. Fan, Y.-M. Liu, Y.-Z. Cao, J.-J. Zhang, B.-L. Fu, X.-M. Li, Z.-Y. Li, Y.-P. Wu, *Food Additives and Contaminants*, 23(8) (2006), pg.777-810;

- [41] L. Alder, K. Greulich, G. Kempe, B. Vieth, *Mass Spectrometry Reviews*, vol.25 (2006) pg.838-865;
- [42] “*Análise de polifenóis em vinhos por LC-MS e voltametria cíclica*”, Ana Maria Dias, Relatório do Estágio Curricular, Departamento de Química, Universidade do Minho, 2008;
- [43] J. Sherma, *Journal of AOAC International*, vol.84 n°5 (2001) pg.1303-1312;
- [44] J. Wong, M. Webster, C. Halverson, M. Hengel, K. Ngim, S. Ebeler, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol.51 (2003) pg.1148-1161;
- [45] K.-J. Chia, S.-D. Huang, *Rapid Communications in Mass Spectroscopy*, vol.20 (2006) pg.118-124;
- [46] I. Barnabas, J. Dean, I. Fowlis, S. Owen, *Journal of Chromatography A*, vol.705 (1995) pg.395-312;
- [47] M.-R. Lee, Y.-C. Yeh, W.-S. Hsiang, C.-C. Chen, *Journal of Chromatography B*, vol.707 (1998) pg.91-97;
- [48] M. Sng, F. Lee, H. Lakso, *Journal of Chromatography A*, vol.759 (1997) pg.225-230;
- [49] C. Aguilar, S. Penalver, E. Pocrull, F. Borrull, R. Marcé, *Journal of Chromatography A*, vol.795 (1998) pg.105-115;
- [50] R. Ferrari, T. Nilsson, R. Arena, P. Arlati, G. Bartolucci, R. Basla, F. Cioni, G. Del Carlo, P. Dellavedova, E. Fattore, M. Fungi, C. Grote, M. Guidotti, Stefania Morgillo, L. Müller, M. Volante, *Journal of Chromatography A*, vol.795 (1998) pg.371-376;
- [51] M.-R. Lee, Y.-C. Yeh, W.-S. Hsiang, B.-Huey Hwang, *Journal of Chromatography A*, vol.806 (1998) pg.317-324;
- [52] T. Nilsson, D. Baglio, I. Galdo-Miguez, J. Madsen, S. Facchetti, *Journal of Chromatography A*, vol.826 (1998) pg.211-216;
- [53] J. Jiménez, J. Bernal, M. Del Nozal, M. Martín, A. Mayorga, *Journal of Chromatography A*, vol.829 (1998) pg.269-277;
- [54] S. Cunha, J. Fernandes, A. Alves, M. Oliveira, *Journal of Chromatography A*, vol.1216 (2009) pg.119-126;
- [55] S. Patil, K. Banerjee, S. Dasgupta, D. Oulkar, S. Patil, M. Jadhav, R. Savant, P. Adsule, M. Deshmukh, *Journal of Chromatography A*, vol.1216 (2009) pg.2307-2319;
- [56] K. Jinno, T. Muramatso, Y. Saito, Y. Kiso, S. Magdic, J. Pawliszyn, *Journal of Chromatography A*, vol.754 (1996) pg.137-144;
- [57] B. Page, G. Lacroix, *Journal of Chromatography A*, vol.757 (1999) pg.173-182;

- [58] C. Aguilar, A. Penalver, E. Pocurrull, J. Ferré, F. Borrull, R. Marcé, *Journal of Chromatography A*, vol.844 (1999) pg.425-432;
- [59] R. Eisert, K. Levsen, *Journal of Chromatography A*, vol.733 (1996) pg.143-157;
- [60] C. Gonçalves, M. Alpendurada, *Journal of Chromatography A*, vol.1026 (2004) pg.239-250;
- [61] J. Jiménez, J. Bernal, M. Nozal, L. Toribio, E. Arias, *Journal of Chromatography A*, vol.919 (2001) pg.147-156;
- [62] S. Abreu, M. Correia, P. Herbert, L. Santos, A. Alves, *Food Additives and Contaminants*, vol.22 (2005) pg.549-556;
- [63] "Pesticide Analytical Manual Vol. I: Multiresidue Methods", F.D.A., 3rd Edition, 1994.

Anexos

Anexo I – Frases de Risco

<u>Códigos</u>	<u>Frases de Risco</u>
R 1	Explosivo em estado seco.
R 2	Risco de explosão por choque, fricção, fogo ou outras fontes de ignição.
R 3	Grande risco de explosão por choque, fricção, fogo ou outras fontes de ignição.
R 4	Forma compostos metálicos explosivos muito sensíveis.
R 5	Perigo de explosão em caso de aquecimento.
R 6	Explosivo em contacto e sem contacto com o ar.
R 7	Pode provocar incêndios.
R 8	Perigo de incêndio em caso de contacto com materiais combustíveis.
R 9	Perigo de explosão se misturado com materiais combustíveis.
R 10	Inflamável.
R 11	Facilmente inflamável.
R 12	Extremamente inflamável.
R 13	Gás liquefeito extremamente inflamável.
R 14	Reage violentamente com a água.
R 15	Reage com a água libertando gases extremamente inflamáveis.
R 16	Explosivo se misturado com substâncias comburentes.
R 17	Inflama-se espontaneamente em contacto com o ar.
R 18	Pode formar misturas de ar-vapor explosivas/inflamáveis durante a utilização.
R 19	Pode formar peróxidos explosivos.
R 20	Nocivo por inalação.
R 21	Nocivo em contacto com a pele.
R 22	Nocivo por ingestão.
R 23	Tóxico por inalação.
R 24	Tóxico em contacto com a pele.
R 25	Tóxico por ingestão.
R 26	Muito tóxico por inalação.
R 27	Muito tóxico em contacto com a pele.
R 27 a	Muito tóxico em contacto com os olhos.
R 28	Muito tóxico por ingestão.
R 29	Em contacto com a água liberta gases tóxicos.
R 30	Pode inflamar-se facilmente durante o uso.
R 31	Em contacto com ácidos liberta gases tóxicos.
R 32	Em contacto com ácidos liberta gases muito tóxicos.
R 33	Perigo de efeitos cumulativos.
R 34	Provoca queimaduras.
R 35	Provoca queimaduras graves.
R 36	Irritante para os olhos.
R 36 a	Lacrimogéneo.
R 37	Irritante para as vias respiratórias.
R 38	Irritante para a pele.

- R 39 Perigo de efeitos irreversíveis muito graves.
- R 40 Possibilidade de efeitos irreversíveis.
- R 41 Risco de lesões oculares graves.
- R 42 Possibilidade de sensibilização por inalação.
- R 43 Possibilidade de sensibilização em contacto com a pele.
- R 44 Risco de explosão se aquecido em ambiente fechado.
- R 45 Pode causar cancro.
- R 46 Pode causar alterações genéticas hereditárias.
- R 47 Pode causar má formações congénitas.
- R 48 Risco de efeitos graves para a saúde em caso de exposição prolongada.
- R 49 Pode causar cancro por inalação.
- R 50 Muito tóxico para os organismos aquáticos.
- R 51 Tóxico para os organismos aquáticos.
- R 52 Nocivo para os organismos aquáticos.
- R 53 A longo prazo pode provocar efeitos negativos no ambiente aquático.
- R 54 Tóxico para a flora.
- R 55 Tóxico para a fauna.
- R 56 Tóxico para os organismos do solo.
- R 57 Tóxico para as abelhas.
- R 58 A longo prazo pode provocar efeitos negativos no meio ambiente.
- R 59 Perigoso para a camada do ozono.
- R 60 Pode comprometer a fertilidade.
- R 61 Risco durante a gravidez com efeitos adversos para à descendência.
- R 62 Possíveis riscos de comprometer a fertilidade.
- R 63 Possíveis riscos, durante a gravidez, de efeitos indesejáveis na descendência.
- R 64 Pode causar danos nos bebés alimentados com o leite materno.
- R 65 Nocivo: pode causar danos nos pulmões se ingerido.
- R 66 A exposição repetida pode causar pele seca e gretada.
- R 67 Os vapores podem causar tonturas e sonolência.

Anexo II – Frases de Segurança

Códigos	Frases de Segurança
S 1	Conservar bem trancado.
S 2	Manter fora do alcance das crianças.
S 3	Conservar em lugar fresco.
S 4	Manter longe de lugares habitados.
S 5	Conservar em... (líquido apropriado a especificar pelo fabricante).
S 6	Conservar em... (gás inerte a especificar pelo fabricante).
S 7	Manter o recipiente bem fechado.
S 8	Manter o recipiente ao abrigo da humidade.
S 9	Manter o recipiente num lugar bem ventilado.
S 10	Manter o conteúdo húmido.
S 11	Evitar o contacto com o ar.
S 12	Não fechar o recipiente hermeticamente.
S 13	Manter longe de comida, bebidas incluindo os dos animais.
S 14	Manter afastado de... (materiais incompatíveis a indicar pelo fabricante).
S 15	Conservar longe do calor.
S 16	Conservar longe de fontes de ignição - Não fumar.
S 17	Manter longe de materiais combustíveis.
S 18	Abrir manipular o recipiente com cautela.
S 20	Não comer nem beber durante a utilização.
S 21	Não fumar durante a utilização.
S 22	Não respirar o pó.
S 23	Não respirar o vapor/gás/fumo/aerossol.
S 24	Evitar o contacto com a pele.
S 25	Evitar o contacto com os olhos.
S 26	Em caso de contacto com os olhos lavar imediata abundantemente em água e chamar um médico.
S 27	Retirar imediatamente a roupa contaminada.
S 28	Em caso de contacto com a pele lavar imediata e abundantemente com... (produto adequado a indicar pelo fabricante).
S 29	Não atirar os resíduos para os esgotos.
S 30	Nunca adicionar água ao produto.
S 33	Evitar a acumulação de cargas electrostáticas.
S 34	Evitar choques e fricções.
S 35	Eliminar os resíduos do produto e os seus recipientes com todas as precauções possíveis.
S 36	Usar vestuário de protecção adequado.
S 37	Usar luvas adequadas.

- S 38 Em caso de ventilação insuficiente usar equipamento respiratório adequado.
- S 39 Usar protecção adequada para os olhos/cara.
- S 40 Para limpar os solos e os objectos contaminados com este produto utilizar... (a especificar pelo fabricante).
- S 41 Em caso de incêndio e/ou explosão não respirar os fumos.
- S 42 Durante as fumigações/pulverizações, usar equipamento respiratório adequado (denominação(ões) adequada(s) a especificar pelo fabricante).
- S 43 Em caso de incêndio usar... (meios de extinção a especificar pelo fabricante. Se a água aumentar os riscos acrescentar "Não utilizar água").
- S 44 Em caso de indisposição consultar um médico (se possível mostrar-lhe o rótulo do produto).
- S 45 Em caso de acidente ou indisposição consultar imediatamente um médico (se possível mostrar-lhe o rótulo do produto).
- S 46 Em caso de ingestão consultar imediatamente um médico e mostrar o rótulo ou a embalagem.
- S 47 Conservar a uma temperatura inferior a... °C (a especificar pelo fabricante).
- S 48 Conservar húmido com... (meio apropriado a especificar pelo fabricante).
- S 49 Conservar unicamente no recipiente de origem.
- S 50 Não misturar com... (a especificar pelo fabricante).
- S 51 Usar unicamente em locais bem ventilados.
- S 52 Não usar sobre grandes superfícies em lugares habitados.
- S 53 Evitar a exposição – obter instruções especiais antes de usar.
- S 54 Obter autorização das autoridades de controlo de contaminação antes de despejar nas estações de tratamento de águas residuais.
- S 55 Utilizar as melhores técnicas de tratamento antes de despejar na rede de esgotos ou no meio aquático.
- S 56 Não despejar na rede de esgotos nem no meio aquático. Utilizar para o efeito, um local apropriado para o tratamento dos resíduos.
- S 57 Utilizar um contentor adequado para evitar a contaminação do meio ambiente.
- S 58 Elimina-se como resíduo perigoso.
- S 59 Informar-se junto do fabricante de como reciclar e recuperar o produto.
- S 60 Elimina-se o produto e o recipiente como resíduos perigosos.
- S 61 Evitar a sua libertação para o meio ambiente. Ter em atenção as instruções específicas das fichas de dados de Segurança.
- S 62 Em caso de ingestão não provocar o vómito: consultar imediatamente um médico e mostrar o rótulo ou a embalagem.

Anexo III - Fórmulas matemáticas

a. Média

$$\bar{x} = \frac{\sum_{n=1}^i x_i}{n}$$

b. Desvio Padrão

$$s = \sqrt{\frac{\sum_{n=1}^i (\bar{x} - x_i)^2}{n-1}}$$

c. Declive / Sensibilidade

$$b = \frac{\sum_{n=1}^i ((x_i - \bar{x})(y_i - \bar{y}))}{\sum_{n=1}^i (x_i - \bar{x})^2}$$

d. Ordenada na Origem

$$a = \bar{y} - b\bar{x}$$

e. Coeficiente de Correlação

$$r = \frac{\sum_{n=1}^i ((x_i - \bar{x})(y_i - \bar{y}))}{\sqrt{(\sum_{n=1}^i (x_i - \bar{x})^2)(\sum_{n=1}^i (y_i - \bar{y})^2)}}$$

f. Estimativa do Desvio Padrão dos pontos experimentais à recta de regressão

$$s_{x/y} = \sqrt{\frac{\sum_{n=1}^i (y_i - \hat{y})^2}{n-2}}$$

g. Estimativa do Desvio Padrão da Ordenada na Origem

$$s_a = s_{x/y} \sqrt{\frac{\sum_{n=1}^i x_i^2}{n \sum_{n=1}^i (x_i - \bar{x})^2}}$$

h. Estimativa do Desvio Padrão do Declive

$$s_b = \frac{s_{x/y}}{\sqrt{\sum_{n=1}^i (x_i - \bar{x})^2}}$$

i. Limite de Detecção

$$LDD = a + 3s_a$$

j. Limite de Quantificação

$$LDQ = a + 10s_a$$

k. Cálculo da Concentração (ppm)

$$C = \frac{m(mg)}{V(L)}$$

l. Cálculo da Concentração (por diluição) (ppm)

$$n_i = n_f \Leftrightarrow C_f = \frac{C_i V_i}{V_f}$$

m. Cálculo do erro da Concentração (ppm)

$$\Delta C = C \sqrt{\left(\frac{\sigma m}{m}\right)^2 + \left(\frac{\sigma V}{V}\right)^2}$$

n. Cálculo do erro da Concentração (por diluição) (ppm)

$$\Delta C = C \sqrt{\left(\frac{\sigma m}{m}\right)^2 + \left(\frac{\sigma V_i}{V_i}\right)^2 + \left(\frac{\sigma V_f}{V_f}\right)^2}$$

o. Teste de Mandel

Regressão Linear: $bx+a$

$s_{x/y}$ (alínea f anterior)

Regressão Quadrática: cx^2+bx+a

s_{y^2} (calcula-se do mesmo modo que $s_{x/y}$)

$$DS^2 = (n-2) s_{x/y} - (n-2) s_{y^2}$$

$$PG = DS^2/s_{y^2}$$

Se $PG \leq F(0,05;n_i;n_q) \Rightarrow$ Tendência Linear

Anexo IV - Instruções de funcionamento do GC-MS

- Construção do Método de Análise e Injecção de Padrões/Amostras em GC-MS

Clicar no ícone do *Software > System Control / Automation* e esperar que todos os componentes se apresentem operacionais;

Verificar o nível de ar e água no sistema: clicar em *Manual Control > Air/Water Check > Begin*, esperar enquanto o sistema faz a medição, e uma vez lendo os resultados, clicar em *Done*.

Clicar em *Aquisition*.

Se o *Air/Water Check* apresentar níveis de Ar ou Água elevados deve-se passar gás de arraste pela coluna, e durante esse tempo fazer a temperatura subir de modo a evaporar a Água presente; se o *Air/Water Check* apresentar níveis aceitáveis, pode-se proceder com as análises.

Para construir o método de análise com as condições experimentais pretendidas: clicar no nome do método e de seguida em *View/Edit Method*, clicar em *Auto Sampler* e seleccionar *None* (não se pretende utilizar Injetor automático); clicar em *Flow Pressure* e defini-lo a 1 mL/min; clicar em *Column Oven* e definir a Rampa de Temperatura; clicar em *Injector*, definir a temperatura do injetor e introduzir o tempo total de análise; clicar em *MS Aquisition Method* e definir os intervalos de tempo em que o filamento está ligado e desligado, seleccionar *Ionization On*, e em *Scan Type* escolher *Full* ou *MS/MS*. No caso do método *Full Scan* em *Ionization* seleccionar *EI*, e em *Internal EI Parameters* definir a *Emission Current* a 10 µAmps; no caso *MS/MS* em *Ionization* seleccionar *EI*, e em *Internal EI Parameters* definir a *Emission Current* a 20 µAmps, em *MS/MS Parameters* introduzir a relação m/z do ião precursor, em *WaveForm Type* escolher *Resonant*, em *Excitation Storage Level* calcular a relação m/z para um *q value* de 0,4, em *Excitation Amplitude* introduzir o valor determinado numa optimização de condições pelo método *AMD*.

Optimização das Condições: Abrir o método e clicar em *MS Aquisition Method*, e em *Scan Type* seleccionar *AMD*. Clicar em *AMD Parameters*; em *Precursor Ion* e introduzir a relação m/z do pico base para o composto em estudo; em *Waveform Type* seleccionar *Resonant*; em *Excitation Amplitude* introduzir as seguintes voltagens de cima para baixo: 0,10, 0,20, 0,30, 0,40, 0,50, 0,60, 0,70, 0,80, 0,90 e 1,00; em *Product Ion Start Mass* introduzir a relação m/z mínima a detectar (50), em *Product Ion End Mass* introduzir a relação m/z máxima a detectar (m/z do pico base + 10). Ao fazer a injecção com estas definições, o cromatograma tem 10 versões diferentes, uma para cada voltagem de ionização. Deve-se fazer uma análise deles todos de modo encontrar um intervalo de voltagens (por exemplo 0,40-0,50 V) em que o ião base passe a ter uma intensidade menor e apareça um novo ião base. Seguidamente redefinir novamente as voltagens (segundo o exemplo: 0,40, 0,41, 0,42, 0,43, 0,44, 0,45, 0,46, 0,47, 0,48, 0,49 e 0,50 V), e analisar todas as versões de modo a verificar qual a voltagem de ionização óptima para a análise *MS/MS*, sendo esta a que produz um espectro de

massa em que o ião base inicial passe a ter uma intensidade de cerca de 30% e exista um novo ião base.

Clicar em *File > Save As*, e dar um nome o método. Fechar o *Method Builder*.

Clicar em *File > Open Method*, e seleccionar o método definido anteriormente.

Clicar no nome do método e de seguida em *Re-Activate Method*.

Clicar em *Single Injection*, dar o nome ao cromatograma a ser criado, e clicar em *Injection*.

Esperar que o equipamento passe do estado *Not Ready* para *Waiting/Ready*. Fazer a injeção.

Uma vez obtido o cromatograma, para fazer a integração do pico deve-se primeiramente ampliar o pico cromatográfico de interesse. Carregar na Tecla I e ao mesmo tempo desenhar uma linha na base do mesmo. Largar a Tecla I para obter a área correspondente a esse pico.

- Construção de Rectas de Calibração em *GC-MS (Full Scan)*

Abrir o Método (*Full Scan*) e clicar em *Calculations Setup*. Seleccionar o *Measurement Type (Area)*, e o *Calibration Type (External Standard)*. Clicar em *Compound Table*, e de seguida em *Select Data File*. Seleccionar o cromatograma com o composto de interesse. Clicar em *Build Compound List* e aparece o cromatograma. Clicar em cima do(s) pico(s) cromatográfico(s) desejado(s). No *Method Builder* clicar em *Import Compound List* e aparece uma tabela, na qual se deve seleccionar o(s) tempo(s) de retenção de interesse, e clicar em *Select*. Clicar duas vezes em cima do tempo de retenção na *Compound List* para aparecer uma nova caixa de diálogo. Clicar em *Calculations*, seleccionar *#Calibration Levels (7)*, e *Calibration Level Amounts* (inserir as 7 concentrações diferentes da recta de calibração, sendo a primeira a mais diluída). Clicar em *Ok*. Clicar em *File* e de seguida em *Save*.

Clicar em *File > New Sample List*. Na linha 1 seleccionar *New Calib Block*, nas restantes (2 a 8) inserir o nome do cromatograma a ser criado para cada nível de calibração e seleccionar *Calibration* no *Sample Type*. Em *Calibration Level* inserir os números de 1 a 7 sucessivamente, e em *Injection* inserir o número de réplicas para cada nível de concentração. Clicar em *Begin*.

- Construção de Rectas de Calibração em *GC-MS/MS*

Abrir o método (MS/MS) e em *Calculations Setup*. Seleccionar o *Measurement Type (Area)*, e o *Calibration Type (External Standard)*. Clicar em *Compound Table*, e de seguida em *Select Data File*. Seleccionar o cromatograma com o composto de interesse. Clicar em *Build Compound List* e aparece o cromatograma. Clicar em cima do(s) pico(s) cromatográfico(s) desejado(s). No *Method Builder* clicar em *Import Compound List* e aparece uma tabela, na qual se deve seleccionar o(s) tempo(s) de

retenção de interesse, e clicar em *Select*. Clicar duas vezes em cima do tempo de retenção na *Compound List* para aparecer uma nova caixa de diálogo. Clicar em *Calculations*, seleccionar *#Calibration Levels (7)*, e *Calibration Level Amounts* (inserir as 7 concentrações diferentes da recta de calibração, sendo a primeira a mais diluída). Clicar em *Ok*. Clicar em *File* e de seguida em *Save*.

Clicar em *File > New Sample List*. Na linha 1 seleccionar *New Calib Block*, nas restantes (2 a 8) inserir o nome do cromatograma a ser criado para cada nível de calibração e seleccionar *Calibration* no *Sample Type*. Em *Calibration Level* inserir os números de 1 a 7 sucessivamente, e em *Injection* inserir o número de réplicas para cada nível de concentração. Clicar em *Begin*.

Anexo V - Instruções de funcionamento do LC-MS^[42]

Instruções de Funcionamento do LC-MS: Ligar os três interruptores do LC (no *Surveyor AS*, no *Surveyor LC Pump* e no *Surveyor PDA Plus*); Abrir o software *XCalibur* e clicar em *Instrument Setup*; Clicar em *Surveyor LC Pump*, na caixa de diálogo aberta; Seleccionar *General* e preencher o quadro (nome dos eluentes); Clicar em *Gradient Program* e escolher a percentagem de cada componente (exemplo 50 % de eluente A e 50 % de eluente B).

Realização da Purga: Rodar o *Drain* 180° para a direita, no *Surveyor LC Pump*, na caixa de diálogo do *Instrument Setup*, clicar um *Surveyor LC Pump* e na barra de ferramentas seleccionar: *Surveyor LC Pump > Direct Control > Operation*; Seleccionar *Solvent valve A* e clicar em *Purge* (efectua a purga do eluente A); Efectuar o mesmo procedimento para os outros eluentes; Voltar o *Drain* 180° para a esquerda.

Lavagem da Seringa: Na caixa de diálogo do *Instrument Setup*, clicar em *Surveyor AS* e na barra de ferramentas seleccionar em *Surveyor AS > Direct Control > Operation*; Clicar em *Wash needle* e na caixa de diálogo clicar em *Reservoir* e escolher *flush bottle* e indicar o volume de lavagem (μL); Clicar em *Apply*.

Definir sequência de análise: No menu principal do *X-Calibur*, clicar em *Sequence Setup* e definir a sequência directamente na caixa de diálogo; Gravar a sequência; Para verificar as condições do método, clicar com o botão direito do rato em *Instrument Method* e seleccionar *Open File*; Na caixa de diálogo aberta, escolher *Scan Type (Full Scan)*, *Polarity (Positive)*, *Data Type (Centroid)*, *MSMS (Parent Mass m/z)*, *Tune Method (Cafeína)*; Na mesma caixa de diálogo aberta clicar em *Divert Valve*, seleccionar *Use Divert Valve*, escolher em *Number of valve positions: 3*, e *Position at Start to Run: To Waste*, e com o cursor escolher a posição em que do *Waste* se passa para o *Load-Detector* no equipamento do MS, Depois de definidas as condições do método, clicar em *File > Save As*; Na caixa de diálogo aberta do lado esquerdo da sequência, clicar no botão direito do rato em *Surveyor LC Pump* e clicar em *Turn On Device*; Proceder de igual modo no *Surveyor PDA Plus*; Clicar em *Real Time* na barra de ferramentas.

Integração dos Picos Cromatográficos: No menu principal do *X-Calibur*, clicar em *Qual Browser*; Clicar em *File > Open* e seleccionar o cromatograma que se pretende integrar; Clicar no ícone que se encontra à esquerda no ecrã do monitor do cromatograma; Clicar no botão direito do rato, escolher *Peak Detection > Set Peak Detection Algorithm and Detect all in this Plot > Genesis*; Clicar em *Ranges > Scan Filter > Peak Algorithm: Genesis > Detector: MS > Plot Type: base peak > Ok*; Clicar em *Display Options > Labels > Area/Height > Ok*.

Precauções: Pelo menos uma vez por semana, os solventes devem ser desgaseificados durante pelo menos 30 minutos no banho de ultra-sons; todos os solventes utilizados devem ser previamente filtrados; a purga deve ser feita sempre que o equipamento é ligado; a seringa deve ser lavada entre cada análise.