



UNIVERSIDADE DA BEIRA INTERIOR

Ciências

**Determinação de pesticidas organofosforados em
amostras biológicas por microextração em
seringa empacotada e cromatografia gasosa
acoplada a espectrometria de massa em tandem
(MEPS-GC-MS/MS)**

Catarina Loureiro dos Santos

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em
Bioquímica
(2ºCiclo de estudos)

Orientador: Prof^a. Doutora Maria Eugenia Gallardo Alba
Co-orientador: Mestre Alexandra Filipa Pereira Gonçalves

Covilhã, Outubro de 2014

Dedicatória

És uma lutadora, que me inspira e motiva em cada dia que passa. Ensinaste-me a dar sempre o meu melhor, a nunca desistir e a fazer sempre a perfeição dos meus actos, porque se não está perfeito não está terminado. E o que está terminado pode ser sempre melhorado!

É a ti mãe, a quem que dedico este trabalho!

Agradecimentos

O trabalho que aqui apresento é reflexo do esforço e dedicação das pessoas directamente envolvidas, mas de tantas outras, que contribuíram de diferentes maneiras para a realização do mesmo. A todos vocês quero dirigir uma palavra de apreço e um agradecimento especial, por tornarem possível a conclusão desta etapa tão importante na minha vida.

À professora Eugénia Gallardo, pela oportunidade e voto de confiança ao me ter confiado este trabalho, um tema que lhe é tão pessoal. Obrigada pelo seu tempo, dedicação, motivação e empenho. E um obrigado especial por todo o seu apoio, compreensão e compaixão, que nos momentos mais difíceis fizeram toda a diferença!

À Alexandra por partilhar comigo os seus conhecimentos de uma forma tão cuidadosa e clara. Pela sua paciência, calma, serenidade, dedicação e disponibilidade para atender às minhas dúvidas.

Aos meus pais, pelo apoio, compreensão e paciência, e apesar dos meus vários fins-de-semana de ausência, sempre me apoiaram e ajudaram. Muito obrigada, pai e mãe, por estarem sempre tão presentes mesmo estando longe!

Aos meus colegas de laboratório, em especial ao David, com quem dividi tantas dúvidas, e à Filipa, com quem partilhei tantas confidências. Obrigada a ambos, pela vossa companhia nas imensas horas passadas no laboratório, e pelas longas conversas das mais variadas temáticas. Obrigada, por enriquecerem um pouco mais a minha vida!

Às minhas amigas, Ana Sofia, Patrícia e Tânia, que apesar da distância marcaram a sua presença através do apoio e compreensão que sempre me transmitiram. Obrigada amigas por fazerem parte da minha vida!

Ao *meu* David. Foste tu, que me inspiraste e motivaste a seguir este caminho. Posso afirmar com toda a minha convicção que sem ti, não teria conseguido. Foste a minha inspiração, a minha força e o meu apoio. Obrigada por me ouvires, respeitares e compreenderes, e por estares sempre ao meu lado, nos bons e maus momentos, sempre disponível para mim. Obrigada pela tua dedicação e empenho, por acreditares em mim e nunca desistires. Obrigada, por fazeres de mim uma pessoa melhor.

Resumo

Os pesticidas representam um variado grupo de compostos amplamente utilizados com o fim de controlar, prevenir ou matar organismos considerados nocivos e indesejáveis ao homem e ao meio ambiente. Podem ser classificados de acordo com o organismo alvo em que actuam como insecticidas, herbicidas, rodenticidas, fungicidas, entre outros.

Os pesticidas organofosforados (POF) são um grupo particular deste tipo de substâncias, usados principalmente como insecticidas. Contudo, o mecanismo de acção dos POF envolve uma enzima comum entre insectos e humanos, a acetilcolinesterase. Esta enzima é responsável pela terminação do sinal nervoso da acetilcolina, neurotransmissor envolvido em diversas funções biológicas. Por este motivo os POF representam um risco de intoxicação para os humanos, sendo que os casos registados são principalmente em zonas rurais e em situações de suicídio ou acidente.

Este trabalho tem por objectivo o desenvolvimento de um método para a determinação de sete POF em sangue total com recurso à cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa em tandem (GC-MS/MS) e à microextração em seringa empacotada (MEPS). Os POF seleccionados para a realização deste estudo foram o azinfos-etil (AZP), diazinão (DZN), dimetoato (DMT), clorpirifos (CLP), clorfenvinfos (CLF), paratião (PRT) e quinalfos (QLP), que de acordo com a literatura são os mais recorrentes em casos de intoxicação aguda, em Portugal.

O método foi validado de acordo com as *guidelines* internacionais da *Food and Drug Administration* (FDA) e da *International Conference Harmonisation* (ICH). O procedimento foi linear para o intervalo de concentrações de 0,5 (limite inferior de quantificação - LLOQ) até 50 µg/mL para todos os compostos excepto para o AZP que foi de 2,5-50 µg/mL. Em todos os casos, os coeficientes de determinação (R^2) foram superiores a 0,99. Para o DMT, composto só avaliado qualitativamente, o limite de detecção (LOD) foi de 40 µg/mL. Tanto a precisão (intra e inter-dia) como a exactidão foram consideradas adequadas por se encontrarem dentro dos valores definidos pelas *guidelines*, isto é, CV inferiores a 15% e BIAS $\pm 15\%$, excepto no LLOQ que foi de 20% e $\pm 20\%$, respectivamente. Esta técnica permitiu, a partir de um pequeno volume de amostra (100 µL), bem como dos reduzidos volumes de solventes orgânicos, obter recuperações entre os 57-77%, o que torna o método apelativo devido ao seu baixo custo e boa eficácia de extracção.

Salienta-se que este foi o primeiro trabalho no qual MEPS foi utilizada para isolar estes compostos a partir de amostras de sangue total.

Palavras-Chave

Pesticidas organofosforados, sangue total, MEPS, GC-MS/MS

Abstract

Pesticides are a wide group of substances used to prevent, control or kill forms of life considered novices to humans and the environment. Organophosphorus pesticides (OPs) are a particular group of these substances used mainly as insecticides. OPs act by inhibition of acetylcolinestrase, an enzyme responsible for the termination of the signal transmission of acetylcholine, a neurotransmitter with several biological functions. Because acetylcolinestrase is common to insects and humans, OPs represent a risk of intoxication for humans. So, and despite the fact that commercialization of some OPs is forbidden, there are still many cases of intoxication, most of them accidental or suicidal.

The aim of our work was to develop a methodology for the determination of seven OPs in whole blood by microextraction in packed syringe (MEPS) and gas chromatography coupled to tandem mass spectrometry (GC-MS/MS). The selected OPs were: diazinon (DZN), chlorpyrifos (CLP), chlorfenvinphos (CLF), parathion-ethyl (PRT), quinalphos (QLP) and azynphos-ethyl (AZP), ethion was used as internal standard. The method was validated according to the guidelines of the Food and Drug Administration (FDA) and the International Conference of Harmonisation (ICH). The procedure was linear for concentrations ranging from 0.5 (lower limit of quantification - LLOQ) to 50 µg/mL for all analytes, with exception of AZP for which the linearity was established between 2.5 and 50 µg/mL. In all cases, the determination coefficients (R^2) were higher than 0.99. DMT was only analysed qualitatively, and its limit of detection was found to be 40 µg/mL. Intra- and inter-day precision and accuracy were considered adequate according to the adopted guidelines, CV lower than 15% and BIAS within $\pm 15\%$, except at the LLOQ, for which 20% and $\pm 20\%$, respectively, were found acceptable.

MEPS revealed to be an efficient technique that allows a small sample volume (100 µL), low organic solvents consumption and good recoveries (57-77%), which makes it appealing due to the cost of analysis and good extraction efficiency.

This is the first study in which a MEPS procedure was used for the isolation of OPs from whole blood samples.

Keywords

Organophosphorus pesticides, whole blood, MEPS, GC-MS/MS

Índice

Resumo	vii
Abstract.....	ix
Lista de Figuras.....	xv
Lista de Tabelas.....	xvii
Lista de Acrónimos.....	xix
Justificação de Tema	xxiii
Objectivos.....	xxv
I. Introdução	1
1. Pesticidas Organofosforados.....	1
1.1. Estrutura Química e Propriedades.....	2
1.2. Toxicocinética.....	3
1.3. Toxicodinâmica.....	5
1.3.1. Mecanismo de Acção	5
1.3.2. Toxicidade e Alvo Biológico	7
1.4. Intoxicação	8
1.4.1. Intoxicação Aguda e Sintomas Associados.....	8
1.4.1.1. Casos de Intoxicação Aguda	9
1.4.2. Intoxicação Crónica	10
1.5. Tratamento	11
1.6. Os Compostos em Estudo	11
1.6.1. Situação Legal em Portugal.....	14
2. Métodos para a Determinação de Pesticidas Organofosforados.....	16
2.1. Amostras biológicas utilizadas para a detecção de Pesticidas Organofosforados	23
2.2. Técnicas de extracção	24
2.2.1. Microextracção em Seringa Empacotada	26
2.3. Determinação Analítica de Pesticidas Organofosforados	28
2.3.1. Espectrometria de Massa em Tandem	28
II. Parte Experimental	33

1. Material e Métodos	33
1.1. Reagentes e Padrões	33
1.1.1. Padrão Interno	33
1.2. Instrumentação	34
1.3. Soluções	34
1.4. Sistema Cromatográfico	35
1.4.1. Condições cromatográficas	35
1.5. Matriz Biológica	36
1.6. Preparação da Amostra	37
1.7. Procedimento de Extracção	37
2. Resultados e Discussão	38
2.1. Identificação dos Analitos em Estudo	38
2.1.1. Selecção e Fragmentação de Iões	38
2.2. Optimização do Método Extractivo	42
2.2.1. Selecção das Condições de MEPS	42
2.2.2. Desenho Experimental	45
2.2.2.1. Superfície de Resposta	51
2.2.2.2. Avaliação de Forma Univariada do Número de Aspirações da Amostra	56
2.2.3. Pré-Tratamento da Amostras: Processo de Precipitação	58
2.3. Validação	59
2.3.1. Selectividade	60
2.3.2. Curva de Calibração	64
2.3.3. Limites de Detecção e Quantificação	65
2.3.4. Precisão e Exactidão	66
2.3.4.1. Precisão intra-dia	67
2.3.4.2. Precisão inter-dia	68
2.3.5. Estabilidade	70
2.3.5.1. Estabilidade das Amostras Processadas	70
2.3.5.2. Estabilidade de Curta Duração	71
2.3.5.3. Estabilidade Ciclos de Congelação-Descongelação	72
2.3.6. Recuperação	73

2.3.7. Arrastamento ou <i>Carry-over</i>	75
2.4. Análise de Amostras Reais.....	75
III. Conclusão	77
IV. Referências Bibliográficas.....	79
V. Anexos.....	89
Anexo I: Análise estatística das técnicas MEPS	89
Anexo II: Análise estatística do DOE.....	102
Anexo III: Equações dos modelos adoptados e dados da análise estatística.....	105
Anexo IV: Análise estatística do estudo univariado do número de aspirações da amostra .	107
Anexo V: Erro relativo (ER%) por recurso a regressão linear simples e ponderada	113
Anexo IV:	114
Comunicações submetidas no âmbito desta tese	119

Lista de Figuras

Figura 1:	Estrutura química geral de um POF	2
Figura 2:	Esquema simplificado do metabolismo dos POF.....	4
Figura 3:	Esquema da reacção entre a AChE e a acetilcolina (lado esquerdo) e o POF (lado direito)	6
Figura 4:	Representação da sinapse colinérgica e dos diferentes sítios de acção da acetilcolina (ACh)	7
Figura 5:	a) Seringa MEPS (capacidade de 250 µL) e micro-coluna com representação da composição da coluna de extracção b) Esquema representativo de um protocolo base para a realização da extracção por MEPS.....	26
Figura 6:	Representação esquemática do funcionamento da fonte ionização por impacto de electrões (IE) e do quadrupolo simples (lado esquerdo e lado direito, respectivamente) geralmente associados ao GC-MS.....	29
Figura 7:	Vários modos de operação possíveis em GC-MS/MS.....	31
Figura 8:	Espectros de massa obtidos para cada composto, resultantes do scan (50-500 <i>m/z</i>)	38
Figura 9:	Cromatograma obtidos a partir da análise no método MRM otimizado	40
Figura 10:	Resultados obtidos para cada composto das 8 técnicas de MEPS realizadas em triplicado (n=3)	42
Figura 11:	Gráficos Pareto para os sete compostos em estudo obtidos a partir do DOE .	46
Figura 12:	Gráficos do efeito principal que cada um, dos quatro factores, tem na resposta para cada um dos compostos em estudo	48
Figura 13:	Gráficos de interacção para cada composto	49
Figura 14:	Gráficos Countor obtidos do CCD para cada um dos compostos em estudo	53
Figura 15:	Resultados obtidos da avaliação de forma univariada do número de aspirações (26, 36, 40, 50 e 60)	56
Figura 16:	Resultados obtidos, para cada composto, do processo de precipitação	58

Figura 17: Cromatograma obtido da análise de uma amostra branco	61
Figura 18: Cromatograma obtido da análise de uma amostra branco fortificada com os compostos em estudo, à concentração de 20 µg/mL (excepto o DMT 150 µg/mL) e o PI à concentração de 10 µg/mL	62

Lista de Tabelas

Tabela 1: Classificação dos pesticidas de acordo com a toxicidade, recomendada pela OMS	1
Tabela 2: Subclasses dos POF	3
Tabela 3: Resumo de propriedades físico-químicas dos POF em estudo	13
Tabela 4: A legislação relevante em vigor relativa à colocação no mercado e utilização dos produtos fitofarmacêuticos, incluindo a que dispõe sobre classificação, rotulagem e embalagens e sobre os limites máximos de resíduos	15
Tabela 5: Métodos para a detecção e quantificação de POF em amostras biológicas ...	17
Tabela 6: Parâmetros do método desenvolvido (GC-MS/MS) com a indicação do tempo de retenção, transições seleccionadas (as transições quantitativas estão destacadas em itálico e sublinhado), energia de colisão e <i>dwell time</i> , definidos para cada composto	35
Tabela 7: Resumo dos iões fragmentados e das respectivas energias de colisão testadas para cada um deles	39
Tabela 8: Resumo das diferentes soluções de lavagem e eluição utilizadas nas 8 técnicas de MEPS	41
Tabela 9: Planificação do DOE 2 ⁴ com descrição dos factores e dos níveis nos quais os factores foram variados	45
Tabela 10: Matriz DOE 2 ⁴ e respectivos resultados obtidos para cada composto em estudo	45
Tabela 11: Planificação da superfície de resposta	51
Tabela 12: Matriz do CCD, com indicação dos ensaios realizados e resultados obtidos para cada composto em estudo	51
Tabela 13: Comparação entre a resposta predita e obtida para cada composto	54
Tabela 14: Procedimento final (otimizado) de MEPS	57

Tabela 15: Janelas máximas de tolerância permitidas para as abundâncias relativas dos iões monitorizados	59
Tabela 16: Intervalo de linearidade estabelecido para cada composto, bem como a respectiva recta e factor de ponderação aplicado	64
Tabela 17: Limites de quantificação de cada um dos compostos de estudo (n=5)	65
Tabela 18: Precisão e exactidão intra-dia (n=6)	67
Tabela 19: Precisão e exactidão inter-dia (n=5)	68
Tabela 20: Estabilidade de amostras processadas (n=3)	70
Tabela 21: Estabilidade de curta-duração (n=3)	71
Tabela 22: Estabilidade a ciclos de congelação-descongelação (n=3)	72
Tabela 23: Recuperação para cada um dos POF nas diferentes gamas de concentração estudadas	73

Lista de Acrónimos

ACh	Acetilcolina
AChE	Acetilcolinesterase
ACN	Acetonitrilo
AZP	Azinfos-etil
BIAS	Erro relativo médio
C ₂	Etilsilano
C ₈	Octilsilano
C ₁₈	Octadecilsilano
CAS	<i>Chemical abstracts service</i>
cc	Corrente contínua
CCD	<i>Central composite design</i>
CE	Comunidade europeia
ChAT	Enzima transferase da acetilcolina
CN	Cianeto
CLF	Clorfenvinfos
CLP	Clorpirifos
CoA	Acetil-coenzima A
CV	Coefficiente de variação
CYP1A2	Citocromo 450 1A2
CYP2B6	Citocromo 450 2B6
CYP2C	Citocromo 450 2C
CYP2C8	Citocromo 450 2C8
CYP2C19	Citocromo 450 2C19
CYP3A4/5	Citocromo 450 3A4/5
DGAV	Direcção Geral de Alimentação e Veterinária
DMT	Dimetoato
DOE	Desenho experimental
dp	Desvio padrão
DUMBELS	Diarreia, urinação, miose, broncoespamos, êmesis, lacrimação e salivação
DZN	Diazinão
ECD	Detector de captura de electrões
EI	Energia de ionização
ETH	Etião
FAO	<i>Food and Agriculture Organization</i>
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>

GC	Cromatografia gasosa
HS	<i>Heaspace</i>
HRMS	Espectrometria de massa de alta resolução
HPLC	Cromatografia líquida de alta eficiência
HACU	Sistema transporte de alta afinidade
HLB	<i>Hidrophilic-lipofilic balance</i>
ICH	<i>International Conference on Harmonization</i>
IE	Impacto de electrões
INMLCF	Instituto Nacional de Medicina Legal e Ciências Forenses
IQ	Ionização química
k	Constantes cinéticas
LC	Cromatografia líquida
LD ₅₀	Dose letal que mata 50% da população em estudo.
LLE	Extracção líquido-líquido
LLME	<i>Liquid-liquid microextraction</i>
LLOQ	Limite inferior de quantificação
LMR	Limites Máximos de Resíduos
LOD	Limite de detecção
M ₁	Modo misto octilsilano - permutador catiónico forte
M	Receptores muscarínicos
MEPS	Microextração em seringa empacotada
MRM	Monitorização de Reacção Múltipla
MS	Espectrometria de massa
MS/MS	Espectrometria de massa em tandem
N	Receptores nicotínicos
NPD	Detector de azoto e fósforo
NTE	<i>Neuropathy target enzyme</i>
OMS	Organização Mundial de Saúde
OPIDP	<i>Organophosphate-induced delayed polyneuropathy</i>
P1	Produto 1
P2	Produto 2
P450	Citocromo 450
PFPD	Detector fotométrico de chama em Pulso
PI	Padrão interno
PRT	Paratíio-etil
POF	Pesticidas organofosforados
PON1	Paraoxonase-1
Q1	Quadrupolo 1
Q2	Quadrupolo 2
Q3	Quadrupolo 3

Q4	Quadropolo 4
QC	Controlos de qualidade
QLP	Quinalfos
R ²	Coeficiente de determinação
RF	Radiofrequência
S	Substrato
SIM	<i>Selected ion monitoring</i>
SCN ⁻	Tiocianato
SLUDGE	Salivação, lacrimação, incontinência urinária, diarreia, cólicas gastrointestinais e êmesis
SNC	Sistema nervoso central
SPE	<i>Solid phase extraction</i>
SPME	<i>Solid-phase microextraction</i>
SR	Superfície de resposta
TEPP	Tetraetil-pirofosfato
TOF	<i>Time of flight</i>
TrR	Tempo de retenção relativo
UE	União europeia
WCX	Permutador catiónico fraco

Justificação de Tema

Os pesticidas organofosforados ficaram popularizados durante as décadas de 40 e 50, período no qual o seu uso estava muito em voga. Estes apareceram como uma alternativa menos poluente e extremamente eficaz no controlo de pestes, como insectos. Contudo, outro factor que contribuiu para a popularidade destas substâncias está relacionado com a sua elevada toxicidade, uma vez que o mecanismo de acção é comum aos mamíferos, nomeadamente aos humanos.

Tanto na Europa como em Portugal, a comercialização de algumas destas substâncias é actualmente proibida, mas apesar disso são ainda descritos vários casos de intoxicação principalmente em zonas rurais. Estes casos de intoxicação ocorrem maioritariamente em situações de suicídio ou acidentais, e muitas das vezes conduzem à morte dos indivíduos. Por estes motivos é de grande interesse o desenvolvimento de um método que permita a rápida detecção e quantificação deste tipo de compostos em amostras biológicas.

Os fluídos biológicos são matrizes complexas e requerem, por isso, o uso de técnicas preparativas que permitam o isolamento dos compostos para posterior análise cromatográfica. As técnicas de microextração estão actualmente a ganhar terreno no campo forense, devido às inúmeras vantagens que apresentam quando comparadas com as técnicas convencionalmente usadas em análises de rotina. A microextração em seringa empacotada (MEPS) é uma técnica recente, que tem revelado ser eficaz na extração e isolamento de diversos compostos em várias matrizes biológicas, com as vantagens de utilizar pequenos volumes de amostra e solventes orgânicos.

Tendo em conta as características apolares dos POF a cromatografia gasosa é considerada uma técnica ideal para a separação dos compostos em estudo. O detector de massas em tandem (GC-MS/MS) oferece a sensibilidade e selectividade necessária para o desenvolvimento de um método analítico, com potencial aplicação em análises forense.

Objectivos

O objectivo principal deste trabalho foi o desenvolvimento de uma metodologia analítica que permita a determinação simultânea de sete POF em sangue, com recurso à microextracção em seringa empacotada (MEPS) e à cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa em tandem (GC-MS/MS). Como objectivos específicos podem ser definidos:

- Desenvolvimento e optimização das condições cromatográficas e do método de detecção (GC-MS/MS);
- Optimização da técnica de extracção com recurso a ferramentas estatísticas como o desenho experimental (DOE) e a superfície de resposta (SR);
- Validação do método analítico de acordo com *guidelines* internacionais da *Food and Drug Administration* (FDA) e *International Conference Harmonisation* (ICH);
- Aplicação do método analítico a amostras reais.

I. Introdução

1. Pesticidas Organofosforados

O termo pesticida ou biocida engloba um variado grupo de substâncias que tem como fim prevenir, destruir e repelir pestes como insectos, roedores, ervas/plantas ou outros seres vivos considerados nocivos e indesejáveis ao homem e ao meio ambiente [1]. O uso destas substâncias tem como objectivo controlar vectores de doenças transmissíveis (como por exemplo a malária), aumentar a produtividade agrícola (pelo controlo de pragas que competem com os alimentos), e ainda na higiene animal a fim de impedir a propagação de parasitas causadores de doenças (em champôs e coleiras contra pulgas e carraças) [1,2].

Idealmente, um pesticida deve ser altamente específico de modo a causar apenas danos no organismo alvo, contudo isso nem sempre se verifica, e por isso os pesticidas representam um risco para o homem e para o meio ambiente [1,2].

Podem ser de origem natural ou sintética, e são vulgarmente classificados de acordo com o organismo alvo em que actuam. Existem quatro grupos principais, os insecticidas (insectos), os herbicidas (ervas), os rodenticidas (roedores) e os fungicidas (fungos), mas também podem ser descritos os moluscicidas (lesmas e caracóis), os larvicidas (larvas) e os acaricidas (ácaros) [1,2]. Cada uma destas classes engloba ainda um vasto leque de compostos, divididos em grupos que abrangem substâncias com características químicas e tóxicas distintas [1,2,3].

Devido às características tóxicas, e ao elevado risco de intoxicação que algumas destas substâncias representam, a organização mundial de saúde (OMS) criou uma classificação para os pesticidas onde estes são divididos em seis grupos de acordo com o grau de toxicidade (tabela 1) [2]. De acordo com esta classificação, os insecticidas são considerados a classe mais tóxica, com particular destaque para os pesticidas organofosforados (POF).

Tabela 1: Classificação dos pesticidas de acordo com a toxicidade, recomendada pela OMS [2].

Classe	Descrição	LD ₅₀ ratos (mg/kg massa muscular)			
		Oral		Dérmica	
		Sólidos	Líquidos	Sólidos	Líquidos
Ia	Extremamente perigoso	< 5	< 20	< 10	< 40
Ib	Altamente perigoso	5-50	20-200	10-100	40-400
II	Moderadamente perigoso	50-500	200-2000	100-1000	400-4000
III	Ligeiramente perigoso	> 500	> 2000	> 1000	> 4000
U	Pouco provável de apresentar perigo	> 2000	> 3000	> 4000	> 6000

LD₅₀: dose letal que mata 50% da população em estudo.

A síntese dos POF teve início em 1800, mas a comercialização destes compostos como pesticidas aconteceu apenas entre 1930 e 1940. O químico alemão Gerhard Schrader é reconhecido pela descoberta da estrutura geral dos POF, pela síntese do primeiro destes compostos a ser comercializado, o tetraetil-pirofosfato (TEPP), e ainda pela síntese do paratião, o POF mais conhecido e mais utilizado em todo o mundo. Desde então foram sintetizadas inúmeros compostos com estrutura semelhante, que são principalmente usados como insecticidas mas também como herbicidas ou acaricidas [1,2,4].

Devido à sua baixa especificidade de acção, isto é, elevada toxicidade para espécies não-alvo, os POF foram responsáveis por um elevado número de intoxicações em humanos, durante o auge da sua utilização [1,2]. Por esse motivo, a comercialização de parte destas substâncias foi já proibida em alguns países devido ao elevado número de casos registados, contudo, o mesmo não acontece em países menos desenvolvidos onde a incidência de intoxicações é ainda muito elevada [2].

1.1. Estrutura Química e Propriedades

Os POF englobam um diverso e variado grupo de compostos com diferentes propriedades químicas e biológicas [2-5]. São compostos derivados de ácido fosfórico ou tiofosfórico [3,6,7], geralmente líquidos, com diferentes volatilidades, fortemente apolares, fracamente solúveis em água mas fortemente lipofílicos [2,4,5]

Na figura 1 encontra-se representada a estrutura química geral dos POF. O fósforo, átomo central pentavalente e tetracoordenado, estabelece três ligações covalentes simples, com três grupos substituintes diferentes (R1, R2 e X) e uma ligação dupla com um átomo de oxigénio ou enxofre [3,5-7]. Os grupos R1 e R2 são geralmente grupos alcoxi, o grupo X é conhecido como o grupo abandonante uma vez que, e após ligação à enzima alvo, este é sensível a hidrólise [4].

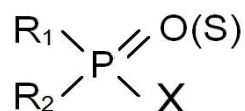


Figura 1: Estrutura química geral de um POF [1].

A reactividade dos POF está relacionada com a sua estrutura química, compostos em que o fósforo estabelece ligação dupla com o oxigénio cria um ambiente altamente electrófilo o que torna o átomo de fósforo altamente reactivo [8]. Por sua vez, compostos com ligação dupla entre o fósforo e o enxofre necessitam de reacções de biotransformação para exercerem a sua acção tóxica [2,4,5,7,8,9]. Para além disso, a toxicidade está ainda

associada ao grupo X, onde grupos haleto, cianeto (CN⁻) ou tiocianato (SCN⁻) são responsáveis pelo aumento da mesma [6,8].

Devido à sua vasta diversidade os POF podem ser agrupados de inúmeras maneiras, por isso consoante o autor podem ser encontradas descritas diferentes classificações [1,3,5,7,8,9]. Uma forma simples é subdividi-los de acordo com os átomos ligados directamente ao fósforo [8,9]. A tabela 2 resume uma classificação adaptada de diferentes fontes bibliográficas, e onde se dividem os POF em seis grupos distintos [1,3,5,7,8,9].

Tabela 2: Subclasses dos POF [1].

Subclasse	Estrutura	Exemplo
Fosfatos	$\begin{array}{c} R_1-O \\ \diagdown \\ P \\ \diagup \\ R_2-O \end{array} \begin{array}{c} =O \\ \\ \\ \\ =O-X \end{array}$	Diclorvos
Fosforotionato	$\begin{array}{c} R_1-O \\ \diagdown \\ P \\ \diagup \\ R_2-O \end{array} \begin{array}{c} =S \\ \\ \\ \\ =O-X \end{array}$	Paratião
Fosfortioate	$\begin{array}{c} R_1-O \\ \diagdown \\ P \\ \diagup \\ R_2-O \end{array} \begin{array}{c} =O \\ \\ \\ \\ =S-X \end{array}$	Ometoato
Fosforoditioato	$\begin{array}{c} R_1-O \\ \diagdown \\ P \\ \diagup \\ R_2-O \end{array} \begin{array}{c} =S \\ \\ \\ \\ =S-X \end{array}$	Malatião
Fosforoamidotioato	$\begin{array}{c} R_1-O/S \\ \diagdown \\ P \\ \diagup \\ R_2-O \end{array} \begin{array}{c} =O/S \\ \\ \\ \\ =N-R_3 \end{array}$	Glifosato
Fosfonatos	$\begin{array}{c} R_1-O \\ \diagdown \\ P \\ \diagup \\ R_2-O \end{array} \begin{array}{c} =O \\ \\ \\ \\ =X \end{array}$	Triclorfon

1.2. Toxicocinética

A maioria dos POF são substâncias apolares, facilmente absorvidas e capazes de atravessar as membranas biológicas devido à sua lipofilicidade [6,7,10,11]. Após absorção acumulam-se rapidamente no tecido adiposo, fígado, rins e glândulas salivares [10,11]. A absorção pode ocorrer por via respiratória, via gastrointestinal ou via dérmica. A facilidade e rapidez com que são absorvidos depende não só da via de exposição bem como da estrutura química do composto. A formulação em que os compostos estão disponíveis, isto é, se são pós ou líquidos, se têm na sua composição solventes orgânicos ou outros excipientes, são factores que podem também contribuir para uma rápida absorção [10,11]. No caso de intoxicações por via dérmica, o tempo de exposição é um factor a ter em atenção, porque, e apesar de por esta via a absorção tender a ser lenta, a eliminação dos POF é difícil e portanto a absorção dérmica é prolongada, o que poderá aumentar a severidade da intoxicação [6,7].

As reacções de biotransformação dos POF em espécies alvo e não-alvo foram já extensivamente estudadas [2,4]. Apenas os POF que contêm ligação dupla com o oxigénio (P=O) são capazes de activar directamente a enzima alvo, ou seja, para os POF com ligação dupla entre o fósforo e o enxofre (P=S) é necessário que ocorra biotransformação para que tenham acção tóxica [2,4,5,8,9]. Essa reacção de bioactivação consiste na dessulfuração oxidativa mediada pelo citocromo P450 presente principalmente, mas não exclusivamente, no fígado (figura 2a). Durante a reacção há a formação de um intermediário oxão capaz de inibir a enzima alvo com elevado poder inibitório. Estes intermediários formados podem ser posteriormente hidrolisados por acção de enzimas do tipo A-esterases, como por exemplo, a paraoxonase 1 (PON1) que contribui para a destoxificação (figura 2e) [4,10,11-13]. Enzimas pertencentes à família do P450 podem também catalisar reacções de dearilação e dealquilação, que levam à formação de intermediários menos tóxicos que o composto original (figura 2b-d) [2,4,9,11-13]. Pode ainda ocorrer hidrólise não-catalítica, que acontece quando os POF fosforilam outro tipo de enzimas, as B-esterases como é o caso da carboxilesterase e da butirilcolinesterase [2,4,10,13]. Estas enzimas são também consideradas alvos biológicos dos POF, mas a inibição destas não tem quaisquer manifestações clínicas [2,4,10]. Por esse motivo, a ligação dos POF a qualquer uma delas é considerada como uma via de destoxificação [2,4].

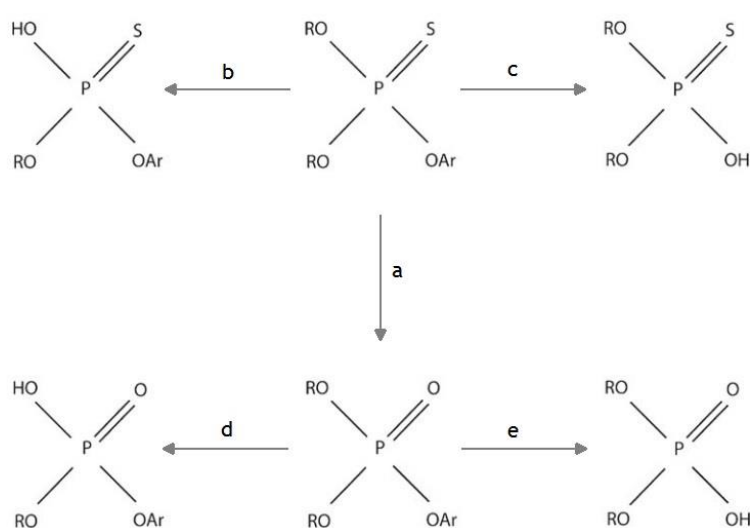


Figura 2: Esquema simplificado do metabolismo dos POF. a) Reacção de dessulfuração oxidativa catalisada pelas diferentes isoformas do P450; b e d) reacções de dealquilação catalisada por P450; c) reacção de dearilação; e) hidrólise catalisada pela PON1. Nem todos os POF são capazes de passar por todas estas reacções, nomeadamente a reacção 1. (Imagem adaptada de Costa L.G., 2008) [2].

É importante reter a ideia de que o metabolismo dos POF corresponde a toda uma complexa rede de reacções, e que, consoante o tipo e a dose de composto ao qual o indivíduo esteve exposto são expressas e activas diferentes enzimas que determinam todo o processo

de biotransformação/destoxificação [4,8,14]. Isto ocorre principalmente devido ao polimorfismo do P450 [4,14].

Vários estudos demonstraram que diferentes isoformas do P450 actuam, específica e preferencialmente, sobre diferentes substratos. Por exemplo, o diazinão é bioactivado pelo CYP2C19 [13,15] enquanto as isoformas CYP3A4/5 e CYP2C8 são mais específicas para o paratião e a CYP2B6 para o clorpirifos [13]. Por outro lado, outros estudos revelaram que as reacções de dessulfuração são dependentes da concentração de composto, sendo que o clorpirifos em concentrações baixas é metabolizado pelas isoformas CYP1A2 e CYP2B6, mas em concentrações altas pelas isoformas CYP3A4 e CYP2C [12,16]. Para além disto, foi mostrado que a mesma isoforma pode actuar sobre diferentes compostos originando metabolitos de natureza distinta, por exemplo, a isoforma CYP2B6 metaboliza o clorpirifos no seu intermediário oxão, mas na presença de paratião a mesma enzima dá origem a p-nitrofenol, dois produtos com estruturas e toxicidades distintas [4]. A complexidade das reacções de biotransformação não se limita apenas às reacções de dessulfuração, o mesmo acontece com outro tipo de reacções que envolvem isoformas do P450. Por exemplo, as reacções de dearilação, em que a isoforma CYP2C19 é expressa preferencialmente na presença de clorpirifos e a isoforma CYP2B6 na presença de paratião [13].

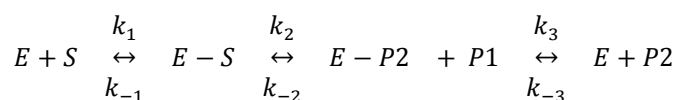
A eliminação ocorre predominantemente pela urina, e menos extensivamente pelas fezes e ar expirado. Devido às suas propriedades alguns POF podem demorar dias até serem totalmente eliminados do organismo [6,10,11]. Contudo, existem algumas excepções e alguns destes compostos são eliminados rapidamente [10].

1.3. Toxicodinâmica

1.3.1. Mecanismo de Acção

Os POF são também conhecidos como agentes anticolinérgicos devido à sua capacidade de ligar e inibir a enzima acetilcolinesterase (AChE) [1-11]. Biologicamente, esta enzima é responsável pela terminação do sinal nervoso transmitido pelo neurotransmissor acetilcolina (ACh) [16,17].

A interacção entre a AChE e os POF está bem documentada, e pode ser vista como a interacção enzima-substrato similar à que ocorre entre a AChE e a ACh [5-8,18]. A reacção enzimática pode ser representada pelo mecanismo *Ping Pong* da seguinte forma:



onde *E* corresponde à enzima, *S* ao substrato, *P1* é o primeiro produto libertado e *P2* o segundo produto libertado, e os *k* representam as diferentes constantes cinéticas das

respectivas reacções (os denotados pelo sinal negativo representam a reacção no sentido inverso, os restantes as reacções no sentido directo) [5,8].

Quer na presença de acetilcolina, quer na presença de POF, o passo inicial é a formação de um complexo enzima-substrato. De seguida, o substrato interage com um resíduo de serina, situado no sítio activo da enzima, e promove a libertação do primeiro produto desta reacção, *P1* [2,4-11].

Pela figura 3 é possível observar as diferenças da reacção na presença de ACh e na presença de um POF, neste caso em particular o oxão do clorpirifos. Do lado esquerdo da imagem está representada a reacção entre a enzima e a ACh. Nesta situação, a enzima sofre acetilação e consequentemente dá-se a libertação de colina. Posteriormente, devido à presença de água, dá-se a regeneração da enzima por libertação de acetato. Este passo é rápido e o *turnover* da proteína está estimado em cerca de 105 moléculas de substrato por molécula de enzima por segundo. No caso dos POF (lado direito da imagem), a enzima sofre fosforilação e o primeiro produto libertado corresponde ao grupo abandonante, que varia consoante o POF. A regeneração da AChE é altamente influenciada pelos grupos ligados ao fósforo e é um passo extremamente lento, que pode levar horas ou mesmo dias até estar completo [2,4-11].

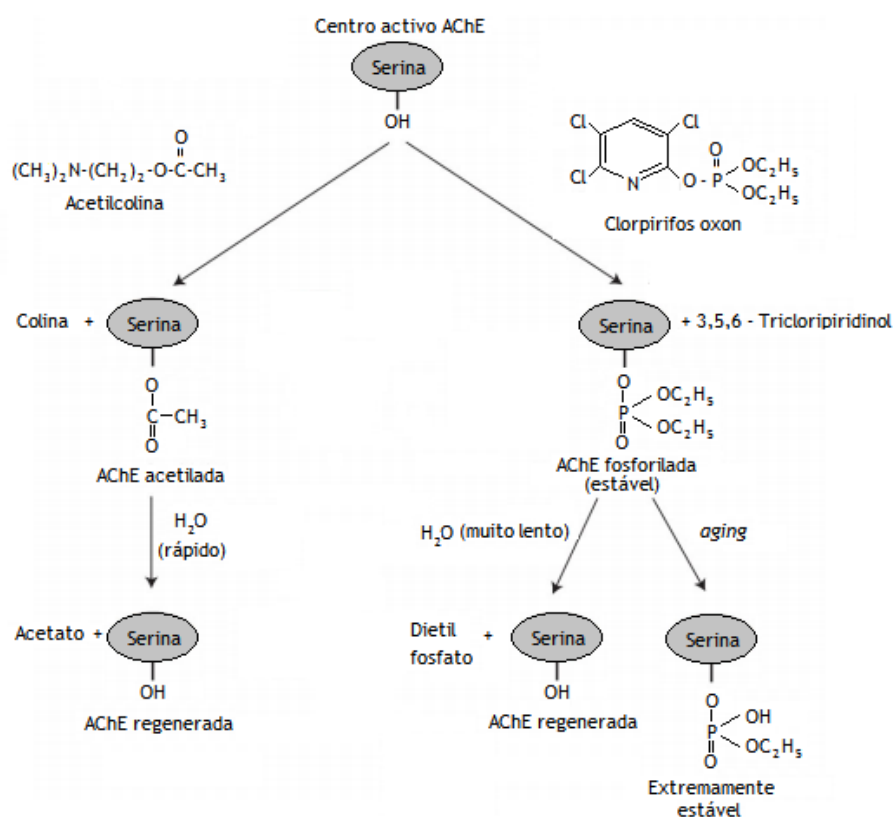


Figura 3: Esquema da reacção entre a AChE e a acetilcolina (lado esquerdo) e o POF (lado direito). Como exemplo é usado o clorpirifos, representado já após ter sofrido a reacção de bioactivação, portanto na forma de oxão. (Imagem adaptada de Costa L.G., 2008) [2].

Na presença de POF pode ainda suceder uma terceira opção denominado por envelhecimento (*aging*), que não acontece na presença de acetilcolina. Este fenómeno é fracamente conhecido, sabe-se apenas que ocorre a formação irreversível de um complexo altamente estável, por um mecanismo não enzimático. Pensa-se que uma alteração conformacional da enzima fosforilada impede o acesso da água e posteriormente a sua regeneração [2,4-11].

1.3.2. Toxicidade e Alvo Biológico

O principal alvo biológico dos POF é a AChE, enzima compartilhada por vários seres vivos, que tem como função biológica a hidrólise ACh [17,18]. No homem, a ACh é um dos principais neurotransmissores com diversas funções ao nível do sistema nervoso central e periférico [2,4,9,17-19].

A ACh é sintetizada nos terminais nervosos a partir da acetil-coenzima A (CoA) e por acção da enzima transferase da acetilcolina (ChAT). À semelhança de outros neurotransmissores, a ACh é armazenada em vesículas pré-sinápticas, e após estímulo é libertada para o terminal nervoso onde posteriormente liga a receptores situados na fenda pós-sináptica. Este sinal é terminado pela acção da AChE, a qual promove a hidrólise da ACh em acetato e colina. Esta última é posteriormente captada para o interior da célula pré-sináptica, onde é utilizada para regenerar o neurotransmissor (figura 4) [17,18].

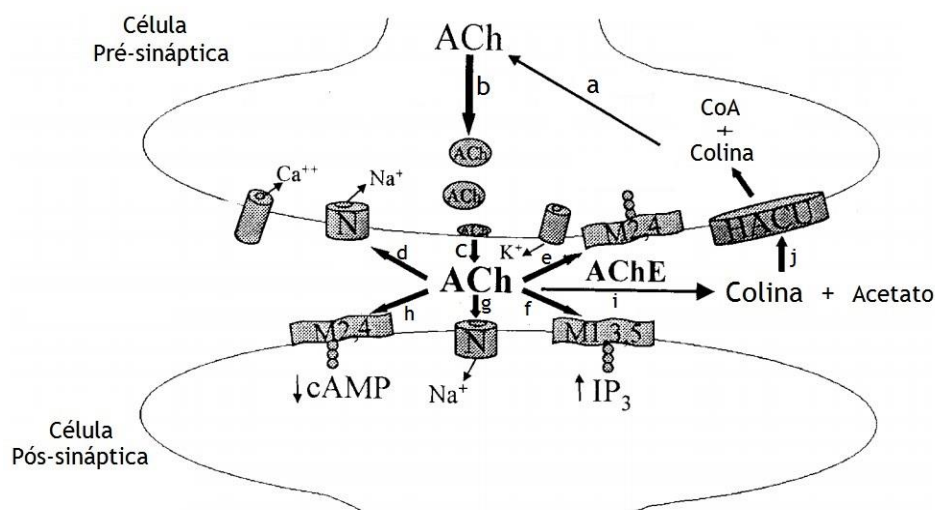


Figura 4: Representação da sinapse colinérgica e dos diferentes sítios de acção da acetilcolina (ACh). a) Síntese de ACh a partir da acetil-coenzima A (CoA) e da colina, por acção da ChAT; b) Transporte ACh para as vesículas; c) Libertação da ACh para a fenda sináptica (os canais de cálcio estimulam a fusão das vesículas com a membrana); d-h) vários receptores aos quais a ACh pode ligar (N representam os nicotínicos e os M os muscarínicos); i) Terminação do sinal nervoso, por acção da acetilcolinesterase (AChE) e hidrólise da ACh em colina e acetato; j) Transporte da colina para o interior da célula pré-sináptica, por acção de um sistema transporte de alta afinidade (HACU). (Imagem adaptada de Pope C.N., 2010) [18].

Deste modo, a inibição da AChE leva à acumulação da ACh, de tal modo, que ocorre uma excessiva estimulação dos receptores colinérgicos. Por consequência, são desencadeados uma série de sintomas característicos consoante o tipo de receptor estimulado. Os receptores colinérgicos encontram-se amplamente distribuídos e podem ser encontrados no sistema nervoso central (SNC) e periférico, bem como na junção neuromuscular [2,8,9,17-19].

São conhecidos dois tipos de receptores colinérgicos, os muscarínicos e os nicotínicos, classificados e designados de acordo com a sensibilidade para dois tóxicos naturais, a muscarina e a nicotina [17]. Estes dois tipos de receptores têm estruturas e funções distintas. Os primeiros pertencem à família da proteína-G, encontram-se no SNC e órgãos efectores e são divididos em 5 grupos. Por sua vez, os receptores nicotínicos têm estrutura pentamérica com funções ionotrópicas e são divididos em três grupos e podem ser encontrados na junção neuromuscular e gânglios autonómicos [8,17-19].

1.4. Intoxicação

1.4.1. Intoxicação Aguda e Sintomas Associados

Em intoxicações agudas por POF os sintomas podem ser divididos em efeitos muscarínicos, efeitos nicotínicos e efeitos no SNC, consoante o tipo do receptor activo. Dado que os receptores colinérgicos estão amplamente distribuídos, os sintomas desenvolvidos podem manifestar-se a vários níveis [2,5-8,11,19].

Os primeiros sintomas, associados a receptores muscarínicos, são principalmente ao nível das glândulas exócrinas, do qual resulta um aumento de secreções dos brônquios, salivação, suores e lacrimejar [5-8,11,19]. Podem também ocorrer broncoespamos, vômitos, miose, urinação e defecação involuntária, devido a efeitos ao nível muscular [2,5-8,19]. Estes sintomas podem ser agrupados segundo algumas mnemónicas, nomeadamente o que concerne os efeitos nos receptores muscarínicos, como *DUMBELS* (diarreia, urinação, miose, broncoespamos, êmesis (vômitos), lacrimação e salivação) ou *SLUDGE* (salivação, lacrimação, incontinência urinária, diarreia, cólicas gastrointestinais e êmesis) [19]. Manifestações cardíacas como hipotensão e bradicardia podem também aparecer [2,5-8,19].

Os efeitos nos receptores nicotínicos ocorrem ao nível da junção neuromuscular e do gânglio simpático. Assim são esperados sintomas como fasciculação (contração muscular involuntária), fraqueza muscular, espasmos e paralisia [2,5-8,19]. O indivíduo pode também desenvolver sinais de hipertensão e taquicardia, mas sintomas relacionados com o ritmo cardíaco e pressão sanguínea podem induzir a um diagnóstico errático, dado que esses sinais vitais tanto podem estar aumentados como diminuídos durante todo o quadro clínico [19].

As manifestações ao nível SNC são menos específicas e resultam em dores de cabeça, tonturas, tremor, ansiedade, confusão, convulsões e coma [5,19]. Durante esta fase os

pacientes podem ainda desenvolver pancreatites, hipo ou hiperglicémia e falha renal aguda [18].

As intoxicações agudas por POF podem ainda ser divididas de acordo com a gravidade da intoxicação: fraca, moderada e severa, uma vez que em cada uma destas situações são encontrados sintomas característicos [2,6,11,19]. Deste modo, casos severos são distintos devido à falha respiratória, enquanto em casos de intoxicação fraca ou moderada são esperados sintomas como miose, manifestações gastrointestinais e salivação. Normalmente, a falha respiratória é causa de morte nos casos severos, que se dá por inibição dos centros respiratórios no cérebro (tronco cerebral), broncoconstrição, aumento das secreções dos brônquios e paralisia dos músculos respiratórios [2,6,11,19].

Cerca de 10-40% dos pacientes tratados por intoxicação aguda pode ainda desenvolver a síndrome intermédia, que se caracteriza pelo aparecimento de paralisia muscular e fraqueza dos músculos respiratórios [2,5,6,19]. Este fenómeno aparece dias após a exposição, quando os sintomas da crise colinérgica inicial já se encontram extintos, ou seja durante o período de recuperação. Pode durar até 15 dias, e se não houver suporte ao nível respiratório pode levar à morte [2,19]. Este fenómeno não está totalmente elucidado, mas autores defendem que a persistente inibição de AChE induz à dessensibilização dos receptores nicotínicos, que posteriormente causam os sintomas descritos [2,19].

Alguns POF podem ainda causar neuropatia tardia (OPIDP, do inglês *organophosphate-induced delayed polyneuropathy*) [2,4,5,7,9,19]. Esta condição desenvolve-se tardiamente, após a crise colinérgica e a síndrome intermédia. É caracterizada por distúrbios ao nível do sistema nervoso periférico, que afecta tanto os nervos motores como os sensoriais. Sintomas associados são ataxia (falta de coordenação dos movimentos voluntários e perda de equilíbrio), dormência de mãos e pés seguida de perda sensorial, e fraqueza muscular progressiva [2,5,19]. Estas manifestações não estão relacionadas com a inibição da AChE, mas sim com a inibição de uma outra enzima esterase presente nos tecidos nervosos e outros órgãos, a enzima alvo de neuropatia (NTE, do inglês *Neuropathy Target Enzyme*). Na presença de POF a NTE sofre fosforilação, de uma maneira semelhante ao que acontece com a AChE. Esta reacção é irreversível e causa danos ao nível do tecido neurológico [2,4,9].

1.4.1.1. Casos de Intoxicação Aguda

Intoxicações agudas por POF surgem predominantemente em situações de suicídio ou de acidente, sendo que os compostos mais recorrentes são o paratião, dimetoato e clorpirifos [20-29]. A fácil aquisição e a inexistência de controlo na venda destas substâncias, faz com que os países em vias de desenvolvimento, como por exemplo a Turquia, a Índia e o Sri Lanka, sejam os que registam maior número de casos de intoxicações agudas por POF [2,4,22-26,28,29]. Contudo, este não é um problema exclusivo de países em vias de desenvolvimento, e actualmente são ainda registados casos em países desenvolvidos, como Alemanha e França,

apesar das medidas adoptadas que restringem a comercialização e utilização de POF [20,21,24,27].

A nível nacional, e de acordo com estudos nos quais referem dados do Instituto Nacional de Medicina Legal e Ciências Forenses (INMLCF, I.P.), são vários os casos reportados até bem recentemente, na sua maioria por motivos suicidas devido à ingestão de paratião e quinalfos [30-34]. Dados referentes a um trabalho onde foram analisados os casos de morte por intoxicação, ocorridos na região da Cova da Beira e autopsiados no Gabinete Médico-Legal da Covilhã, entre 2001 e 2012, revelam que num total de 19 casos, 53% foi devido à ingestão voluntária de pesticidas, dos quais 60% correspondem a POF, nomeadamente paratião, clorpirifos e dimetoato [35].

A dose letal em humanos, para a maioria dos compostos, não é conhecida, por isso é difícil estimar as concentrações esperadas em amostras reais. Os métodos descritos na literatura usam intervalos de calibração na ordem dos microgramas por mililitro ($\mu\text{g}/\text{mL}$) ou nanogramas por mililitro (ng/mL) [30-34, 36-61]. Dos vários estudos onde foram analisadas amostras reais, particularmente sangue, as concentrações detectadas são relativamente elevadas [30-33,37-39]. Por exemplo, no seu estudo Gallardo E., *et al*, efectuou a análise de 25 amostras reais de sangue, e em algumas situações a concentração de PRT excedeu os 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ [30,32].

1.4.2. Intoxicação Crónica

As intoxicações crónicas por POF são menos comuns que as agudas, contudo existem países onde o uso de POF é ainda muito recorrente, nomeadamente países que dependem economicamente da agricultura [2,4,7,62]. Tanto os agricultores, como os habitantes que moram nas proximidades dos campos agrícolas, particularmente as crianças e mulheres grávidas, são expostos diariamente a baixas doses de POF. Por esse motivo, e apesar de não existirem dados que apoiem ou refutem os efeitos adversos da exposição crónica, existem alguns trabalhos nos quais é avaliada a exposição crónica destes grupos [41,42,50,57,59,62-66]. Será importante realçar que os POF não actuam exclusivamente sobre a AChE e que existem outros alvos biológicos nos quais podem também exercer acção tóxica, podendo por isso afectar e alterar outras vias biológicas provocando efeitos adversos [2,4].

Doses baixas apesar de não desencadearem os sintomas característicos de intoxicação por POF, podem gerar inibição contínua da AChE que, por sua vez, conduz à tolerância colinérgica e conseqüentemente a anormalias, nomeadamente ao nível cognitivo [2,4]. Os estudos que existem são escassos e um pouco contraditórios, mas alguns autores consideram que a exposição crónica pode ter conseqüências dramáticas, principalmente em crianças, causando problemas ao nível do desenvolvimento [2,4,62].

Os POF não são considerados mutagénicos mas existem evidências que apontam para o relacionamento entre exposições longas e o desenvolvimento de tumores [2,8,62].

1.5. Tratamento

O tratamento aplicado depende dos sintomas que o paciente apresente. Normalmente é administrado sulfato de atropina, mas há casos onde o tratamento com oximas pode também ajudar. Em situações muito graves pode ser necessário suporte respiratório [2,5,6,7,11,19].

O sulfato de atropina é uma substância antagonista dos receptores muscarínicos, por isso ao ligar a esses receptores bloqueia o efeito causado pelo excesso de ACh [2,5,7,11]. As doses administradas, por via intravenosa, variam de acordo com a gravidade da intoxicação e em casos severos apenas doses elevadas revelaram ser eficazes [2,5,6,7]. Por sua vez, em casos moderados, o tratamento convencional, inicia-se com administração de 1 mg (0,05 mg/kg), e se não forem observados quaisquer efeitos adversos segue-se administração sucessiva em períodos de 10-15 minutos, da mesma dose ou doses superiores, que podem ir até às 5 mg [2,6,7]. Este procedimento mantém-se até serem verificados sintomas de “atropinização”, isto é, até se verificar efeitos como broncodilatação, aumento da pressão sanguínea, entre outros. Esses sintomas devem persistir por mais de 48 horas, de modo a garantir a eficácia do tratamento [2,6,7,19,30].

As oximas, como por exemplo a pralidoxima, podem ser administradas em conjunto com o tratamento com sulfato de atropina [7,11,30]. Estas substâncias, ao contrário da atropina, são capazes de reactivar a AChE, revertendo a ligação do POF e regenerando a AChE [2,5,6,11]. São administradas por via intravenosa, e dado o modo de acção, o tratamento com oximas é mais eficaz quando são administradas numa fase inicial da intoxicação, de modo a evitar o efeito de envelhecimento quando o tratamento já não terá qualquer efeito positivo [2,5,6,7,11,19,30]. Durante o tratamento com oximas a função hepática deve ser controlada de modo a evitar hepatotoxicidade [2,6,7,30]. Para além disso, devem ser administrados apenas em casos de intoxicação por POF, não sendo eficazes em intoxicações por carbamatos (são também inibidores da acetilcolinesterase, e as oximas potenciam a sua acção tóxica) [2].

1.6. Os Compostos em Estudo

Para este estudo, foram seleccionados sete POF, azinfos etilo (AZP), diazinão (DZN), dimetoato (DMT), clorpirifos (CLP), clorfenvinfos (CLF), etil-paratião (PRT) e quinalfos (QLP). Com a excepção do AZP e CLP que são apenas usados como insecticidas, todos os outros são também usados como acaricidas [30]. Relativamente à toxicidade, e pela classificação recomendada pela OMS (tabela 1), o DMT, o DZN, o CLP e o QLP pertencem ao grupo II (moderadamente perigoso), o AZP e o CLF pertencem ao grupo Ib (altamente perigoso) e o PRT pertence ao grupo Ia (extremamente perigoso) [67].

De acordo com a Direcção Geral de Alimentação e Veterinária (DGAV), actualmente em Portugal, apenas é permitida a comercialização de dois dos compostos em estudo, o CLP e o DMT [68]. A comercialização dos restantes compostos é proibida, mas a retirada do mercado foi realizada recentemente (2007 para o CLF, 2003 para QLP e AZP, e 2009 para o DZN), apenas o PRT foi retirado do mercado há mais tempo (1995) [30,68]. Apesar da sua venda já não estar disponível, estes compostos podem ainda ser utilizados, uma vez que quem os adquiriu pode tê-los como reserva em casa, e por isso podem ainda ser usados mesmo estando proibidos.

Por estes motivos, e tendo em conta o número de intoxicações bem como a toxicidade destes compostos, qualquer um deles representa um risco de intoxicação em humanos e por isso são objecto de análise deste estudo.

Na tabela 3 encontram-se resumidas algumas características dos compostos em estudo.

Tabela 3: Resumo de propriedades físico-químicas dos POF em estudo [67].

Composto	CAS ^a	Fórmula molecular	Massa molecular (g/mol)	Estrutura	$k_{o/w}$ ^b
Azinfos	2642-71-9	$C_{12}H_{16}N_3O_3PS_2$	345,38		3,4
Clorfenvinfos	2921-88-2	$C_{12}H_{14}Cl_3O_4P$	359,57		3,8
Clorpirifos	470-90-6	$C_9H_{11}Cl_3NO_3PS$	350,59		4,7
Diazinão	333-41-5	$C_{12}H_{21}N_2O_3PS$	304,35		3,6
Dimetoato	60-51-5	$C_5H_{12}NO_3PS_2$	229,26		0,7
Paratião	56-38-2	$C_{10}H_{14}NO_5PS$	291,26		3,8
Quinalfos	13593-03-8	$C_{12}H_{15}N_2O_3PS$	298,30		4,4
Etião (Padrão interno)	563-12-2	$C_9H_{22}O_4P_2S_4$	38,48		-

^a CAS: Chemical Abstract Service

^b $K_{o/w}$: Logaritmo do coeficiente de partição do composto entre o octanol e a água, estimado a partir do programa EPI Suite.

1.6.1. Situação Legal em Portugal

Actualmente, em todos os Estados membros da União Europeia (EU), produtos fitofarmacêuticos, particularmente os pesticidas, só podem ser comercializados e utilizados após ter sido concedida, pelas autoridades responsáveis, uma autorização de venda e comercialização. Em Portugal, a entidade responsável pela regulação e controlo do uso de produtos fitofarmacêuticos é a DGAV, que se rege por normas estipulados pela EU, que tem em atenção critérios internacionalmente reconhecidos de instituições como a FAO e OMS [68].

Os produtos autorizados e as normas de utilização são regulados por um sistema de homologação suportado juridicamente pelo Decreto-Lei nº94/98, de 15 de Abril e, desde 14 de Junho de 2011, pelo Regulamento (CE) n.º 1107/2009, de 21 de Outubro. O sistema de homologação é o processo pelo qual a DGAV autoriza a colocação no mercado e a utilização de produtos fitofarmacêuticos, através de uma avaliação com base na eficácia, propriedades físico-químicas, toxicologia, ambiente e ecotoxicologia. É ainda importante referir que o Regulamento (CE) n.º 1107/2009 do Parlamento Europeu e do Conselho, com entrada em vigor desde 14 de Junho de 2011, veio introduzir novas regras no processo de avaliação, particularmente no que respeita à avaliação zonal dos produtos fitofarmacêuticos e à consagração do princípio do reconhecimento mútuo [68].

Deste modo, a colocação de um produto no mercado é precedida por uma avaliação técnico-científica anual, *“que inclui a avaliação de risco para o homem, na qualidade de aplicador e consumidor de produtos agrícolas tratados, para os animais, para o ambiente e espécies não visadas, sendo, apenas, concedida autorização de colocação no mercado aos produtos que, em resultado da referida avaliação, e quando utilizados de acordo com as orientações dos rótulos, não tenham efeitos prejudiciais na saúde humana e animal e não exerçam qualquer influência inaceitável no ambiente, e desde que naturalmente, tenham demonstrado eficácia satisfatória para as utilizações propostas.”* [68].

Desta avaliação resulta a publicação do Guia dos Produtos Fitofarmacêuticos - Lista de Produtos com Venda Autorizada. Nesse mesmo documento, são ainda incluídas outras informações complementares, *“nomeadamente o regime para o estabelecimento de Limites Máximos de Resíduos (LMR), bem como a fixação dos próprios LMR, a legislação referente a classificação toxicológica e ambiental dos produtos, aos rótulos e embalagens, o regime sobre o estabelecimento dos procedimentos necessários ao reconhecimento oficial de organizações que pretendam realizar ensaios de campo para efeitos da comprovação da eficácia dos produtos, assim como o que regula as importações paralelas de produtos fitofarmacêuticos.”* [68].

Tabela 4: A legislação relevante em vigor relativa à colocação no mercado e utilização dos produtos fitofarmacêuticos, incluindo a que dispõe sobre classificação, rotulagem e embalagens e sobre os limites máximos de resíduos [68].

Âmbito	Nacional	Comunitária
Colocação no mercado	Decreto-Lei n.º 94/98, de 15.04, e suas alterações (em aplicação transitória por força do Regulamento (CE) n.º 1107/2009, do Parlamento Europeu e do Conselho, de 21.10	Directiva n.º 91/414/CEE, do Conselho, de 15.07, e suas alterações. Regulamento (CE) n.º 1107/2009, do Parlamento Europeu e do Conselho, de 21.10, regulamentado por: Regulamento de Execução (UE) n.º 540/2011, da Comissão, de 25.05, e suas alterações. Regulamento de Execução (UE) n.º 544/2011, da Comissão, de 10.06. Regulamento de Execução (UE) n.º 545/2011, da Comissão, de 10.06. Regulamento de Execução (UE) n.º 546/2011, da Comissão, de 10.06. Regulamento de Execução (UE) n.º 547/2011, da Comissão, de 08.06.
		Directiva n.º 67/548/CEE, do Conselho, de 27.06 e suas alterações. Directiva n.º 1999/45/CE, do Parlamento Europeu e Conselho, de 31.05 e suas alterações. Regulamento (CE) n.º 1272/2008, do Parlamento Europeu e do Conselho, de 16.12
Classificação e rotulagem e embalagens	Decreto-Lei n.º 82/2003, de 23.04, alterado pelo Decreto-Lei n.º 63/2008, de 02.04.	
Sementes tratadas com produtos fitofarmacêuticos	Decreto-Lei n.º 38/2009, de 10.02. Decreto-Lei n.º 88/2010, de 20.07, alterado pelo Decreto-Lei n.º 112/2012, de 19.06	
Condições de comercialização e aplicação de produtos fitofarmacêuticos	Decreto-Lei n.º 173/2005, de 21.10, alterado pelos Decretos-Leis n.ºs 187/2006, de 19.09 e 101/2009, de 11.05.	
Uso não profissional de produtos fitofarmacêuticos em ambiente doméstico	Decreto-Lei n.º 101/2009, de 11.05.	
Gestão de resíduos de embalagens e de resíduos de excedentes de produtos fitofarmacêuticos	Decreto-Lei n.º 187/2006, de 19.09, rectificado pela Declaração de Rectificação n.º 78/2006, de 17.11.	
Limites máximos de resíduos	Decreto-Lei n.º 144/2003, de 02.07 (apenas os artigos 10.º e 11.º) Decreto-Lei n.º 39/2009, de 10.02.	Regulamento (CE) n.º 396/2005, do Parlamento Europeu e do Conselho, de 23.02, e suas alterações.
Custos por serviços prestados	Portaria n.º 984/2008, de 02.09, alterada pelas Portarias n.ºs 622/2009, de 08.06 e 8/2010, de 06.01.	

2. Métodos para a Determinação de Pesticidas Organofosforados

Pelos vários motivos discutidos anteriormente, e tendo em especial atenção o número de casos de intoxicações que ainda hoje são verificados, particularmente nas zonas rurais, os POF representam uma séria fonte de intoxicação em humanos. Assim, a quantificação de POF em amostras biológicas é de grande interesse a nível clínico e forense.

Actualmente a monitorização de pacientes é efectuada tendo por base a percentagem de inibição da AChE no sangue ou em plasma [2,3]. Este método apresenta uma boa relação dose-efeito, contudo tem algumas desvantagens, nomeadamente a variabilidade da actividade enzimática entre indivíduos e a falta de especificidade do método (não permite identificar o composto responsável pela intoxicação) [2]. Deste modo, em termos clínicos, um método rápido e preciso, que envolva a detecção e quantificação de POF será uma ferramenta de grande utilidade na monitorização e tratamento em casos de intoxicação por POF.

São muitos os trabalhos realizados para a detecção, determinação e quantificação de POF nas mais diversas matrizes, desde água, alimentos e amostras biológicas. Tendo em atenção o objectivo do presente trabalho, nesta secção apenas serão abordados e referidos os trabalhos realizados em amostras biológicas humanas. Na tabela 5 encontram-se resumidos os trabalhos realizados em amostras biológicas para a determinação e quantificação de POF. A pesquisa foi efectuada na base de dados *U.S. National Library of Medicine, National Institutes of Health* (PubMed), limitada a artigos científicos publicados desde 2000 até 2014, e com o recurso às seguintes palavras-chave: *organophosphorous pesticides, azynphos-ethyl, dimethoate, diazinon, chlorpyrifos, chlorfenvinfos, parathion-ethyl, quinalphos, biological samples, blood, urine, SPE, LLE, microextraction, detection e determination*. É importante salientar, que na breve revisão bibliográfica que irá ser abordada apenas foram tidos em conta trabalhos realizados em amostras biológicas humanas nos quais fossem detectados e quantificados os compostos em estudo.

Tabela 5: Métodos para a detecção e quantificação de POF em amostras biológicas.

Composto(s)	Amostra biológica	Preparação da amostra		Detecção e quantificação			Ref.		
		Técnica de Extração	Recuperação (%)	Técnica	Intervalo de calibração (ng/mL)	LOD (ng/mL)		LOQ (ng/mL)	
DMT, DZN, CLF, CLP, PRT, QLP	Sangue (100 µL)	SPME	<i>Sangue</i> DMT - 0,67-0,25 PRT - 14,13-12,45 QLP -6,69-6,45	GC-MS	PRT,QLP - 50-50000 DMT - 50-40000	<i>Sangue</i> DMT - 2000 DZN - 4000 CLF -40 CLP - 1000 PRT - 250 QLP - 100	<i>Urina</i> DMT -500 DZN -20 CLF,CLP, PRT - 30 QLP -20	<i>Sangue</i> DMT -500 PRT,QLP - 50	30,32, 33, 36
	Urina (100 µL)		<i>Urina</i> DMT - 2,47-0,38 PRT - 27,70-24,47 QLP - 45,64-21,93			<i>Urina</i> DMT - 100 PRT,QLP - 10			
AZP, DMT, DZN, CLF, CLP, PRT, QLP	Sangue (500 µL)	SPE (HLB)	AZP - 86,2 - 103,6 DMT - 87,6 - 108,4 DZN - 69,3 - 71,6 CLF -58,1 - 80,6 CLP - 45 - 61,4 PRT - 49,1 - 60,0 QLP - 63,4 - 68,4	GC-MS	50 - 25000	n/d	500	31	
DMT DZN CLP CLF PRT QLP	Sangue (500 µL) Conteúdo gástrico (500 µL)	SPE (C ₁₈)	<i>Sangue</i> DMT - 97,29 DZN - 89,63 CLF - 85,58 CLP - 74,17 PRT - 80,60 QLP - 80,96	GC-ECD GC-MS	50-5000	n/d	50	34	
			<i>Suco gástrico</i> DMT - 44,53 DZN - 49,27 CLF - 41,81 CLP - 41,50 PRT - 49,10 QLP - 45,75						

Continuação da tabela 5

Composto(s)	Amostra biológica	Preparação da amostra		Detecção e quantificação				Ref.
		Técnica de Extração	Recuperação (%)	Técnica	Intervalo de calibração (ng/mL)	LOD (ng/mL)	LOQ (ng/mL)	
DZN CLF CLP PRT QLP	Sangue (500 µL)	HS-SPME	DZN - 2,9 CLP - 8,3 CLF - 1,7 PRT - 4,7 QLP - 1,3	GC-MS	0,025-0,5 (µg/g)	DZN - 0,01 CLP - 0,03 CLF - 0,05 PRT - 0,02 QLP - 0,01 (µg/g)	n/d	37
DMT DZN CLP	Sangue (100 µL)	Precipitação com sulfato de zinco:metanol (1:5)	DMT,CLP - 97-100 DZN 97-99	LC-MS/MS	0.5-100	n/d	0.5	38
DZN CLP PRT	Sangue (1000 µL)	SPE (HLB)	DZN - 79-87 CLP - 90-93,8 PRT - 75,4-80,4	GC-MS	CLP, DZN -150-5000 PRT - 130-5000	DZN - 40 CLP - 80 PRT - 90	DZN, CLP - 150 PRT - 130	39
CLP	Soro (500 µL) Urina (500 µL)	Soro Precipitação com acetoneitrilo	Soro - 93-107 Urina - 98-103	LC/LC-MS/MS	1-100	Soro - 1 Urina - 0.5	Soro - 5 Urina - 1	40
DMT CLP PRT	Sangue (2000 µL)	SPE (C ₁₈)	n/d	GC-ECD GC-MS	0.05-0.2 (mg/kg)	DMT - 0,0017 CLP - 0,0019 PRT - 0,0007 (mg/kg)	DMT - 0,0058 CLP - 0,0061 PRT - 0,0027 (mg/kg)	41
DZN CLP	Sangue Sangue do cordão umbilical (500µL)	LLE	DZN - 117,8 CLP - 137,5	GC-MS	n/d	<100	n/d	42

Continuação da tabela 5

Composto(s)	Amostra biológica	Preparação da amostra		Deteccção e quantificação			Ref.		
		Técnica de Extração	Recuperação (%)	Técnica	Intervalo de calibração (ng/mL)	LOD (ng/mL)		LOQ (ng/mL)	
DMT DZN CLP	Soro (2000 µL)	SPE (C ₁₈) LLME	Soro		GC-MS	n/d	Soro (SPE) DZN - 1 CLP - 2	43	
	Urina (5000 µL)		Urina						SPE DMT - 1.4 DZN - 0.6 CLP - 0.7
			SPE DZN - 86-88 CLP - 87	LLME DZN - 71-98 CLP - 26					
			SPE DMT - 68-102 DZN - 96 CLP - 97	SPE DMT - 72-93 DZN - 61-77 CLP - 60-64			Urina SPE DMT - 1.4 DZN - 0.6 CLP - 0.7		
DZN CLP	Soro (100 µL)	SPE (C ₁₈)	DZN - 71 - 91 CLP - 83 - 95		GC-MS/MS	0.1-1000	DZN -0,3 CLP -0,2	DZN -0,9 CLP -0,6	44
DMT PRT	Plasma (8000 µL - SPE) (10000 µL - LLE)	SPE e LLE (C ₁₈)	DMT - 95,5-109,1 PRT - 86,4-96,1		GC-PFPD	0.05-2	DMT - 0,01 PRT - 0,02	DMT - 25 PRT - 40	45
CLP	Sangue (500 µL)	SPME	n/d		GC-MS/MS	1-50	0.2	1	46
AZP DMT PRT QLP	Soro (1000 µL) Sangue (2000 µL)	SPE (HLB)	Soro		GC-MS	10-1000	5 PRT - 25 [48]	10 PRT - 50 [48]	47,48
			Sangue						
			AZP - 93,6-101,8 DMT - 88,2-90,0 CLP - 95,4- 95,8 PRT - 91,44-98,5 QLP - 95,4-98,6	73,1-101,8 72,3-83,3 45-51,8 53,8-62,9 56,5-68,3					

Continuação da tabela 5

Composto(s)	Amostra biológica	Preparação da amostra		Detecção e quantificação				Ref.
		Técnica de Extração	Recuperação (%)	Técnica	Intervalo de calibração (ng/mL)	LOD (ng/mL)	LOQ (ng/mL)	
DZN CLP	Plasma (2000 µL)	SPE (WCX)	DZN - 89-95	GC-HRMS	DZN - 16-6400 CLP - 21-6400	DZN - 16 CLP - 21	DZN - 16 CLP - 21	49
DZN CLP	Sangue e sangue do cordão umbilical (2000 µL)	SPE (WCX) [49]	n/d	GC-HRMS [49]	[49]	n/d	[49]	50
			<i>Sangue</i> DZN - 1,7 PRT - 0,37			<i>Sangue</i> DZN - 3 PRT - 18	0.02	
	Sangue (300 µL)		<i>Plasma</i> DZN - 1,39 PRT - 0,78			<i>plasma</i> DZN - 5 PRT - 16	0.02	
	plasma (300 µL)		<i>Rim</i> DZN - 1,34 PRT - 0,87		0,02-20 (no rim e fígado vem em µg/g)	<i>Rim</i> DZN - 4 PRT - 12 (µg/g)	0.02 (µg/g)	51
DZN PRT	Rim (1g)	HS-SPME	<i>Fígado</i> DZN - 0,31 PRT - 0,32	GC-NPD		<i>Fígado</i> DZN - 10 PRT - 25 (µg/g)	0.02 (µg/g)	
	fígado (1g)		<i>Líquido cefalorraquidiano</i> DZN - 2,5 PRT - 1,25			<i>Líquido cefalorraquidiano</i> DZN - 2 PRT - 8	0.02	
	<i>Líquido cefalorraquidiano</i>							

Continuação da tabela 5

Composto(s)	Amostra biológica	Preparação da amostra		Detecção e quantificação				Ref.
		Técnica de Extração	Recuperação (%)	Técnica	Intervalo de calibração (ng/mL)	LOD (ng/mL)	LOQ (ng/mL)	
DZN	Soro (200 µL)	Precipitação com acetonitrilo	73,8-17,2	LC-APCI-MS	250-8000	125	250	52
AZP DMT PRT	Sangue Plasma Soro Urina Conteúdo gástrico (700 µL)	Precipitação com tolueno	AZP - 105 DMT - 50 PRT - 56	GC-NPD GC-MS	n/d	10	n/d	53
DZN CLP PRT	Soro Plasma (4 g)	SPE (C ₁₈)	C18 DZN - 25 CLP - 18 PRT - 17 Mista DZN - 27 CLP - 121 PRT - 20	GC-HRMS	0,25-400 (pg/g)	DZN - 0,5 CLP, PRT - 1 (pg/g)	0,25 (pg/g)	54
CLP	Soro Urina Conteúdo gástrico (3000 µL)	LLE	102-104	GC-MS	50-5000	25	83	55

Continuação da tabela 5

Composto(s)	Amostra biológica	Preparação da amostra		Detecção e quantificação				Ref.
		Técnica de Extração	Recuperação (%)	Técnica	Intervalo de calibração (ng/mL)	LOD (ng/mL)	LOQ (ng/mL)	
AZP DMT DZN CLP PRT QLP	Urina (5000 µL)	SPE (C ₁₈)	DMT 69-88 DZN 76 -119 CLP 83 -100 PRT 84 -111 CLF - 75-106 QLP 78 - 107 AZP 74-109	GC-IT- MS/MS	0,1-100	DMT - 0,067 DZN - 0,023 CLP - 0,010 PRT - 0,023 CLF - 0,033 QLP - 0,104 AZP - 0,035	DMT - 0,145 DZN - 0,078 CLP - 0,034 PRT - 0,099 CLF - 0,108 QLP - 0,346 AZP - 0,118	56
DZN	Cabelo (200 mg)	Extracção metanólica	121	GC-ECD GC-MS	0-100 (em GC-MS 0-0,1 pg/mg)	2 (GC-ECD) 2.5 (GC-MS)	2,5 (GC-ECD) 5 (GC-MS) (pg/mg)	57
DMT	Soro (2000 µL)	LLE	67,8-87	LC-ESI- MS/MS	5-50	2	5	58
DZN CLP PRT	Sangue e sangue do cordão umbilical (4g)	SPE (fase mista)	13-91	GC-HRMS	[54]	[54]	[54]	59
DMT DZN	Soro e urina	SPE	90-99	LC-MS	DMT - 100-5000 DZN - 50-250	7-70	22-85	60

GC-EDC: cromatografia gasosa acoplado detector de captura de electrões; **GC-HRMS:** cromatografia gasosa de alta definição acoplada a espectrometria de massa; **GC-MS:** cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa; **GC-MS/MS:** cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa em tandem; **GC-NPD:** cromatografia gasosa acoplada a detector nitrogénio-fósforo; **GC-PFPD:** cromatografia gasosa acoplado detector fotométrico de chama; **HS-SPME:** *headspace* microextração em fase sólida; **LC-MS:** cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massa; **LC-MS/MS:** cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massa em tandem; **LLE:** extração líquido-líquido; **LLOQ:** Limite inferior de quantificação; **LOD:** Limite de detecção; **Ref.:** referências bibliográfica; **n/d:** não disponível no documento original; **SPE:** extração em fase sólida; **SPME:** microextração em fase sólida.

2.1. Amostras biológicas utilizadas para a detecção de Pesticidas Organofosforados

As amostras biológicas, no geral, são de análise muito complexa, uma vez que têm na sua composição diversos elementos que vão desde células e fragmentos celulares, a macromoléculas como proteínas e lípidos, e ainda elementos mais pequenos como sais, ácidos e bases. A escolha da amostra a analisar depende de vários factores, e em muito do objectivo e aplicabilidade do método.

No caso dos POF, as amostras biológicas mais usadas em métodos de determinação são o sangue [30-33,35-37,39,41,45-48,51,59], o plasma [44,49-51,53,54] e o soro [40, 43,52,54,55,58,60]. A diferença entre estas matrizes está na constituição de cada uma, sendo que o plasma e o soro possuem menos interferentes que o sangue. Mas todas elas permitem a identificação dos compostos na sua forma inalterada, o que possibilita determinar a relação dose-efeito. Em situações de intoxicação aguda a dose a que o indivíduo esteve exposto será, muito provavelmente, elevada, por esse motivo o facto da absorção dos POF ser rápida não representa uma condicionante à detecção e quantificação destes compostos em nenhuma destas amostras biológicas [30-34, 36-61].

A urina é também uma matriz muito utilizada, contudo, no caso dos POF a maioria dos trabalhos que usa esta matriz focam-se principalmente na detecção de metabolitos, ou seja, em muitos dos métodos desenvolvidos os compostos na sua forma original não são incluídos [63-66,69-71]. Apesar disso foram encontrados na literatura vários trabalhos onde os compostos são detectados em urina na sua forma inalterada [30,32,33,35,40,43,55,56,60]. É importante lembrar que a urina representa a principal via de eliminação para os POF, e por isso será mais fácil detectar os compostos na sua forma metabolizada. Por esse motivo, esta matriz é muitas vezes usada para avaliar exposição crónica aos POF [63-66].

Existem ainda outras matrizes biológicas, como as vísceras, que podem ser também usadas para detectar este grupo de compostos. Na bibliografia consultada foram encontrados trabalhos onde analisam o líquido cefalorraquidiano, o fígado, o rim [51] e o conteúdo gástrico [24,34,55]. Contudo, tendo em conta a sua elevada complexidade, são matrizes de difícil análise, que exigem vários passos de extracção antes da análise cromatográfica, e que podem apenas ser utilizadas unicamente em casos de morte, após autópsias. Ainda assim, são matrizes com interesse forense, que possibilitam uma análise qualitativa e das quais é possível obter informações relevantes, nomeadamente sobre qual a via de entrada do tóxico e também sobre a toxicocinética.

O recurso a matrizes alternativas, como por exemplo o cabelo, é pouco recorrente para a detecção de POF em casos de intoxicação aguda. Tendo em conta as características do cabelo como matriz biológica para análises de interesse forense, muito dificilmente serão detectados compostos em casos de exposição aguda, deste modo, o cabelo ganha interesse em situações crónicas permitindo a confirmação de exposição prolongada [57]. Existem alguns

trabalhos no qual usam sangue do cordão umbilical, que é considerado também como uma matriz alternativa, nos quais foi avaliado o impacto que a exposição crónica por POF tem no desenvolvimento do feto [42,59]. Existem ainda dois estudos populacionais, que avaliam também a exposição crónica, mas recorrem à análise de sémen e urina para avaliar o impacto ao nível do sistema reprodutor [72,73].

2.2. Técnicas de extracção

A complexidade das matrizes biológicas requer o uso de técnicas preparativas a fim de eliminar o maior número possível de interferentes presentes nas amostras, mas garantindo sempre a integridade dos compostos em análise.

Muitas das vezes, antes de ser executada a técnica de extracção, pode ser realizado um passo de diluição, ou até mesmo precipitação, ambos os procedimentos facilitam a execução da técnica extractiva. A precipitação elimina principalmente proteínas presentes nas amostras, e é um passo que deve ser avaliado de modo a garantir que o composto não sofre alterações ou não fica retido no precipitado.

A extracção líquido-líquido (LLE, do inglês *liquid-liquid extraction*) baseia-se na formação de duas fases imiscíveis, uma fase orgânica, com grande afinidade para os analitos, e uma fase aquosa, onde os restantes elementos da amostra ficam retidos. Existem descritos na literatura alguns trabalhos onde a LLE é utilizada para isolar os POF nas mais diversas matrizes [42,45,55,58]. Apesar de ser uma técnica convencional, a LLE apresenta algumas desvantagens quando comparada com outras, nomeadamente a falta de selectividade, que conduz à obtenção de baixas recuperações, o uso de grandes volumes de amostra bem como de solventes orgânicos tóxicos, entre outras [74]. Por estes motivos, a técnica de extracção actualmente mais usada para isolamento dos POF, das mais diversas matrizes biológicas, é a extracção em fase sólida (SPE, do inglês *solid-phase extraction*) [31,36,39,41,43,44,45,47-50,54,55,59,60].

Em SPE, a amostra é feita passar por uma coluna, geralmente descartável, que tem no seu interior um sorbente, de características específicas, que permite a adsorção dos compostos. É feito um passo de lavagem para eliminar interferentes indesejados e posteriormente os compostos são eluídos da coluna, ficando assim isolados dos restantes elementos da matriz. Podem ser usadas colunas com enchimentos variáveis, e por esse motivo, o protocolo pode ser facilmente adaptado às características dos compostos [74]. No caso dos POF, e atendendo às suas propriedades físico-químicas, as mais utilizadas são colunas de fase reversa, como as C₁₈ (enchimento com características polares) [36,41,43-45,54,56], mas também são encontrados trabalhos onde utilizam as HLB (do inglês, *hidrophilic-lipofilic balance*), que são semelhantes às colunas de fase reversa usadas em cromatografia líquida [31,39,47,48], e ainda as colunas de troca cationica fraca (WCX, do

inglês, *weak cation exchange*) [49,50,59]. Colunas diferentes implicam metodologias também diferentes, particularmente em termos do processo de eluição [74]. Os valores de recuperação obtidos nos vários trabalhos situam-se acima dos 70% (tabela 5), excepto num único trabalho onde se obtiveram recuperações entre 17-27% [54].

A SPE permite de uma forma simples o isolamento de compostos das mais diversas matrizes biológicas e apresenta uma série de vantagens em relação à LLE. Para além de utilizar volumes de solventes orgânicos significativamente inferiores, é fácil de executar, é versátil, económica e reprodutível, e geralmente as recuperações obtidas são elevadas [74]. De facto, no trabalho descrito por Wang *et al.* onde são comparadas ambas as técnicas (LLE com SPE) para a determinação de POF em sangue, mostra que as recuperações obtidas com SPE são significativamente superiores às obtidas em LLE [45].

Contudo, nos últimos anos as técnicas de microextração têm ganho algum destaque em toxicologia forense, principalmente devido ao baixo impacto ambiental (gasto reduzido de solventes orgânicos) [74,75]. A microextração em fase sólida (SPME, do inglês *solid-phase microextraction*), como o próprio nome indica, é uma técnica de microextração, na qual os compostos são selectivamente adsorvidos/absorvidos num suporte sólido unido a uma seringa [75,76]. O suporte sólido consiste numa fibra capilar de sílica fundida (com aproximadamente 1 cm) revestida por uma fase estacionária que pode ser líquida ou sólida (polímero ou substância adsorvente, respectivamente) [30,75,76]. Esta técnica fundamenta-se nos princípios de termodinâmica e transferência de massa, e em oposição ao que acontece noutras técnicas de extração, toda a quantidade de composto extraída é injectada no sistema cromatográfico [74,76]. De uma maneira geral, a fibra é exposta à amostra, os compostos são adsorvidos/absorvidos para a fibra. Passado algum tempo é estabelecido o equilíbrio (2 a 30 minutos) e a fibra é recolhida para o interior da seringa. Posteriormente os compostos extraídos são directamente injectados no sistema cromatográfico (no caso de GC são deadsorvidos termicamente, em LC são dissolvidos em fase móvel). Esta técnica permite trabalhar em vários modos de operação diferentes, sendo que as mais usuais são a imersão directa e o *headspace* (HS) [75,76].

Como vantagens, a SPME é uma técnica selectiva, que pode ser usada para isolar compostos voláteis, e não-voláteis, em amostras líquidas, gasosas ou sólidas. É de fácil e rápida execução, não necessita de equipamentos complicados e caros, e não gasta, ou utiliza volumes mínimos, de solventes orgânicos [75,76]. Existem, por isso, descritos na literatura vários trabalhos nos quais utilizam SPME para isolamento dos POF de matrizes biológicas [30,32,33,35,37,46,51]. Apesar das suas vantagens, as recuperações obtidas são geralmente baixas, e na maioria dos trabalhos os valores situam-se entre os 1-15% (tabela 5). Apenas um trabalho descreve recuperações entre 20-45%, obtido para o PRT em urina [32].

2.2.1. Microextração em Seringa Empacotada

As técnicas de microextração têm ganho ênfase nos últimos anos por vários motivos. Para além de permitirem efectuar análises a partir de pequenos volumes de amostra, requerem baixos volumes de solventes orgânicos, o que as torna mais amigas do ambiente e também economicamente aliciantes (menos custos e desperdícios laboratoriais). Geralmente estas técnicas permitem automatização e fácil acoplamento *online* com instrumentos analíticos (GC e LC) [74,75].

A microextração em seringa empacotada (MEPS, do inglês *microextraction in packed syringe*) foi recentemente criada por Abdel Rehim e é considerada uma miniaturização de SPE devido às várias semelhanças que estas técnicas apresentam entre si [75,77-79].

Em MEPS são usadas colunas de pequenas dimensões, pela qual é feita passar a amostra, com o auxílio de uma seringa, geralmente com capacidade entre os 100-250 μL (figura 5a). A coluna é na realidade uma micro-coluna, com cerca de 1 cm de comprimento e apenas 1 mg de material sorbente, e dada as suas reduzidas dimensões alberga volumes muito baixos. Desta forma, a principal diferença entre MEPS e SPE reside na dimensão da coluna e, conseqüentemente, nos pequenos volumes utilizados, tanto de amostra como de solventes orgânicos. As colunas de MEPS podem ser reutilizadas, e o mesmo não acontece com as colunas de SPE, que na sua maioria são descartáveis ao fim de uma única utilização [75,77-79].

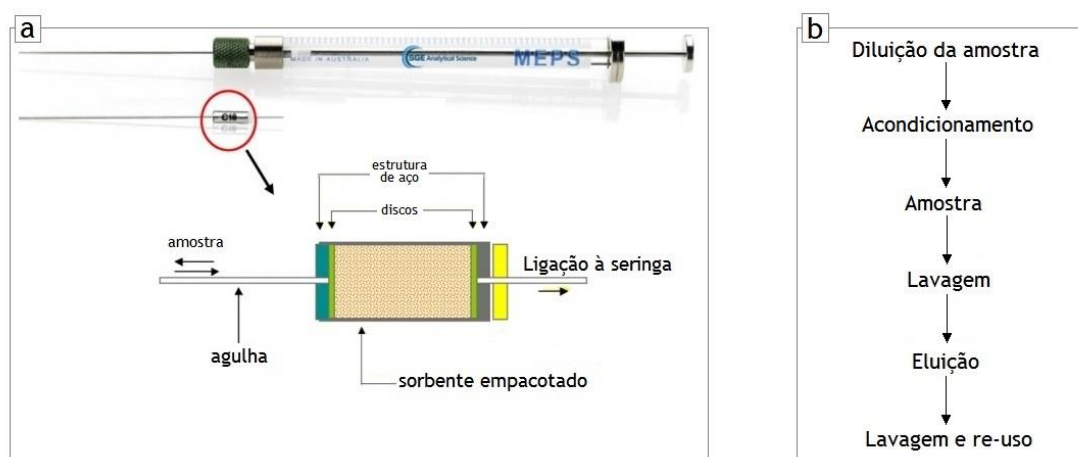


Figura 5: a) Seringa MEPS (capacidade de 250 μL) e micro-coluna com representação da composição da coluna de extração (Imagem adaptada de Rehim A., 2010) [78]. b) Esquema representativo de um protocolo base para a realização da extração por MEPS (Imagem adaptada de Rehim A., 2011) [77].

Contudo e apesar das dimensões das colunas serem um ponto divergente entre as duas técnicas, o tipo de sorbente utilizado nas colunas de MEPS é equiparável aos utilizados em SPE. Assim, à semelhança do que acontece com SPE, estão comercialmente disponíveis enchimentos de materiais absorventes à base de sílica com características polares (C_{18} , C_2 , C_8), modo misto (M1, troca catiónica), entre muitos outros [75,77-79].

Em termos práticos, o protocolo de MEPS assenta em seis passos base, esquematizados na figura 5b.

Antes de iniciar o processo de extracção é sempre aconselhável a diluição da amostra, para tal, diferentes factores de diluição devem ser aplicados consoante o tipo de amostra (urina e plasma 1:5, sangue 1:25) [77,78]. Este passo inicial diminui a viscosidade da amostra e facilita o passo de aspiração, bem como evita a saturação da coluna [77-79]. É ainda importante ter em atenção o pH da amostra, que dependendo das características dos compostos pode ser um factor crucial para o bom rendimento da técnica. A eliminação de proteínas e outras macromoléculas, através de precipitação ou centrifugação, pode ser também fundamental [77].

O processo de extracção, propriamente dito, inicia-se com o acondicionamento da coluna, que é essencial para garantir que estão reunidas as condições necessárias para que os compostos adiram ao sorbente. Para tal, é utilizado um solvente orgânico, por exemplo o metanol, que por activação dos grupos ligantes do sorbente, favorece as interacções com os compostos [77-79]. A passagem da amostra é o passo seguinte, e pode ser feito o maior número de vezes a uma velocidade constante (10 a 20 $\mu\text{L/s}$) [77,79]. Na teoria, quanto mais vezes for aspirada a amostra, maior quantidade de composto ficará retido, contudo na prática o mesmo pode não se verificar, tendo em conta que é aplicada uma força para ejectar a amostra da coluna entre as aspirações. Após a passagem da amostra é essencial um passo de lavagem para eliminar os possíveis interferentes que possam também ficar retidos na coluna. Durante este passo é importante assegurar que os compostos não perdem afinidade para a coluna, são por isso usadas soluções aquosas com baixas percentagens de solventes orgânicos (cerca de 5-10%) [77-78]. Só depois da lavagem é feita a eluição dos compostos, com uma solução para a qual os compostos têm elevada afinidade (geralmente são utilizados soluções com elevadas percentagens de solventes orgânicos) [77-78]. Eluídos os compostos da coluna, esta pode ser preparada para nova utilização, para tal podem ser realizadas duas lavagens. Na primeira pode ser usada a solução de eluição, ou alternativamente deve ser utilizado um solvente orgânico (metanol ou acetonitrilo) com cerca de 10-20% de 2-propanol. Para a segunda lavagem pode ser usada uma solução aquosa com cerca de 5% de solvente orgânico [77,78].

As soluções de lavagem e eluição a utilizar diferem consoante o tipo de coluna utilizado, que por sua vez dependerá das características dos compostos a extrair. Por esse motivo, Rehim aconselha diferentes protocolos a adoptar para cada tipo de coluna (C_{18} ou mista) [77].

Apesar de ser uma técnica relativamente recente, MEPS apresenta várias vantagens quando comparada com SPE, nomeadamente o baixo consumo de solventes orgânicos e a reutilização das colunas (cerca de 100 utilizações em plasma e 400 em água), o que faz de MEPS uma técnica economicamente viável e extremamente aliciante. Para além disso, com recurso a pequenos volumes de amostra é possível obter recuperações elevadas e semelhantes às obtidas com SPE, a qual utiliza volumes de amostra bem superiores. Por

último, é importante não esquecer que MEPS permite ainda o fácil acoplamento *online* a sistemas cromatográficos (tanto GC como LC) [75,77-79].

2.3. Determinação Analítica de Pesticidas Organofosforados

Os POF são compostos apolares e por esse motivo a técnica cromatográfica de eleição para a sua detecção e doseamento é a cromatografia gasosa (GC do inglês, *gas chromatography*) acoplado a detectores de espectrometria de massa (MS, do inglês *mass spectrometry*) [30-37,39,41-43,47-50,53-55,57], espectrometria de massa em tandem (MS/MS) [44,46,56], detector fotométrico de chama (PFPD) [45] e detector nitrogénio-fósforo (NPD do inglês *nitrogen-phosphorus detector*) [51,53] e ainda detector de captura de electrões (ECD, do inglês *electron capture detector*) [34,41,57]. Apesar dos POF serem de facto compostos ideais para GC, existem ainda alguns trabalhos onde usam cromatografia líquida (LC, do inglês *liquid chromatography*) acoplada a MS [52,60] e também a MS/MS [38,40,58].

Qualquer uma destas técnicas é bem conhecida no campo de toxicologia, mas como no presente trabalho foi utilizado a espectrometria de massa em tandem será realizada uma sucinta introdução sobre a mesma.

2.3.1. Espectrometria de Massa em Tandem

A espectrometria de massa trouxe um grande avanço às técnicas analíticas e o acoplamento as sistemas de GC surgiu no final da década de 50 [79-82]. Actualmente é uma técnica robusta, utilizada em análises de rotina que proporciona resultados com elevada fiabilidade [79-81].

A espectrometria de massa é uma técnica de detecção conhecida pela sua elevada selectividade, pois é capaz de produzir espectros únicos para cada tipo de molécula [79-82]. De uma maneira geral, uma fonte ionizante é aplicada sobre o composto em análise provocando a sua ionização, e como resultado são obtidos fragmentos iónicos que são separados de acordo com a razão massa/carga (m/z). O resultado obtido é designado por espectro de massa, e traduz a abundância relativa dos iões (I) definidos em função da razão m/z (expressa em percentagem normalizada ou em percentagem de iões totais) [80,81].

Um sistema de detecção de MS pode ser dividido em três módulos distintos: fonte de ionização, analisador de massas e detector [79-82]. O método de ionização por impacto de electrões (IE) é amplamente usado, mas pode também ser encontrado o método de ionização química (IQ). Em relação aos tipos de analisadores existem vários: o quadrupolo simples, armadilha de iões (*ion trap*), TOF (do inglês, *time of flight*), transformada de Fourier, entre outras, todos eles requerem pressões baixas. O detector mais comumente usado é o

multiplicador de iões, no qual os iões são transformados em electrões por um eléctrodo dinodo [79-82].

Em IE a amostra é introduzida numa câmara de ionização que se encontra em vácuo (pressões baixas na ordem de 10^{-4} Torr). Um filamento de luz incandescente produz um feixe de electrões que por acção de um eléctrodo com potencial positivo (geralmente 70V, ou seja cada electrão tem energia 70eV) atravessa a amostra provocando a sua ionização, da qual resultam os fragmentos de iões (figura 6) [79-81].

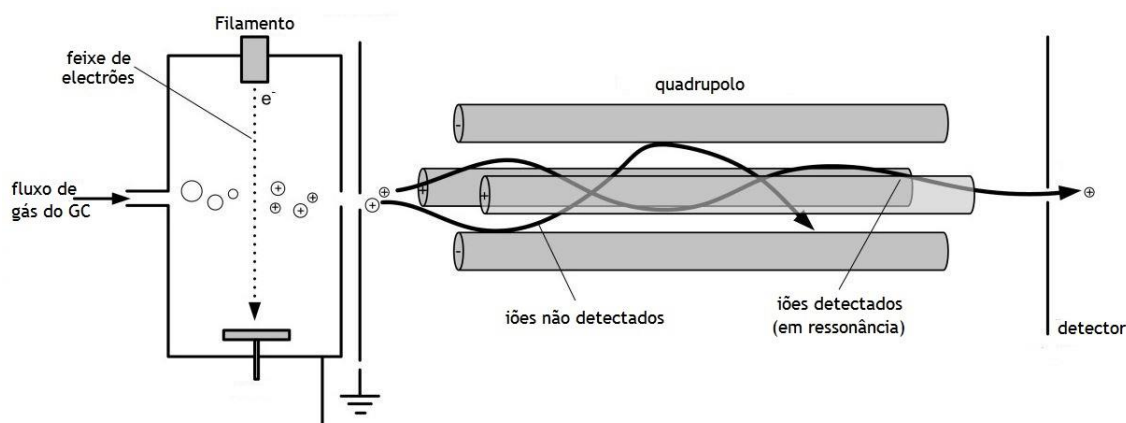


Figura 6: Representação esquemática do funcionamento da fonte ionização por impacto de electrões (IE) e do quadrupolo simples (lado esquerdo e lado direito, respectivamente) geralmente associados ao GC-MS (imagem adaptada de Wittmann, 2007) [83].

Após a ionização dos compostos, os fragmentos de iões são direccionados/focados para o quadrupolo, ou filtro de massas como é também conhecido [80,81]. Um quadrupolo consiste num conjunto de quatro barras metálicas, cilíndricas, dispostas paralelamente (figura 6) [79-82]. Por aplicação simultânea de corrente contínua (cc) e de radiofrequência (RF), às barras diagonalmente opostas, é criado, no centro do conjunto, um campo eléctrico onde os electrões se movem seguindo uma trajectória oscilatória.

Deste modo, é possível, para um dado intervalo de massas efectuar um varrimento (ou *scan*) através da variação de cc e RF (mantendo a sua razão constante), do qual resultam os espectros de massas característicos para cada composto [79-81]. Por outro lado, para uma dada razão RF/cc apenas iões com determinado m/z conseguem manter uma trajectória estável, o que lhes permite a travessia pelo quadrupolo sem chocar com as barras, alcançando assim o detector [80,81]. Existe uma relação linear entre a massa do ião capaz de atravessar o quadrupolo e a amplitude da voltagem [80]. Este tipo de monitorização é designado por modo SIM (do inglês, *Selected Ion Monitoring*) e é responsável pela elevada selectividade e sensibilidade alcançada quando se usa um quadrupolo [80,81].

O quadrupolo é o analisador de massas mais utilizado devido à sua versatilidade e fácil uso, que oferece um bom compromisso entre o intervalo de massas, resolução e precisão. Trabalha geralmente a *unit-mass-resolution*, isto é, diferencia entre massas que diferem em apenas 1Da [81].

O triplo quadrupolo nasce do acoplamento em série de três de quadrupolos. O primeiro e o terceiro quadrupolos (Q1 e Q3, respectivamente) funcionam como descrito anteriormente, isto é, são analisadores de massa e permitem a identificação dos compostos de acordo com a razão m/z . O segundo quadrupolo (Q2) funciona como uma célula de colisão, onde a aplicação de um RF induz a aceleração dos iões, que por colisão com um gás inerte pesado (o árgon ou o azoto) provoca a fragmentação dos iões [79,81].

A principal vantagem, em comparação com um quadrupolo simples, é que em MS/MS, existe a possibilidade de seleccionar um ião, denominado por ião pai ou ião precursor, que posteriormente irá ser fragmentado, de forma controlada, em iões filhos ou produtos de iões [79,81]. Por este motivo, quando comparado com MS, numa análise em MS/MS há diminuição de ruído e, conseqüentemente um aumento significativo da sensibilidade e da selectividade, uma vez que o ião monitorizado (detectado) precede necessariamente do ião precursor seleccionado no Q1 [81]

Para além destas vantagens, MS/MS permite vários modos de operação distintos [81]. Na figura 6 encontram-se esquematizados alguns dos possíveis modos de operação em GC-MS/MS.

- Scan completo: um *scan* corresponde a um varrimento, neste caso a um varrimento num determinado intervalo de massas. Este modo de operação permite perceber quais os fragmentos de iões característicos de determinado composto. O varrimento acontece em Q1, e os restantes funcionam como condutores dos compostos até ao detector. O resultado obtido traduz o número de iões resultantes da ionização do composto [81].

- Produto de iões ou *product ion*: permite simultaneamente fragmentar um ião precursor e fazer um varrimento dos iões resultantes dessa mesma fragmentação. Assim, em Q1 é seleccionado um ião precursor, que é fragmentado no Q2, e no Q3 é feito um varrimento de massas resultantes da fragmentação. Este modo de operação permite avaliar, e posteriormente seleccionar, as transições específicas, do ião precursor para o produto de ião correspondente, para cada composto [81].

- Scan dos iões precursores: em Q1 é feito um varrimento de todas as m/z , no Q2 ocorre a fragmentação dos iões e em Q3 faz-se a selecção do um único produto de ião pretendido. Este modo de operação é útil na análise de metabolitos porque permite fazer o varrimento de compostos que têm produtos de iões em comum [81].

- Monitorização de Reacção Múltipla ou *Multiple Reaction Monitoring (MRM)*: os quadrupolos Q1 e Q3 trabalham em modo SIM. Ou seja, no Q1 é seleccionado um ião precursor que é fragmentado no Q2 e no Q3 monitoriza-se o produto de ião resultante da fragmentação. A cada fragmentação ião precursor/fragmento de ião se denomina por transição. Este modo de operação permite monitorizar várias transições em simultâneo, e é usada em análises quantitativas, pois é com este que alcança elevada sensibilidade e selectividade [81].

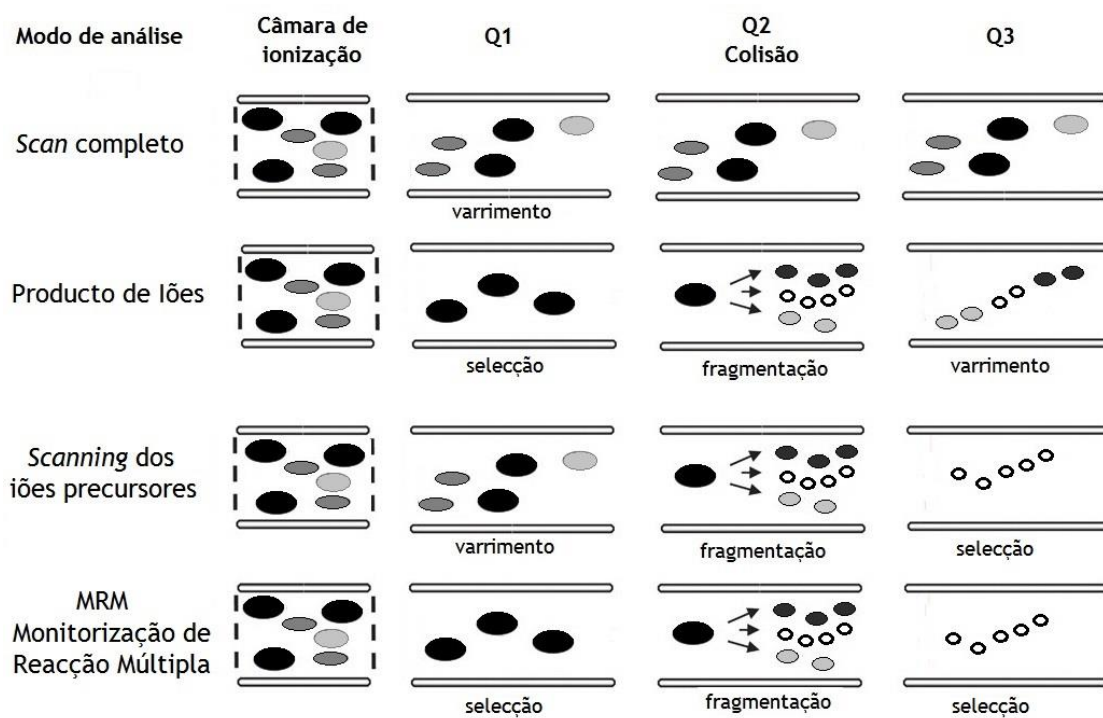


Figura 7: Vários modos de operação possíveis em GC-MS/MS. (Imagem adaptada de Domon B., *et al.*, 2006) [84].

II. Parte Experimental

1. Material e Métodos

1.1. Reagentes e Padrões

- Metanol LiChrosolv® (HPLC *grade*), VWR International (Carnaxide, Portugal);
- Acetato de etilo (*analytical grade*), VWR International (Carnaxide, Portugal);
- Acetato de amónia (*ultra pure grade*), Ampresco (Solon, E.U.A.);
- Ácido acético, Chem-lab (Zelgeden, Bélgica);
- Ácido fórmico, Sigma-Aldrich (Sintra, Portugal);
- 2-propanol (*pro-analysis*), Sigma-Aldrich (Sintra, Portugal);
- Acetonitrilo PROLABO® (HPLC *grade*), VWR International (Carnaxide, Portugal);
- Hidróxido de amónia, Sigma-Aldrich (Sintra, Portugal);
- Água desionizada Mili-Q.

Os padrões puros dos compostos em estudo, azinfos-etil, diazinão, dimetoato, clorfenvinfos (mistura racémica), clorpirifos, paratião e quinalfos foram adquiridos à Sigma-Aldrich (Sintra, Portugal).

O padrão interno, o etião, foi também adquirido pela Sigma-Aldrich (Sintra, Portugal).

1.1.1. Padrão Interno

A análise de amostras biológicas requer, geralmente um passo de extracção antes de análise cromatográfica, para o isolamento dos compostos da matriz biológica. Por esse motivo, é frequentemente usado um padrão interno (PI). Este é uma substância de concentração conhecida que é adicionado antes do passo de extracção. O PI escolhido deve reunir um conjunto de requisitos, nomeadamente, deve ter um comportamento semelhante aos compostos em análise contudo não pode, nem deve, estar presente na matriz biológica. O PI acompanha todo o processo, e dado que o seu comportamento é similar aos compostos permite acompanhar e verificar a integridade dos mesmos durante toda a análise.

Para este trabalho o PI escolhido foi o etião, um POF que actualmente não se encontra comercializado em Portugal.

1.2. Instrumentação

- Sistema de purificação de água Mili-Q Advantage A10[®], Interface (Amadora, Portugal);
- Balança analítica modelo CP225, Sartorius S.A. (Lisboa, Portugal);
- Vortex mixer 230V, Labnet International (VWR International, Carnaxide, Portugal);
- Câmara de refrigeração (a 4 °C), Dagard Ibérica (Odivelas, Portugal);
- Medidor de pH modelo 744, Metrohm (SOQUIMICA, Lisboa, Portugal);
- Placa de agitação magnética ASINCRO, J.P. Selecta (ILC, Porto, Portugal);
- Micropipetas automáticas Gilson, volumes máximos 20, 200 e 1000 µL (VWR International, Carnaxide, Portugal);
- Centrífuga Heraeus Multifuge IS-R, Thermo Scientific (Osterode, Alemanha);
- Seringa de MEPS, capacidade 250 µL da SGE - Analytical Science (ILC, Porto, Portugal);
- Coluna MEPS C₁₈ da SGE - Analytical Science (ILC, Porto, Portugal).

1.3. Soluções

Soluções-mãe: para cada composto em estudo, incluindo o padrão interno, foram individualmente preparadas soluções-mãe à concentração 1 mg/mL. Para tal, foram pesados 5 mg de composto puro, diluídos em metanol e transferidos para um balão volumétrico de 5 mL. Perfez-se o volume total com metanol e homogeneizou-se. As soluções foram guardadas à temperatura de 4°C e ao abrigo de luz.

Soluções de trabalho: foram preparadas a partir das soluções-mãe, por diluições sucessivas com metanol. Para os compostos AZP, DZN, CLF, CLP, PRT e QLP foram preparadas as seguintes soluções de trabalho: 100 µg/mL, 50 µg/mL e 5 µg/mL. Para o DMT foram usadas as seguintes concentrações: 500 µg/mL, 200 µg/mL e 100 µg/mL. Para o PI foi preparada uma solução trabalho à concentração de 50 µg/mL. Todas as soluções foram guardadas ao abrigo de luz à temperatura de 4°C.

Solução tampão acetato amónia pH 4,9: para um volume final de 1L pesaram-se 7,7 g de acetato de amónia e diluíram-se em água milli-Q. Adicionaram-se 3,3 mL de ácido acético. A solução foi transferida para um balão volumétrico de 1 L, sendo o volume aferido com água milli-Q. Homogeneizou-se a solução. O pH final medido da solução foi de 4,9.

Solução 2-propanol (1,5%) em ácido fórmico (0,1%) em água: pipetaram-se 10 µL de ácido fórmico para um balão volumétrico de 10 mL, perpez-se o volume com água milli Q. e homogeneizou-se. Para outro balão volumétrico de 10 mL foram pipetados 150 µL de 2-propanol e perpez-se o volume com a solução de ácido fórmico preparada anteriormente.

1.4. Sistema Cromatográfico

Para este trabalho foi utilizado um cromatógrafo de gases, modelo HP7890A, acoplado a um detector de espectrometria de massa triplo quadrupolo, modelo 7000B, (Agilent Technologies, Waldbronn, Alemanha). Ainda acoplado ao sistema cromatográfico usou-se um injector automático modelo MPS 2 (Gerstel, Mülheim an der Ruhr, Alemanha). Foi utilizada uma coluna capilar de sílica fundida com 5% de fenilmetilsiloxano, dimensões de 30 m x 0,25 mm I.D., 0,25 µm (J & W Scientific, Folsom, EUA).

1.4.1. Condições cromatográficas

O injector foi mantido à temperatura de 240°C, em modo de injeção *splitless*, sendo o gás de arraste usado o hélio, com fluxo constante de 0,8 mL/min. O volume de injeção de amostra foi de 2 µL.

Para obter uma adequada eficiência separativa foi estabelecida uma temperatura inicial do forno de 130°C durante 2 minutos, seguido de um aumento de 5°C por minuto, até se atingirem os 190°C. Posteriormente foi realizada uma segunda rampa, de 10°C por minuto, até alcançar os 240°C, e finalmente uma terceira rampa, de 15°C por minuto, até se atingir a temperatura final de 270°C que foi mantida durante 4 minutos.

A nível do espectrómetro de massas estabeleceu-se um fluxo de 1,5 mL/min de hélio e de 2,5 mL/min de azoto na célula de colisão em modo de impacto electrónico (EI) com uma corrente de trabalho de 35 µA e a energia de 70 eV.

A temperatura do detector foi de 230°C. Os dados foram adquiridos com o sistema a operar em modo MRM com auxílio do programa *Mass Hunter Workstation software* (Agilent Technologie). Para cada composto foram escolhidas as transições que melhor identificavam e caracterizavam cada um dos analitos em estudo. Foram seleccionadas no total três transições: duas qualitativas e uma quantitativa (destacadas a itálico e sublinhado na tabela 6). Para o PI foi usada apenas uma transição.

Tabela 6: Parâmetros do método desenvolvido (GC-MS/MS) com a indicação do tempo de retenção, transições seleccionadas (as transições quantitativas estão destacadas em itálico e sublinhado), energia de colisão e *dwell time*, definidos para cada composto.

Tempo do Segmento (min)	Composto	Tempo de retenção (min)	Transições (m/z)	Energia de colisão (eV)	<i>Dwell time</i> (ms)
			ião precursor → Produto de ião		
9,00	DMT	12,75	<u>92,9 → 63,0</u>	10	17,0
			124,7 → 78,9	15	13,0
			229 → 86,9	5	10,0
13,60	DZN	14,27	136,5 → 84,1	10	10,0
			151,6 → 124,2	5	21,2
			<u>151,6 → 137,2</u>	5	13,3
16,00	PRT	17,22	<u>291 → 137</u>	2	10,0
			291 → 263,1	2	22,1
			291 → 291	2	11,6
	CLP	17,24	<u>257,2 → 166</u>	20	11,2
			257,2 → 194	15	26,0
			257,2 → 239,9	15	31,3
17,80	CLF	18,28	108,7 → 80,9	10	10,0
			268,1 → 268,1	10	10,0
			<u>268,1 → 160,1</u>	10	10,0
	QLP	18,35	145,6 → 91,1	20	10,0
<u>145,6 → 118,1</u>			10	10,0	
19,50	ETH (IS)	20,42	156,4 → 129	20	50,9
22,50	AZP	23,55	230,6 → 128,9	25	30,9
			<u>131,9 → 77,0</u>	15	18,9
			159,7 → 77	20	18,5
			159,7 → 132,1	5	15,8

1.5. Matriz Biológica

O sangue foi a matriz biológica seleccionada para este estudo. O sangue utilizado foi obtido de excedentes de transfusões sanguíneas do Instituto Português do Sangue e da Transplantação (Delegação Centro),

Foram ainda utilizados *pools* de sangue total extraído da veia femoral de indivíduos autopsiados em ambiente hospitalar. Todas as amostras foram conservadas a -20°C antes de cada utilização.

1.6. Preparação da Amostra

Com o intuito de diminuir a presença de interferentes e facilitar o processo de extracção, a matriz biológica foi inicialmente sujeita a um pré-tratamento que consistiu na precipitação de proteínas e diluição da amostra. Deste modo, a 100 μL de sangue, previamente fortificados com PI, foram adicionados 500 μL de tampão acetato de amónia seguidos de 600 μL acetonitrilo congelado (ACN) (a temperatura de congelação foi de -20°C), que levou à precipitação de proteínas. A mistura foi centrifugada a 4500 rpm durante 15 minutos. De seguida procedeu-se à evaporação de acetonitrilo, sob corrente contínua de azoto, e posteriormente foi adicionado tampão na proporção de 1:30 (sangue:tampão).

1.7. Procedimento de Extracção

O procedimento de extracção final (otimizado) inicia-se com o acondicionamento do sorbente C_{18} de MEPS com 4 vezes 250 μL de metanol e água (também 4 vezes 250 μL). Posteriormente, 150 μL de amostra foram aspirados 40 vezes, a uma velocidade constante de cerca de 10 $\mu\text{L}/\text{s}$. Foi efectuado um passo de lavagem com 25 μL de uma solução de 2-propanol (1,5%) em ácido fórmico (0,1%) em água, e de seguida os compostos foram eluídos com 440 μL de metanol puro. Para a reutilização do sorbente, a coluna foi lavada com 250 μL de metanol (3 vezes). Os compostos eluídos foram sujeitos a evaporação sob corrente contínua de azoto à temperatura ambiente, e o resíduo foi ressuscitado em 65 μL de metanol. Este volume foi transferido para um vial e 2 μL foram injectados no sistema cromatográfico.

2. Resultados e Discussão

2.1. Identificação dos Analitos em Estudo

O primeiro passo no desenvolvimento do método analítico prende-se com a identificação qualitativa dos compostos. Neste trabalho foi usado um espectrómetro de massa triplo quadrupolo o qual operou três modos distintos: *scan*, *product ion* e MRM. Para a detecção dos compostos, estes foram sujeitos a várias análises individuais e consecutivas, e no final obteve-se um método em modo MRM que permitiu a identificação inequívoca de cada um dos compostos a partir de transições cuidadosamente seleccionadas.

2.1.1. Selecção e Fragmentação de Iões

Com o fim de seleccionar quais os iões característicos de cada composto, inicialmente o detector MS/MS trabalhou em modo *scan*, no qual foi feito um varrimento de iões entre os 50-500 *m/z*. Cada composto, foi injectado individualmente à concentração de 100 µg/mL. Os espectros de massas obtidos encontram-se ilustrados na figura 8.

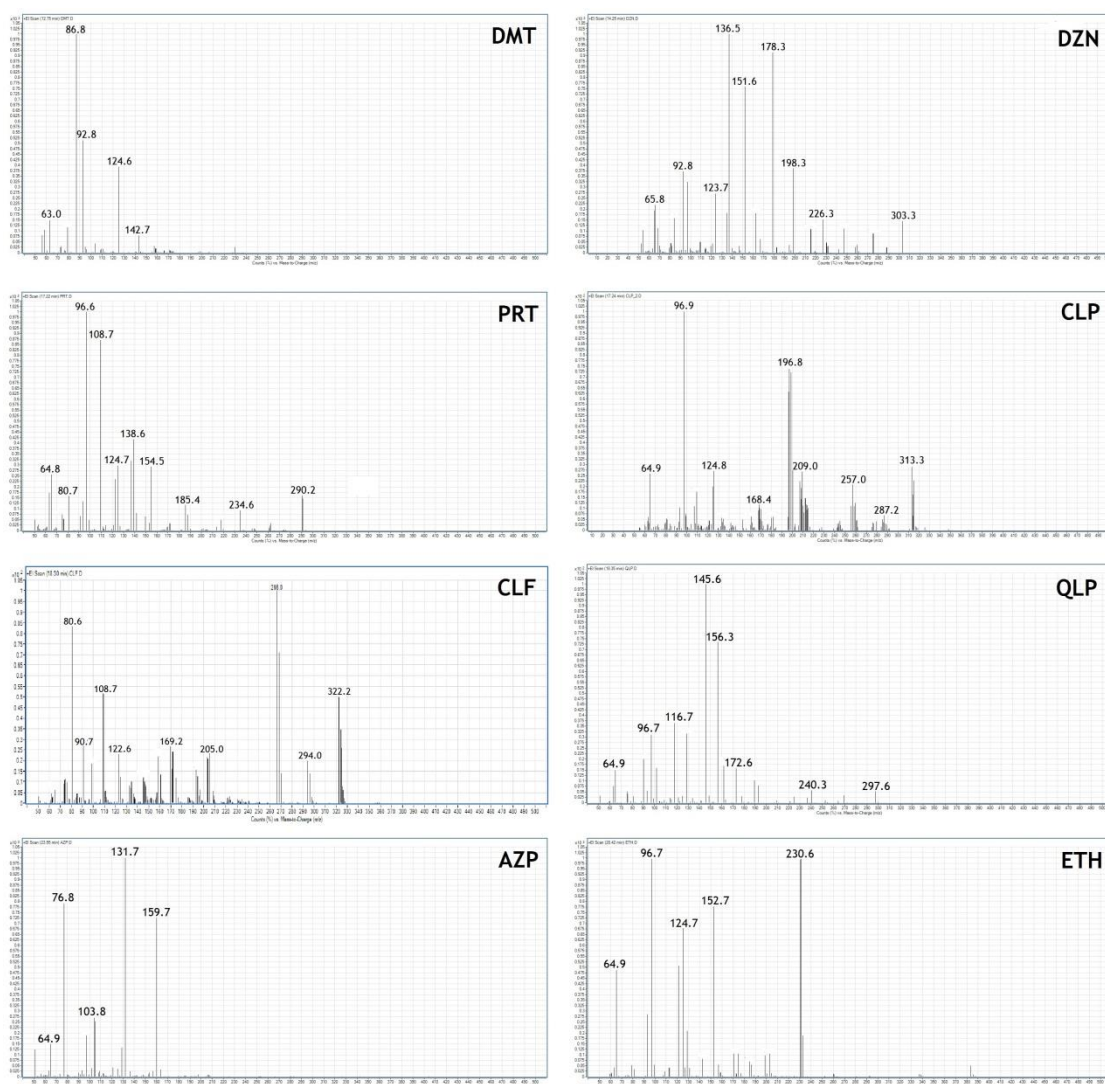


Figura 8: Espectros de massa obtidos para cada composto, resultantes do scan (50-500 m/z). Os compostos foram analisados individualmente à concentração de 100 µg/mL.

Com base no espectro de massa obtido para cada composto e, tendo em conta a abundância relativa de cada ião, foi escolhido para cada analito um ião precursor, o qual foi fragmentado, em modo *product ion*, com diferentes energias de colisão (1, 2, 5, 10, 15, 20, 25 e 30 eV). A tabela 7 indica quais os iões seleccionados e as energias utilizadas para fragmentação de cada um deles. Cada composto foi analisado individualmente, à concentração de 100 µg/mL, e do conjunto de transições obtidas foram seleccionadas aquelas que melhor identificavam cada um deles.

Tabela 7: resumo dos iões fragmentados e das respectivas energias de colisão testadas para cada um deles.

Composto	DMT	DZN	PRT	CLP	CLF	QLP	ETH	AZP
Ião precursor / fragmentado (m/z)	86,8	136,5	96,6	198,5	108,7	145,6	145,6	
	92,9	151,6	108,7	123	266,1	156,4	156,4	103,9
	124,6	178,3	138,6*	257,2	268,1	189,1	189,1	131,9
	142,7	198,3	291*	312,5	322,1	297,6	297,6	159,7
	229	303,4						
Energia de colisão (eV)	5, 10, 15, 20							
	* estes iões foram ainda fragmentados com as energias 1, 2, 25 e 30							

Para cada composto em estudo e para o método final MRM foram escolhidas três transições: uma transição quantitativa e duas qualitativas (tabela 6, no ponto 1.4.1). Nesta fase trabalhou-se com os compostos à concentração de 5 µg/mL, excepto para o DMT que foi de 50 µg/mL. Os compostos foram analisados individualmente, para a selecção das transições que apresentavam melhor sinal cromatográfico (maior área absoluta), poucos interferentes no cromatograma e ainda ausência de contribuições cruzadas com os outros analitos do estudo (devido à semelhança estrutural entre os compostos).

Para além da escolha de transições foi também optimizado o *dwell time*. Este parâmetro corresponde ao tempo de aquisição que o equipamento despende para procurar cada massa seleccionada, afecta por isso a qualidade dos pontos de aquisição, e consequentemente influencia a definição do pico cromatográfico [81]. A optimização deste parâmetro foi conseguida com recurso ao software *Agilent Mass Hunter Dynamic MRM assistant*.

Outro parâmetro estudado foi o modo de injeção. Trata-se de um parâmetro importante em cromatografia gasosa, e apesar de não estar directamente relacionado com a detecção em MS/MS pode inferir nos resultados finais (afecta a resolução dos picos cromatográficos) [80]. Podem ser usados dois tipos de injeção, injeção com repartição e injeção sem repartição, ou mais comumente conhecidos como, *split* e *splitless*, respectivamente. No primeiro modo, parte da amostra vaporizada é purgada por acção de uma válvula de repartição, e apenas uma pequena porção é guiada para a coluna. No segundo modo, *splitless*, a válvula de repartição está fechada o que permite que todo o volume de amostra injectado seja guiado para a coluna.

Os dois modos de injeção foram comparados entre si (modo *split* num ratio de 1:5), observou-se que em modo *splitless* os cromatogramas obtidos apresentavam menor ruído bem como picos cromatográficos mais bem definidos (melhor resolução). Por esse motivo, para o método cromatográfico final adoptou-se o modo de injeção *splitless*.

Na figura 9 apresenta-se o cromatograma obtido por análise de uma amostra fortificada com os compostos em estudo a uma concentração de 5 µg/mL (excepto para o DMT que foi 50 µg/mL) e o padrão interno (5 µg/mL), utilizando o método cromatográfico anteriormente descrito.

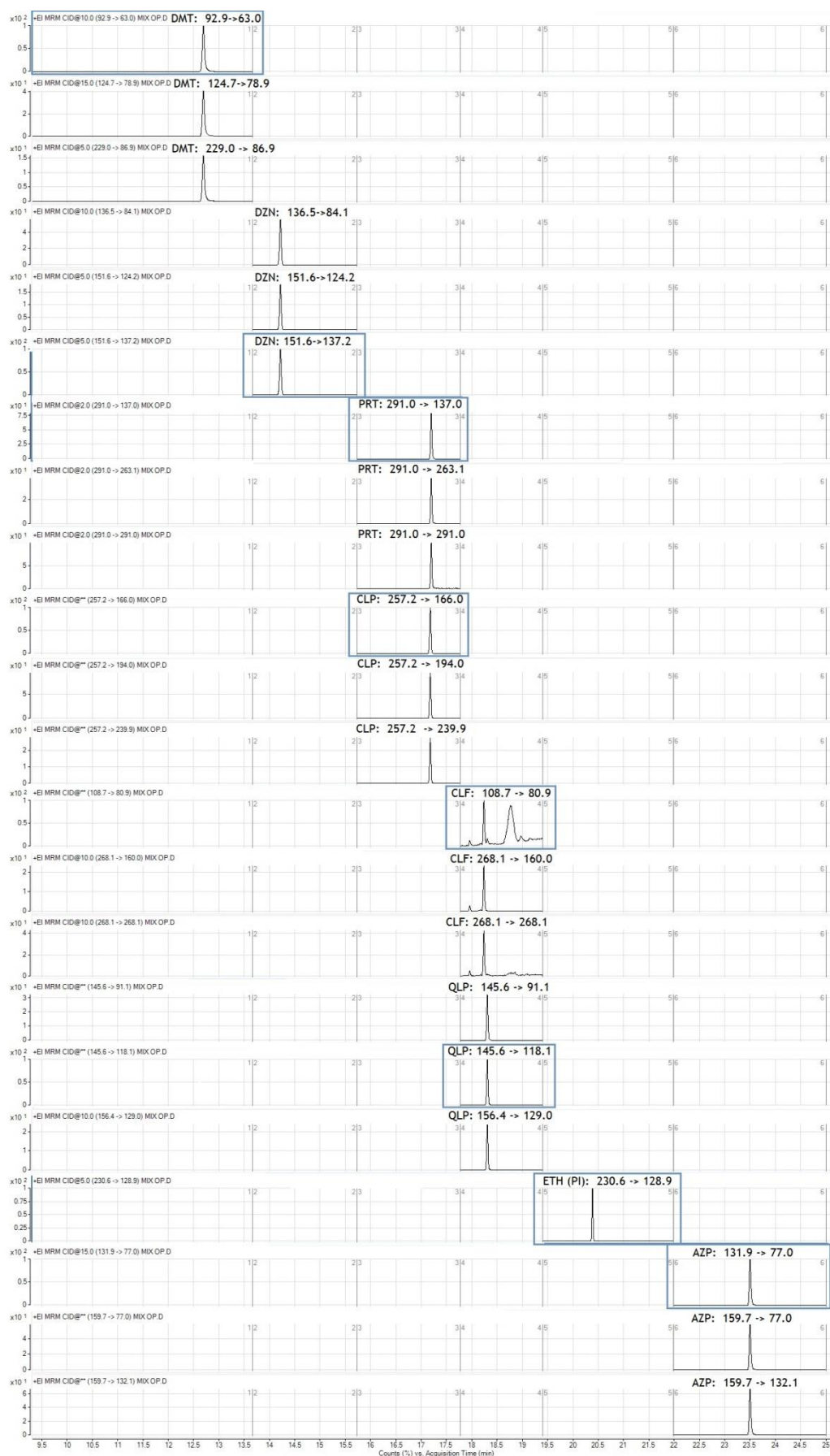


Figura 9: Cromatograma obtidos a partir da análise no método MRM otimizado.

2.2. Optimização do Método Extractivo

2.2.1. Selecção das Condições de MEPS

Os compostos em estudo são apolares/hidrofóbicos (apesar de alguns se dissolverem fracamente em água) e o pka, para a maioria deles, não é conhecido. Por estes motivos foram escolhidas as colunas C₁₈. Este tipo de coluna permite a adsorção de compostos apolares pois o seu interior é preenchido por um sorbente apolar, o octadesilcilano (C₁₈).

Dado a complexidade do sangue total, é aconselhável fazer uma diluição prévia da matriz a fim de facilitar o processo de extracção [77]. Assim, optou-se por uma diluição de 1:30, onde 100 µL de amostra fortificada foram diluídos em 2900 µL de tampão acetato de amónia a pH 4,9. Nesta fase inicial, de optimização de MEPS, trabalhou-se com os compostos à concentração de 5 µg/mL, excepto o DMT que se encontrava à concentração de 25 µg/mL.

Para garantir os melhores resultados com MEPS, e tendo por base o descrito na literatura, foram inicialmente comparados 8 protocolos de extracção, denominados por técnicas 1 a 8, cada um deles foi realizado em triplicado (n=3). As diferenças entre eles incidiram nos passos de lavagem e eluição, como resumido na tabela 8. Os restantes passos do procedimento de extracção foram iguais entre os protocolos, sendo que o acondicionamento foi estabelecido com 4 vezes 250 µL de metanol, seguido de 4 vezes 250 µL de água. A amostra foi aspirada 12 vezes num volume de 250 µL, e a reutilização da coluna foi feita com 3 vezes 250 µL da solução de eluição. Após a eluição, foram adicionados 25µL de PI e o eluato foi evaporado sobre corrente contínua de azoto. Posteriormente o resíduo seco foi ressuscitado em 65 µL de metanol que foram transferidos para um vial e analisados no sistema cromatográfico.

Tabela 8: Resumo das diferentes soluções de lavagem e eluição utilizadas nas 8 técnicas de MEPS.

	Lavagem	Eluição
<i>Técnica 1</i>	150 µL 2-propanol (8%) em ác. Fórmico (2%) em H ₂ O	100 µL metanol:acetoneitrilo (7:3)
<i>Técnica 2</i>	150 µL 2-propanol (8%) em ác. Fórmico (2%) em H ₂ O	100 µL metanol (100%)
<i>Técnica 3</i>	150 µL 2-propanol (8%) em ác. Fórmico (2%) em H ₂ O	100 µL acetoneitrilo (100%)
<i>Técnica 4</i>	150 µL ác. Fórmico (0,1%) em 2-propanol (5%) em H ₂ O	100 µL metanol (100%)
<i>Técnica 5</i>	150 µL ác. Fórmico (0,1%) em 2-propanol (5%) em H ₂ O	100 µL NH ₄ OH (0.1%) em metanol
<i>Técnica 6</i>	150 µL ác. Fórmico (0,1%) em 2-propanol (5%) em H ₂ O	100 µL NH ₄ OH (0.1%) em MeOH:ACN (5:5)
<i>Técnica 7</i>	150 µL ác. Fórmico (0,1%) em 2-propanol (5%) em H ₂ O	100 µL ACN (100%)
<i>Técnica 8</i>	150 µL ác. Fórmico (0,1%) em 2-propanol (5%) em H ₂ O	100 µL MeOH:ACN (7:3)

Para a interpretação dos resultados foi tida em conta a razão entre a área absoluta obtida e a área do PI (para cada composto foi apenas usada a transição quantitativa). Na figura 11 estão representados os resultados obtidos em forma de gráficos de barras.

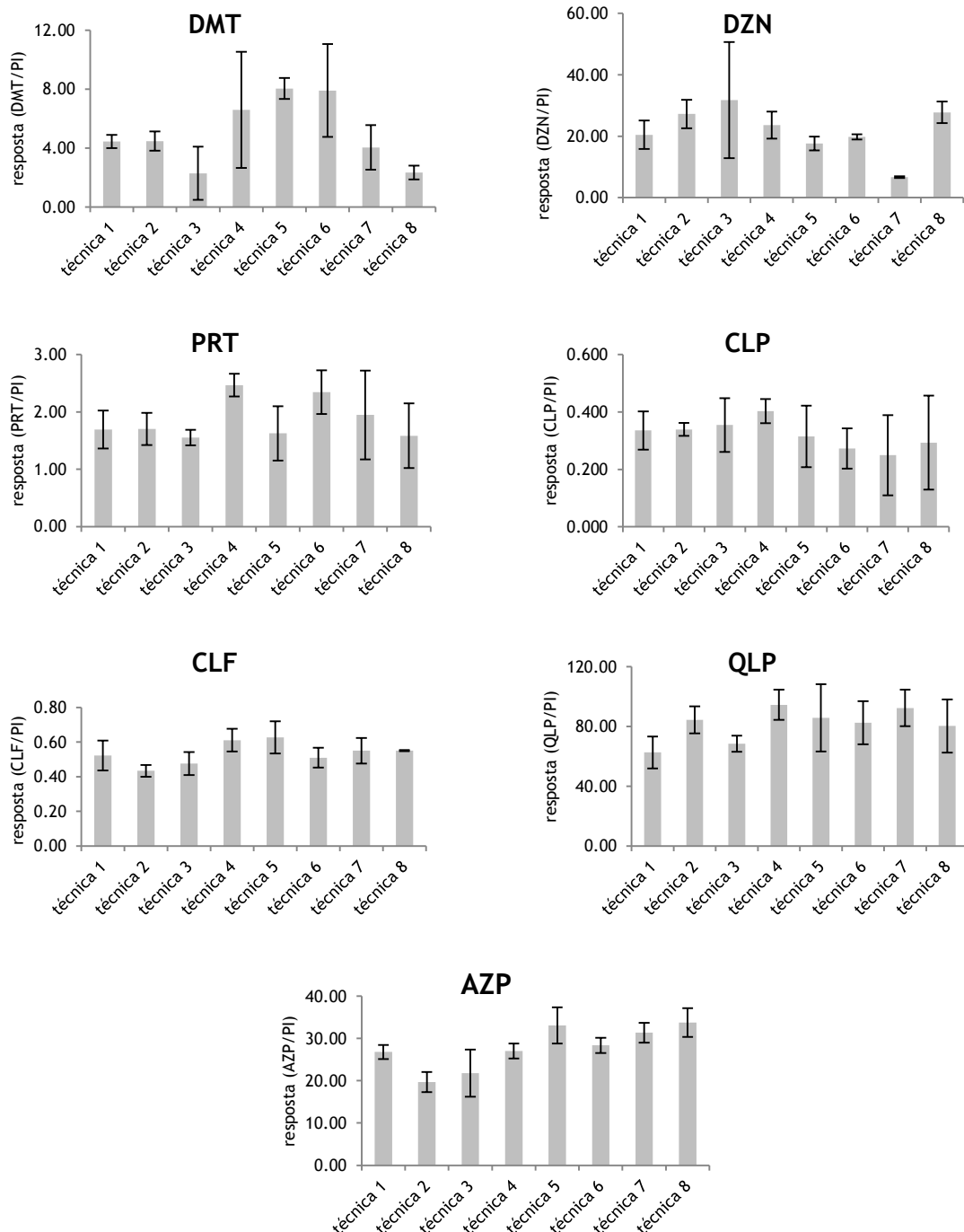


Figura 10: Resultados obtidos para cada composto das 8 técnicas de MEPS realizadas em triplicado (n=3). Os resultados são expressos pela média da razão da área do composto e do PI, e as barras de erro que correspondem ao desvio padrão.

Pela análise dos gráficos anteriores podemos verificar que não foi possível seleccionar uma técnica que seja óptima para todos os compostos em simultâneo, pelo que foi necessário chegar a uma solução de compromisso. A selecção de uma técnica extractiva a otimizar tem que ter em conta, não só o compromisso necessário para uma recuperação de todos os compostos em estudo, mas também deve reflectir outras premissas que apontem para uma maior necessidade de recuperação de um determinado composto em detrimento de outros.

Deste modo, pela análise individual de cada composto, foi possível verificar que para o DMT, PRT e CLP apenas uma técnica se destaca das restantes, a técnica 5 para o DMT e a técnica 4 para os outros dois. Contudo, para os outros compostos é mais difícil fazer essa selecção dado que, na maioria das situações, é possível destacar pelo menos duas das oito técnicas. Assim, temos que as melhores técnicas para o DZN foram a 2 e 8, para o CLF a 4 e 5, para o QLP as técnicas 4 e 7, e para o AZP a 5 e 8. De forma a confirmar estas conclusões retiradas de forma empírica, os resultados obtidos foram avaliados por análise estatística (anexo I), com recurso ao ANOVA, F-teste e *t*-teste, através do programa Excel[®], na qual as 8 técnicas foram comparadas entre si.

Para simplificar a apresentação, e conseqüente interpretação de resultados, em anexo apenas são apresentados os resultados considerados relevantes para as conclusões finais, e os parâmetros usados para as conclusões encontram-se destacados.

O uso do ANOVA permite verificar se existe diferença entre um conjunto de populações [85]. Para tal, foi assumido que para o valor $p > 0.05$ não existe significância estatística, isto é, não existe diferença estatisticamente significativa que justifique o uso de uma técnica em particular. Para quatro dos compostos, DZN, PRT, CLP e QLP, é isso que se verifica (anexo I: A-D), verificou-se que, não existe significância estatística entre as técnicas.

Por sua vez, para os restantes compostos verificou-se que existe diferença estatística entre as técnicas, dado que $p < 0,05$. Por esse motivo foram utilizados o F-teste e o *t*-teste para avaliar e comparar as técnicas entre si. O primeiro, F-teste, serve para estudar a variância entre duas populações, informação crucial para a aplicação do *t*-teste, que permite comparar a média entre populações. O uso destes dois testes permite analisar as técnicas, duas a duas, e verificar quais apresentam diferença estatística que fundamente a escolha de uma preferencialmente em relação à outra [85]. Foi novamente assumido que só existe significância estatística quando $p < 0,05$.

No caso do DMT foram excluídas as técnicas 3, 4 e 6 uma vez que apresentavam um desvio padrão elevado. Por comparação das restantes técnicas, verificou-se que técnica 5 se destaca das restantes, apresentando diferença estatística em comparação com todas as outras (anexo I: E.1-4). Por esse motivo, a técnica 5 foi considerada a mais adequada para o DMT.

Para o CLF só se verificou diferença estatística para a técnica 2 quando comparada com as técnicas 4, 5 e 8 (anexo I: F.1-3). A técnica 2 foi excluída uma vez que esta apresentava resultados piores em relação às outras. Por outro lado, comparando as técnicas

com maior resposta, a 4 e 5, foi possível verificar que não existe diferença estatística entre elas pelo que, qualquer uma destas pode ser usada (anexo I: F.4).

Para o AZP, a análise estatística provou que as melhores técnicas são a 5 e 8, uma vez que existe diferença estatística entre estas e as restantes (anexo I: G.1-7). Contudo, não existe diferença estatística entre estas duas técnicas, portanto, podemos afirmar que, qualquer uma delas pode ser usada (anexo I: G.1-8).

Tendo em consideração os resultados a técnica 4 foi a técnica seleccionada a utilizar no decurso deste estudo, uma vez que é a técnica que apresenta melhores resultados para a maioria dos compostos (PRT, CLP, CLF e QLP). Contudo, no caso do DMT, e apesar de inicialmente a técnica 4 ter sido excluída por ter desvio padrão muito elevado, quando comparada com a técnica 5 (a técnica que apresenta melhores resultados para este composto) verificamos que não existe diferença estatística (anexo I:E.5). Assim, o uso da técnica 4 para o DMT não irá comprometer os resultados finais. Por sua vez, para o AZP o mesmo não sucede. Foi confirmado que existe diferença estatística entre a técnica 4 e as técnicas 5 e 8 (anexo I: F.6-7). Contudo, este é o único composto, dos 7 em estudo, em que realmente se justifica o uso de outra técnica que não a 4. Deste modo, e tendo em consideração o conjunto dos resultados, a técnica 4 foi escolhida como protocolo de extracção MEPS para todos os compostos em estudo.

2.2.2. Desenho Experimental

O desenho experimental (DOE, do inglês *Design of Experiments*) é uma ferramenta estatística usada com o intuito de otimizar um protocolo experimental, pois permite estudar a influência de um ou vários factores (ou variáveis) numa resposta. Assim, de uma forma simples, é possível estudar o efeito de factores controlados, minimizando simultaneamente, o efeito de factores não-controláveis [85-87]. Quando comparado com outras abordagens/métodos, como por exemplo *one-factor-at-time*, o DOE tem ainda as vantagens de diminuir o número de experiências necessárias, de estudar vários factores em simultâneo e de avaliar a existência de interacções entre factores [85-87]. Deste modo, o DOE surge como uma alternativa poderosa que permite economizar tempo e recursos, tendo em conta que, particularmente a optimização é um passo dispendioso no desenvolvimento do método analítico [85-88,79].

Para este trabalho optou-se por utilizar um desenho factorial completo (2^k), isto é combinações de 2 níveis (mínimo e máximo) de k factores [86,87]. De acordo com o descrito na literatura, foram identificados quatro factores capazes de influenciar a resposta: o número de aspirações da amostra, a percentagem de 2-propanol na solução de lavagem, o volume de solução de lavagem e número de aspirações na eluição. Na tabela 9 encontram-se descritos os factores e os níveis seleccionados.

Tabela 9: Planificação do DOE 2⁴ com descrição dos factores e dos níveis nos quais os factores foram variados.

Factores	Pontos factoriais		Ponto intermédio
	Mínimo	Máximo	
A: número de aspirações da amostra	16	26	21
B: volume de lavagem (µL)	50	250	150
C: percentagem de 2-propanol na solução de lavagem	2	10	6
D: número de aspirações na eluição	1	7	4

Com recurso ao programa *Design Expert* versão Trial 7.1.1 desenhou-se a matriz para o desenho factorial completo 2⁴, na tabela 10 encontram-se resumidos os 19 ensaios realizados, bem como os resultados obtidos em cada um deles. Os ensaios foram efectuados de forma aleatória, com o fim de minimizar erros sistemáticos [85,86]. Foram ainda incluídos replicados de combinações factor-nível iguais (n=3), coincidente com ponto central dos factores (ensaios 7, 13 e 14 destacados na tabela 10) [85,86]. Os resultados são expressos pela razão entre a área absoluta do composto e a área absoluta de PI.

Tabela 10: Matriz DOE 2⁴ e respectivos resultados obtidos para cada composto em estudo.

Std	Run	Bloco	A	B	C	D	Resposta						
							DMT	DZN	PRT	CLP	CLF	QLP	AZP
6	1	1	26	50	10	1	34,63	21,21	2,17	0,43	0,33	51,92	19,12
5	2	1	16	50	10	1	27,78	36,52	1.19	0,27	0,29	43,09	19,07
9	3	1	16	50	2	7	62,74	28,99	1.53	0,23	0,44	58,55	24,85
8	4	1	26	250	10	1	9,60	62,01	2.38	0,56	0,35	50,23	22,47
17	5	1	21	150	6	4	50,66	88,04	2.36	0,59	0,50	71,78	30,04
10	6	1	26	50	2	7	88,32	37,26	1.74	0,32	0,51	68,62	38,43
19	7	1	21	150	6	4	40,09	51,63	2.58	0,58	0,79	93,87	40,91
15	8	1	16	250	10	7	5,22	36,82	1.79	0,46	0,49	71,48	26,84
3	9	1	16	250	2	1	27,91	32,13	1.56	0,40	0,50	69,36	26,42
11	10	1	16	250	2	7	21,05	29,84	1.60	0,30	0,43	71,76	26,46
1	11	1	16	50	2	1	44,01	38,03	1.44	0,36	0,38	67,06	20,78
12	12	1	26	250	2	7	32,94	64,51	2.96	0,65	0,77	116,92	47,14
4	13	1	26	250	2	1	61,33	64,71	2.63	0,72	0,71	111,58	40,99
2	14	1	26	50	2	1	64,47	61,69	2.68	0,64	0,65	112,46	41,18
7	15	1	16	250	10	1	3,42	41,97	1.59	0,34	0,35	73,82	22,39
18	16	1	21	150	6	4	36,68	54,25	2.24	0,60	0,63	101,02	39,12
16	17	1	26	250	10	7	7,24	51,67	2.67	0,55	0,65	116,16	45,54
14	18	1	26	50	10	7	50,54	51,09	2.66	0,58	0,64	111,33	45,68
13	19	1	16	50	10	7	55,43	30,68	1.22	0,39	0,34	63,88	22,55

Std: ordem aleatória; **Run:** ordem dos ensaios; **A:** número de aspirações da amostra; **B:** volume de lavagem (µL); **C:** percentagem de 2-propanol na solução de lavagem; **D:** número de aspirações na eluição

Os gráficos Pareto são uma forma simples, intuitiva e sucinta de apresentar os resultados, onde é possível observar o efeito individual bem como a efeito conjunto (interacções) que os factores têm na resposta. Na figura 11 estão representados os gráficos Pareto obtidos para cada um dos compostos em estudo.

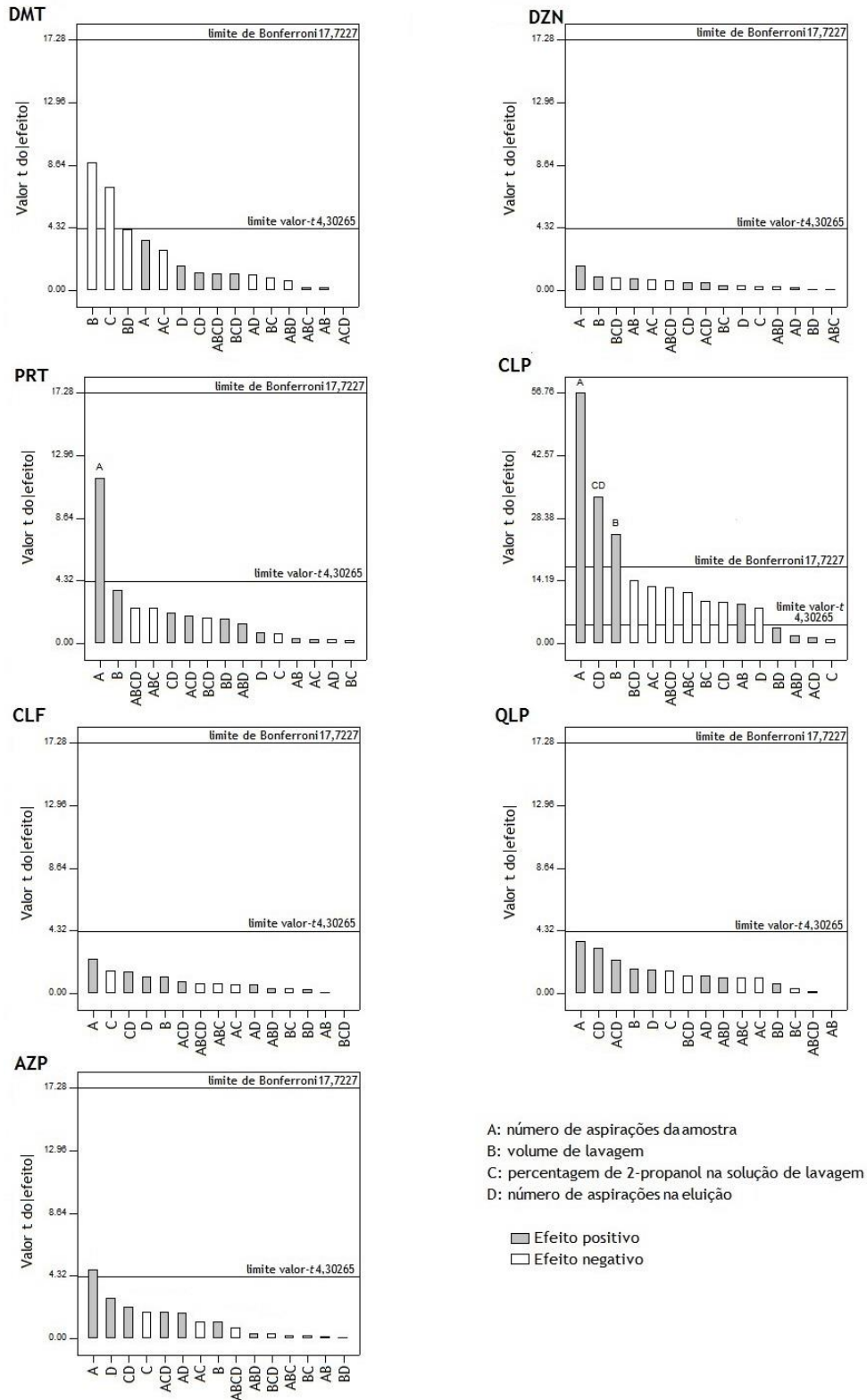


Figura 11: Gráficos Pareto para os sete compostos em estudo obtidos a partir do DOE.

Para interpretação dos resultados, podem ser considerados dois limites distintos, o limite do valor de t e o limite de Bonferroni, ambos determinam quando um factor é ou não relevante. Assim, quando o efeito de determinado factor, ou do conjunto de factores, ultrapassa qualquer um destes limites é indicativo de que esse mesmo factor influencia a resposta.

Pela análise da figura 12, foi possível verificar que para o DMT os factores mais significativos são o volume de lavagem e a percentagem de 2-propanol na solução de lavagem (ambos com efeito negativo). Por sua vez, para o PRT, CLP e AZP, o número de aspirações de amostra foi o factor mais significativo (com efeito positivo). É importante destacar que o CLP foi um caso especial, porque quase todos os factores revelam ter influência na resposta, uma vez que na sua maioria ultrapassam o limite do valor de t . Portanto, e apesar de existirem vários factores que poderão contribuir de forma significativa, o factor volume de lavagem, a interacção entre a percentagem de 2-propanol com o número de aspirações na eluição, bem como o número de aspirações da amostra, ultrapassam o limite de Bonferroni, e foram por isso considerados os mais significativos na resposta (todos os três com efeito positivo). Para os restantes compostos, DZN, CLF e QLP, nenhum factor mostrou ser estatisticamente relevante.

Apesar de com os gráficos Pareto ser possível retirar bastantes informações sobre os resultados é ainda importante conhecer outro tipo de informações, nomeadamente os gráficos do efeito principal e os gráficos de interacção. Em anexo são ainda apresentadas informações complementares a estes gráficos, nos quais se encontram resumidos alguns parâmetros da análise estatística por ANOVA (anexo II: A-G).

Na figura 12, são apresentados os gráficos do efeito principal para cada composto. Neste tipo de gráficos é tido em conta o declive da recta, o qual nos dá informação sobre o tipo de efeito que o factor tem na resposta. Assim, quanto maior o declive, maior será a influência do factor sobre a resposta. Podemos verificar que para todos os compostos o número de aspirações da amostra é, de facto, o factor que mais efeito tem na resposta. Para alguns compostos, existem também outros factores que aparentam influenciar a resposta, como por exemplo o volume de lavagem e percentagem de 2-propanol na solução de lavagem, para o DMT. Estas conclusões são facilmente confirmadas pela informação em anexo (II:A-G), onde é possível verificar que os factores mencionados são os que apresentam $p < 0,05$ e por isso são considerados estatisticamente significativos.

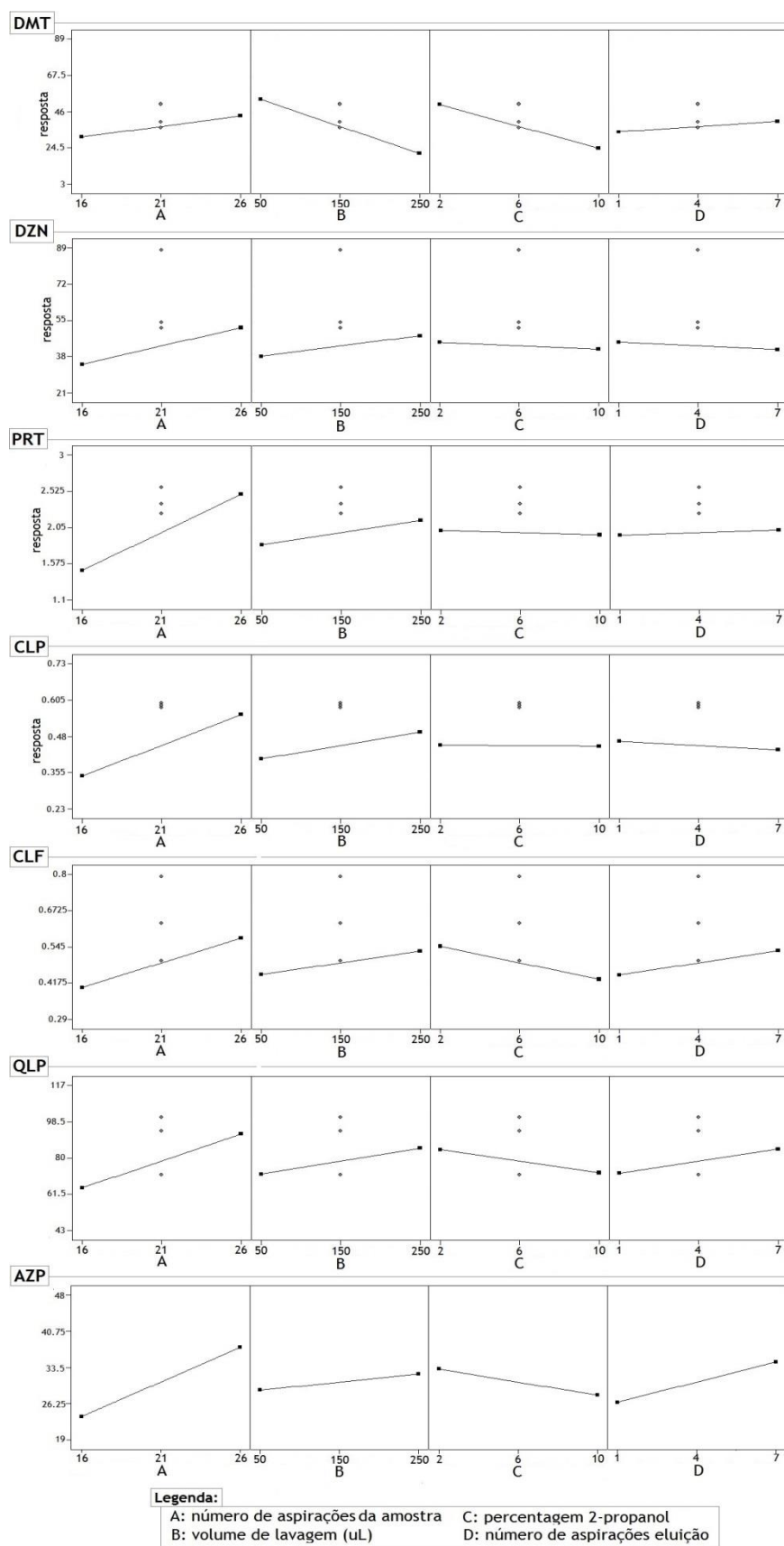


Figura 12: Gráficos do efeito principal que cada um, dos quatro factores, tem na resposta para cada um dos compostos em estudo.

Os gráficos de interação, como o próprio nome sugere, fornecem informação sobre a interação entre os factores, que neste caso é confirmada pelo cruzamento entre as linhas. A partir destes gráficos, apresentados na figura 13, podemos verificar que para a maioria dos compostos apenas ocorre interação entre os factores percentagem de 2-propanol e número de aspirações na eluição. Por sua vez, para o DMT existe também interação entre o número de aspirações da amostra e a percentagem de 2-propanol. Novamente, a informação em anexo, confirma estas mesmas conclusões (anexo II:A-G).

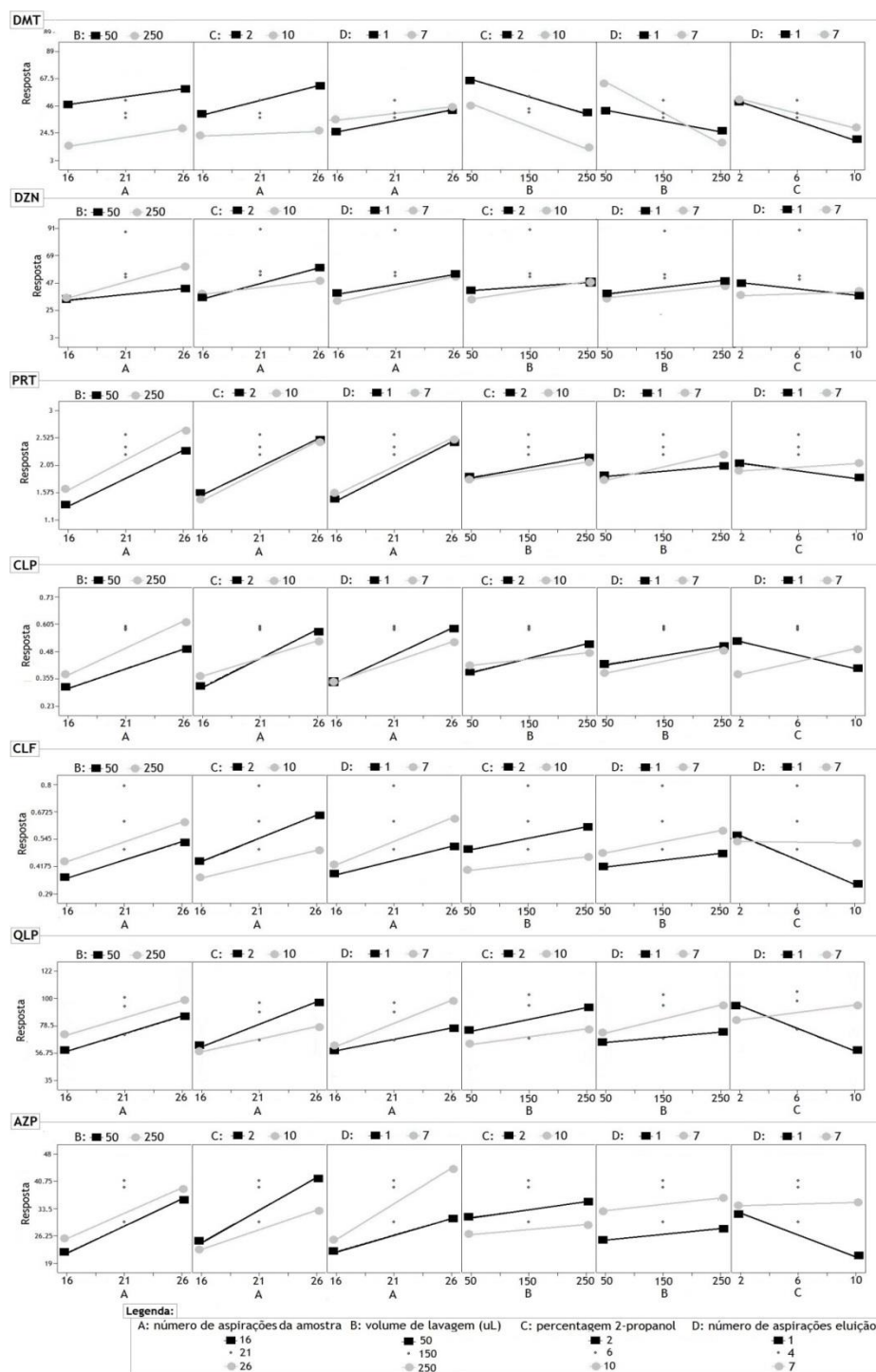


Figura 13: Gráficos de interação para cada composto.

Tendo em conta o conjunto de resultados foi possível concluir que, para a maioria dos compostos, o número de aspirações da amostra é o factor mais significativo, exercendo efeito positivo sobre a resposta. Foi ainda possível verificar que existem algumas interacções entre factores, nomeadamente no caso do CLP e também do DMT.

Contudo e apesar de todas as informações recolhidas a partir do DOE, é importante notar que os níveis (máximos e mínimos) usados podem ser uma condicionante do próprio método, por serem muito próximos ou muito afastados, o que em ambas as situações pode conduzir a conclusões erradas [85,86]. De facto, a escolha dos factores a variar, bem como dos níveis, é um passo crucial para obter resultados adequados a partir do DOE, mas por vezes é difícil prever se os níveis definidos compreendem a zona óptima desejada. Por esse motivo, nestas situações é muitas vezes realizado um segundo passo de optimização, no qual são frequentemente utilizados desenhos onde em vez de dois níveis são usados três níveis, de modo a assegurar que o espaço experimental é estudado em toda a sua dimensão [85-87].

2.2.2.1. Superfície de Resposta

A superfície de resposta (SR) permite caracterizar e definir a relação existente entre a resposta e os factores em estudo [85,86]. É útil, quando no DOE, é verificada a existência de interacções entre factores, pois permite obter um modelo matemático (equação) que representa a resposta obtida em função dos factores [85-88]. Deste modo, para além das interacções entre factores ser avaliada, é ainda possível investigar os máximos e mínimos do modelo matemático e por isso alcançar as condições óptimas desejadas [85-87].

Uma vez mais, recorreu-se ao programa *Design Expert* para desenhar a matriz para a SR, para tal foi utilizado o *central composite design* (CCD) [85,86]. Os factores estudados foram iguais aos anteriormente utilizados no DOE, apenas os níveis foram alterados (tabela 11). Optou-se por aumentar o número de aspirações da amostra, uma vez que os resultados anteriores indicavam que existia uma tendência para o aumento da resposta com o aumento do número de aspirações da amostra. A matriz obtida encontra-se resumida na tabela 12, bem como os resultados obtidos em cada um dos ensaios. Dado que seria impossível realizar os 30 ensaios todos no mesmo dia, estes foram divididos em dois blocos, onde cada bloco corresponde a um dia de análise. Os ensaios foram realizados novamente de forma aleatória, e foram também incluídos replicados (n=6) distribuídos pelos blocos e correspondentes aos pontos centrais (ensaios 2, 9, 17, 18, 27 e 28).

Tabela 11: Planificação da superfície de resposta.

Factores	Pontos factoriais		Ponto intermédio	Pontos <i>Star</i>	
	máximo	mínimo		máximo	mínimo
A: número de aspirações da amostra	18	30	24	12	36
B: volume de lavagem (μL)	50	150	100	0	100
C: percentagem de 2-propanol na solução de lavagem	3	9	6	0	12
D: número de aspirações eluição	3	7	5	1	9

Tabela 12: Matriz do CCD, com indicação dos ensaios realizados e resultados obtidos para cada composto em estudo.

Std	Run	Bloco	A	B	C	D	Resposta						
							DMT	DZN	PRT	CLP	CLF	QLP	AZP
13	1	2	24	0	6	5	143,42	34,79	2,88	0,49	0,65	86,55	45,86
30	2	2	24	100	6	5	41,00	34,84	3,15	0,35	0,69	92,26	46,54
28	3	2	24	100	6	9	51,00	38,60	3,77	0,45	0,72	98,80	38,10
27	4	2	24	100	6	1	26,91	20,90	2,98	0,32	0,59	84,53	39,19
26	5	2	24	100	12	5	9,07	26,37	2,26	0,34	0,37	69,78	21,02
21	6	2	12	100	6	5	20,67	10,88	1,46	0,22	0,29	50,95	15,43
25	7	2	24	100	0	5	123,18	40,24	3,74	0,42	0,62	95,05	45,34
24	8	2	24	200	6	5	26,32	35,17	3,88	0,52	0,71	111,57	50,15
29	9	2	24	100	6	5	45,59	37,50	3,71	0,45	0,67	110,48	48,19
22	10	2	36	100	6	5	57,53	51,65	5,11	0,58	0,88	132,43	57,39
3	11	1	18	150	3	3	87,58	33,11	3,64	0,36	0,69	85,22	58,50
11	12	1	18	150	3	7	97,16	34,99	3,83	0,43	0,80	92,39	57,58
8	13	1	30	150	9	3	37,16	41,72	4,55	0,46	0,87	111,90	61,96
15	14	1	18	150	9	7	38,29	29,97	3,32	0,32	0,62	63,64	33,01
4	15	1	30	150	3	3	104,96	44,24	4,84	0,59	0,94	121,80	63,63
13	16	1	18	50	9	7	71,73	30,21	3,44	0,42	0,62	90,59	45,93
17	17	1	24	100	6	5	63,37	48,20	4,94	0,65	0,89	122,95	61,98
18	18	1	24	100	6	5	56,95	38,17	4,27	0,57	0,77	115,34	58,36
5	19	1	18	50	9	3	70,46	37,20	3,66	0,50	0,68	100,22	45,84
2	20	1	30	50	3	3	128,54	48,73	5,83	0,71	1,04	149,49	71,40
7	21	1	18	150	9	3	23,24	36,14	4,05	0,39	0,67	101,85	28,36
6	22	1	30	50	9	3	75,32	50,65	5,09	0,67	0,83	103,84	63,24
9	23	1	18	50	3	7	180,63	28,58	4,37	0,39	0,52	79,34	48,24
14	24	1	30	50	9	7	120,44	58,18	4,58	0,56	0,94	147,44	38,00
1	25	1	18	50	3	3	180,17	21,11	2,71	0,10	0,66	96,37	21,95
10	26	1	30	50	3	7	113,36	25,24	3,90	0,33	0,98	144,47	67,35
20	27	1	24	100	6	5	110,46	22,63	3,31	0,28	0,92	118,77	38,72
19	28	1	24	100	6	5	47,08	30,29	4,73	0,35	0,69	115,76	52,64
16	29	1	30	150	9	7	41,73	47,58	5,72	0,65	0,94	132,33	37,00
12	30	1	30	150	3	7	78,12	26,04	3,63	0,30	0,88	129,91	38,06

Std: ordem aleatória; Run: ordem dos ensaios; A: número de aspirações da amostra; B: volume de lavagem (μL); C: percentagem de 2-propanol na solução de lavagem; D: número de aspirações na eluição

Como referido anteriormente, a SR permite obter um modelo matemático e com este é possível obter as condições ótimas. Para averiguar qual o melhor modelo que representa cada uma das respostas, foram tidos em consideração dados da análise estatística nomeadamente o valor de p ($<0,05$ é considerado que o modelo é estatisticamente significativo), o coeficiente de determinação (R^2), o R^2 ajustável e ainda o R^2 preditivo (todos os três devem ser o mais próximos de 1, e o R^2 ajustável e R^2 preditivo devem ser próximos um do outro) [85-87]. Assim, para os compostos DZN, PRT, CLP foi escolhido o modelo linear e para os restantes (DMT, CLF, QLP, AZP) foi escolhido o modelo quadrático, por serem considerados os modelos que melhor representavam as respostas em questão (anexo III). Em anexo encontram-se apresentadas as respectivas equações adoptadas para cada composto, bem como os parâmetros descritos (valor p , R^2 , R^2 ajustável e R^2 preditivo).

A partir do modelo matemático é possível obter uma representação gráfica que, dependendo do modelo adoptado, pode assumir várias formas [86]. Os *contour plots* são uma representação alternativa a este tipo de gráficos, onde uma série de linhas, ou curvas, identificam os valores dos factores para os quais a resposta é constante, no centro dessas linhas encontra-se a zona óptima desejada [85,86]. Na figura 14 estão representados os *contour plots* obtidos, e de onde é possível verificar que a zona óptima não foi alcançada em nenhuma das situações, sendo que em alguns casos esta está bem distante da zona experimental definida (linhas paralelas verticais ou horizontais).

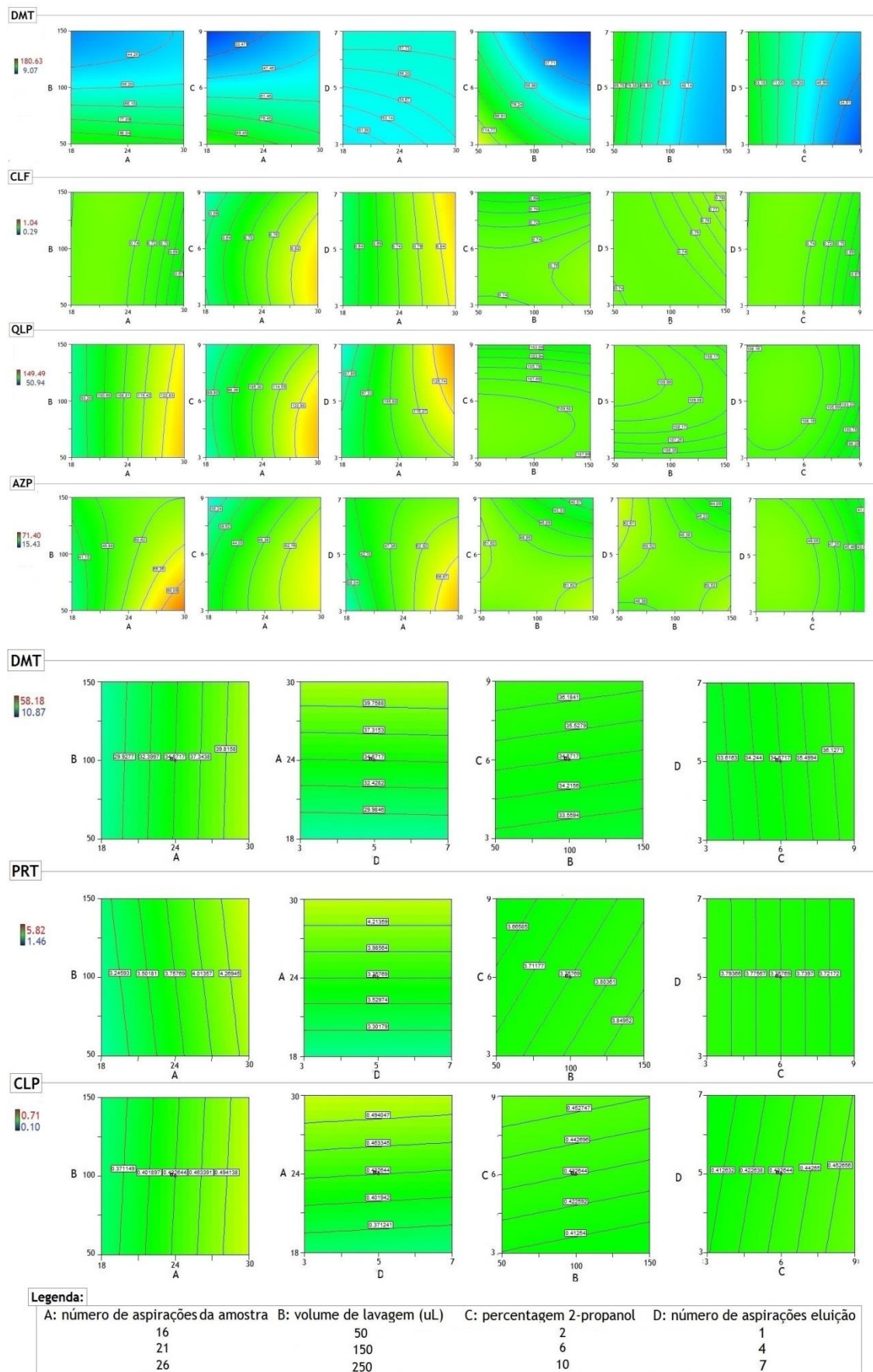


Figura 14: Gráficos *Counter* obtidos do CCD para cada um dos compostos em estudo.

Ainda assim, os modelos obtidos foram usados para estimar as condições óptimas para a técnica de extracção. Para tal, recorreu-se de novo ao programa *Design Expert*, e as condições óptimas estimadas foram as seguintes:

- 36 aspirações da amostra
- 25 µL de solução de lavagem
- 1,5% de 2-propanol na solução de lavagem
- 4,4 aspirações de eluição

Dado a redundância do valor obtido para o número de aspirações de eluição, este factor foi convertido em volume, ou seja, 440 µL (dado que 100 µL correspondem a 1 aspiração de eluição). O volume de lavagem foi fixo em 25 µL, apesar de nas condições óptimas estimadas indicarem que este passo não era necessário. Contudo, tendo em conta que o passo de lavagem antes da eluição é aconselhável para eliminar possíveis interferentes, que possam ficar também retidos na coluna, foi decidido utilizar o menor volume possível [77-79].

Estas mesmas condições foram reproduzidas no laboratório em quadruplicado (n=4), e os resultados obtidos encontram-se resumidos na tabela 13. O erro relativo médio ou BIAS (%) foi usado para conhecer a inexactidão do método, isto é, a proximidade entre a resposta predita e a resposta obtida experimentalmente.

Tabela 13: Comparação entre a resposta predita e obtida para cada composto. As condições óptimas foram feitas em n=4.

Composto	Resposta predita	Valor obtido (média ± dp)	BIAS (%)
DMT	142,16	19,00 ± 3,28	-86,64
DZN	46,92	18,24 ± 5,86	-61,12
PRT	5,08	4,92 ± 0,26	-3,24
CLP	0,58	0,27 ± 0,03	-53,18
CLF	1,05	0,73 ± 0,11	-30,16
QLP	149,49	57,02 ± 2,51	-61,86
AZP	68,86	29,46 ± 20,12	-57,22

dp: desvio padrão

Os resultados na tabela 13 demonstram que a resposta obtida, na maioria das situações, é distante da resposta predita, apenas para o PRT existe proximidade entre os dois valores, sendo que os BIAS são na maioria bastante elevados e sempre inferiores ao predito (os valores são todos negativos). Apesar de, para cada modelo matemático escolhido o valor de p ser estatisticamente significativo, de um modo geral, os R^2 obtidos são demasiado baixos (anexo III). Tal é indicativo de que o modelo não representa adequadamente a resposta, e por esse motivo quando aplicadas as condições óptimas estimadas a partir dos modelos matemáticos a resposta obtida é distante do esperado. Para além disso, é importante ter em atenção que as condições óptimas foram estimadas para maximizar simultaneamente a resposta para os sete compostos, assim uns podem influenciar a resposta de outros e fazer com que as condições ideais se desviem dos modelos de cada composto.

Tendo em conta os resultados obtidos, e dado que a zona óptima não foi atingida, procedeu-se ainda a um último passo de optimização da técnica de extracção. Anteriormente no DOE, foi verificado que o número de aspirações da amostra é o factor que mais influência tem na resposta, contudo os níveis em que este factor foi estudado podem ter condicionado os resultados. Assim, e de modo a averiguar se de facto o número de aspirações da amostra usado foi suficiente, optou-se ainda por realizar um estudo univariado do número de aspirações da amostra.

2.2.2.2. Avaliação de Forma Univariada do Número de Aspirações da Amostra

De forma a completar o estudo da optimização do processo extractivo, o estudo de forma univariada do número de aspirações da amostra, foi realizado em cinco níveis (26, 36, 40, 50 e 60), e os restantes factores foram mantidos constantes (condições iguais às condições óptimas estimadas a partir da SR). Foram realizados ensaios em triplicado (n=3) e os resultados obtidos, expressos pela razão entre a área absoluta do composto e a área absoluta obtida de PI, encontram-se representados na figura 15.

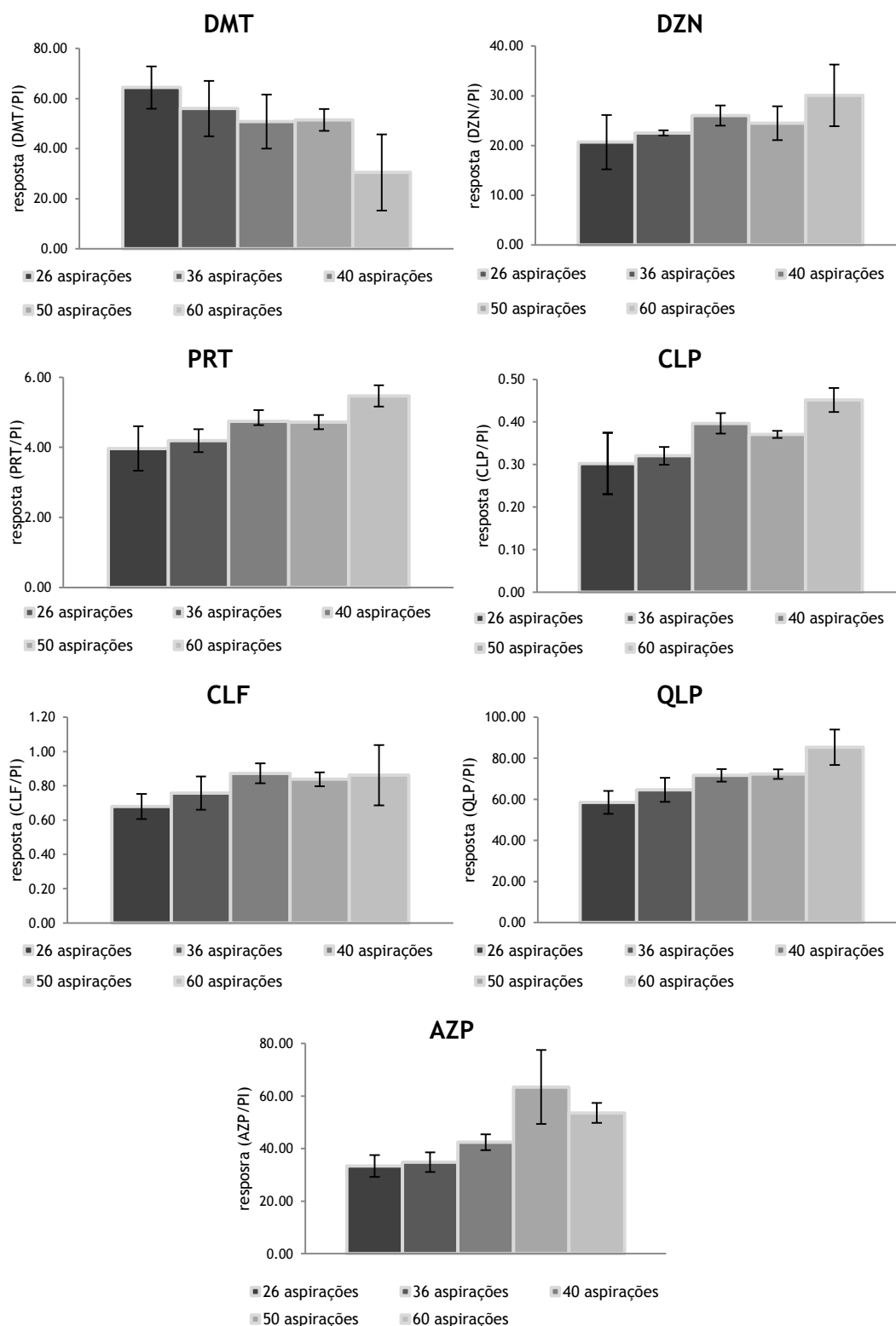


Figura 15: Resultados obtidos da avaliação de forma univariada do número de aspirações (26, 36, 40, 50 e 60). Os resultados são expressos pela razão área absoluta do composto pela área absoluta PI. As barras correspondem à média dos ensaios (n=3) e o erro é representado pelo desvio padrão.

Com excepção para o DMT, seria vantajoso que o número de aspirações da amostra fosse superior a 36 (pelo menos 50 ou 60 aspirações). Contudo, na prática um número elevado de aspirações torna o procedimento de MEPS demasiado moroso e exaustivo. Ainda assim, usou-se a análise estatística para fazer a comparação entre 36 e 40 aspirações. Foi possível confirmar que para o CLP e PRT existe significância estatística, sendo que com 40 aspirações os resultados são significativamente melhores (anexo IV:A-G). Deste modo, foi decidido aumentar o número de aspirações para 40, de modo a assegurar o melhor rendimento da técnica de extracção. Tendo em conta estes resultados, e aqueles obtidos na etapa do DOE, apresentam-se na tabela 14 as condições finais do método extractivo a serem usadas durante o processo de validação.

Tabela 14: Procedimento final (otimizado) de MEPS.

Acondicionamento	4 x 250 µL metanol 4 x 250 µL água
Número de aspirações da amostra	40 x 150 µL
Lavagem	1 x 25 µL de solução de 2-propanol (1,5%) em ácido fórmico (0,1%) em água
Volume de eluição	440 µL metanol

2.2.3. Pré-Tratamento da Amostras: Processo de Precipitação

Como referido anteriormente, o sangue é uma matriz biológica de elevada complexidade. Por esse motivo, antes de se iniciar o procedimento de MEPS foi realizado um pré-tratamento da amostra, que consistiu na precipitação de proteínas com ACN. A precipitação permite a remoção de proteínas, e outros elementos que ficam retidos nos aglomerados formados. Este pré-tratamento reduz de forma significativa a viscosidade da matriz, que no caso particular da MEPS facilita o passo de aspiração de amostra.

Com base na literatura, o ACN congelado pode ser usado para precipitar proteínas em sangue [40,52]. Dado que o ACN é um solvente orgânico forte para o qual os compostos podem ter afinidade, procedeu-se ainda a um pequeno passo de optimização da precipitação de modo a assegurar que a adição deste não iria influenciar negativamente os resultados.

Foram comparados entre si dois ensaios distintos, cada um dos ensaios foi realizado em triplicado (figura16):

- 100 µL de sangue, fortificados com os compostos e PI, foram precipitados com 600 µL de ACN. A mistura foi centrifugada durante 15 minutos a 4500 rpm. O conteúdo dos tubos foi transferido para outro tubo aos quais foram adicionados tampão acetato (diluição de 1:30).

- 100 µL de sangue, fortificados com os compostos e PI, foram precipitados com 600 µL de ACN. A mistura foi centrifugada durante 15 minutos a 4500 rpm. O ACN foi evaporado

sob corrente contínua de azoto e após evaporação, foram adicionados aos tubos tampão acetato (diluição de 1:30).

Apesar da análise estatística não mostrar significância estatística entre os ensaios (anexo IV:A-G), optou-se por efectuar a evaporação do ACN já que no caso do DMT e QLP se obtiveram resultados inferiores na presença de ACN (diminuição da eficiência da extracção) (figura 16). Tal poderá ocorrer devido à afinidade que estes compostos têm pelo ACN, diminuindo a afinidade com o sorbente de extracção.

Deste modo, o pré-tratamento das amostras foi estabelecido com as seguintes condições: 100 μ L de sangue, fortificados com PI, foram precipitados com 600 μ L de ACN. A mistura foi centrifugada durante 15 minutos a 4500 rpm. O ACN foi evaporado sob corrente contínua de azoto e após evaporação, foi adicionado tampão acetato (diluição de 1:30).

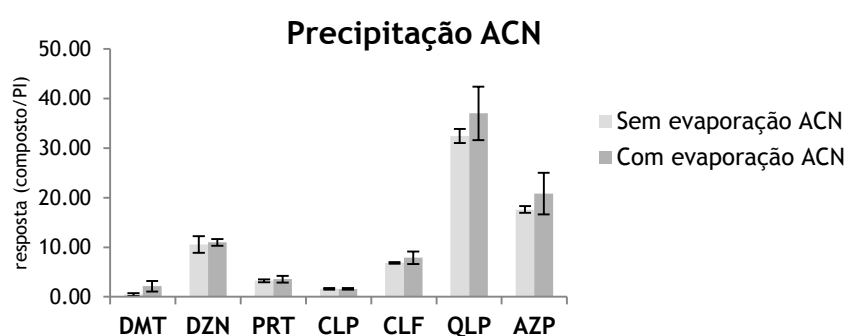


Figura 16: Resultados obtidos, para cada composto, do processo de precipitação. Os resultados são expressos pela razão área absoluta do composto pela área absoluta PI. As barras correspondem à média dos ensaios (n=3) e o erro é representado pelo desvio padrão.

2.3. Validação

A validação é um processo fundamental no desenvolvimento de um método analítico pois garante a reprodutibilidade e fidelidade do método, e por isso assegura a veracidade dos resultados. Existem disponíveis várias *guidelines*, nas quais são descritos diferentes parâmetros, que podem e devem ser adoptados, para a validação do método analítico. Apesar de muitos dos parâmetros definidos em cada uma dessas *guidelines* ser coincidente, existem também algumas divergências e até alguma falta de consenso em alguns aspectos [89,90]. Por esse motivo, é importante reter a ideia de que não existe nenhum protocolo de validação ideal e a escolha dos parâmetros a validar deve ser feita de acordo com o método e a aplicabilidade do mesmo [89-92]

Para este trabalho foram tidas em consideração as *guidelines* da *Food and Drugs Administration* (FDA) e da *International Conference on Harmonisation* (ICH), e os parâmetros validados foram os seguintes:

- selectividade;
- linearidade / curva de calibração;
- limites de detecção e quantificação;
- precisão e exactidão (inter- e intra- dia);
- estabilidade;
- recuperação;
- arrastamento (ou *carry-over*);

2.3.1. Selectividade

Existem, na matriz biológica, diversos elementos que podem interferir no método analítico, como por exemplo, elementos da própria matriz, metabolitos, produtos de degradação, xenobióticos, entre outros [89,91,92]. A selectividade representa a capacidade de um método analítico medir e diferenciar inequivocamente um composto de outros elementos presentes na matriz biológica. Este é um parâmetro de extrema importância pois garante a ausência de interferentes, que possam induzir a resultados falsos, não desejáveis [89,91,92].

Para além de se avaliar a existência de alguma interferência endógena, é importante monitorizar as intensidades relativas de cada composto e por isso existe a necessidade de se estabelecer quais os critérios de aceitação admitidos para as abundâncias relativas dos seus sinais iónicos. A abundância relativa de um ião diagnóstico, expressa como percentagem da intensidade do pico base, é determinada por integração da área do pico cromatográfico seleccionado normalizada ao pico base [93]. A tabela 15 descreve as janelas máximas de tolerância permitidas para as abundâncias relativas dos iões monitorizados de forma a garantir uma confiança adequada na sua identificação.

Tabela 15: Janelas máximas de tolerância permitidas para as abundâncias relativas dos iões monitorizados [93].

Abundância relativa (% do pico base)	Janela máxima de tolerância permitida
> 50%	± 10% (intervalo absoluto)
25% a 50%	± 20% (intervalo relativo)
5% a <25%	± 5% (intervalo absoluto)
<5%	± 50% (intervalo relativo)

A razão entre a magnitude da resposta do instrumento para o íão de diagnóstico menos intenso e a magnitude da resposta ao ruído da linha base (razão sinal/ruído) deve ser superior a 3:1 [96].

Os critérios de confirmação qualitativa podem incluir ainda a avaliação do tempo de retenção relativo do composto (TrR), onde o tempo de retenção do pico de interesse é medido relativamente ao tempo de retenção de um composto de referência cromatográfica (PI). O TrR do composto em análise não deve diferir mais de $\pm 1\%$ daquele do PI [93].

Assim e de acordo com a FDA, foram analisados diferentes *pools* de amostras branco, num número total de 6. Na figura 17 encontra-se um exemplo de um cromatograma de uma amostra branco, e na figura 18 encontra-se o cromatograma de uma amostra fortificada com os compostos em estudo à concentração de 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (excepto o DMT 150 $\mu\text{g}/\text{mL}$) e o PI a 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Podemos verificar, e tendo em conta os critérios acima descritos, que em nenhuma das transições, quer quantitativas quer qualitativas, existem interferentes aos tempos de retenção dos compostos, pelo que podemos afirmar que o método é selectivo para os compostos em estudo.

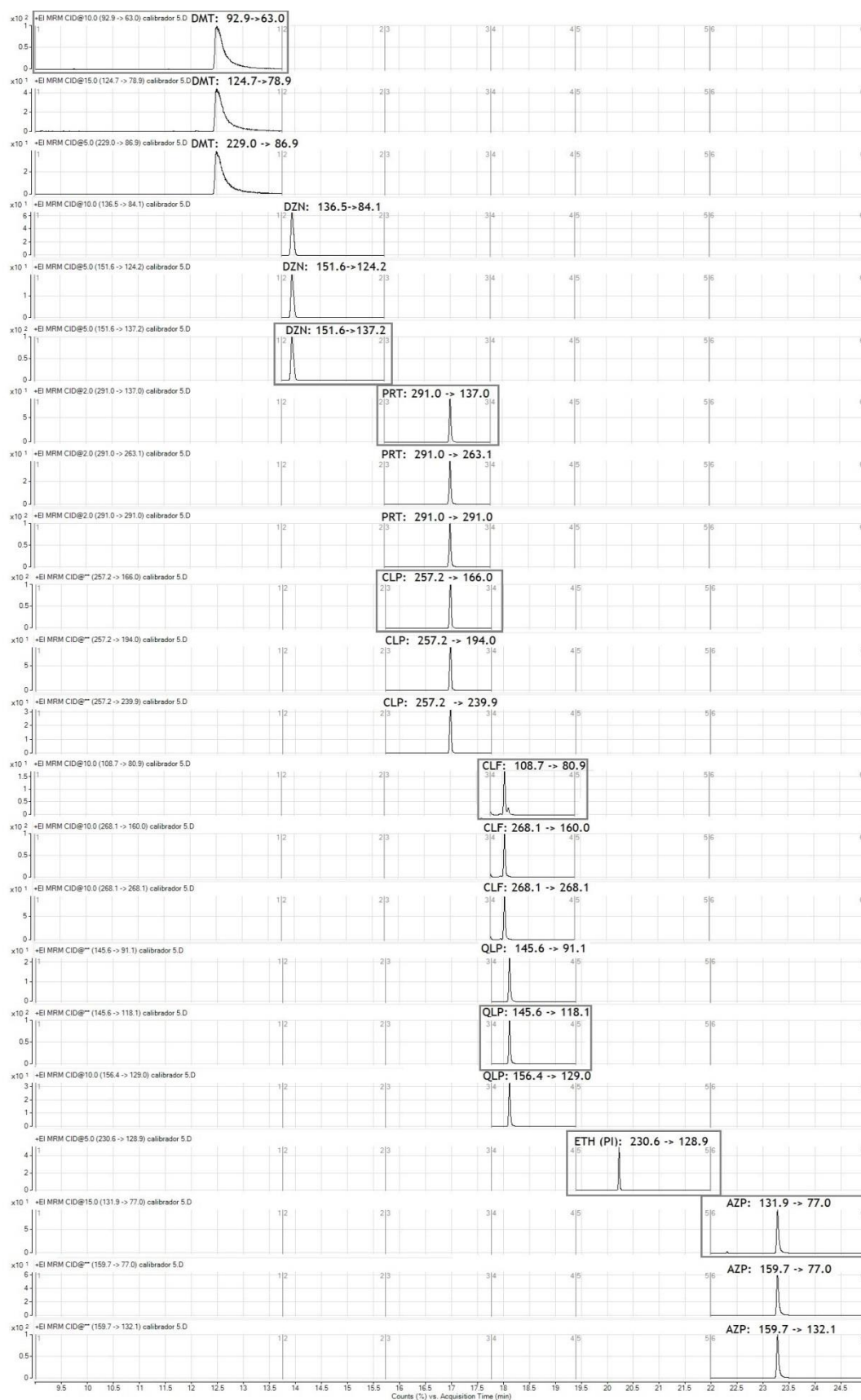


Figura 18: Cromatograma obtido da análise de uma amostra branco fortificada com os compostos em estudo, à concentração de 20 µg/mL (excepto o DMT 150 µg/mL) e o PI à concentração de 10 µg/mL.

2.3.2. Curva de Calibração

A linearidade, ou curva de calibração, representa a relação entre a resposta obtida e a concentração do composto [89-92]. O intervalo de linearidade, cuidadosamente escolhido, deve abranger a gama de concentração esperada em amostras reais [89,91,92]. Para estudar a linearidade, são usados calibradores de concentração conhecida, preparados por fortificação de amostras branco. Devem ser usados entre 5-8 calibradores, uniformemente distribuídos entre si, e cada curva deve incluir o LLOQ (do inglês, *lower limit of quantification*) definido para o método [91,92]. Em conjunto com a curva devem ainda ser analisados um branco (matriz biológica processada sem a presença do composto) e um zero (matriz biológica processada fortificada com PI mas sem a presença do composto) [91].

Para avaliar a linearidade deve ser escolhido o método mais simples e que melhor represente a relação resposta-concentração [91,92]. Assim, é muitas vezes utilizada a regressão linear simples, que assume a existência de linearidade entre as duas variáveis e pode ser escrita na seguinte expressão matemática [85]:

$$y = mx + b \quad (2)$$

onde as variáveis y e x correspondem à resposta obtida e à concentração do composto, respectivamente, e m e b são o declive e a ordenada na origem da recta obtida. Esta expressão é frequentemente denominada por curva ou recta de calibração.

No presente trabalho, e com excepção do AZP, a linearidade foi obtida no intervalo de 0,5-50 $\mu\text{g/mL}$ e com recurso a sete calibradores: 0,5; 2,5; 5; 15; 20; 40 e 50 $\mu\text{g/mL}$. Para o AZP linearidade foi estabelecida no intervalo de 2,5-50 $\mu\text{g/mL}$ e foram usados apenas seis calibradores 2,5; 5; 15; 20; 40 e 50 $\mu\text{g/mL}$. Apesar de a linearidade ser um parâmetro obrigatório para ambas as *guidelines* não existe consenso em relação ao número de replicados que deve ser efetuado [89,91,92]. Para este trabalho foram feitos replicados de 5, realizados em dias diferentes.

Por vezes o modelo linear não é o mais indicado, uma vez que só se aplica quando a variância dos resultados é constante em todo o intervalo de calibração, isto é, quando existe homocedasticidade nos resultados. Contudo, isso raramente acontece, principalmente, quando os intervalos de calibração são largos, como é frequente em toxicologia analítica [85,89]. Nestas situações, diz-se que existe heterocedasticidade dos resultados (variâncias heterógenas entre o calibrador mais baixo e mais alto). Por isso, é recomendado o uso de transformações matemáticas ou factores de ponderação que permitam uma melhor aproximação entre o modelo e os resultados obtidos [85,89].

Deste modo, para cada composto, foi obtido o modelo linear e a este foram aplicados seis factores de ponderação diferentes $\left(\frac{1}{x}, \frac{1}{x^2}, \frac{1}{y}, \frac{1}{y^2}, \frac{1}{\sqrt{x}}, \frac{1}{\sqrt{y}}\right)$. Os resultados obtidos foram comparados entre si, e para cada composto foi seleccionado o modelo que melhor

representava os resultados. O valor do coeficiente de determinação (R^2) é uma forma de averiguar se o modelo escolhido representa de forma correcta os resultados obtidos. Isto é, valores de R^2 próximos de 1 indicam que os resultados se adaptam ao modelo. Por sua vez, este valor por si só pode levar a interpretações erradas. Assim, é também importante ter em atenção outros parâmetros como o erro percentual (ER) e os BIAS. Deste modo, os critérios usados para a selecção do melhor modelo, para cada composto, foram o R^2 , o ER e ainda o BIAS (anexo V). Na tabela 16 encontram-se sumariadas as informações e resultados referentes à linearidade para cada composto.

Tabela 16: Intervalo de linearidade estabelecido para cada composto, bem como a respectiva recta e factor de ponderação aplicado.

	Factor de ponderação	Intervalo de linearidade ($\mu\text{g/mL}$)	Equação da recta		R^2 (média \pm ds)	LLOQ ($\mu\text{g/mL}$)
			m (média \pm dp)	b (média \pm dp)		
DZN	$1/x^2$	0,5 - 50	$2,52 \pm 0,08$	$-0,22 \pm 0,43$	$0,995 \pm 0,002$	0,5
PRT	$1/y$	0,5 - 50	$0,83 \pm 0,03$	$-0,31 \pm 0,03$	$0,998 \pm 0,001$	0,5
CLP	$1/y$	0,5 - 50	$0,55 \pm 0,02$	$-0,07 \pm 0,03$	$0,997 \pm 0,001$	0,5
CLF	$1/y$	0,5 - 50	$1,53 \pm 0,10$	$-0,53 \pm 0,07$	$0,997 \pm 0,001$	0,5
QLP	$1/y^2$	0,5 - 50	$5,86 \pm 0,15$	$-0,71 \pm 0,39$	$0,997 \pm 0,001$	0,5
AZP	$1/x$	2,5 - 50	$2,23 \pm 0,09$	$-3,30 \pm 0,88$	$0,995 \pm 0,003$	2,5

m: declive; b: ordenada na origem; R^2 : coeficiente de determinação; LLOQ: Limite inferior de quantificação (do inglês, *Lower Limit of quantification*); dp: desvio padrão

Foram obtidos R^2 acima de 0,99 para todos os analitos. A concentração calculada para cada calibrador também se encontrou dentro do intervalo de BIAS de ± 15 da concentração nominal excepto no LLOQ em que os valores se enquadram dentro do intervalo de $\pm 20\%$.

De forma a completar o estudo da linearidade, foram analisadas diariamente controlos de qualidade (QC), em triplicado, e a três concentrações diferentes: baixa (1 $\mu\text{g/mL}$), média (10 $\mu\text{g/mL}$) e alta (30 $\mu\text{g/mL}$). Para o AZP apenas foram usados dois QC às concentrações 10 $\mu\text{g/mL}$ e 30 $\mu\text{g/mL}$.

2.3.3. Limites de Detecção e Quantificação

O limite inferior de quantificação corresponde à quantidade mínima que o método analítico é capaz de quantificar, com precisão e exactidão adequados, isto é, coeficientes de variação (CV) inferiores a 20 % e BIAS ± 20 % [89,92]. A resposta do analito no LLOQ deve ser pelo menos 5 vezes superior ao sinal obtido da amostra branca.

No presente trabalho, foi estabelecido que o LLOQ corresponde ao calibrador mais baixo, ou seja, 0,5 $\mu\text{g/mL}$ para todos os compostos excepto para o AZP que foi de 2,5 $\mu\text{g/mL}$ (tabela 17). Tendo em conta outros trabalhos descritos na literatura o LLOQ determinado para cada composto é considerado satisfatório [30-34,36,56].

Tabela 17: Limites de quantificação de cada um dos compostos de estudo (n=5).

Composto	LLOQ (µg/mL)	Concentração calculada (média ± dp) (µg/mL)	CV (%)	BIAS (%)
DNZ	0,5	0,50 ± 0,01	1,04	-0,72
PRT	0,5	0,56 ± 0,02	3,72	12,19
CLP	0,5	0,47 ± 0,02	4,56	-6,97
CLF	0,5	0,59 ± 0,03	5,40	17,79
QLP	0,5	0,50 ± 0,00	0,45	0,12
AZP	2,5	2,72 ± 0,16	5,79	8,85

dp: desvio padrão

Por sua vez, o limite de detecção (LOD, do inglês *limit of detection*) é definido como a quantidade mínima detectada, mas não necessariamente quantificável [89,92]. Este parâmetro não foi avaliado de forma exaustiva, e foi admitido que o LOD foi igual ao LOQ, excepto para o DMT que o valor obtido foi de 40 µg/mL, após análise de 6 *pools* de amostra fortificada (CV 10,5%).

Foi considerada esta premissa tendo em atenção que, geralmente, casos de intoxicação aguda por POF conduzem à morte dos indivíduos, e por isso são esperados encontrar em amostras reais concentrações elevadas. Assim, e tendo em conta o LOQ definido para cada um dos compostos em estudo, considerou-se este valor como adequado para o LOD.

2.3.4. Precisão e Exactidão

A precisão descreve a proximidade entre resultados obtidos de uma série de análises de múltiplas alíquotas retiradas da mesma amostra biológica [89,91,92]. É expressa na forma de percentagem como o coeficiente de variação, e é calculada de acordo com a seguinte expressão:

$$CV(\%) = \frac{\text{Desvio padrão}}{\text{Média}} \times 100 \quad (3)$$

Por sua vez, a exactidão reflecte a proximidade entre o valor obtido pelo método analítico e o valor real presente na amostra [89,91,92]. É usualmente designada por BIAS e é calculada como a percentagem de desvio do valor real, de acordo com a seguinte expressão:

$$BIAS (\%) = \frac{\text{Valor calculado} - \text{Valor real}}{\text{Valor real}} \times 100 \quad (4)$$

Para avaliar ambos os parâmetros, são geralmente usados 3 níveis de concentração diferentes, dentro do intervalo de linearidade e que inclua o LLOQ. Para cada nível devem ser

realizadas 5 determinações [91]. O CV bem como a BIAS não devem exceder os 15% para todos os valores, excepto no LLOQ que pode ser de 20% [89,91,92].

A precisão pode ser ainda dividida em precisão intra-dia, inter-dia [91]. A primeira avalia a precisão do método sob as mesmas condições durante um curto período de tempo (mesmo dia), e pode também ser vista como a medida da repetibilidade do método. A precisão inter-dia (ou precisão intermédia ou reprodutibilidade¹) avalia a precisão em função do tempo e pode envolver diferentes analistas, dias, equipamentos e laboratórios [89,91,92].

2.3.4.1. Precisão intra-dia

No presente trabalho, para avaliar a precisão intra-dia, foram usados 3 níveis de concentração: 0,5; 15 e 50 µg/mL para todos os compostos em estudo, excepto para o AZP onde foram usados as concentrações de 2,5; 15 e 50 µg/mL. Foram realizados ensaios em sextuplicado (n=6), sendo que cada nível foi analisado em dias diferentes. Os resultados obtidos encontram-se resumidos na tabela 18. O CV e BIAS foram calculados de acordo com as expressões (3) e (4), obtendo-se um CV inferior a 10% e BIAS de ±20%, para a concentração mais baixa e de ±15% para as restantes concentrações.

¹ * De acordo com a ICH a precisão intermédia (ou precisão inter-dia) representa a precisão em função de algumas variáveis como analista, equipamento e dias (num espaço de tempo mais alargado). Por outro lado, a precisão entre laboratórios é definida como a reprodutibilidade [92].

Tabela 18: Precisão e exactidão intra-dia (n=6).

	Concentração nominal ($\mu\text{g/mL}$)	Concentração calculada (média \pm dp) ($\mu\text{g/mL}$)	CV (%)	BIAS (%)
DZN	0,5	0,55 \pm 0,05	9,39	10,77
	15	16,45 \pm 1,62	10,04	9,69
	50	51,38 \pm 5,18	10,08	2,76
PRT	0,5	0,59 \pm 0,03	4,32	17,89
	15	15,18 \pm 0,45	2,97	1,18
	50	52,46 \pm 3,26	6,25	4,91
CLP	0,5	0,58 \pm 0,05	8,49	16,22
	15	16,60 \pm 1,67	10,06	10,68
	50	51,69 \pm 5,21	10,08	3,38
CLF	0,5	0,60 \pm 0,02	3,10	19,74
	15	15,82 \pm 0,45	2,83	5,46
	50	51,53 \pm 1,24	2,40	3,06
QLP	0,5	0,51 \pm 0,05	8,83	2,26
	15	16,44 \pm 0,49	2,95	9,61
	50	55,23 \pm 4,52	8,18	10,46
AZP	2,5	2,37 \pm 0,14	6,11	-5,14
	15	16,81 \pm 1,71	10,16	12,06
	50	57,42 \pm 3,34	5,83	14,85

dp: desvio padrão

2.3.4.2. Precisão inter-dia

A precisão inter-dia foi avaliada, com excepção para o AZP, em sete níveis de concentração, repetidos durante cinco dias diferentes (n=5). Os níveis de concentração são equivalentes aos calibradores usados para a recta, e correspondem aos valores de: 0,5; 2,5; 5; 15; 20; 40 e 50 $\mu\text{g/mL}$. Para o AZP foram apenas usados seis níveis correspondentes às concentrações: 2,5; 5; 15; 20; 40 e 50 $\mu\text{g/mL}$.

De forma semelhante à precisão intra-dia, foram calculados os valores de CV e BIAS, e os valores obtidos encontram-se resumidos na tabela 19. Podemos verificar que novamente todos os valores estão dentro do aceitável e recomendado pelas *guidelines*, sendo que os CV foram inferiores a 10 % e os BIAS situam-se no intervalo de $\pm 15\%$.

Tabela 19: Precisão e exactidão inter-dia (n=5).

	Concentração nominal ($\mu\text{g/mL}$)	Concentração calculada (média \pm dp) ($\mu\text{g/mL}$)	CV (%)	BIAS (%)
DZN	0,5	0,50 \pm 0,01	1,04	-0,72
	2.5	2,64 \pm 0,16	6,04	5,61
	5	4,73 \pm 0,47	10,02	-5,40
	15	15,88 \pm 0,75	4,72	5,86
	20	19,99 \pm 0,97	4,87	-0,05
	40	38,99 \pm 1,98	5,07	-2,52
	50	48,61 \pm 1,69	3,47	-2,78
PRT	0,5	0,56 \pm 0,02	3,72	12,19
	2.5	2,13 \pm 0,03	1,60	-14,65
	5	4,34 \pm 0,24	5,54	-13,18
	15	15,47 \pm 0,45	2,93	3,12
	20	20,06 \pm 0,27	1,35	0,29
	40	40,60 \pm 0,70	1,73	1,49
	50	50,12 \pm 0,91	1,82	0,25
CLP	0,5	0,47 \pm 0,02	4,56	-6,97
	2.5	2,65 \pm 0,09	3,58	5,81
	5	4,88 \pm 0,38	7,70	-2,31
	15	16,54 \pm 0,40	2,40	10,27
	20	20,68 \pm 0,87	4,19	3,42
	40	39,66 \pm 0,67	1,69	-0,84
	50	48,44 \pm 1,00	2,06	-3,12
CLF	0,5	0,59 \pm 0,03	5,40	17,79
	2.5	2,14 \pm 0,04	2,01	-14,34
	5	4,32 \pm 0,32	7,41	-13,55
	15	15,22 \pm 0,51	3,33	1,48
	20	19,51 \pm 0,78	4,00	-2,47
	40	40,03 \pm 0,47	1,18	0,08
	50	51,55 \pm 0,69	1,34	3,10
QLP	0,5	0,50 \pm 0,00	0,45	0,12
	2.5	2,51 \pm 0,06	2,58	0,58
	5	4,84 \pm 0,21	4,36	-3,25
	15	16,21 \pm 0,60	3,68	8,10
	20	20,23 \pm 1,03	5,09	1,14
	40	39,41 \pm 0,76	1,93	-1,48
	50	48,75 \pm 0,83	1,71	-2,51
AZP	2,5	2,72 \pm 0,16	5,79	8,85
	5	4,73 \pm 0,29	6,17	-5,42
	15	15,54 \pm 0,65	4,15	3,62
	20	18,11 \pm 0,61	3,39	-9,47
	40	39,24 \pm 1,14	2,90	-1,90
	50	52,16 \pm 0,90	1,72	4,32

dp: desvio padrão

Em todos os casos, precisão (intra- e inter-dia) e exactidão, os valores obtidos estão dentro das gamas de valores definidos como aceitáveis pela FDA [91].

2.3.5. Estabilidade

A FDA define que a estabilidade de um composto numa matriz biológica depende das condições de armazenamento, propriedades químicas do composto e da própria matriz [91]. Deste modo o estudo da estabilidade de um composto numa matriz biológica torna-se essencial durante o passo de validação. As condições em que a amostra é manipulada e armazenada em situações de rotina devem ser mimetizadas de modo a avaliar se a integridade do composto é garantida durante todo o processo [91].

Para este trabalho foram avaliadas a estabilidade em amostras processadas, a estabilidade de ciclos de congelação/descongelação e a estabilidade de curta-duração (FDA). Em cada uma das situações, as amostras sujeitas às condições de estudo foram comparadas com amostras, fortificadas com compostos e PI, preparadas de fresco e analisadas no próprio dia. Todos os ensaios foram realizados em triplicado (n=3). O critério usado para avaliar a estabilidade dos compostos teve por base os valores de CV e BIAS obtidos.

2.3.5.1. Estabilidade das Amostras Processadas

Para avaliar a estabilidade em amostras processadas foram usados três níveis de concentração: 1; 10 e 30 µg/mL para todos os compostos, excepto para o AZP onde foram apenas usadas dois níveis de concentração: 10 e 30 µg/mL. As amostras foram processadas, isto é, sujeitas ao processo de extracção e posteriormente foram deixadas no injector durante 24 horas. Passado esse período foi feita a análise cromatográfica e os resultados obtidos encontram-se sumariados na tabela 20.

Tabela 20: Estabilidade de amostras processadas (n=3).

	Concentração nominal ($\mu\text{g/mL}$)	Concentração calculada (média \pm dp) ($\mu\text{g/mL}$)	CV (%)	BIAS (%)
DZN	1	1,09 \pm 0,07	9,27	11,83
	10	10,56 \pm 0,33	2,26	11,49
	30	28,17 \pm 2,36	8,65	-13,56
PRT	1	0,74 \pm 0,23	7,95	11,56
	10	11,55 \pm 0,89	5,96	11,56
	30	32,60 \pm 6,92	5,82	-12,21
CLP	1	1,02 \pm 0,05	3,72	3,84
	10	10,28 \pm 1,03	0,20	12,04
	30	28,95 \pm 2,66	5,49	-11,03
CLF	1	1,80 \pm 0,08	13,78	-10,19
	10	10,86 \pm 0,47	1,20	9,49
	30	31,17 \pm 1,25	2,79	-5,32
QLP	1	1,05 \pm 0,06	4,63	5,62
	10	10,59 \pm 0,56	5,01	7,85
	30	29,57 \pm 1,62	5,01	-10,62
AZP	10	11,07 \pm 0,61	5,38	7,91
	30	31,29 \pm 0,14	0,44	-3,51

dp: desvio padrão

Os resultados obtidos mostram que os compostos são estáveis após extracção durante pelo menos 24 horas, dado que os valores de CV obtidos foram sempre inferiores a 15%, bem como o BIAS. A estabilidade de amostras processadas é relevante em situações quando, por algum motivo, é necessário a repetição (re-injeção) da análise cromatográfica.

2.3.5.2. Estabilidade de Curta Duração

Para a estabilidade de curta duração as amostras, fortificadas com os compostos, foram deixadas à temperatura ambiente durante 24 horas, após esse período foi adicionado PI e foi realizada a extracção das amostras pelo protocolo anteriormente descrito. Com excepção do AZP, foram usados três níveis de concentração: 1, 10 e 30 $\mu\text{g/mL}$, para o AZP foram usados dois níveis: 10 e 30 $\mu\text{g/mL}$. Os resultados encontram-se resumidos na tabela 21. Os CV obtidos foram inferiores a 15 % e os BIAS situaram-se num intervalo de $\pm 15\%$. Estes resultados mostram que os compostos são estáveis na matriz biológica durante um período de 24 horas à temperatura ambiente

Tabela 21: Estabilidade de curta-duração (n=3).

	Concentração nominal ($\mu\text{g/mL}$)	Concentração calculada (média \pm dp) ($\mu\text{g/mL}$)	CV (%)	BIAS (%)
DZN	1	0,81 \pm 0,22	13,58	-11,26
	10	11,36 \pm 0,64	0,94	12,77
	30	27,76 \pm 2,95	10,66	-14,89
PRT	1	1,08 \pm 0,10	15,79	6,85
	10	10,62 \pm 0,93	2,38	7,90
	30	31,03 \pm 0,97	2,91	-3,41
CLP	1	1,06 \pm 0,23	13,93	6,91
	10	11,71 \pm 0,49	3,10	15,38
	30	29,82 \pm 0,90	2,93	-5,5
CLF	1	1,22 \pm 0,15	16,67	12,57
	10	12,58 \pm 1,11	10,97	15,74
	30	32,47 \pm 0,77	2,18	6,20
QLP	1	1,10 \pm 0,34	12,57	7,99
	10	13,40 \pm 1,32	12,64	11,41
	30	29,68 \pm 0,62	1,98	-2,79
AZP	10	10,76 \pm 0,90	9,40	8,32
	30	28,83 \pm 0,79	2,61	-12,25

dp: desvio padrão

2.3.5.3. Estabilidade Ciclos de Congelação-Descongelação

A estabilidade em ciclos de congelação-descongelação é relevante porque, em situações de rotina, as amostras são muitas vezes congeladas antes de serem analisadas. Pode até acontecer, que uma mesma amostra seja descongelada várias vezes para serem efetuadas e repetidas várias análises,

Deste modo, a estabilidade em ciclos de congelação-descongelação foi efectuada a partir de amostras fortificadas com os compostos, que foram sujeitas a ciclos de congelação (por um período nunca inferior a 24 horas) e descongelação (pelo menos 1 hora), num total de 3 ciclos. Após o terceiro ciclo as amostras foram fortificadas com PI e sujeitas ao processo de extracção anteriormente descrito e posterior análise cromatográfica. Os resultados obtidos encontram-se resumidos na tabela 22.

Tabela 22: Estabilidade a ciclos de congelação-descongelação (n=3).

	Concentração nominal (µg/mL)	Concentração calculada (média ± dp) (µg/mL)	CV (%)	BIAS (%)
DZN	1	0,74 ± 0,38	10,93	-14,87
	10	11,36 ± 1,35	11,54	-9,32
	30	26,53 ± 3,42	9,18	2,99
PRT	1	0,88 ± 0,06	15,38	15,64
	10	10,07 ± 1,20	3,20	-9,91
	30	27,23 ± 5,38	0,88	2,89
CLP	1	0,87 ± 0,07	16,86	11,28
	10	11,87 ± 0,32	4,95	-1,10
	30	23,84 ± 0,59	2,81	5,65
CLF	1	0,56 ± 0,25	9,10	11,23
	10	7,51 ± 1,12	10,25	-15,57
	30	36,80 ± 2,02	3,62	6,20
QLP	1	1,25 ± 0,78	4,67	-9,25
	10	12,89 ± 1,37	2,48	-14,83
	30	26,19 ± 3,63	4,37	-1,62
AZP	10	12,61 ± 1,68	9,32	5,55
	30	25,65 ± 1,77	15,09	12,25

dp: desvio padrão

Os resultados mostram que as amostras são estáveis a pelo menos três ciclos de congelação-descongelação, já que os CV são inferiores ou próximos de 15% e os BIAS situam-se no intervalo de ±15%.

2.3.6. Recuperação

Pela definição da FDA a recuperação corresponde à resposta obtida da extracção de uma amostra fortificada em comparação com a resposta máxima prevista [91]. É portanto, um parâmetro relacionado com a técnica de extracção, e que permite avaliar a eficiência da mesma. Deve ser calculada a três níveis de concentração diferentes (baixo, médio e alto) e os resultados podem ser expressos em forma de percentagem [89,91].

No presente trabalho foram efetuados ensaios em triplicado e os níveis de concentração escolhidos foram de 0,5; 15 e 50 µg/mL para todos os compostos com excepção do AZP que foram usados 2,5; 15 e 50 µg/mL e de 40; 100 e 250 µg/mL para o DMT. A recuperação foi calculada em forma de percentagem de acordo com a seguinte fórmula:

$$\text{Recuperação (\%)} = \frac{\text{Resposta amostra com analito extraído}}{\text{Resposta amostra com analito não extraído}} \times 100 \quad (1)$$

A “Resposta amostra com analito extraído” corresponde ao valor obtido de uma amostra fortificada com os compostos e sujeita ao processo de extracção, enquanto que a

“Resposta amostra com analito não extraído” corresponde à amostra processada e fortificada após extracção (equivalente ao 100% de composto, isto é, resposta máxima prevista). Em todos os ensaios o PI foi adicionado no final de cada extracção, e a resposta corresponde à razão entre área obtida do composto pela área do PI.

Os resultados obtidos encontram-se resumidos na tabela 23. Pelos resultados apresentados e podemos verificar que, com excepção do DMT, a recuperação se situa entre 57-77%, apenas para o DMT não foram conseguidas recuperações elevadas. O passo de optimização foi fundamental para a obtenção destes resultados, mesmo sabendo que as condições óptimas não foram alcançadas. Em relação ao DMT, este composto assumiu, desde o início da optimização, um comportamento distinto dos outros, e talvez por esse motivo, as condições de extracção para este deveriam ser outras, a fim de alcançar valores de recuperação mais elevados.

De qualquer forma, e tendo em conta outros estudos, os resultados obtidos são satisfatórios dado que as recuperações obtidas são equivalentes às reportadas por outros autores, ainda que o volume de amostra utilizado, bem como o volume de solventes orgânicos, é bastante inferior [30-34,37,47,48]. Saliencia-se que não foi possível comparar os resultados obtidos no presente estudo com outros publicados na literatura que utilizem como técnica de extracção a MEPS, uma vez que, até à data, não existe descrito nenhum estudo. Estes resultados reflectem que a MEPS é uma técnica promissora, adequada para isolamento de seis, dos sete POF em estudo, em sangue. Apresenta, ainda como vantagem, em relação a SPE, o facto de ser uma técnica mais amiga do ambiente.

Tabela 23: Recuperação para cada um dos POF nas diferentes gamas de concentração estudadas. Ensaios realizados em triplicado (n=3).

	Recuperação* (%)		
	0,5 µg/mL	15 µg/mL	50 µg/mL
DMT* ¹	3 ± 0,52	3 ± 1,91	3 ± 0,63
DZN	57 ± 19,48	70 ± 8,93	77 ± 6,54
PRT	62 ± 5,67	66 ± 2,44	76 ± 4,51
CLP	64 ± 11,78	59 ± 3,28	68 ± 6,52
CLF	63 ± 5,82	67 ± 2,60	73 ± 4,57
QLP	71 ± 6,24	70 ± 2,37	77 ± 4,29
AZP* ²	61 ± 5,59	60 ± 3,03	68 ± 4,10

*valores expressos como média±desvio padrão

¹ para o DMT foram usadas as concentrações de 40, 100 e 150 µg/mL.

² para o AZP a concentração usada foi de 2,5 µg/mL

2.3.7. Arrastamento ou *Carry-over*

Em MEPS pode ocorrer o fenómeno de arrastamento, ou *carry-over*, e este fenómeno foi também avaliado. Para tal, após a extracção do calibrador mais alto (50 µg/mL), e após o passo de reutilização da coluna de MEPS, com 3 vezes 250 µL de metanol, realizou-se nova eluição com 440 µL de metanol. Este solvente foi evaporado, reconstituído em 65 µL de metanol e uma alíquota de 2 µL foi injectada. Este passo foi repetido em triplicado (n=3), e verificou-se que não existe fenómeno de arrastamento, uma vez que não foram observados picos cromatográficos em nenhuma das transições (quantitativas e qualitativas), aos tempos de retenção de cada composto.

2.4. Análise de Amostras Reais

Uma parte integrante e fundamental do processo de validação é a aplicação do método em amostras reais para detecção e quantificação dos analitos de interesse. Actualmente este método está a ser aplicado às amostras de sangue com suspeita de intoxicação aguda por POF que chegam ao laboratório de Cromatografia do Centro de Investigação em Ciências da Saúde da Universidade da Beira Interior.

III. Conclusão

Neste trabalho foi desenvolvida uma metodologia analítica inovadora para a detecção e quantificação simultânea de sete POF em amostras de sangue total através de MEPS e GC-MS/MS.

Tanto o método de detecção, como a técnica de extracção, foram inicialmente optimizadas, com particular destaque para a técnica de extracção. Na abordagem da optimização da técnica de MEPS foram usadas ferramentas estatísticas, DOE e SR, essenciais para os resultados finais obtidos. O recurso a estas ferramentas permitiu uma gestão laboratorial, de tempo e custos, do qual resultou a maximização dos resultados obtidos.

É importante referir e destacar que este é o primeiro trabalho que usa MEPS para o isolamento de POF em amostras biológicas. Esta é uma técnica inovadora, que utiliza baixos volumes de solventes orgânicos, do qual resulta menor gasto de consumíveis e menores desperdícios laboratoriais (*green methodology*). Consequentemente, estas características fazem de MEPS uma técnica de extracção bastante atractiva do ponto de vista económico e ambiental.

Por comparação com outros trabalhos, é ainda notória a diferença que existe em relação ao volume de amostra utilizado, que no presente trabalho é significativamente inferior aos restantes (apenas 100 µL). Assim, e tendo em conta os valores de recuperação obtidos (57-77%), MEPS mostrou ser eficaz como técnica de extracção para o isolamento de POF de sangue.

O método desenvolvido foi validado de acordo com *guidelines* internacionais, e mostrou ser linear na gama de 0,5-50 µg/mL (excepto para o AZP que foi de 2,5-50 µg/mL), com coeficientes de determinação superiores a 0,99 e com precisão e exactidão adequados. Os limites de quantificação alcançados (na ordem dos µg/mL) permitem uma avaliação quantitativa e qualitativa dos POF em amostras reais. No caso do DMT o método desenvolvido permite apenas a sua detecção, possibilitando assim uma análise qualitativa.

A determinação de POF em amostras biológicas assume um interesse relevante tendo em conta o panorama nacional. Deste modo, o método aqui apresentado é passível de ser aplicado em análises de rotina devido à sua fácil execução e também ao baixo custo.

IV. Referências Bibliográficas

- [1] Kala M., Pesticides in Moffat A.C in Moffat A.C., Osselton M.D., Widdop B., editores. Clarke's Analysis of drugs and poisons, 4^o edição, 2011, pp. 258-287
- [2] Costa L.G., Toxic effects of pesticides in Klaassen, C.D., editor. Casarett and Doull's Toxicology. The basic Science of poisons, 7^o edição, 2008, pp. 883-930
- [3] Maroni M., Colosio C., Ferioli A., Fait A., Biological monitoring of pesticides exposure : Chapter 1: Toxicology, 143, 2000, pp. 5-118
- [4] Costa L.G., Current issues in organofosfate toxicology, Clinica Chimica Acta, 366, 2006, pp. 1-13
- [5] Bagjar J., Complex view on poisoning with nerve agents and organophosphates, Acta Medica, 48 (1), 2005, pp. 3-21
- [6] Balali-Mood M., Balali-Mood K., Neurotoxic disorders of organophosphorus compounds and their managements, Archive of Iranian Medicine, 11 (1), 2008, pp. 65-89
- [7] Balali-Mood M., Balali-Mood K., Moodi M., Balali-Mood B., Health aspects of organophosphorous pesticides in Asian countries, Iranian Journal of Public Health, 41 (10), 2012, pp. 1-14
- [8] Sultatos L. G., Mammalian toxicology of organophosphorus pesticides, Journal of Toxicology and Environmental Health: Current Issues, 43 (3), 1994, pp. 271-289
- [9] Mileson B. E, Chambers J.E., Chen W.L., Dettbarn W., Ehrich M., Eldefrawi A.T., Gaylor D.W., Hamemik K., Hodgson E., Karczmar A.G., Padilla S., Pope C. N., Richardson R.J., Saunders D.R., Sheets L.P., Sultatos L.G., Wallace K.B., Common mechanism of toxicity: A case study of organophosphorus pesticides, The Toxicological Sciences, 41, 1998, pp. 8-20
- [10] Vale J.A., Toxicokinetic and toxicodynamic aspects of organophosphorus (OP) insecticide poisoning, Toxicology Letters, 102-103, 1998, pp. 649-652
- [11] Kumar S.V., Fareedullah M.D., Sudakar Y., Venkateswrlu B., Kumar E. A., Current review on organophosphorus poisoning, Archives oh Applied Science Research, 2(4), 2010, pp. 199-205

[12] Buratti F.M., Volpe M.T., Meneguz A., Vittozi L., Testai E., CYP-specific bioactivation of four organophosphorothioate pesticides by human liver microsomes, *Toxicology and Applied Pharmacology*, 186, 2003, pp. 143-154

[13] Mutch E., Williams F.M., Diazinon, clorpyrifos and parathion are metabolised by multiple cytochromes P450 in human liver, *Toxicology*, 224, 2006, pp. 22-32

[14] Eyer F., Roberts D.M., Buckley N.A., Eddleston M., Thiermann H., Worek F., Eyer P., Extreme variability in formation of chlorpyrifos oxon (CPO) in patients poisoned by chlorpyrifos (CPF), *Biochemical Pharmacology*, 78, 2009, pp. 531-537

[15] Kappers W.A., Edwards R.J., Murray S., Boobis A.R., Diazinon is activated by CYP2C19 in human liver, *Toxicology and Applied Pharmacology*, 177, 2001, pp. 68-76

[16] Leoni C., Balduzzi M., Buratti F.M., Testai E., The contribution of human small intestine to clorpyrifos biotransformation, *Toxicology Letters*, 215, 2012, pp. 42-48

[17] Purves D., Augustine G.J., Fitzpatrick D., Hall W.C., Lamantia A.S., McNamara J.O., Williams S.M., "Neuroscience", Sinauer Associates, 3^o edição, 2004, pp. 119-126.

[18] Pope C.N., Organophosphorus pesticides: do they all have the same mechanism of toxicity, *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part B: Critical Reviews*, 2, 2010, pp. 161-181

[19] Paudyal, B.P., Organophosphorus Poisoning, *Journal of Nepal Medical Association*, 47 (8), 2008, pp. 251-172

[20] Hoffmann U., Papendorf T., Organophosphate poisonings with parathion and dimethoate, *Intensive Care Medicine*, 32, 2006, pp. 464-468

[21] Li B., Ricordel I., Schopfer L.M., Baud F., Mégarbane B., Masson P., Lockridge O., Dichlorvos, chlorpyrifos oxon and aldicarb adducts of butyrylcholinesterase, detected by mass spectrometry in human plasma following deliberate overdose, *Journal of Applied Toxicology*, 30, 2010, pp. 559-565

[22] Eddleston M., Eyer P., Worek F., Mohamed F., Senarathna L., von Meyer L., Juszczak E., Hittarage A., Azhar S., Dissanayake W., Sheriff M.H. R., Szinicz L., Dawson A.H., Buckley N.A., Differences between organophosphorus insecticides in human self-poisoning: a prospective cohort study, *The Lancet*, 366, 2005, pp. 1452-1459

- [23] Eddleston M., Eyer P., Worek F., Sheriff M.H. R Buckley N.A., Predicting outcome using butyrylcholinesterase activity in organophosphorus pesticide self-poisoning, *QJM: An International Journal of Medicine*, 101, 2008, pp. 467-474
- [24] Ohta H., Mori M., Nakajima H., Kanamori T., A case of suicide by ingestion of completely decomposed pesticide diazinon, *Journal of the Canadian Society of Forensic Science*, 39 (3), 2006, pp. 141-151
- [25] Sungurtekin H., Gürses E., Balci C., Evaluation of several clinical scoring tools in organophosphate poisoned patients, *Clinical Toxicology*, 44, 2006, pp. 121-126
- [26] Rosenstock L., Keifer M., Daniell W.E., McConnell R., Claypoole K., Chronic central nervous system effects of acute organophosphate pesticide intoxication, *The Lancet*, 338, 1991, pp. 223-227
- [27] Bertias G.K., Katonis P., Tzanakakis G., Tsatsakis A.M., Review of clinical and toxicological features of acute pesticide poisonings in Crete (Greece) during the period 1991-2001, *Medical Science Monitor*, 10 (8), 2004, pp. 622-627
- [28] Makwava Prakash V., Odedara Ram V., Shah Harsh D., Acute organophosphorus poisoning and clinical admission score association among patients admitted in emergency ward of a tertiary teaching hospital of medical college, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Sciences*, 17 (08) 2012, pp. 1-5
- [29] Srivastava A., Peshin S.S., Kaleekal T., Gupta S.K., An epidemiological study of poisoning cases reported to the National Poisons Information Centre, all India Institute of Medical Sciences, New Delhi, *Human & Experimental Toxicology*, 24, 2005, pp. 279-285
- [30] Gallardo E., Aplicación de sistemas de extracción sin disolventes para la determinación de pesticidas organofosforados en material de interés médico-legal, in Tese de Doutoramento, 2005, Universidade de Santiago de Compostela
- [31] Raposo, R., Barroso M., Fonseca S., Costa S., Queiroz J.A., Gallardo E., Dias M., Determination of eight selected organophosphorus insecticides in postmortem blood samples using solid-phase extraction and gas chromatography/mass spectrometry, *Rapid communications in mass spectrometry*, 24, 2010, pp. 3187-3194
- [32] Gallardo E., Barroso M., Margalho C., Cruz A., Vieira D.N., López-Rivadulla M., Determination of parathion in biological fluids by means of direct solid-phase microextraction, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 386, 2006, pp. 1717-1726

- [33] Gallardo E., Barroso M., Margalho C., Cruz A., Vieira D.N., López-Rivadulla M., Determination of quinalphos in blood and urine by direct solid-phase microextraction combined with gas chromatography-mass spectrometry, *Journal of Chromatography B*, 832, 2006, pp. 162-168
- [34] Valente N.I.P., *Análise de pesticidas organofosforados em toxicologia forense*, in *Dissertação de Mestrado*, 2012, Universidade de Aveiro
- [35] Abreu A.R.M.: *Mortes por intoxicação autopsiadas na Cova da Beira entre 2001 e 2012*, in *Dissertação de Mestrado*, 2013, Universidade da Beira Interior
- [36] Gallardo E., Barroso M., Margalho C., Cruz A., Solid-phase microextraction for gas chromatographic/mass spectrometric analysis of dimethoate in human biological samples, *Rapid communications in mass spectrometry*, 20, 2006, pp. 865-869
- [37] Musshoff F., Junker H., Madea B., Simple Determination of 22 Organophosphorous pesticides in human blood using headspace solid-Phase microextraction and gas chromatography with mass spectrometric detection, *Journal of Chromatographic Science*, 4, 2002, pp. 29-34
- [38] Salm P., Taylor P.J., Roberts D., Silva J., Liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for the simultaneous quantitative determination of the organophosphorus pesticides dimethoate, fenthion, diazinon and chlorpyrifos in human blood, *Journal of Chromatography B*, 877, 2009, pp.568-574
- [39] Park M.J., In S.W., Lee S.K., Choi W.K., Park Y.S., Chung H.S., Post-mortem blood concentrations of organophosphorus pesticides, *Forensic Science International*, 184, 2009, pp. 28-31
- [40] Sancho J.V., Pozo O.J., Hernández F., Direct determination of chlorpyrifos and its main metabolite 3,5,6-trichloro-2-pyridinol in human serum and urine by coupled-column liquid chromatography/electrospray-tandem mass spectrometry, *Rapid communications in mass spectrometry*, 14, 2000, pp. 1485-1490
- [41] Latif Y., Sherazi S.T.H., Bhangar M.I., Nizamani S., Evalutaion of pesticides residues in human blood samples of agro professionals and non-agro professionals, *American Journal of Analytical Chemistry*, 3, 2012, pp. 587-595

- [42] Corrion M.L., Ostrea Jr. E.M., Bielawski D.M., Posecion Jr. N.C., Seagraves J.J., Detection of prenatal exposure to several classes of environmental toxicants and their metabolites by gas chromatography-mass spectrometry in maternal and umbilical cord blood, *Journal of Chromatography B*, 822, 2005, pp. 221-229
- [43] Pitarch E., López F.J., Serrano R., Hernández F., Multiresidue determination of organophosphorus and organochlorine pesticides in human biological fluids by capillary gas chromatography, *Fresenius Journal of analytical chemistry*, 369, 2001, pp 502-509
- [44] Pitchar E., Serrano R., López F.J., Hernández F., Rapid multiresidue determination of organochlorine and organophosphorus compounds in human serum by solid-phase extraction and gas chromatography coupled to tandem mass spectrometry, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 376, 2003, pp. 189-197
- [45] Wang Y., Du R., Simultaneous extraction of trace organophosphorous pesticides from plasma sample by automated solid phase extraction and determination by gas chromatography coupled with pulsed flame photometric detector, *Forensic Science International*, 198, 2010, pp. 70-73
- [46] Hernández F., Pitarch E., Beltran J., López F.J., Headspace solid-phase microextraction in combination with gas chromatography and tandem mass spectrometry for the determination of organochlorine and organophosphorus pesticides in whole human blood, *Journal of Chromatography B*, 769, 2002, pp. 64-77
- [47] Lacassie E., Marquet P., Gaulier J.M., Dreyfuss M.F., Lachâtre G., Sensitive and specific multiresidue methods for the determination of pesticides of various classes in clinical and forensic toxicology, *Forensic Science International*, 121, 2001, pp. 116-125
- [48] Lacassie E., Dreyfuss M.F., Gaulier J.M., Marquet P., Daguet J.L., Lachâtre G., Multiresidue determination method for organophosphorus pesticides in serum and whole blood by gas chromatography-mass-selective detection, *Journal of Chromatography B*, 759, 2001, pp. 109-116
- [49] Pérez, J.J., Williams M.K., Weerasekera G., Smith K., Whyatt R.M., Needham L.L., Barr D.B., Measurement of Pyrethroid, Organophosphorus, and Carbamate Insecticides in Human Plasma using Isotope Dilution Gas Chromatography-High Resolution Mass Spectrometry, *Journal of Chromatography B Analytical Technology Biomedical life Sciences*, 878(27), 2010, pp. 2554-2562

[50] Heun K., Bradman A., Harley K., Yousefi P., Barr D.B., Eskenazi B., Holland N., Organophosphate pesticide levels in blood and urine of women and newborns living in an agricultural community, *Environmental Research*, 117, 2012, pp. 8-16

[51] Tsoukali H., Theodoridis G., Raikos N., Grigoratou I., Solid phase microextraction gas chromatographic analysis of organophosphorus pesticides in biological samples, *Journal of Chromatography B*, 822, 2005, pp. 194-200

[52] Inoue S., Saito T., Mase H., Suzuki Y., Takazawa K., Yamamoto I., Inokuchi S., Rapid simultaneous determination for organophosphorus pesticides in human serum by LC-MS, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 44, 2007, pp. 258-264

[53] Tarbah F.A., Mahler H., Temme O., Daldrup T., An analytical method for a rapid screening pg organophosphate pesticides In human biological samples and foodstuffs, *Forensic Science International*, 121, 2001, pp. 126-133

[54] Barr D.B., Barr J.R., Maggio V.L., Whitehead Jr. R.D., Sadowski M.A., Whyatt R.M., Needham L.L., A multi-analyte method for quantification of contemporary pesticides in human serum and plasma using high-resolution mass spectrometry, *Journal of Chromatography B*, 778, 2002, pp. 99-111

[55] Martínez MA., Ballesteros S., Torre C.S., Sanchiz A., Almarza E., García-Aguilera A., Attempted suicide by ingestion of chlorpyrifos: identification in serum and gastric content by GC-FID/GC-MS, *Journal of Analytical Toxicology*, 28, 2004, pp. 609-615

[56] Cazorla-Reyes R., Fernández-Moreno J.L., Romero-González R., Frenich A.G., Vidal J.L.M., Single solid phase extraction method for simultaneous analysis of polar and non-polar pesticides in urine samples by gas chromatography and ultra-high pressure liquid chromatography couple to tandem mass spectrometry, *Talanta*, 85, 2011, pp. 183-196

[57] Tsatsakis A.M., Tzatzarakis M.N., Tutudaki M., Pesticide levels in head hair samples of Cretan population as an indicator of present and past exposure, *Forensic Science International*, 176, 2008, pp. 67-71

[58] Araoud M., Douki W., Najjar M.F., Kenani A., Simple analytical method for determination of pesticide residues in human serum by liquid chromatography tandem mass spectrometry, *Journal of Environmental Science and Health Part B*, 45, 2010, pp. 242-248

[59] Whyatt R.M., et al, Contemporary-use pesticides in personal air samples during pregnancy and blood samples at delivery among urban minority mothers and newborns, *Environmental Health Perspectives*, 111, 2003, pp. 749-756

[60] Zlatković M., Jovanović M., Djordjević D., Vucinić S., Rapid simultaneous determination of organophosphorus pesticides in human serum and urine by liquid chromatography-mass spectrometry, *Military-medical and pharmaceutical review (Vojnosanit Pregl)*, 67,2010, pp. 717-722 (article in Serbian) disponível online: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20954410> (consultado a 10/10/2013)

[62] Kapka-Skrzypczak L., Cyranka M., Skrzypczak M., Kruszewski M., Biomonitoring and biomarkers of organophosphate pesticides exposure - state of the art, *Annals of Agricultural and Environmental Medicine*, 18 (2), 2011, pp. 294-303

[63] Dalvie M.A., Naik I., Channa K., London L., Urinary dialkyl phosphate levels before and after first season chlorpyrifos spraying amongst farm workers in the Western Cape, South Africa, *Journal of Environmental Science and Health, Part B: Pesticides, Food Contaminants, and Agriculture Wastes*, 46 (2), 2011, pp. 163-172

[64] Azaroff L.S., Biomarkes of exposure to organophosphorous insecticides among farmers' families in rural El Salvador: factors associated with exposure, *Environmental Research Section A*, 80, 1999, pp. 138-137

[65] Quirós-Alcalá L., Bradman A., Smith K., Weerasekera G., Odetokun M., Barr D.B., Nishioka M., Castorina R., Hubbard A., Nicas M., Hammond S.K., McKone T.E., Eskenazi B., Organophosphorous pesticide breakdown product in house dust and children's urine, *Journal of Exposure Science and Environmental Epidemiology*, 22 (6), 2012, pp. 559-568

[66] Bradman A., Kogut K., Eisen E.A., Jewell N.P., Quirós-Alcalá L., Castorina R., Chevrier J., Holland N.T., Barr D.B., Kavanagh-Baird G., Eskenazi B., Variability of organophosphorous pesticides metabolite levels in spot and 24 hr urine samples collected from young children during 1 week, *Environmental Health Perspectives* 121 (1), 2013, pp. 118-124

[67] Pesticides Database (PAN), Pesticide Action Network North America (PANNA), disponível online: http://www.pesticideinfo.org/Detail_Chemical.jsp?Rec_Id=PC33392 (consultado a 10/10/2013)

[68] Direcção-Geral de Agricultura e Desenvolvimento Rural (DGADR) - Ministério da Agricultura, Ambiente, Mar e Ordenamento do Território, Guia dos Produtos Fitofarmacêuticos - Lista de Produtos com Venda Autorizada, disponível online em:

<http://www.dgv.min-agricultura.pt/portal/page/portal/DGV/genericos?generico=3666233&cboui=3666233>
(consultado a 8/6/2014)

[69] Olsson A.O., Baker S.E., Nguyen J.V., Romanoff L.C., Udunka S.O., Walker R.D., Flemmen K.L., Barr D.B., A liquid chromatography-tandem mass spectrometry multiresidue method for quantification of specific metabolites of organophosphorus pesticides, synthetic pyrethroids, selected herbicides, and DEET in human urine, *Analytical Chemistry*, 76, 2004, pp. 2453-2461

[70] Sancho, J.V., Pozo O.J., López F.J., Hernández F., Different quantitation approaches for xenobiotics in human urine samples by liquid chromatography/electrospray tandem mass spectrometry, *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 16, 2002, pp. 639-645

[71] Hernández F., Sancho J.V., Pozo O.J., Direct determination of alkyl phosphates in human urine by liquid chromatography/electrospray tandem mass spectrometry, *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 16, 2002, pp. 1766-1773

[72] Perry M.J., Venners S.A., Barr D.B., Xu X., Environmental pyrethroid and organophosphorus insecticide exposure and sperm concentration, *Reproductive Toxicology*, 23, 2007, pp. 113-118

[73] Perry M.J., Venners S.A., Chen X., Liu X., Tang G., Xing H., Barr D.B., Xu X., Organophosphorous pesticides exposures and sperm quality, *Reproductive Toxicology*, 31 (1), 2010, pp. 75-79

[74] Stimpfl T., Extraction in Moffat A.C., Osselton M.D., Widdop B., editors, *Clarke's Analysis of drugs and poisons*, 4ª edição, 2011, pp. 462-470

[75] Barroso M., Moreno I., Fonseca B., Queiroz J.A., Gallardo E., Role of microextraction sampling procedures in forensic toxicology, *Bioanalysis*, 4(14), 2012, 1805-1826

[76] Gallardo E., Costa S., Barroso M., A microextração em fase sólida como técnica de preparação de amostras em química analítica e toxicologia: Teoria e aplicações, *Revista Lusófona de Ciências e Tecnologias da Saúde*, 6 (1), 2009, 105-124

[77] Abdel-Rehim M., Microextraction by packed sorbent (MEPS): A tutorial., *Analytica Chimica Acta*, 701, 2011, pp. 119-128.

[78] Abdel-Rehim M., Recent advances in microextraction by packed sorbent for bioanalysis., *Journal of Chromatography A*, 1217, 2010, pp. 2569-2580.

[79] Opolzer D., Moreno I., Fonseca B., Passarinha L., Barroso M., Costa S., Queiroz J.A., Gallardo E., Analytical approach to determine biogenic amines in urine using microextraction in packed syringe and liquid chromatography coupled to electrochemical detection. *Biomedical Chromatography*, 27, 2012, pp. 60-614

[79] Watson D., Mass Spectrometry in Moffat A.C., Osselton M.D., Widdop B., editores. *Clarke's Analysis of drugs and poisons in pharmaceuticals, body fluids and post-mortem material*, 4ª edição, 2011, pp. 577-592

[80] Chaves das Neves H.J., Freitas A.M.C., *Introdução à cromatografia gás-líquido de alta resolução*, Editor Dias de Sousa Lda., 1ª edição, 1996, pp. 12-141

[81] Ríos A.C., *Aplicación de la cromatografía líquida acoplada a la espectrometría de masas en tandem a la determinación de antidepressivos en plasma y fluido oral*, in Tese de Doutoramento, 2006, Universidade de Santiago de Compostela

[82] Skoog D.A., West D.M., Holler F.J., Crouch S.R., *Fundamentals of analytical chemistry*, 8ª edição, 2004, pp. 947-972

[83] Wittmann C., Fluxome analysis using GC-MS, *Microbial Cell Factories*, 6 (6), 2007, pp. 1-17

[84] Domon B., Aebersold R., Mass spectrometry and protein analysis, *Science*, 312 (14), 2006, pp. 212-217

[85] Miller M, Miller J (2005) *Experimental design and optimization in statistics and chemometrics for analytical chemistry*, 5ª edição, 2005

[86] Mason RL, Gunst RF, Hess JL (2003) *Design & analysis with factorial structure in Statistical design and analysis of experiments with applications to engineering and science*, 2ª edição, 2003

[1] Kala M., Pesticides in Moffat A.C in Moffat A.C., Osselton M.D., Widdop B., editores. *Clarke's Analysis of drugs and poisons*, 4ª edição, 2011, pp. 258-287

[87] Cox D.R., Reid N., *The theory of the design of experiments*, 2000, 1ª edição, pp. 106-193

[88] Costa S., Barroso M., Castañera A., Dias M., Design of experiments, a powerful tool for method development in forensic toxicology: application to the optimization of urinary morphine 3-glucuronide acid hydrolysis, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 396, 2010, pp. 533-2542

[89] Peters F.T., Maurer H.H., Bioanalytical method validation and its implications for forensic and clinical toxicology - A review, *Accreditaion and Quality assurance*, 7, 2002, pp. 441-449

[90] Wille S.M.R., Peters F.T., Di Fazio V., Samyn N., Practical aspects concerning validation and quality control for forensic and clinical bioanalytical quantitative methods, *Accreditaion and Quality assurance*, 16, 2011, pp. 279-292

[91] Guidance for Industry - bioanalytical method validation., U.S. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration, Center for Drug Evaluation and Research (CDER), Center for Veterinary Medicine (CVM) (2001), disponível online em: <http://www.fda.gov/downloads/Drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/ucm070107.pdf> (retrieved at 6/04/2014).

[92] Validation of analytical procedures: text and methodology Q2(R1)., International Conference on Harmonisation of technical requirements for registration of pharmaceuticals for human use (2005), disponível online em: http://www.ich.org/fileadmin/Public_Web_Site/ICH_Products/Guidelines/Quality/Q2_R1/Step4/Q2_R1__Guideline.pdf (consultado a 6/04/2014)

[93] World Anti-doping Agency (WADA). Identification Criteria for Qualitative Assays Incorporating Column Chromatography and Mass Spectrometry, disponível online em: Disponível em: http://www.wada-ama.org/Documents/World_Anti-Doping_Program/WADP-IS-Laboratories/Technical_Documents/WADA_TD2010IDCRv1.0_Identification_Criteria_for_Qualitative_Assays_May_08_2010_EN.doc.pdf. (consultado a 6/04/2014)

V. Anexos

Anexo I: Análise estatística das técnicas MEPS

A. Análise ANOVA: Comparação das técnicas para DZN

técnica 1	técnica 2	técnica 3	técnica 4	técnica 5	técnica 6	técnica 7	técnica 8
25.84	32.46	26.25	27.78	16.68	18.91	34.85	23.74
17.59	23.63	16.19	24.02	16.01	20.49	6.53	30.22
18.00	25.63	52.81	19.06	20.18	20.00	6.90	29.39

SUMÁRIO

Grupos	Contagem	Soma	Média	Variância
técnica 1	3	61.4301	20.4767	21.64506
técnica 2	3	81.72601	27.242	21.41254
técnica 3	3	95.25041	31.75014	357.8248
técnica 4	3	70.8654	23.6218	19.12133
técnica 5	3	52.87139	17.6238	5.003806
técnica 6	3	59.40479	19.8016	0.650953
técnica 7	3	48.28321	16.0944	263.962
técnica 8	3	83.36078	27.78693	12.42773

ANOVA

Fonte de variação	SQ	gl	MQ	F	valor P	F crítico
Entre grupos	633.0861	7	90.44087	1.030594	0.44802	2.657197
Dentro de grupos	1404.097	16	87.75604			
Total	2037.183	23				

B. Análise ANOVA: Comparação das técnicas para PRT

técnica 1	técnica 2	técnica 3	técnica 4	técnica 5	técnica 6	técnica 7	técnica 8
2.08	1.99	1.41	2.70	2.10	2.60	2.84	2.23
1.53	1.70	1.69	2.34	1.15	1.91	1.50	1.22
1.48	1.43	1.55	2.36	1.63	2.53	1.50	1.30

SUMÁRIO

<i>Grupos</i>	<i>Contagem</i>	<i>Soma</i>	<i>Média</i>	<i>Variância</i>
técnica 1	3	5.086145	1.695382	0.10953
técnica 2	3	5.1134	1.704467	0.078599
técnica 3	3	4.656764	1.552255	0.018563
técnica 4	3	7.403891	2.467964	0.039632
técnica 5	3	4.878971	1.626324	0.225111
técnica 6	3	7.035785	2.345262	0.143629
técnica 7	3	5.839692	1.946564	0.60105
técnica 8	3	4.75358	1.584527	0.318627

ANOVA

<i>Fonte de variação</i>	<i>SQ</i>	<i>gl</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>valor P</i>	<i>F crítico</i>
Entre grupos	2.666553	7	0.380936	1.985669	0.121218	2.657197
Dentro de grupos	3.069483	16	0.191843			
Total	5.736036	23				

C. Análise ANOVA: Comparação das técnicas para CLP

técnica 1	técnica 2	técnica 3	técnica 4	técnica 5	técnica 6	técnica 7	técnica 8
0.41	0.34	0.41	0.43	0.42	0.23	0.41	0.11
0.30	0.32	0.41	0.36	0.21	0.23	0.19	0.41
0.29	0.36	0.25	0.42	0.31	0.35	0.15	0.37

SUMÁRIO

<i>Grupos</i>	<i>Contagem</i>	<i>Soma</i>	<i>Média</i>	<i>Variância</i>
técnica 1	3	1.00689	0.33563	0.004482
técnica 2	3	1.017199	0.339066	0.000506
técnica 3	3	1.064405	0.354802	0.008798
técnica 4	3	1.209763	0.403254	0.00177
técnica 5	3	0.944582	0.314861	0.011511
técnica 6	3	0.818069	0.27269	0.004872
técnica 7	3	0.747991	0.24933	0.019515
técnica 8	3	0.879872	0.293291	0.026874

ANOVA

<i>Fonte de variação</i>	<i>SQ</i>	<i>gl</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>valor P</i>	<i>F crítico</i>
Entre grupos	0.050164	7	0.007166	0.731948	0.648371	2.657197
Dentro de grupos	0.156652	16	0.009791			
Total	0.206817	23				

D. Análise ANOVA: Comparação das técnicas para QLP

técnica 1	técnica 2	técnica 3	técnica 4	técnica 5	técnica 6	técnica 7	técnica 8
50.32	91.35	63.85	105.98	88.51	66.26	105.94	96.67
67.16	87.97	74.48	91.21	61.97	87.31	82.32	83.02
70.35	74.21	67.07	86.48	106.78	94.02	89.10	61.38

SUMÁRIO

Grupos	Contagem	Soma	Média	Variância
técnica 1	3	187.8335	62.61117	115.7939
técnica 2	3	253.5329	84.51095	82.47286
técnica 3	3	205.3979	68.46597	29.68065
técnica 4	3	283.6774	94.55914	103.4731
técnica 5	3	257.2631	85.75437	507.5977
técnica 6	3	247.5876	82.5292	209.7556
técnica 7	3	277.3512	92.45039	147.8983
técnica 8	3	241.0752	80.35841	316.6239

Fonte de variação	SQ	gl	MQ	F	valor P	F crítico
Entre grupos	2539.745	7	362.8207	1.918042	0.132919	2.657197
Dentro de grupos	3026.592	16	189.162			
Total	5566.337	23				

E. Análise ANOVA: Comparação das técnicas para DMT

	técnica 1	técnica 2	técnica 3	técnica 4	técnica 5	técnica 6	técnica 7	técnica 8
n=1	4.07	4.64	1.34	4.24	8.28	11.53	5.59	2.23
n=2	4.95	5.02	1.15	4.37	8.59	6.38	3.95	1.93
n=3	4.32	3.74	4.37	11.13	7.23	5.80	2.58	2.84

ANOVA: factor único

Grupos	Contagem	Soma	Média	Variância
técnica 1	3	13.34379	4.447929	0.203597
técnica 2	3	13.39749	4.46583	0.43046
técnica 3	3	6.855366	2.285122	3.273424
técnica 4	3	19.74337	6.581122	15.53578
técnica 5	3	24.10188	8.03396	0.507474
técnica 6	3	23.71271	7.904238	9.927892
técnica 7	3	12.11881	4.039603	2.277029
técnica 8	3	6.999312	2.333104	0.215786

ANOVA

Fonte de variação	SQ	gl	MQ	F	valor P	F crítico
Entre grupos	108.4014	7	15.48592	3.827056	0.012433	2.657197
Dentro de grupos	64.74288	16	4.04643			
Total	173.1443	23				

E.1: Comparação entre as técnicas 1 e técnica 5

Teste F: duas amostras para variâncias			Teste T: duas amostras com variâncias iguais		
	técnica 5	técnica 1		técnica 1	técnica 5
Média	8.03396	4.447929	Média	4.447929	8.03396
Variância	0.507474	0.203597	Variância	0.203597	0.507474
Observações	3	3	Observações	3	3
gl	2	2	Variância agrupada	0.355535	
F	2.492548		Hipótese de diferença de média	0	
P(F<=f) uni-caudal	0.286324		gl	4	
F crítico uni-caudal	19		Stat t	-7.36577	
			P(T<=t) uni-caudal	0.000905	
			t crítico uni-caudal	2.131847	
			P(T<=t) bi-caudal	0.00181	
			t crítico bi-caudal	2.776445	

E.2: Comparação entre as técnicas 2 e 5

Teste F: duas amostras para variâncias			Teste T: duas amostras com variâncias iguais		
	técnica 5	técnica 2		técnica 2	técnica 5
Média	8.03396	4.46583	Média	4.46583	8.03396
Variância	0.507474	0.43046	Variância	0.43046	0.507474
Observações	3	3	Observações	3	3
gl	2	2	Variância agrupada	0.468967	
F	1.17891		Hipótese de diferença de média	0	
P(F<=f) uni-caudal	0.458945		gl	4	
F crítico uni-caudal	19		Stat t	-6.38138	
			P(T<=t) uni-caudal	0.001547	
			t crítico uni-caudal	2.131847	
			P(T<=t) bi-caudal	0.003094	
			t crítico bi-caudal	2.776445	

E.3: Comparação entre as técnicas 5 e técnica 7

Teste F: duas amostras para variâncias			Teste T: duas amostras com variâncias iguais		
	<i>técnica 7</i>	<i>técnica 5</i>		<i>técnica 5</i>	<i>técnica 7</i>
Média	4.039603	8.03396	Média	8.03396	4.039603
Variância	2.277029	0.507474	Variância	0.507474	2.277029
Observações	3	3	Observações	3	3
gl	2	2	Variância agrupada	1.392252	
F	4.486985		Hipótese de diferença de média	0	
P(F<=f) uni-caudal	0.182249		gl	4	
F crítico uni-caudal	19		Stat t	4.146041	
			P(T<=t) uni-caudal	0.007153	
			t crítico uni-caudal	2.131847	
			P(T<=t) bi-caudal	0.014306	
			t crítico bi-caudal	2.776445	

E.4: Comparação entre as técnica 5 e técnica 8

Teste F: duas amostras para variâncias			Teste T: duas amostras com variâncias iguais		
	<i>técnica 5</i>	<i>técnica 8</i>		<i>técnica 5</i>	<i>técnica 8</i>
Média	8.03396	2.333104	Média	8.03396	2.333104
Variância	0.507474	0.215786	Variância	0.507474	0.215786
Observações	3	3	Observações	3	3
gl	2	2	Variância agrupada	0.36163	
F	2.35175		Hipótese de diferença de média	0	
P(F<=f) uni-caudal	0.298352		gl	4	
F crítico uni-caudal	19		Stat t	11.61057	
			P(T<=t) uni-caudal	0.000157	
			t crítico uni-caudal	2.131847	
			P(T<=t) bi-caudal	0.000314	
			t crítico bi-caudal	2.776445	

E.5: Comparação entre as técnica 4 e técnica 5

Teste F: duas amostras para variâncias			Teste T: duas amostras com variâncias iguais		
	<i>técnica 4</i>	<i>técnica 5</i>		<i>técnica 4</i>	<i>técnica 5</i>
Média	6.581122	8.03396	Média	6.581122	8.03396
Variância	15.53578	0.507474	Variância	15.53578	0.507474
Observações	3	3	Observações	3	3
gl	2	2	Variância agrupada	8.021627	
F	30.61392		Hipótese de diferença de média	0	
P(F<=f) uni-caudal	0.031632		gl	4	
F crítico uni-caudal	19		Stat t	-0.62825	
			P(T<=t) uni-caudal	0.281964	
			t crítico uni-caudal	2.131847	
			P(T<=t) bi-caudal	0.563928	
			t crítico bi-caudal	2.776445	

F. Análise ANOVA: Comparação das técnicas para CLF

<i>técnica 1</i>	<i>técnica 2</i>	<i>técnica 3</i>	<i>técnica 4</i>	<i>técnica 5</i>	<i>técnica 6</i>	<i>técnica 7</i>	<i>técnica 8</i>
0.42	0.46	0.40	0.68	0.58	0.44	0.62	0.55
0.57	0.45	0.50	0.61	0.57	0.54	0.47	0.55
0.57	0.40	0.52	0.55	0.73	0.54	0.56	0.55

SUMÁRIO

<i>Grupos</i>	<i>Contagem</i>	<i>Soma</i>	<i>Média</i>	<i>Variância</i>
<i>técnica 1</i>	3	1.568033	0.522678	0.00741
<i>técnica 2</i>	3	1.302724	0.434241	0.001139
<i>técnica 3</i>	3	1.426579	0.475526	0.004408
<i>técnica 4</i>	3	1.833566	0.611189	0.004264
<i>técnica 5</i>	3	1.881286	0.627095	0.008698
<i>técnica 6</i>	3	1.52974	0.509913	0.003314
<i>técnica 7</i>	3	1.650447	0.550149	0.005461
<i>técnica 8</i>	3	1.651834	0.550611	1.32E-05

ANOVA

<i>Fonte de variação</i>	<i>SQ</i>	<i>gl</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>valor P</i>	<i>F crítico</i>
Entre grupos	0.087689	7	0.012527	2.887414	0.037437	2.657197
Dentro de grupos	0.069416	16	0.004338			
Total	0.157105	23				

F.1: Comparação entre as técnica 2 e técnica 4

Teste F: duas amostras para variâncias			Teste T: duas amostras com variâncias iguais		
	<i>técnica 4</i>	<i>técnica 2</i>		<i>técnica 2</i>	<i>técnica 4</i>
Média	0.611189	0.434241	Média	0.434241	0.611189
Variância	0.004264	0.001139	Variância	0.001139	0.004264
Observações	3	3	Observações	3	3
gl	2	2	Variância agrupada	0.002702	
F	3.742305		Hipótese de diferença de média	0	
P(F<=f) uni-caudal	0.210868		gl	4	
F crítico uni-caudal	19		Stat t	-4.16921	
			P(T<=t) uni-caudal	0.00702	
			t crítico uni-caudal	2.131847	
			P(T<=t) bi-caudal	0.01404	
			t crítico bi-caudal	2.776445	

F.2: Comparação entre as técnicas 2 e técnica 5

Teste F: duas amostras para variâncias			Teste T: duas amostras com variâncias iguais		
	<i>técnica 5</i>	<i>técnica 2</i>		<i>técnica 2</i>	<i>técnica 5</i>
Média	0.627095	0.434241	Média	0.434241	0.627095
Variância	0.008698	0.001139	Variância	0.001139	0.008698
Observações	3	3	Observações	3	3
gl	2	2	Variância agrupada	0.004919	
F	7.633349		Hipótese de diferença de média	0	
P(F<=f) uni-caudal	0.11583		gl	4	
F crítico uni-caudal	19		Stat t	-3.36778	
			P(T<=t) uni-caudal	0.014051	
			t crítico uni-caudal	2.131847	
			P(T<=t) bi-caudal	0.028102	
			t crítico bi-caudal	2.776445	

F.3: Comparação entre as técnicas 2 e técnica 8

Teste F: duas amostras para variâncias			Teste T: duas amostras com variâncias desiguais		
	<i>técnica 2</i>	<i>técnica 8</i>		<i>técnica 2</i>	<i>técnica 8</i>
Média	0.434241	0.550611	Média	0.434241	0.550611
Variância	0.001139	1.32E-05	Variância	0.001139	1.32E-05
Observações	3	3	Observações	3	3
gl	2	2	Variância agrupada	0	
F	86.27741		Hipótese de diferença de média	2	
P(F<=f) uni-caudal	0.011458		gl	-5.93666	
F crítico uni-caudal	19		Stat t	0.01361	
			P(T<=t) uni-caudal	2.919986	
			t crítico uni-caudal	0.02722	
			P(T<=t) bi-caudal	4.302653	
			t crítico bi-caudal	0.434241	0.550611

F.4: Comparação entre as técnicas 4 e técnica 5

Teste F: duas amostras para variâncias			Teste T: duas amostras com variâncias iguais		
	<i>técnica 5</i>	<i>técnica 4</i>		<i>técnica 4</i>	<i>técnica 5</i>
Média	0.627095	0.611189	Média	0.611189	0.627095
Variância	0.008698	0.004264	Variância	0.004264	0.008698
Observações	3	3	Observações	3	3
gl	2	2	Variância agrupada	0.006481	
F	2.039745		Hipótese de diferença de média	0	
P(F<=f) uni-caudal	0.328975		gl	4	
F crítico uni-caudal	19		Stat t	-0.24199	
			P(T<=t) uni-caudal	0.410344	
			t crítico uni-caudal	2.131847	
			P(T<=t) bi-caudal	0.820689	
			t crítico bi-caudal	2.776445	

F.5: Comparação entre as técnicas 4 e técnica 8

Teste F: duas amostras para variâncias			Teste T: duas amostras com variâncias desiguais		
	<i>técnica 4</i>	<i>técnica 8</i>		<i>técnica 4</i>	<i>técnica 8</i>
Média	0.611189	0.550611	Média	0.611189	0.550611
Variância	0.004264	1.32E-05	Variância	0.004264	1.32E-05
Observações	3	3	Observações	3	3
gl	2	2	Variância agrupada	0	
F	322.8764		Hipótese de diferença de média	2	
P(F<=f) uni-caudal	0.003088		gl	1.604258	
F crítico uni-caudal	19		Stat t	0.124929	
			P(T<=t) uni-caudal	2.919986	
			t crítico uni-caudal	0.249859	
			P(T<=t) bi-caudal	4.302653	
			t crítico bi-caudal	0.611189	0.550611

G. Análise ANOVA: Comparação das técnicas para AZP

<i>técnica 1</i>	<i>técnica 2</i>	<i>técnica 3</i>	<i>técnica 4</i>	<i>técnica 5</i>	<i>técnica 6</i>	<i>técnica 7</i>	<i>técnica 8</i>
25.95	22.23	16.69	28.97	30.63	26.72	33.19	32.62
28.69	19.34	21.01	26.55	30.56	28.12	28.71	31.12
25.74	17.51	27.70	25.54	38.02	30.26	32.15	37.60

SUMÁRIO

<i>Grupos</i>	<i>Contagem</i>	<i>Soma</i>	<i>Média</i>	<i>Variância</i>
<i>técnica 1</i>	3	80.38147	26.79382	2.709718
<i>técnica 2</i>	3	59.08421	19.69474	5.678206
<i>técnica 3</i>	3	65.40111	21.80037	30.80165
<i>técnica 4</i>	3	81.05398	27.01799	3.119208
<i>técnica 5</i>	3	99.20228	33.06743	18.39127
<i>técnica 6</i>	3	85.09545	28.36515	3.17634
<i>técnica 7</i>	3	94.04635	31.34878	5.51456
<i>técnica 8</i>	3	101.3411	33.78038	11.49604

<i>Fonte de variação</i>	<i>SQ</i>	<i>gl</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>valor P</i>	<i>F crítico</i>
Entre grupos	539.1102	7	77.01574	7.61712	0.000404	2.657197
Dentro de grupos	161.774	16	10.11087			
Total	700.8842	23				

G.1: Comparação entre as técnicas 2 e técnica 5

Teste F: duas amostras para variâncias			Teste T: duas amostras com variâncias iguais		
	<i>técnica 5</i>	<i>técnica 2</i>		<i>técnica 2</i>	<i>técnica 5</i>
Média	33.06743	19.69474	Média	19.69474	33.06743
Variância	18.39127	5.678206	Variância	5.678206	18.39127
Observações	3	3	Observações	3	3
gl	2	2	Variância agrupada	12.03474	
F	3.238922		Hipótese de diferença de média	0	
P(F<=f) uni-caudal	0.235909		gl	4	
F crítico uni-caudal	19		Stat t	-4.72113	
			P(T<=t) uni-caudal	0.004582	
			t crítico uni-caudal	2.131847	
			P(T<=t) bi-caudal	0.009164	
			t crítico bi-caudal	2.776445	

G.2: Comparação entre as técnicas 3 e técnica 5

Teste F: duas amostras para variâncias			Teste T: duas amostras com variâncias iguais		
	<i>técnica 3</i>	<i>técnica 5</i>		<i>técnica 3</i>	<i>técnica 5</i>
Média	21.80037	33.06743	Média	21.80037	33.06743
Variância	30.80165	18.39127	Variância	30.80165	18.39127
Observações	3	3	Observações	3	3
gl	2	2	Variância agrupada	24.59646	
F	1.674798		Hipótese de diferença de média	0	
P(F<=f) uni-caudal	0.37386		gl	4	
F crítico uni-caudal	19		Stat t	-2.7824	
			P(T<=t) uni-caudal	0.024848	
			t crítico uni-caudal	2.131847	
			P(T<=t) bi-caudal	0.049696	
			t crítico bi-caudal	2.776445	

G.3: Comparação entre as técnicas 1 e técnica 8

Teste F: duas amostras para variâncias			Teste T: duas amostras com variâncias iguais		
	<i>técnica 8</i>	<i>técnica 1</i>		<i>técnica 1</i>	<i>técnica 8</i>
Média	33.78038	26.79382	Média	26.79382	33.78038
Variância	11.49604	2.709718	Variância	2.709718	11.49604
Observações	3	3	Observações	3	3
gl	2	2	Variância agrupada	7.102879	
F	4.242522		Hipótese de diferença de média	0	
P(F<=f) uni-caudal	0.190748		gl	4	
F crítico uni-caudal	19		Stat t	-3.21064	
			P(T<=t) uni-caudal	0.016285	
			t crítico uni-caudal	2.131847	
			P(T<=t) bi-caudal	0.032569	
			t crítico bi-caudal	2.776445	

G.4: Comparação entre as técnicas 2 e técnica 8

Teste F: duas amostras para variâncias			Teste T: duas amostras com variâncias iguais		
	<i>técnica 8</i>	<i>técnica 2</i>		<i>técnica 2</i>	<i>técnica 8</i>
Média	33.78038	19.69474	Média	19.69474	33.78038
Variância	11.49604	5.678206	Variância	5.678206	11.49604
Observações	3	3	Observações	3	3
gl	2	2	Variância agrupada	8.587123	
F	2.02459		Hipótese de diferença de média	0	
P(F<=f) uni-caudal	0.330623		gl	4	
F crítico uni-caudal	19		Stat t	-5.88706	
			P(T<=t) uni-caudal	0.002081	
			t crítico uni-caudal	2.131847	
			P(T<=t) bi-caudal	0.004162	
			t crítico bi-caudal	2.776445	

G.5: Comparação entre as técnicas 3 e técnica 8

Teste F: duas amostras para variâncias			Teste T: duas amostras com variâncias iguais		
	<i>técnica 3</i>	<i>técnica 8</i>		<i>técnica 3</i>	<i>técnica 8</i>
Média	21.80037	33.78038	Média	21.80037	33.78038
Variância	30.80165	11.49604	Variância	30.80165	11.49604
Observações	3	3	Observações	3	3
gl	2	2	Variância agrupada	21.14885	
F	2.679327		Hipótese de diferença de média	0	
P(F<=f) uni-caudal	0.271789		gl	4	
F crítico uni-caudal	19		Stat t	-3.1905	
			P(T<=t) uni-caudal	0.0166	
			t crítico uni-caudal	2.131847	
			P(T<=t) bi-caudal	0.0332	
			t crítico bi-caudal	2.776445	

G.6: Comparação entre as técnicas 4 e técnica 5

Teste F: duas amostras para variâncias			Teste T: duas amostras com variâncias iguais		
	<i>técnica 5</i>	<i>técnica 4</i>		<i>técnica 5</i>	<i>técnica 4</i>
Média	21.80037	33.78038	Média	33.06743	27.01799
Variância	30.80165	11.49604	Variância	18.39127	3.119208
Observações	3	3	Observações	3	3
gl	2	2	Variância agrupada	10.75524	
F	2.679327		Hipótese de diferença de média	0	
P(F<=f) uni-caudal	0.271789		gl	4	
F crítico uni-caudal	19		Stat t	2.259176	
			P(T<=t) uni-caudal	0.04338	
			t crítico uni-caudal	2.131847	
			P(T<=t) bi-caudal	0.086759	
			t crítico bi-caudal	2.776445	

G.7: Comparação entre as técnicas 4 e técnica 8

Teste F: duas amostras para variâncias			Teste T: duas amostras com variâncias iguais		
	<i>Técnica 8</i>	<i>técnica 4</i>		<i>técnica 4</i>	<i>técnica 8</i>
Média	21.80037	33.78038	Média	27.01799	33.78038
Variância	30.80165	11.49604	Variância	3.119208	11.49604
Observações	3	3	Observações	3	3
gl	2	2	Variância agrupada	7.307623	
F	2.679327		Hipótese de diferença de média	0	
P(F<=f) uni-caudal	0.271789		gl	4	
F crítico uni-caudal	19		Stat t	-3.06378	
			P(T<=t) uni-caudal	0.01876	
			t crítico uni-caudal	2.131847	
			P(T<=t) bi-caudal	0.03752	
			t crítico bi-caudal	2.776445	

G.8: Comparação entre as técnicas 5 e técnica 8

Teste F: duas amostras para variâncias			Teste T: duas amostras com variâncias iguais		
	<i>Técnica 5</i>	<i>técnica 8</i>		<i>técnica 5</i>	<i>técnica 8</i>
Média	33.06743	33.78038	Média	33.06743	33.78038
Variância	18.39127	11.49604	Variância	18.39127	11.49604
Observações	3	3	Observações	3	3
gl	2	2	Variância agrupada	14.94365	
F	1.599792		Hipótese de diferença de média	0	
P(F<=f) uni-caudal	0.384646		gl	4	
F crítico uni-caudal	19		Stat t	-0.22588	
			P(T<=t) uni-caudal	0.416184	
			t crítico uni-caudal	2.131847	
			P(T<=t) bi-caudal	0.832367	
			t crítico bi-caudal	2.776445	

Anexo II: Análise estatística do DOE

A. Análise ANOVA para o DMT

Factores	efeito	coeficiente	SE (standard error)	F	Valor p
A	12.690	37.289	1.822	12.131	0.081
B	-32.402	6.345	1.822	79.093	0.074
C	-26.114	-16.201	1.822	51.374	0.012
D	6.291	-13.057	1.822	2.982	0.019
AB	0.684	3.146	1.822	0.035	0.226
AC	-10.148	0.342	1.822	7.759	0.868
AD	-4.038	-5.074	1.822	1.228	0.108
BC	-3.326	-2.019	1.822	0.833	0.383
BD	-15.245	-1.663	1.822	17.510	0.458
CD	4.459	-7.623	1.822	1.498	0.053
ABC	0.873	2.229	1.822	0.057	0.346
ABD	-2.384	0.437	1.822	0.428	0.833
ACD	0.064	-1.192	1.822	0.000	0.580
BCD	4.214	0.032	1.822	1.338	0.988
ABCD	4.280	2.107	1.822	1.380	0.367

B. Análise ANOVA para o DZN

Factores	efeito	coeficiente	SE (standard error)	F	Valor p
A	17.395	8.697	5.076	2.936	0.229
B	9.772	4.886	5.076	0.926	0.437
C	-3.148	-1.574	5.076	0.096	0.786
D	-3.428	-1.714	5.076	0.114	0.768
AB	8.138	4.069	5.076	0.642	0.507
AC	-7.399	-3.699	5.076	0.531	0.542
AD	2.153	1.076	5.076	0.045	0.852
BC	3.468	1.734	5.076	0.117	0.765
BD	-1.068	-0.534	5.076	0.011	0.926
CD	5.563	2.781	5.076	0.300	0.639
ABC	-0.689	-0.345	5.076	0.005	0.952
ABD	-2.930	-1.465	5.076	0.083	0.800
ACD	5.475	2.738	5.076	0.291	0.644
BCD	-8.813	-4.407	5.076	0.754	0.477
ABCD	-7.298	-3.649	5.076	0.517	0.547

C. Análise ANOVA para o PRT

Factores	efeito	coeficiente	SE (standard error)	F	Valor p
A	1.000	0.500	0.044	131.060	0.008
B	0.318	0.159	0.044	13.260	0.068
C	-0.059	-0.029	0.044	0.450	0.570
D	0.069	0.035	0.044	0.630	0.512
AB	0.030	0.015	0.044	0.110	0.767
AC	0.025	0.013	0.044	0.085	0.798
AD	-0.023	-0.011	0.044	0.069	0.818
BC	-0.020	-0.010	0.044	0.050	0.844
BD	0.150	0.075	0.044	2.940	0.229
CD	0.185	0.093	0.044	4.510	0.168
ABC	-0.214	-0.107	0.044	6.010	0.134
ABD	0.117	0.058	0.044	1.790	0.313
ACD	0.164	0.082	0.044	3.530	0.201
BCD	-0.156	-0.078	0.044	3.200	0.215
ABCD	-0.214	-0.107	0.044	6.010	0.134

D. Análise ANOVA para o CLP

Factores	efeito	coeficiente	SE (standard error)	F	Valor p
A	0.213	0.106	0.106	3221.800	0.000
B	0.093	0.047	0.047	619.900	0.002
C	-0.003	-0.002	-0.002	0.790	0.468
D	-0.030	-0.015	-0.015	62.920	0.016
AB	0.033	0.017	0.017	77.910	0.013
AC	-0.048	-0.024	-0.024	164.820	0.006
AD	-0.035	-0.018	-0.018	87.550	0.011
BC	-0.036	-0.018	-0.018	93.550	0.011
BD	0.013	0.007	0.007	12.330	0.072
CD	0.125	0.063	0.063	1115.990	0.001
ABC	-0.043	-0.022	-0.022	132.490	0.008
ABD	0.006	0.003	0.003	2.930	0.229
ACD	0.006	0.003	0.003	2.200	0.277
BCD	-0.054	-0.027	-0.027	204.070	0.005
ABCD	-0.048	-0.024	-0.024	161.700	0.006

E. Análise ANOVA para o CLF

Factores	efeito	coeficiente	SE (standard error)	F	Valor p
A	0.175	0.088	0.037	5.590	0.142
B	0.084	0.042	0.037	1.300	0.373
C	-0.118	-0.059	0.037	2.520	0.253
D	0.087	0.043	0.037	1.380	0.362
AB	0.007	0.003	0.037	0.008	0.938
AC	-0.047	-0.024	0.037	0.410	0.590
AD	0.044	0.022	0.037	0.360	0.612
BC	-0.024	-0.012	0.037	0.100	0.777
BD	0.020	0.010	0.037	0.075	0.809
CD	0.110	0.055	0.037	2.210	0.276
ABC	-0.051	-0.026	0.037	0.480	0.559
ABD	0.027	0.014	0.037	0.140	0.746
ACD	0.061	0.031	0.037	0.680	0.495
BCD	0.002	0.001	0.037	0.001	0.982
ABCD	-0.053	-0.026	0.037	0.510	0.551

F. Análise ANOVA para o QLP

Factores	efeito	coeficiente	SE (standard error)	F	Valor p
A	13.051	13.764	3.810	13.050	0.069
B	-11.801	6.526	3.810	2.930	0.229
C	12.396	-5.900	3.810	2.400	0.262
D	-0.410	6.198	3.810	2.650	0.245
AB	-8.185	-0.205	3.810	0.003	0.962
AC	9.314	-4.093	3.810	1.150	0.395
AD	-2.682	4.657	3.810	1.490	0.346
BC	5.433	-1.341	3.810	0.120	0.759
BD	23.550	2.716	3.810	0.510	0.550
CD	-8.388	11.775	3.810	9.550	0.091
ABC	8.492	-4.194	3.810	1.210	0.386
ABD	17.412	4.246	3.810	1.240	0.381
ACD	-9.587	8.706	3.810	5.220	0.150
BCD	-1.077	-4.793	3.810	1.580	0.335
ABCD	13.051	-0.539	3.810	0.020	0.901

G. Análise ANOVA para o AZP

Factores	efeito	coeficiente	SE (standard error)	F	Valor p
A	13.899	6.949	1.458	22.730	0.041
B	3.321	1.661	1.458	1.300	0.373
C	-5.325	-2.662	1.458	3.340	0.209
D	8.135	4.067	1.458	7.790	0.108
AB	-0.393	-0.196	1.458	0.018	0.905
AC	-3.412	-1.706	1.458	1.370	0.363
AD	5.123	2.562	1.458	3.090	0.221
BC	-0.618	-0.309	1.458	0.045	0.852
BD	0.293	0.146	1.458	0.010	0.929
CD	6.256	3.128	1.458	4.610	0.165
ABC	-0.708	-0.354	1.458	0.059	0.831
ABD	1.060	0.530	1.458	0.130	0.751
ACD	5.301	2.651	1.458	3.310	0.211
BCD	-0.922	-0.461	1.458	0.100	0.782
ABCD	-2.176	-1.088	1.458	0.560	0.533

Anexo III: Equações dos modelos adoptados e dados da análise estatística

Equação para o DMT

$$\begin{aligned} \text{Resposta DMT} = & 390.590 - 5.209A - 1.889B - 41.816C - 0.501D + 0.017AB + 0.665AC \\ & - 0.097AD + 0.016BC - 0.018BD + 1.020CD + 0.004A^2 + 0.005B^2 + 0.766C^2 \\ & + 0.025C^2 \end{aligned}$$

Modelo	p-value	R ²	Adj R ²	Pred R ²
Quadratic	0.0001	0.8939	0.5263	0.7877

Equação para o DZN

$$\text{Resposta DZN} = 2.712 + 1.199A - 0.004B + 0.582C + 0.069D$$

Modelo	p-value	R ²	Adj R ²	Pred R ²
Linear	0.0097	0.4146	0.0757	0.317

Equação para o PRT

$$\text{Resposta PRT} = 0.963 + 0.114A + 0.002B - 0.018C - (7.067 \times 10^{-5})D$$

Modelo	p-value	R ²	Adj R ²	Pred R ²
Linear	0.0009	0.5262	0.2491	0.4472

Equação para o CLP

$$\text{Resposta CLP} = 0.053 + 0.015A - (9.509 \times 10^{-5})B + 0.008C - 0.002D$$

Modelo	p-value	R ²	Adj R ²	Pred R ²
Linear	0.0321	0.345	-0.0004	0.2358

Equação para o CLF

$$\begin{aligned} \text{Resposta CLF} = & -0.228 + 0.052A + 0.001B + 0.047C - 0.052D - (9.938 \times 10^{-5})AB \\ & - (6.526 \times 10^{-4})AC + (9.861 \times 10^{-4})AD - (3.469 \times 10^{-5})BC \\ & + (1.368 \times 10^{-4})BD + 0.002CD - (4.110 \times 10^{-4})A^2 + (3.601 \times 10^{-6})B^2 \\ & - 0.004C^2 + (5.277 \times 10^{-4})D^2 \end{aligned}$$

modelo	p-value	R ²	Adj R ²	Pred R ²
Quadratic	0.0008	0.8599	0.3453	0.7198

Equação para o QLP

$$\begin{aligned} \text{Resposta QLP} = & 8.242 + 4.749A + 0.163B + 7.554C - 9.857D - 0.005AB - 0.185AC + 0.650AD \\ & + 0.003BC - 0.09BD + 0.239CD - 0.061A^2 - (1.386 \times 10^{-4})B^2 - 0.501C^2 \\ & - 0.549D^2 \end{aligned}$$

modelo	p-value	R ²	Adj R ²	Pred R ²
Quadratic	0.0015	0.8453	0.0337	0.6907

Equação para o AZP

$$\begin{aligned} \text{Resposta AZP} = & -139.140 + 7.204A + 0.697B + 3.829C + 17.879D - 0.017AB + 0.077AC \\ & - 0.419 AC - 0.029BC - 0.046BD - 0.123CD - 0.048A^2 + (4.615 \times 10^{-4})B^2 \\ & - 0.283C^2 - 0.296D^2 \end{aligned}$$

modelo	p-value	R ²	Adj R ²	Pred R ²
Quadratic	0.0417	0.723	-0.4819	0.446

Anexo IV: Análise estatística do estudo univariado do número de aspirações da amostra

A. Análise ANOVA: Comparação para DMT

	26 aspirações	36 aspirações	40 aspirações	50 aspirações	60 aspirações
<i>n</i> =1	60.60	43.78	38.83	54.84	14.19
<i>n</i> =2	58.54	58.78	53.73	53.03	33.00
<i>n</i> =3	74.05	65.41	59.75	46.49	44.34

ANOVA: factor único

SUMÁRIO

Grupos	Contagem	Soma	Média	Variância
26 aspirações	3	193.1816657	64.39388857	70.96853401
36 aspirações	3	167.9684301	55.98947671	122.7870286
40 aspirações	3	152.3032191	50.76773969	115.9918779
50 aspirações	3	154.3558138	51.45193794	19.2678043
60 aspirações	3	91.52553946	30.50851315	231.880281

ANOVA

Fonte de variação	SQ	gl	MQ	F	valor P	F crítico
Entre grupos	1871.211	4	467.802833	4.170142313	0.030517668	3.478049691
Dentro de grupos	1121.791	10	112.1791052			
Total	2993.002	14				

A.1: Comparação entre as 36 e as 40 aspirações

Teste F: duas amostras para variâncias			Teste T: duas amostras com variâncias iguais		
	36 aspirações	40 aspirações		40 aspirações	36 aspirações
Média	55.98947671	50.76773969	Média	55.98947671	50.76773969
Variância	122.7870286	115.9918779	Variância	122.7870286	115.9918779
Observações	3	3	Observações	3	3
gl	2	2	Variância agrupada	119.3894533	
F	1.058582987		Hipótese de diferença de média	0	
P(F<=f) uni-caudal	0.485771041		gl	4	
F crítico uni-caudal	19		Stat t	0.585298814	
			P(T<=t) uni-caudal	0.294887422	
			t crítico uni-caudal	2.131846786	
			P(T<=t) bi-caudal	0.589774845	
			t crítico bi-caudal	2.776445105	

B. Análise ANOVA: Comparação para DZN

	26 aspirações	36 aspirações	40 aspirações	50 aspirações	60 aspirações
n=1	18.5343	23.0302	24.6751	28.4001	37.2376
n=2	16.6154	21.9960	28.3474	22.4308	26.1065
n=3	26.9055	22.5304	25.0459	22.5826	26.9687

SUMÁRIO

Grupos	Contagem	Soma	Média	Variância
26 aspirações	3	62.05519105	20.68506368	29.94064727
36 aspirações	3	67.55652777	22.51884259	0.267504566
40 aspirações	3	78.06843707	26.02281236	4.08729903
50 aspirações	3	73.41355635	24.47118545	11.58304699
60 aspirações	3	90.31272085	30.10424028	38.34894316

ANOVA

Fonte de variação	SQ	gl	MQ	F	valor P	F crítico
Entre grupos	155.6007	4	38.90017853	2.309234262	0.129093913	3.478049691
Dentro de grupos	168.4549	10	16.84548821			
Total	324.0556	14				

C. Análise ANOVA: Comparação para PRT

	26 aspirações	36 aspirações	40 aspirações	50 aspirações	60 aspirações
n=1	3.6097	4.1168	4.7309	4.7049	5.5105
n=2	3.5895	3.9103	4.8524	4.5271	5.7489
n=3	4.7005	4.5469	4.6387	4.9282	5.1460

SUMÁRIO

Grupos	Contagem	Soma	Média	Variância
26 aspirações	3	11.8996727	3.966557566	0.404103607
36 aspirações	3	12.57405208	4.191350692	0.105455399
40 aspirações	3	14.22196522	4.740655073	0.011486357
50 aspirações	3	14.16023682	4.720078939	0.040389406
60 aspirações	3	16.40543208	5.46847736	0.092186594

ANOVA

Fonte de variação	SQ	gl	MQ	F	valor P	F crítico
Entre grupos	4.065544	4	1.016386001	7.775036575	0.004078733	3.478049691
Dentro de grupos	1.307243	10	0.130724273			
Total	5.372787	14				

C.1: Comparação entre as 36 e as 40 aspirações

Teste F: duas amostras para variâncias

	36 aspirações	40 aspirações
Média	4.191350692	4.740655073
Variância	0.105455399	0.011486357
Observações	3	3
gl	2	2
F	9.180926468	
P(F<=f) uni-caudal	0.098222888	
F crítico uni-caudal	19	

Teste T: duas amostras com variâncias iguais

	40 aspirações	36 aspirações
Média	4.191333	4.740667
Variância	0.105481	0.011488
Observações	3	3
Variância agrupada	0.058485	
Hipótese de diferença de média	0	
gl	4	
Stat t	-2.78202	
P(T<=t) uni-caudal	0.024858	
t crítico uni-caudal	2.131847	
P(T<=t) bi-caudal	0.049716	
t crítico bi-caudal	2.776445	

D. Análise ANOVA: Comparação para CLP

	26 aspirações	36 aspirações	40 aspirações	50 aspirações	60 aspirações
n=1	0.2899	0.2989	0.4160	0.3626	0.4634
n=2	0.2369	0.3211	0.3695	0.3789	0.4191
n=3	0.3801	0.3410	0.4037	0.3704	0.4720

SUMÁRIO

Grupos	Contagem	Soma	Média	Variância
26 aspirações	3	0.90688458	0.30229486	0.005241135
36 aspirações	3	0.961038159	0.320346053	0.000443466
40 aspirações	3	1.189281747	0.396427249	0.0005804
50 aspirações	3	1.111846739	0.37061558	6.63864E-05
60 aspirações	3	1.354512827	0.451504276	0.000803369

ANOVA

Fonte de variação	SQ	gl	MQ	F	valor P	F crítico
Entre grupos	0.043127	4	0.010781772	7.555811024	0.004517956	3.478049691
Dentro de grupos	0.01427	10	0.001426951			
Total	0.057397	14				

D.1: Comparação entre as 36 e as 40 aspirações

Teste F: duas amostras para variâncias

	40 aspirações	36 aspirações
Média	0.396427	0.320346
Variância	0.00058	0.000443
Observações	3	3
gl	2	2
F	1.308782	
P(F<=f) uni-caudal	0.433129	
F crítico uni-caudal	19	

Teste T: duas amostras com variâncias iguais

	36 aspirações	40 aspirações
Média	0.320346	0.396427
Variância	0.000443	0.00058
Observações	3	3
Variância agrupada	0.000512	
Hipótese de diferença de média	0	
gl	4	
Stat t	-4.11829	
P(T<=t) uni-caudal	0.007316	
t crítico uni-caudal	2.131847	
P(T<=t) bi-caudal	0.014633	
t crítico bi-caudal	2.776445	

E. Análise ANOVA: Comparação para CLF

	26 aspirações	36 aspirações	40 aspirações	50 aspirações	60 aspirações
n=1	0.6438	0.6986	0.8174	0.7956	0.6632
n=2	0.6300	0.7027	0.9323	0.8406	0.9976
n=3	0.7637	0.8691	0.8675	0.8773	0.9257

SUMÁRIO

Grupos	Contagem	Soma	Média	Variância
26 aspirações	3	2.03750015	0.679166717	0.005404531
36 aspirações	3	2.270436398	0.756812133	0.009452769
40 aspirações	3	2.617170531	0.872390177	0.003319575
50 aspirações	3	2.513540131	0.83784671	0.001671748
60 aspirações	3	2.586444828	0.862148276	0.030985203

ANOVA

Fonte de variação	SQ	gl	MQ	F	valor P	F crítico
Entre grupos	0.080961	4	0.020240252	1.990825115	0.171972597	3.478049691
Dentro de grupos	0.101668	10	0.010166765			
Total	0.182629	14				

F. Análise ANOVA: Comparação para QLP

	26 aspirações	36 aspirações	40 aspirações	50 aspirações	60 aspirações
n=1	55.0822	62.5725	69.7112	70.3448	94.9586
n=2	55.5460	60.0747	75.2567	71.6655	82.8398
n=3	65.0010	71.1983	70.0256	74.8511	78.3345

SUMÁRIO

Grupos	Contagem	Soma	Média	Variância
26 aspirações	3	175.629275	58.54309167	31.33216661
36 aspirações	3	193.845563	64.61518765	34.06284977
40 aspirações	3	214.993485	71.66449501	9.702670127
50 aspirações	3	216.8614565	72.28715218	5.36652934
60 aspirações	3	256.1328862	85.37762872	73.92070337

ANOVA

Fonte de variação	SQ	gl	MQ	F	valor P	F crítico
Entre grupos	1210.477321	4	302.6193302	9.800806054	0.001728197	3.47805
Dentro de grupos	308.7698384	10	30.87698384			
Total	1519.247159	14				

F.1: Comparação entre as 36 e as 40 aspirações

Teste F: duas amostras para variâncias			Teste T: duas amostras com variâncias iguais		
	36 aspirações	40 aspirações		36 aspirações	40 aspirações
Média	64.61518765	71.66449501	Média	64.61518765	71.66449501
Variância	34.06284977	9.702670127	Variância	34.06284977	9.702670127
Observações	3	3	Observações	3	3
gl	2	2	Variância agrupada	21.88275995	
F	3.510667613		Hipótese de diferença de média	0	
P(F<=f) uni-caudal	0.221696672		gl	4	
F crítico uni-caudal	19		Stat t	-1.845614648	
			P(T<=t) uni-caudal	0.069346299	
			t crítico uni-caudal	2.131846786	
			P(T<=t) bi-caudal	0.138692598	
			t crítico bi-caudal	2.776445105	

G. Análise ANOVA: Comparação para AZP

	26 aspirações	36 aspirações	40 aspirações	50 aspirações	60 aspirações
n=1	30.9664	33.0005	45.8770	71.4381	49.1782
n=2	31.0300	32.2633	40.6018	71.6976	56.0782
n=3	38.2050	39.0904	40.7752	47.1630	55.4750

SUMÁRIO

Grupos	Contagem	Soma	Média	Variância
26 aspirações	3	100.2013743	33.40045811	17.31355037
36 aspirações	3	104.3542529	34.78475095	14.0400569
40 aspirações	3	127.2539574	42.41798578	8.981070044
50 aspirações	3	190.2987887	63.43292957	198.548609
60 aspirações	3	160.7313149	53.57710497	14.60396406

ANOVA

Fonte de variação	SQ	gl	MQ	F	valor P	F crítico
Entre grupos	1972.624	4	493.1559833	9.727431706	0.001778498	3.478049691
Dentro de grupos	506.9745	10	50.69745008			
Total	2479.598	14				

G.1: Comparação entre as 36 e as 40 aspirações

Teste F: duas amostras para variâncias			Teste T: duas amostras com variâncias iguais		
	36 aspirações	40 aspirações		36 aspirações	40 aspirações
Média	34.78475095	42.41798578	Média	34.78475095	42.41798578
Variância	14.0400569	8.981070044	Variância	14.0400569	8.981070044
Observações	3	3	Observações	3	3
gl	2	2	Variância agrupada	11.51056347	
F	1.563294444		Hipótese de diferença de média	0	
P(F<=f) uni-caudal	0.390122954		gl	4	
F crítico uni-caudal	19		Stat t	-2.75535185	
			P(T<=t) uni-caudal	0.025541584	
			t crítico uni-caudal	2.131846786	
			P(T<=t) bi-caudal	0.051083168	
			t crítico bi-caudal	2.776445105	

Anexo V: Erro relativo (ER%) por recurso a regressão linear simples e ponderada

		Modelo linear	1/x	1/x ²	1/y	1/y ²	1/x ^{1/2}	1/y ^{1/2}
DZN	ΣER %	673.49	210.43	175.24	209.31	174.95	323.85	314.18
	R ²	0.998	0.997	0.995	0.997	0.994	0.998	0.998
PRT	ΣER %	378.44	270.88	246.58	237.49	278.54	341.06	314.50
	R ²	0.999	0.998	0.991	0.998	0.988	0.999	0.999
CLP	ΣER %	817.62	204.11	163.14	189.18	161.51	339.58	313.31
	R ²	0.997	0.997	0.996	0.997	0.996	0.998	0.998
CLF	ΣER %	628.16	309.43	258.23	281.55	286.20	424.33	397.43
	R ²	0.999	0.998	0.990	0.997	0.987	0.999	0.999
QLP	ΣER %	557.45	138.31	123.65	132.19	120.19	231.18	214.30
	R ²	0.998	0.998	0.997	0.998	0.998	0.998	0.998
AZP	ΣER %	262.31	186.16	175.72	181.31	184.86	206.53	201.61
	R ²	0.995	0.995	0.991	0.994	0.987	0.995	0.995

Anexo IV:

A. Análise ANOVA precipitação com ACN: DMT

Com evaporação	Sem evaporação
0.7845	3.3458
0.2803	1.4072
0.2568	1.6451

SUMÁRIO

Grupos	Contagem	Soma	Média	Variância
Com evaporação	3	4.847576	1.615859	0.023036
Sem evaporação	3	4.781506	1.593835	0.024122

ANOVA

Fonte de variação	SQ	gl	MQ	F	valor P	F crítico
Entre grupos	0.000728	1	0.000728	0.030856	0.869096	7.708647
Dentro de grupos	0.094317	4	0.023579			
Total	0.095044	5				

B. Análise ANOVA precipitação com ACN: DZN

Com evaporação	Sem evaporação
12.3874	11.7637
10.1046	10.7718
9.0972	10.4536

SUMÁRIO

Grupos	Contagem	Soma	Média	Variância
Com evaporação	3	31.58922574	10.52974191	2.841901373
Sem evaporação	3	32.98901711	10.99633904	0.466923777

ANOVA

Fonte de variação	SQ	gl	MQ	F	valor P	F crítico
Entre grupos	0.326569	1	0.326569	0.197393	0.679812	7.708647
Dentro de grupos	6.61765	4	1.654413			
Total	0.095044	5				

C. Análise ANOVA precipitação com ACN: PRT

Com evaporação	Sem evaporação
3.5794	4.3397
3.1170	3.1766
2.9761	3.1606

SUMÁRIO

Grupos	Contagem	Soma	Média	Variância
Com evaporação	3	9.672441	3.224147	0.099593
Sem evaporação	3	10.67683	3.558945	0.457253

ANOVA

Fonte de variação	SQ	gl	MQ	F	valor P	F crítico
Entre grupos	9.672441	3.224147	0.099593	9.672441	3.224147	0.099593
Dentro de grupos	10.67683	3.558945	0.457253	10.67683	3.558945	0.457253
Total	1.281825	5				

D. Análise ANOVA precipitação com ACN: CLP

Com evaporação	Sem evaporação
1.7832	1.7650
1.4870	1.4619
1.5774	1.5547

SUMÁRIO

Grupos	Contagem	Soma	Média	Variância
Com evaporação	3	4.847576	1.615859	0.023036
Sem evaporação	3	4.781506	1.593835	0.024122

ANOVA

<i>Fonte de variação</i>	<i>SQ</i>	<i>gl</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>valor P</i>	<i>F crítico</i>
Entre grupos	0.000728	1	0.000728	0.030856	0.869096	7.708647
Dentro de grupos	0.094317	4	0.023579			
Total	0.095044	5	0.095044			

E. Análise ANOVA precipitação com ACN: CLF

Com evaporação	Sem evaporação
7.0128	9.2852
6.8871	6.9244
6.6949	7.4263

SUMÁRIO

<i>Grupos</i>	<i>Contagem</i>	<i>Soma</i>	<i>Média</i>	<i>Variância</i>
Com evaporação	3	97.40362	32.46787	2.035729
Sem evaporação	3	111.0123	37.00409	28.7995

ANOVA

<i>Fonte de variação</i>	<i>SQ</i>	<i>gl</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>valor P</i>	<i>F crítico</i>
Entre grupos	30.86588	1	30.86588	2.001988	0.230008	7.708647
Dentro de grupos	61.67046	4	15.41761			
	92.53634	5	92.53634			

F. Análise ANOVA precipitação com ACN: QLP

Com evaporação	Sem evaporação
33.9396	42.9424
32.3732	32.5013
31.0908	35.5685

SUMÁRIO

<i>Grupos</i>	<i>Contagem</i>	<i>Soma</i>	<i>Média</i>	<i>Variância</i>
Com evaporação	3	97.40362	32.46787	2.035729
Sem evaporação	3	111.0123	37.00409	28.7995

ANOVA

<i>Fonte de variação</i>	<i>SQ</i>	<i>gl</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>valor P</i>	<i>F crítico</i>
Entre grupos	30.86588	1	30.86588	2.001988	0.230008	7.708647
Dentro de grupos	61.67046	4	15.41761			
Total	92.53634	5	92.53634			

G. Análise ANOVA precipitação com ACN: AZP

Com evaporação	Sem evaporação
18.2008	25.6299
16.9136	18.1550
17.7497	18.6351

SUMÁRIO

<i>Grupos</i>	<i>Contagem</i>	<i>Soma</i>	<i>Média</i>	<i>Variância</i>
Com evaporação	3	52.86404	17.62135	0.426577
Sem evaporação	3	62.42004	20.80668	17.50525

ANOVA

<i>Fonte de variação</i>	<i>SQ</i>	<i>gl</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>valor P</i>	<i>F crítico</i>
Entre grupos	15.21953	1	15.21953	1.697488	0.262559	7.708647
Dentro de grupos	35.86365	4	8.965913			
Total	51.08318	5				

Comunicações submetidas no âmbito desta tese

Santos C., Gonçalves A., Barroso M., Gallardo E., Determinação de pesticidas organofosforados em amostras biológicas por microextracção em seringa empacotada e cromatografia gasosa acoplado a espectrometria de massa em tandem (MEPS-GC-MS/MS), IX Annual CICS Symposium 2014, Universidade da Beira Interior (UBI), 30 Junho e 1 de Julho de 2014, Covilhã, Portugal.

Santos C., Gonçalves A., Gallardo E., Desenvolvimento e validação de uma metodologia para a determinação de pesticidas organofosforados em sangue por GC-MS/MS, I Conferencia Nacional de Medicina Legal. 30-31 Outubro 2014 (poster submetido).

Santos C., Gonçalves A., Barroso M., Gallardo E., Determination of organophosphorous pesticides in blood using microextraction in packet sorbent and gas chromatography tandem mass spectrometry, artigo submetido para Journal of Chromatography A.