



**NOVA**

NOVA SCHOOL OF  
SCIENCE & TECHNOLOGY

DEPARTAMENTO DE QUÍMICA

MARIANA ASCENSÃO SEQUEIRA ALBANO

Licenciada em Ciências de Engenharia Química e Bioquímica

IMPLEMENTAÇÃO E VALIDAÇÃO DE UM MÉTODO DE  
ENSAIO PARA ANÁLISE DE 17 $\beta$ -ESTRADIOL EM ÁGUAS  
POR UPLC-MS/MS

MESTRADO EM ENGENHARIA QUÍMICA E BIOQUÍMICA

Universidade NOVA de Lisboa

Novembro, 2021



# IMPLEMENTAÇÃO E VALIDAÇÃO DE UM MÉTODO DE ENSAIO PARA ANÁLISE DE 17 $\beta$ -ESTRADIOL EM ÁGUAS POR UPLC-MS/MS

MARIANA ASCENSÃO SEQUEIRA ALBANO

Licenciada em Ciências de Engenharia Química e Bioquímica

**Orientador:** Dr. Alexandre António Mourão Rodrigues,  
Técnico Superior de Laboratório, EPAL, S.A.

**Coorientador:** Professor Mário Fernando José Eusébio,  
Professor auxiliar, FCT NOVA

## Júri:

**Presidente:** Doutora Maria Madalena Alves Campos de Sousa  
Dionísio Andrade,  
Professora Associada com Agregação da FCT NOVA

**Arguente:** Doutor Marco Diogo Richter Gomes da Silva,  
Professor Associado com Agregação da FCT NOVA

**Orientador:** Doutor Alexandre António Mourão Rodrigues,  
Técnico Superior de Laboratório, EPAL, S.A.

MESTRADO EM ENGENHARIA QUÍMICA E BIOQUÍMICA

Universidade NOVA de Lisboa

Novembro, 2021



**Implementação e Validação de um Método de Ensaio para Análise de 17 $\beta$ -Estradiol em Águas por UPLC-MS/MS**

Copyright © Mariana Ascensão Sequeira Albano, NOVA School of Science and Technology | FCT NOVA

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



## Agradecimentos

A realização desta dissertação não teria sido possível sem a contribuição de inúmeras pessoas. A todas elas quero expressar a minha gratidão.

Em primeiro lugar, quero agradecer à Direção de Laboratórios da EPAL, em especial ao Eng.º Rui Neves Carneiro, por ter possibilitado a realização do estágio curricular nas suas instalações.

Ao Dr. Alexandre Rodrigues, o meu orientador no Laboratório de Química Orgânica da EPAL, quero agradecer por todos os conhecimentos transmitidos, pelo apoio e disponibilidade demonstrados, pela paciência e pela simpatia.

Ao professor Mário Eusébio, coorientador deste trabalho, quero agradecer pela disponibilidade, pelas sugestões e pelo sentido crítico.

À Andreia Videira, quero agradecer pela disponibilidade, simpatia e ajuda prestada na ausência do Dr. Alexandre.

Ao Dr. Vítor Cardoso, quero agradecer pela receção e pela disponibilidade.

Gostaria ainda de agradecer à Catarina Vitorino, à Cristina Correia, à Sofia Silva e à Raquel Franco pela receção, integração e simpatia.

Quero ainda agradecer à Gabriela e à Vânia Cristina pela disponibilidade no fornecimento do material necessário à realização deste trabalho.

Por fim, mas não menos importante, gostaria de agradecer à minha família e amigos próximos, em especial aos meus pais, ao meu irmão e ao meu namorado, por toda a motivação, compreensão, apoio e conselhos dados.



## Resumo

A realização desta dissertação teve como objetivo a implementação e validação de um método de ensaio para a análise de  $17\beta$ -estradiol, um desregulador endócrino, em águas destinadas ao consumo humano, de modo a cumprir o limite estipulado de 1 ng/L, pela Diretiva 2020/2184, e em águas superficiais e subterrâneas.

A metodologia analítica utilizada foi a cromatografia líquida de ultra eficiência associada à espectrometria de massa *tandem* (UPLC-MS/MS), com ionização por *Electrospray* no modo negativo, utilizando a extração em fase sólida (SPE) como técnica de preparação da amostra.

O desenvolvimento do método iniciou-se com a otimização das condições de formação do íon precursor e dos íões produto no espectrómetro de massa, de forma a definir duas transições MRM, a serem utilizadas na quantificação e identificação do analito. Após definidas as condições de monitorização, foram definidas as condições cromatográficas.

Na validação do método analítico, foram avaliados parâmetros como a linearidade da gama de trabalho (1,0 – 10  $\mu\text{g/L}$ ), precisão, exatidão, limiares analíticos, efeitos de matriz e estimativa da incerteza. O coeficiente de correlação da reta de calibração obtido foi superior a 0,995 e a linearidade foi comprovada através de testes estatísticos. Na precisão, em termos de repetibilidade e de precisão intermédia, os coeficientes de variação obtidos foram inferiores a 15%. Globalmente, a recuperação média obtida foi de 103,8% com um coeficiente de variação de 10,7%. O limite de quantificação do método obtido foi de 0,39 ng/L, o que permite o cumprimento do limite estipulado. Verificaram-se ainda efeitos de matriz significativos, logo o desenvolvimento foi efetuado através do método de padrão interno, com  $17\beta$ -estradiol- $\text{D}_5$ . A estimativa da incerteza expandida considerada, para esta metodologia, foi de 23,2%.

Conclui-se que foi possível validar o método desenvolvido e que este pode ser implementado em rotina no controlo da qualidade de águas.

**Palavras-chave:**  $17\beta$ -estradiol, desregulador endócrino, águas, SPE, UPLC-MS/MS, validação.



## Abstract

The purpose of this dissertation was to implement and validate an analytical method for the analysis of 17 $\beta$ -estradiol (an endocrine disruptor) in drinking water, in order to comply with the limit of 1 ng/L specified in the Directive 2020/2184, and in surface and groundwater.

The analytical methodology used was based on ultra performance liquid chromatography associated with tandem mass spectrometry (UPLC-MS/MS), that comprised Electrospray ionization in negative mode. Solid phase extraction (SPE) was used as sample preparation technique.

The work development started with the optimization of the mass spectrometer conditions to form the precursor ion and the product ions of 17 $\beta$ -estradiol, in order to define two MRM transitions, to be used in the quantification and identification of the analyte. After defining the monitoring conditions, the chromatographic conditions were defined.

Regarding the analytical method validation, parameters such as linearity of the working range (1.0 – 10  $\mu$ g/L), precision, accuracy, detection and quantification limits, matrix effects and uncertainty estimation were evaluated. The correlation coefficient of the calibration curve was greater than 0.995 and the linearity was proven through statistical tests. As for precision, in terms of repeatability and intermediate precision, the coefficients of variation obtained were less than 15%. Overall, the average recovery obtained was 103.8% with a coefficient of variation of 10.7%. The quantification limit of the method was 0.39 ng/L, which complies with the acceptance criteria. Significant matrix effects were detected, and consequently the method development was carried out using the internal standard method, with 17 $\beta$ -estradiol-D<sub>5</sub>. For this methodology, the expanded uncertainty estimate considered was 23.2%.

It was possible to conclude that the analytical method is valid and it can be implemented for routine control of 17 $\beta$ -estradiol in water samples.

**Keywords:** 17 $\beta$ -estradiol, endocrine disruptor, water, SPE, UPLC-MS/MS, validation.



# Índice

<b>Capítulo 1 – Introdução</b> .....	1
1.1. Motivação e Enquadramento .....	1
1.2. EPAL.....	3
1.3. Composto em Análise.....	4
1.3.1. Origem, destino e efeitos .....	5
1.4. Legislação.....	9
<b>Capítulo 2 – Metodologia Analítica</b> .....	11
2.1. Preparação da Amostra.....	13
2.1.1. Extração em Fase Sólida.....	13
2.2. Cromatografia .....	19
2.2.1 Princípios Teóricos.....	21
2.3 Cromatografia Líquida .....	24
2.3.1 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência.....	25
2.3.2 Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência.....	25
2.3.3 Constituintes do Sistema .....	27
2.4 Cromatografia Líquida associada a Espetrometria de Massa .....	31
2.4.1 Espetrometria de Massa .....	32
2.4.2 Efeitos de Matriz.....	37
2.4.2.1 Padrão Interno.....	39
<b>Capítulo 3 – Validação do Método Analítico</b> .....	41
3.1 Avaliação Indireta.....	41
3.1.1 Seletividade e Especificidade.....	41
3.1.2 Quantificação .....	42
3.1.2.1 Curva de Calibração .....	42
3.1.2.1.1 Linearidade .....	42
3.1.2.1.2 Gama de Trabalho.....	42
3.1.2.2 Limiares Analíticos.....	43
3.1.2.2.1 Limite de Detecção.....	43
3.1.2.2.2 Limite de Quantificação.....	43
3.1.2.3 Sensibilidade .....	44
3.1.3 Precisão.....	44
3.1.3.1 Repetibilidade.....	45
3.1.3.2 Precisão Intermédia .....	45

3.1.3.3 Reprodutibilidade .....	45
3.2 Avaliação Direta .....	46
3.2.1 Ensaios de Recuperação .....	46
3.3 Estimativa da Incerteza .....	46
<b>Capítulo 4 - Materiais e Métodos</b> .....	<b>49</b>
4.1 Equipamento e Material .....	49
4.1.1 Equipamento .....	49
4.1.2 Material .....	50
4.2 Reagentes .....	50
4.2.1 Gerais .....	50
4.2.2 Padrões Comerciais .....	50
4.3 Amostras .....	51
4.4 Preparação de Soluções .....	51
4.4.1 Solventes e Fase móvel .....	51
4.4.2 Soluções Padrão .....	51
4.4.2.1 Solução Padrão Primária de $\beta$ -Estradiol .....	51
4.4.2.2 Solução Padrão Intermédia I de $\beta$ -Estradiol .....	52
4.4.2.3 Solução Padrão Intermédia II de $\beta$ -Estradiol .....	52
4.4.2.4 Solução Padrão Intermédia III de $\beta$ -Estradiol .....	52
4.4.2.5 Solução Padrão Primária de $\beta$ -Estradiol-D <sub>5</sub> .....	52
4.4.2.6 Solução Padrão Intermédia I de $\beta$ -Estradiol-D <sub>5</sub> .....	52
4.4.2.7 Soluções Padrão de Calibração .....	53
4.4.2.8 Soluções Padrão para o Estudo de Linearidade do PI .....	53
4.4.2.9 Soluções para a Otimização das Condições de Operação do Espetrómetro de Massa .....	54
4.4.2.10 Solução Padrão de Fortificação para Ensaios de Recuperação .....	54
4.5 Condições do Espetrómetro de Massa .....	55
4.6 Condições Cromatográficas .....	56
4.7 Validação do Método de Ensaio .....	57
4.7.1 Estudo da Linearidade .....	57
4.7.2 Limiares Analíticos .....	58
4.7.3 Precisão .....	58
4.8 Condições de Preparação da Amostra .....	58
4.9 Ensaios de Recuperação .....	59
4.10 Efeitos de Matriz .....	60

---

<b>Capítulo 5 - Apresentação e Discussão dos Resultados</b> .....	61
5.1 Otimização das Condições do Espetrometro de Massa .....	61
5.2 Condições Cromatográficas.....	66
5.2.1 Estudo do Efeito da Temperatura da Coluna .....	69
5.2.2 Estudo do Efeito do Volume de Injeção .....	70
5.2.3 Estudo do Efeito do Gradiente de Eluição .....	71
5.3 Validação do Método de Ensaio.....	73
5.3.1 Estudos de Linearidade .....	73
5.3.2 Limiares Analíticos Instrumentais .....	77
5.3.3 Razão MRM1/MRM2 .....	78
5.3.4 Precisão.....	79
5.3.4.1 Repetibilidade .....	79
5.3.4.2 Precisão Intermédia .....	80
5.3.5 Estudo de Competição entre os Compostos .....	80
5.3.6 Estabilidade do Padrão Interno .....	81
5.3.7 Ensaio de Recuperação.....	81
5.3.8 Efeitos de Matriz.....	87
5.3.8.1 Estudo dos Efeitos de Matriz em Função do Fator de Concentração.....	89
5.3.8.2 Avaliação de Efeitos de Matriz provenientes do SPE.....	89
5.3.9 Avaliação das Perdas do Processo .....	90
5.4 Incerteza do Método.....	92
<b>Capítulo 6 - Conclusões e Perspetivas Futuras</b> .....	95
<b>Referências Bibliográficas</b> .....	99
<b>Anexo I - Método dos Mínimos Quadrados</b> .....	105
<b>Anexo II – Análise de Resíduos</b> .....	107
<b>Anexo III - Teste de Mandel</b> .....	109
<b>Anexo IV – Teste de RIKILT</b> .....	115
<b>Anexo V – Teste das Áreas Normalizadas</b> .....	117
<b>Anexo VI – Teste de Normalidade</b> .....	119
<b>Anexo VII – Teste de Homogeneidade de Variâncias</b> .....	125
<b>Anexo VIII – Limiares Analíticos</b> .....	129
<b>Anexo IX – Precisão</b> .....	131
<b>Anexo X – Incerteza Global do Método</b> .....	135



## Índice de Figuras

<b>Figura 1.1</b> - Estrutura molecular do estradiol.....	4
<b>Figura 1.2</b> - Esquema das fontes e destinos do estrogénio E2 no ambiente.....	7
<b>Figura 2.1</b> - Representação de um cartucho de SPE.....	16
<b>Figura 2.2</b> - Principais passos da SPE.....	17
<b>Figura 2.3</b> – Características dos solventes utilizados normalmente em SPE.....	18
<b>Figura 2.4</b> - (a) Esquema de separação de uma mistura de componentes A e B. (b) Sinal do detetor ao longo do tempo de eluição.....	20
<b>Figura 2.5</b> - Cromatograma típico para uma mistura de dois componentes.....	21
<b>Figura 2.6</b> - Contribuições ilustrativas de cada termo da equação de van Deemter.....	26
<b>Figura 2.7</b> - Curva de van Deemter para partículas de 10, 5, 3 e $\leq 2 \mu\text{m}$ .....	26
<b>Figura 2.8</b> - Componentes de um sistema de UPLC.....	27
<b>Figura 2.9</b> - Posições da válvula de injeção.....	29
<b>Figura 2.10</b> - Reação química de síntese da sílica híbrida de segunda geração.....	30
<b>Figura 2.11</b> - Representação esquemática do funcionamento da ionização por Electrospray.....	34
<b>Figura 2.12</b> - Representação esquemática de um quadrupolo.....	34
<b>Figura 2.13</b> - Representação esquemática de um triplo quadrupolo.....	35
<b>Figura 2.14</b> - Representação esquemática de um fotomultiplicador.....	37
<b>Figura 2.15</b> - Estrutura molecular do PI.....	40
<b>Figura 5.1</b> - Representação gráfica da variação da intensidade do sinal com a tensão no capilar.....	62
<b>Figura 5.2</b> - Representação gráfica da variação da intensidade do sinal com a voltagem de cone.....	62
<b>Figura 5.3</b> - Fragmentação proposta do ião precursor de estradiol.....	63
<b>Figura 5.4</b> - Fragmentação proposta do ião precursor de estradiol-D <sub>5</sub> .....	64
<b>Figura 5.5</b> - Representação gráfica da variação da intensidade do sinal com a energia de colisão.....	64
<b>Figura 5.6</b> - Espetro de massa do estradiol obtido no modo Daughter Scan.....	65
<b>Figura 5.7</b> - Espetro de massa do estradiol-D <sub>5</sub> obtido no modo Daughter Scan.....	66
<b>Figura 5.8</b> - Cromatogramas obtidos da injeção de uma solução padrão de estradiol.....	67
<b>Figura 5.9</b> - Cromatogramas obtidos da injeção de uma solução padrão de PI.....	68
<b>Figura 5.10</b> - Cromatogramas obtidos da injeção do solvente.....	69
<b>Figura 5.11</b> - Cromatogramas representativos do efeito da temperatura.....	70
<b>Figura 5.12</b> - Cromatogramas representativos do efeito do volume de injeção.....	71
<b>Figura 5.13</b> - Cromatogramas representativos do efeito da alteração do tempo do gradiente.....	72
<b>Figura 5.14</b> – Representação gráfica das retas de calibração.....	73
<b>Figura 5.15</b> - Representação gráfica da análise de resíduos.....	75

<b>Figura 5.16</b> - Representação gráfica do teste de RIKILT. ....	75
<b>Figura 5.17</b> - Representação gráfica do teste das áreas normalizadas. ....	76
<b>Figura 5.18</b> - Variabilidade da razão MRM1/MRM2 ao longo da gama de linearidade. ....	79
<b>Figura 5.19</b> - Estabilidade do PI ao longo do intervalo de linearidade. ....	81
<b>Figura 5.20</b> – Recuperações obtidas através dos métodos com e sem padrão interno. ....	82
<b>Figura 5.21</b> - Representação gráfica das recuperações médias obtidas e do coeficiente de variação por tipo de matriz e por nível de fortificação. ....	83
<b>Figura 5.22</b> - Representação gráfica de efeitos de matriz para amostras de água para consumo humano. ....	87
<b>Figura 5.23</b> - Representação gráfica de efeitos de matriz para amostras de água superficial. ....	88
<b>Figura 5.24</b> - Representação gráfica de efeitos de matriz para amostras de água subterrânea.....	88
<b>Figura 5.25</b> - Diagrama de causa-e-efeito para a variabilidade dos resultados obtidos. ....	93
<b>Figura III.1</b> - Representação gráfica dos ajustes linear e polinomial para E2 com PI. ....	110
<b>Figura III.2</b> - Representação gráfica dos ajustes linear e polinomial para E2 sem PI. ....	111
<b>Figura III.3</b> - Representação gráfica dos ajustes linear e polinomial para PI. ....	113
<b>Figura IX.1</b> - Resultados obtidos para o padrão de calibração P2, em condições de precisão intermédia. ....	133
<b>Figura IX.2</b> - Resultados obtidos para o padrão de calibração P8, em condições de precisão intermédia. ....	134

## Índice de Tabelas

<b>Tabela 1.1</b> - Propriedades físico-químicas do composto.....	5
<b>Tabela 1.2</b> - Concentrações de E2 produzidas e excretadas pelos seres humanos.....	6
<b>Tabela 1.3</b> - Concentrações médias ou gama de concentrações do E2 detetadas em vários países.....	8
<b>Tabela 2.1</b> - Dados de estudos para determinação de estrogénios em águas.....	12
<b>Tabela 2.2</b> - Resultados obtidos de estudos para determinação de estrogénios em águas.....	12
<b>Tabela 2.3</b> - Materiais adsorventes utilizados em fase reversa.....	15
<b>Tabela 2.4</b> - Modos de operação de um triplo quadrupolo.....	36
<b>Tabela 4.1</b> - Volumes pipetados e concentração para cada solução padrão de calibração.....	53
<b>Tabela 4.2</b> - Volumes pipetados e concentração para cada solução padrão de PI.....	54
<b>Tabela 4.3</b> - Condições previamente definidas para o espectrómetro de massa.....	55
<b>Tabela 4.4</b> - Condições cromatográficas utilizadas para a análise do analito.....	56
<b>Tabela 4.5</b> - Gradiente da fase móvel.....	56
<b>Tabela 4.6</b> - Condições inseridas no método criado no software para análise de estradiol.....	57
<b>Tabela 4.7</b> - Condições da técnica de SPE.....	58
<b>Tabela 4.8</b> - Condições do sistema de concentração sob corrente de azoto.....	59
<b>Tabela 5.1</b> - Resumo das condições ótimas para a obtenção do ião precursor e dos iões produto.....	66
<b>Tabela 5.2</b> - Gradientes utilizados para o estudo do efeito do gradiente.....	72
<b>Tabela 5.3</b> - Gama de trabalho, equação da reta, coeficiente de determinação e coeficiente de variação do método.....	74
<b>Tabela 5.4</b> - Resultados do teste de normalidade para valores da gama de trabalho.....	76
<b>Tabela 5.5</b> - Resultados da aplicação dos testes estatísticos.....	77
<b>Tabela 5.6</b> - Limiares analíticos obtidos com base na reta de calibração, em condições de repetibilidade e pela razão sinal/ruído.....	77
<b>Tabela 5.7</b> - Variabilidade da razão MRM1/MRM2 ao longo do intervalo de linearidade.....	78
<b>Tabela 5.8</b> - Estudo da precisão instrumental, em termos de repetibilidade.....	79
<b>Tabela 5.9</b> - Resultados obtidos para o estudo da precisão intermédia.....	80
<b>Tabela 5.10</b> - Média da área absoluta de estradiol e coeficiente de variação.....	80
<b>Tabela 5.11</b> - Amostras com presença de estradiol.....	82
<b>Tabela 5.12</b> - Recuperação média obtida na matriz de água para consumo humano.....	83
<b>Tabela 5.13</b> - Recuperação média obtida na matriz de água superficial.....	83
<b>Tabela 5.14</b> - Recuperação média obtida na matriz de água subterrânea.....	83
<b>Tabela 5.15</b> - Resultados do teste de normalidade para concentrações de fortificação.....	84
<b>Tabela 5.16</b> - Recuperação média, desvio padrão relativo e variância obtidos por nível de concentração.....	84

<b>Tabela 5.17</b> – Recuperações médias obtidas por tipo de matriz.....	85
<b>Tabela 5.18</b> - Resultados do teste de normalidade para cada matriz.....	85
<b>Tabela 5.19</b> - Recuperação média, desvio padrão relativo e variância obtidos por tipo de matriz para 1 ng/L.....	86
<b>Tabela 5.20</b> – Recuperação e CV globais do método.....	86
<b>Tabela 5.21</b> - Estimativa do limite de quantificação do método global.....	87
<b>Tabela 5.22</b> - Avaliação dos efeitos de matriz com o fator de concentração.....	89
<b>Tabela 5.23</b> - Avaliação do efeito de matriz associado às várias etapas do SPE.....	90
<b>Tabela 5.24</b> - Recuperações obtidas do processo completo.....	91
<b>Tabela 5.25</b> - Resultados das áreas e CV para a amostra fortificada após preparação e padrão de calibração.....	91
<b>Tabela 5.26</b> - Recuperações obtidas do processo sem o passo de extração.....	92
<b>Tabela 5.27</b> – Incerteza expandida do método pela abordagem bottom-up.....	92
<b>Tabela 5.28</b> – Incerteza expandida do método de acordo com a ISO 11352.....	93
<b>Tabela 5.29</b> – Incerteza expandida do método de acordo com o Guia Nordest.....	93
<b>Tabela II.1</b> - Desvios obtidos relativamente à concentração teórica, com o PI.....	107
<b>Tabela II.2</b> - Desvios obtidos relativamente à concentração teórica, sem o PI.....	108
<b>Tabela II.3</b> - Desvios obtidos relativamente à concentração teórica para o PI.....	108
<b>Tabela III.1</b> - Áreas calculadas para o ajuste linear e polinomial, para E2 com PI.....	110
<b>Tabela III.2</b> - Erros quadráticos obtidos para cada ajuste e respetivo desvio padrão residual para E2 com PI.....	110
<b>Tabela III.3</b> - Áreas calculadas para o ajuste linear e polinomial, para E2 sem PI.....	111
<b>Tabela III.4</b> - Erros quadráticos obtidos para cada ajuste e respetivo desvio padrão residual para E2 sem PI.....	112
<b>Tabela III.5</b> - Áreas calculadas para o ajuste linear e polinomial, para PI.....	112
<b>Tabela III.6</b> - Erros quadráticos obtidos para cada ajuste e respetivo desvio padrão residual para PI....	113
<b>Tabela IV.1</b> - Valores obtidos para as razões para E2 com PI.....	115
<b>Tabela IV.2</b> - Valores obtidos para as razões para E2 sem PI.....	116
<b>Tabela IV.3</b> - Valores obtidos para as razões para PI.....	116
<b>Tabela V.1</b> - Cálculo dos valores normalizados para E2 com PI.....	118
<b>Tabela V.2</b> - Cálculo dos valores normalizados para E2 sem PI.....	118
<b>Tabela V.3</b> - Cálculo dos valores normalizados para PI.....	118
<b>Tabela VI.1</b> - Resultados para a normalidade das concentrações de 1,0 e 10 µg/L (com PI).....	119
<b>Tabela VI.2</b> - Resultados para a normalidade das concentrações de 1,0 e 10 µg/L (sem PI).....	120
<b>Tabela VI.3</b> - Resultados para a normalidade das concentrações de 1,0 e 10 µg/L (PI).....	120
<b>Tabela VI.4</b> - Resultados para a normalidade das concentrações de 1, 2 e 3 ng/L.....	121

---

<b>Tabela VI.5</b> - Resultados para a normalidade de água para consumo humano.....	122
<b>Tabela VI.6</b> - Resultados para a normalidade de água superficial. ....	123
<b>Tabela VI.7</b> - Resultados para a normalidade de água subterrânea. ....	123
<b>Tabela VII.1</b> - Resultados obtidos para as duas concentrações estudadas, para E2 com PI. ....	126
<b>Tabela VII.2</b> - Resultados obtidos para as duas concentrações estudadas, para E2 sem PI. ....	126
<b>Tabela VII.3</b> - Resultados obtidos para as duas concentrações estudadas, para PI. ....	127
<b>Tabela VIII.1</b> - Desvio padrão residual, declive da reta e limiares analíticos. ....	129
<b>Tabela VIII.2</b> - Áreas e concentrações estimadas para o padrão de menor concentração (com PI). ....	129
<b>Tabela VIII.3</b> - Áreas e concentrações estimadas para o padrão de menor concentração (sem PI). ....	130
<b>Tabela VIII.4</b> - Razão sinal/ruído do padrão de menor concentração.....	130
<b>Tabela IX.1</b> - Precisão em termos de repetibilidade (estradiol - com PI). ....	131
<b>Tabela IX.2</b> - Precisão em termos de repetibilidade (estradiol - sem PI). ....	131
<b>Tabela IX.3</b> - Precisão em termos de repetibilidade (PI). ....	132



## Lista de Siglas, Acrónimos e Símbolos

AdP	Águas de Portugal
AdVT	Águas do Vale do Tejo
APCI	Ionização Química à Pressão Atmosférica ( <i>Atmospheric Pressure Chemical Ionization</i> )
API	Ionização à Pressão Atmosférica ( <i>Atmospheric Pressure Ionization</i> )
APPI	Fotoionização à Pressão Atmosférica ( <i>Atmospheric Pressure Photoionization</i> )
BEH	Tecnologia híbrida de pontes de etileno ( <i>Bridged Ethylene Hybrid</i> )
CAL	Companhia das Águas de Lisboa
CID	Dissociação Induzida por Colisão ( <i>Collision Induced Dissociation</i> )
CV	Coeficiente de Variação
dc	Corrente contínua ( <i>direct current</i> )
DL	Decreto-Lei
DQA	Diretiva Quadro da Água
EDCs	Desreguladores endócrinos ( <i>Endocrine-Disrupting Chemicals</i> )
EMA	Erro Máximo Admissível
EPAL	Empresa Portuguesa das Águas Livres
ESI	Ionização por <i>Electrospray</i> ( <i>Electrospray Ionization</i> )
ETA	Estação de Tratamento de Água
ETAR	Estação de Tratamento de Águas Residuais
FC	Fator de Concentração
GC	Cromatografia Gasosa ( <i>Gas Chromatography</i> )
HLB	Equilíbrio hidrofílico-lipofílico ( <i>Hydrophilic-Lipophilic Balance</i> )
HPLC	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência ( <i>High Performance Liquid Chromatography</i> )
HRT	Tratamentos de Reposição Hormonal ( <i>Hormone Replacement Therapy</i> )
LC	Cromatografia Líquida ( <i>Liquid Chromatography</i> )
LLE	Extração líquido-líquido ( <i>Liquid-Liquid Extraction</i> )
LOD	Limite de Detecção ( <i>Limit of Detection</i> )
LOQ	Limite de Quantificação ( <i>Limit of Quantification</i> )
MQL	Limite de Quantificação do Método ( <i>Method Quantification Limit</i> )
MRM	Monitorização de Reações Múltiplas ( <i>Multiple Reaction Monitoring</i> )
MRM1	Transição de quantificação
MRM2	Transição de confirmação
MS	Espectrometria de massa ( <i>Mass Spectrometry</i> )
MS/MS	Espectrometria de massa <i>tandem</i> ( <i>Tandem Mass Spectrometry</i> )
m/z	Razão massa/carga
PI	Padrão Interno
RF	Radiofrequência
RSD	Desvio padrão relativo ( <i>Relative Standard Deviation</i> )
SIM	Monitorização Seletiva de Iões ( <i>Selected Ion Monitoring</i> )

SPE	Extração em fase sólida ( <i>Solid Phase Extraction</i> )
UPLC	Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência ( <i>Ultra Performance Liquid Chromatography</i> )
$a$	Ordenada na origem
$A_i$	Área de um dado pico
$b$	Declive da reta de calibração
$C_a$	Concentração experimental do composto na amostra
$C_i$	Concentração correspondente a um dado pico
$C_T$	Concentração teórica do composto
$D_{\text{crítico}}$	Valor tabelado do teste de normalidade de Kolmogorov-Smirnov
$d_p$	Tamanho da partícula ( $\mu\text{m}$ )
E1	Estrona
E2	17 $\beta$ -estradiol/ $\beta$ -estradiol/ estradiol
E3	Estriol
F	Valor tabelado da distribuição de Fisher-Snedecor
$F_0$	Distribuição Normal cumulativa
$H$	Altura de um prato teórico
$k$	Fator de expansão
$k$	Fator de retenção
$K_C$	Coefficiente de partição
$K_{ow}$	Coefficiente de partição octanol-água
$L$	Comprimento da coluna cromatográfica (mm)
$N$	Número de pratos teóricos
$n$	Número de medições
P	Pressão
PG	Valor de teste (homogeneidade de variâncias)
pKa	Cologaritmo da constante de dissociação ácida
Q	Quadrupolo
R	Coefficiente de correlação da reta
$R^2$	Coefficiente de determinação da reta
$R_s$	Resolução cromatográfica
S	Sensibilidade
$s$	Desvio padrão
$s^2$	Variância
Sw	Solubilidade da água
$S_{x_0}$	Desvio padrão de várias leituras do branco
$S_{y/x}$	Desvio padrão residual da reta de calibração
$t_{\text{crítico}}$	Valor tabelado da distribuição t de Student
$t_M$	Tempo morto (min)
$t_R$	Tempo de retenção (min)
$t_S$	Tempo de retenção na fase estacionária (min)

U	Incerteza expandida (%)
$u$	Velocidade linear da fase móvel
$u_c$	Incerteza combinada (%)
$u_{CPI}$	Incerteza associada à concentração do padrão interno
$u_{exatidão}$	Incerteza associada à exatidão
$u_{p_{cal}}$	Incerteza associada à preparação de padrões de calibração
$u_{precisão}$	Incerteza associada à precisão intermédia
$u_{reta}$	Incerteza associada à interpolação da reta de calibração
VT	Valor de teste
W	Largura do pico na base
$W_{1/2}$	Largura do pico a meia altura
$\bar{x}$	Média aritmética do número de medições
$x_i$	Valor individual de uma medição
$y_i$	Valor individual do sinal instrumental
$\alpha$	Fator de seletividade
$\Delta C$	Variação da concentração
$\Delta L$	Variação do sinal de resposta
$\eta$	Viscosidade da fase móvel
$\Phi$	Resistência ao fluxo



# Capítulo 1 – Introdução

## 1.1. Motivação e Enquadramento

A água potável é definida como a água que é adequada para o consumo humano, ou seja utilizada para beber, cozinhar ou para higiene pessoal. Esta é classificada como segura se não contiver toxinas, substâncias cancerígenas, microrganismos patogénicos ou não causar outros riscos associados à saúde <sup>[1]</sup>.

A água doce é a fonte da água que bebemos, contudo esta representa menos do que 3% da água total do nosso planeta, sendo que a água que usamos representa menos do que 1%, uma vez que a maior parte se encontra em calotes de gelo, glaciares ou no subsolo. Assim, a água potável provém de águas superficiais, como rios, lagos e lagoas, e de águas subterrâneas <sup>[2]</sup>.

Um dos problemas mais comuns, que preocupa pessoas em todo o mundo, é o acesso a água potável e saneamento, que são reconhecidos, pela Organização das Nações Unidas, como direitos humanos. O direito à água diz que todas as pessoas devem ter acesso a água suficiente, segura, aceitável, fisicamente acessível e barata para uso pessoal e doméstico <sup>[3,4]</sup>.

A água é um recurso natural finito, sendo que a sua escassez tem vindo a aumentar, devido ao crescimento da população mundial e devido à procura do setor industrial e doméstico das economias emergentes. Como esta é indispensável à sobrevivência do Homem e dos ecossistemas, a sua preservação é muito importante <sup>[5,6]</sup>.

Apesar da maior parte da água ser tratada antes de entrar nas nossas casas, os custos associados a esses tratamentos e os riscos para a saúde podem ser reduzidos, se as fontes de água potável forem protegidas de contaminações. Porém, a contaminação surge, muitas vezes, de atividades quotidianas <sup>[7,8]</sup>.

A qualidade da água para consumo é um indicador essencial para avaliar o nível de desenvolvimento de um país e o bem-estar da sua população. A avaliação de diversos parâmetros físicos, químicos e biológicos é fulcral para verificar que os valores se encontram dentro das referências definidas pela legislação, de modo a permitir e encorajar as pessoas a beberem água da torneira <sup>[9-11]</sup>.

Considera-se que inúmeras substâncias químicas podem introduzir-se no ambiente, sendo que muitas delas em pequenas quantidades, na ordem dos nanogramas por litro (ng/L) e dos microgramas por litro (µg/L). Contudo, muitos destes compostos não estão incluídos como poluentes na legislação <sup>[12,13]</sup>.

Existe uma preocupação crescente com compostos presentes no meio ambiente que podem interferir com o sistema endócrino de humanos e de outros animais e provocar efeitos adversos. Estas substâncias são chamadas de desreguladores endócrinos (EDCs) [13].

Um desregulador endócrino pode ser definido como uma substância ou mistura exógena que altera uma ou várias funções do sistema endócrino e, conseqüentemente, causa efeitos adversos na saúde de um organismo intacto, ou na sua descendência, ou (sub)populações. Estas substâncias podem ser naturais, como por exemplo as hormonas esteroides, ou sintéticas, como por exemplo alguns pesticidas [14,15].

Os EDCs podem atuar através da mimetização ou antagonização de hormonas endógenas, da alteração do modelo de síntese ou metabolismo das hormonas, ou da modificação dos níveis de recetores hormonais. Assim, estes podem interferir com a reprodução e o desenvolvimento [16].

Os estrogénios são uma classe de hormonas esteroides que são, maioritariamente, produzidos pelas glândulas suprarrenais e pelos ovários, e são responsáveis pelo desenvolvimento e regulação do sistema reprodutivo feminino e das características sexuais secundárias [17,18]. As hormonas incluídas nesta classe são o  $\beta$ -estradiol (E2) e os seus metabolitos, a estrona (E1) e o estriol (E3), que são regularmente excretados, por humanos e animais, através da urina e das fezes [19,20].

A principal fonte destas hormonas são as estações de tratamento de águas residuais, uma vez que estas não são completamente removidas pelos processos de tratamento, portanto são descarregadas continuamente para o meio ambiente, principalmente para águas superficiais. Devido à possibilidade de desregulação endócrina, tanto em humanos como em animais, o teor de estrogénios presente nas águas superficiais é importante, pois estas são uma fonte de água potável [12,21]. Os estrogénios também podem entrar no ambiente devido a escoamentos agrícolas para as águas recetoras [22].

Vários estudos demonstraram que a presença de hormonas estrogénicas na água provoca feminização dos peixes. Para além disso, provocam modificações na reprodução e no comportamento sexual, redução da fertilidade, desequilíbrio na proporção sexual, assim como alteração de outras características reprodutivas [16,18,24,25,27].

A observação dos riscos para a saúde de organismos aquáticos, associados à exposição a hormonas estrogénicas, levantou questões para os possíveis efeitos no Homem [23].

Os estrogénios exógenos têm sido associados ao aumento do cancro da mama e do cancro da próstata, apesar de a relação de causa-efeito ainda ser discutida [25,27,28].

O E2 é a hormona estrogénica natural mais abundante e mais potente, que pode causar disrupção endócrina a concentrações muito baixas, daí merecer especial atenção [23,26].

Na Diretiva 2020/2184 do Parlamento Europeu e do Conselho, de 16 de dezembro, foi estabelecido um valor paramétrico de referência de 1 ng/L para o composto 17 $\beta$ -estradiol, em águas para consumo humano. Até 12 de janeiro de 2022 será estabelecida uma primeira lista de vigilância de substâncias presentes em águas para consumo humano, da qual o estradiol irá fazer parte <sup>[33]</sup>.

O presente estudo tem como objetivo a implementação e validação de um método de monitorização do  $\beta$ -estradiol em águas, de acordo com o valor de referência acima indicado.

## 1.2. EPAL

A EPAL – Empresa Portuguesa das Águas Livres, S.A., é uma sociedade anónima de capitais inteiramente públicos que é detida a 100% pela AdP – Águas de Portugal, SGPS, S.A., integrando o Grupo Águas de Portugal. Foi fundada em 1868, sendo que, na altura, se denominava de CAL – Companhia das Águas de Lisboa. Até 1935, a área de intervenção da EPAL estava circunscrita ao abastecimento e distribuição de água no concelho de Lisboa. A partir desse ano, a sua área de intervenção aumentou, passando a abastecer em alta diversos municípios.

Atualmente, a EPAL partilha a concessão da exploração e da gestão do Sistema Municipal de Abastecimento de Água e de Saneamento de Lisboa com as Águas do Vale do Tejo - AdVT - sendo responsáveis pela captação, produção, transporte e distribuição de água para consumo humano a 3,5 milhões de habitantes, em 87 municípios, que ocupam 33% do território continental português. Tendo em conta a sua área de intervenção e o número de consumidores, a EPAL apresenta uma captação de água anual de cerca de 219,5 milhões de metros cúbicos.

O sistema de captação de água tem origem superficial e subterrânea. Existem duas captações superficiais, na Albufeira de Castelo do Bode (rio Zêzere) e em Valada Tejo (rio Tejo), sendo que o subsistema de Castelo de Bode é o mais importante, pois representa 75% da capacidade de produção. Já as captações subterrâneas dizem respeito aos poços de Lezírias, Ota e Alenquer. Toda a água captada necessita de ser tratada antes da sua distribuição, para tal, a EPAL possui duas Estações de Tratamento de Água (ETA), a da Asseiceira e a do Vale da Pedra.

A EPAL possui também dois laboratórios de Controlo da Qualidade da Água, um localizado em Lisboa, onde foi desenvolvido o presente estudo, onde se realiza o controlo analítico das águas captadas, tratadas, aduzidas e distribuídas pelo sistema, e outro localizado em Vale da Pedra, onde se realiza o controlo operacional de tratamento da ETA. Os laboratórios encontram-se acreditados de acordo com a norma NP ISO/IEC 17025 – “Requisitos gerais de compe-

tência para laboratórios de ensaio e calibração”. A acreditação permite que sejam analisados 110 parâmetros da qualidade da água, o que corresponde a 198 compostos, através de 135 métodos analíticos.

O objetivo do controlo é garantir a qualidade da água, desde os recursos hídricos até à torneira do consumidor. A Direção de Laboratórios (LAB) é responsável pela conceção, implementação e gestão do Plano de Controlo da Qualidade da Água no Sistema de Abastecimento da EPAL (PCQA). O PCQA tem dois objetivos fundamentais, assegurar que certos parâmetros se encontram dentro dos limites estabelecidos pela legislação em vigor (controlo legal) e efetuar um controlo operacional que permita detetar possíveis anomalias, ocasionais ou sistemáticas, na qualidade da água, de modo a permitir a implementação de medidas preventivas eficazes.

Por forma a garantir a máxima qualidade da água fornecida, a EPAL efetua, anualmente, mais de 300 mil análises, apresentando mais de 99% de conformidade com os parâmetros legislados. Para além disso, controla ainda outros parâmetros que não são obrigatórios e realiza um número de análises superior ao estabelecido na legislação de forma a garantir o fornecimento de uma água de qualidade ao consumidor final [34].

### 1.3. Composto em Análise

O composto em estudo, o 17 $\beta$ -estradiol, também denominado por  $\beta$ -estradiol ou E2, pertence à família das hormonas esteroides, mais especificamente aos estrogénios, sendo produzido naturalmente pelo organismo a partir do colesterol. Os estrogénios naturais são muito importantes para a saúde humana, mas, quando libertados para o ambiente, podem provocar disrupção endócrina na escala dos ng/L [18,19,26].

Na Figura 1.1 observa-se a estrutura molecular do 17 $\beta$ -estradiol. Esta consiste em três anéis hexagonais (A,B,C) e um anel pentagonal (D), sendo que o anel A é fenólico. Para além disso, possui grupos hidroxilo nas posições 3 e 17, dos quais, o grupo presente na posição 17 se situa acima do plano da molécula, isto é, na posição “ $\beta$ ” [24].

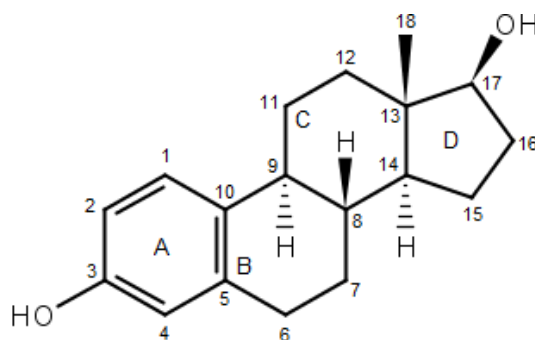


Figura 1.1 - Estrutura molecular do estradiol.

As propriedades físico-químicas do  $\beta$ -estradiol encontram-se representadas na Tabela 1.1.

**Tabela 1.1** - Propriedades físico-químicas do composto.

Propriedades físico-químicas	$\beta$ -estradiol
Fórmula molecular	$C_{18}H_{24}O_2$
Número CAS	50-28-2
Massa molar (g/mol)	272,38
Solubilidade na água, $S_w$ , a 20°C (mg/L)	13 <sup>[38]</sup>
Coefficiente de partição, $\log K_{ow}$	3,1 – 4,0 <sup>[18]</sup>
Cologaritmo da constante de acidez, $pK_{a1}$	10,5 – 10,7 <sup>[18]</sup>
Pressão de vapor (mm Hg)	$2,3 \times 10^{-10}$ <sup>[38]</sup>

Propriedades físico-químicas como a solubilidade na água e o coeficiente de partição são cruciais para entender o destino das substâncias no ambiente.

O  $K_{ow}$  é a razão de concentração de um composto orgânico entre octanol e água, no equilíbrio. Os valores de  $K_{ow}$  são usados para medir a lipofilicidade e correlacionam-se inversamente com a solubilidade. Assim, com o aumento da lipofilicidade, os valores de  $\log K_{ow}$  também aumentam, o que significa que o composto tem maior tendência para se associar com matéria orgânica sólida. Um valor abaixo de 2,5 demonstra que existe pouco potencial de sorção, já um valor acima de 4 demonstra que existe um grande potencial de sorção. O estradiol é relativamente lipofílico, portanto é moderadamente solúvel em água <sup>[24,36]</sup>.

O elevado valor de  $pK_a$  indica que o  $\beta$ -estradiol é um ácido fraco. Este parâmetro permite analisar o grau de ionização do composto, sendo que este varia com o pH. Para um pH superior ao  $pK_a$  ocorre dissociação e o composto fica carregado negativamente (no grupo hidroxilo na posição 3 da Figura 1.1). Já a pressão de vapor, indica que o composto não é volátil <sup>[25,27]</sup>.

### 1.3.1. Origem, destino e efeitos

Todos os seres humanos, bem como os animais podem excretar hormonas esteroides, que entram no meio ambiente através de descarga pelo esgoto ou eliminação de resíduos animais. Contudo, pensa-se que a excreção humana é a principal causa das elevadas concentrações no ambiente <sup>[18,39]</sup>.

Em mulheres, durante os anos reprodutivos, o  $\beta$ -estradiol é o estrogénio mais produzido. Já durante a menopausa, os ovários deixam de produzir E2, sendo que, no período seguinte, a sua produção decresce substancialmente e passa a ser constante. Assim, o E2 é o estrogénio mais importante desde a menarca até à menopausa <sup>[18]</sup>.

Para além de ser produzido naturalmente pelo organismo, o estradiol é utilizado como princípio ativo em Tratamentos de Reposição Hormonal (HRT), de modo a atenuar os sintomas da menopausa [24,43]. As hormonas esteroides são também utilizadas em animais cujo propósito é produzir carne, uma vez que induzem o crescimento, logo o E2 pode encontrar-se em alimentos e bebidas de origem animal [18,24].

O estradiol é excretado pelo corpo humano, maioritariamente pela urina (95%), nas suas formas conjugadas biologicamente inativas de sulfato e de glicuronídeo, todavia as formas conjugadas biotransformam-se facilmente na forma livre, que é biologicamente ativa. O processo de clivagem ainda não está bem estudado, sendo que uma hipótese é que os responsáveis são microrganismos, como por exemplo a bactéria *Escherichia coli*. Quando comparadas com a forma não conjugada, as formas conjugadas têm pouca atividade estrogénica. Sabe-se que a conjugação pode ocorrer na posição C<sub>3</sub>, na posição C<sub>17</sub> ou em ambas [18,26,35,36,40-42].

A excreção de estrogénios varia de acordo com o sexo, com a fase de desenvolvimento e com o estado fisiológico, tendo as mulheres grávidas e as mulheres férteis uma maior contribuição [25].

Uma mulher excreta cerca de 5 µg/dia de 17β-estradiol na urina. Durante a gravidez, a excreção diária é cerca de 308 µg. Por outro lado, os homens segregam 1,5 µg/dia [18,25,36].

Nas fezes, as mulheres férteis e as mulheres grávidas excretam 0,2 e 202 µg/dia de E2, respetivamente [25].

Os valores de β-estradiol, aproximadamente, produzidos e excretados pela urina diariamente encontram-se na Tabela 1.2 [18,36].

**Tabela 1.2** - Concentrações de E2 produzidas e excretadas pelos seres humanos.

População	Quantidade produzida (µg/dia)	Quantidade excretada na urina (µg/dia)
Mulheres (antes da puberdade)	13	-
Mulheres (durante o ciclo)	82 - 695	0,3 - 5
Homens (antes da puberdade)	6,5	-
Homens	48	1,5

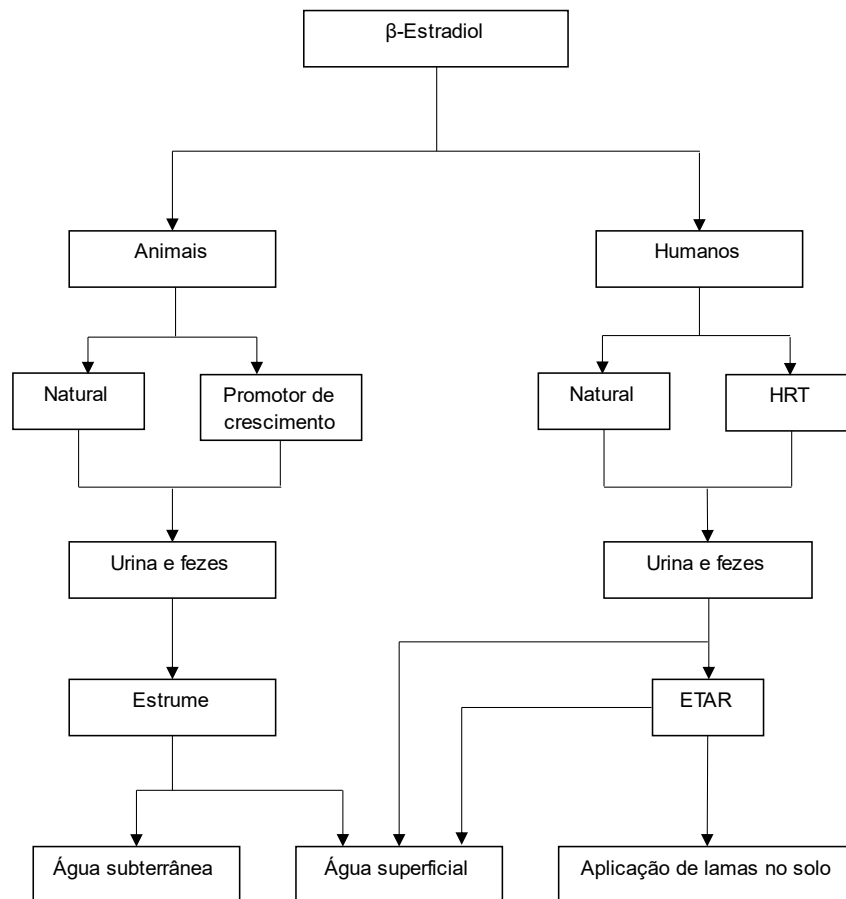
Nos animais, a excreção diária varia também de acordo com a espécie, o sexo, a idade, o ciclo circadiano e o estado reprodutivo. Nos bovinos e nas ovelhas, os estrogénios são maioritariamente excretados pelas fezes, 50-70% e 96%, respetivamente. Enquanto, nos porcos e nas aves são principalmente segregados pela urina, 90-96% e 69%, respetivamente.

Tal como nos humanos, a excreção de hormonas é maior quando relacionada com a reprodução. É difícil estimar a quantidade de estrogénios que é excretada pelos animais para o

meio ambiente, uma vez que os dados que dizem respeito a esses níveis são obtidos, maioritariamente, a partir de estudos focados no ciclo hormonal de fêmeas e animais maduros para fins de reprodução, o que não representa o cenário completo [41]. Portanto, as hormonas podem ser libertadas diretamente através da urina e das fezes dos animais ou, indiretamente, através da aplicação de estrume como fertilizante dos terrenos agrícolas [27,41].

Os estrogénios têm sido detetados em afluentes e efluentes, em particular, no solo e corpos de água em regiões perto de Estações de Tratamento de Águas Residuais (ETARs) e estrume animal. As hormonas podem ser encontradas em águas subterrâneas, em águas superficiais, em águas do solo e em águas de escoamento agrícola [27].

A Figura 1.2. representa um esquema das fontes e destinos do estradiol no ambiente.



**Figura 1.2** - Esquema das fontes e destinos do estrogénio E2 no ambiente (adaptado de [23]).

Uma das principais fontes de contaminação das águas, através da presença de E2, são as ETARs, uma vez que os estrogénios não são completamente removidos ou degradados através de processos biológicos. Devido à eliminação incompleta, o β-estradiol é descarregado

em águas recetoras, como por exemplo rios, o que faz com que o efluente seja indiretamente reutilizado [22,37].

A Tabela 1.3 apresenta várias concentrações médias ou gamas de concentrações do composto detetadas no meio ambiente em diversos países [13,44].

**Tabela 1.3** - Concentrações médias ou gama de concentrações do E2 detetadas em vários países.

Substância	Concentração no ambiente (ng/L)	Condições	País	Referência
17 $\beta$ -Estradiol	4,4 – 10,1	Água superficial	Portugal	[44]
	1,2 – 10,8	Água superficial		
	5,2 – 5,7	Água superficial		
	15	Esgoto doméstico	Alemanha	[13]
	0,15 – 5,2	Efluente de ETAR		
	0,15 – 3,6	Água superficial		
	0,2 – 2	Água potável		
	<0,6 – 12	Efluente de ETAR	Países Baixos	
	<0,3 – 5,5	Água superficial	França	
	11 – 17	Afluente de ETAR		
	5 – 9	Efluente de ETAR		
	1 – 3	Água superficial	Inglaterra	
	2,7 – 48	Efluente de ETAR		
	0,5 – 7	Água superficial	Itália	
	1,6 – 7,4	Efluente de ETAR		
	10 – 31	Afluente de ETAR		
	3 – 8	Efluente de ETAR	Itália e Holanda	
	2 – 6	Água superficial		
	<0,5 – 20	Esgoto doméstico	Suécia	
	<0,5 – 7	Efluente de ETAR		
	1,1	Esgoto doméstico	Estados Unidos da América	
0,5	Efluente de ETAR			
0,27 – 2,67	Água superficial	Canadá		
0,48 – 3,66	Efluente de ETAR			
6	Efluente de ETAR	Brasil		
21	Esgoto doméstico			

A exposição ao  $\beta$ -estradiol por organismos aquáticos demonstrou provocar efeitos adversos, mesmo em concentrações muito pequenas. A evidência mais reportada diz respeito à feminização dos peixes macho. Verificou-se que estes produziam vitelogenina (uma proteína plasmática específica do sexo feminino), apresentavam gónadas de ambos os sexos, uma diminuição nas características sexuais masculinas, uma contagem reduzida de espermatozoi-

des e uma diminuição do comportamento sexual. Além disso, também se observou uma redução na produção e eclosão de ovos, um desequilíbrio na proporção sexual e uma redução na fertilidade <sup>[16,18]</sup>.

Os estrogénios são essenciais para a fisiologia humana normal, contudo tornam-se um problema se acumularem no meio ambiente e entrarem na cadeia alimentar. Alguns estudos demonstraram que a exposição ao estradiol em crianças, em pré-puberdade e na puberdade, pode provocar um crescimento excessivamente rápido, puberdade precoce em mulheres e puberdade tardia em homens. Este composto também pode interferir na produção de esperma, afetar a fertilidade masculina e aumentar a incidência de cancro da mama, cancro testicular e cancro da próstata <sup>[18,25,27]</sup>.

Assim, tendo em conta os riscos que os estrogénios, mais especificamente o estradiol, por ser o mais potente, apresentam para a saúde humana e animal, a sua monitorização é de extrema importância <sup>[25]</sup>.

## 1.4. Legislação

Tendo em conta a importância da água, foi necessário estabelecer normas de qualidade, através da elaboração de Diretivas pelo Parlamento Europeu e pelo Conselho, que devem ser satisfeitas pelos Estados-Membros da União Europeia, para que seja feito um esforço conjunto na recuperação e preservação ambiental dos recursos hídricos.

Em setembro de 2000 foi adotada a Diretiva 2000/60/CE do Parlamento Europeu e do Conselho, de 23 de outubro, com o nome Diretiva Quadro da Água (DQA). A DQA é o principal instrumento da Política da União Europeia relativa à água, estabelecendo uma estrutura para a proteção e utilização sustentável das águas de superfície e subterrâneas no espaço comunitário, através de uma abordagem e de objetivos comuns e coordenados entre si <sup>[45-47]</sup>.

A 31 de janeiro de 2012, foi elaborada uma proposta de diretiva, COM(2011)876, que pretendia alterar as Diretivas 2000/60/CE e 2008/105/CE no que respeita às substâncias prioritárias no domínio da política da água. Esta proposta mencionava o  $\beta$ -estradiol como uma substância prioritária, estabelecendo-se uma norma de qualidade ambiental expressa em valor médio anual, tanto para águas de superfície interiores como para outras águas de superfície, cujos valores definidos foram de 0,4 ng/L e 0,8 ng/L, respetivamente <sup>[47,48]</sup>.

A 12 de agosto de 2013, a União Europeia emitiu a Diretiva 2013/39/UE do Parlamento Europeu e do Conselho, aprovando a inclusão de 12 das 15 substâncias propostas no documento COM(2011)876. O  $17\beta$ -estradiol foi uma das substâncias que ficaram excluídas, portanto não foram definidos valores limite, porém este composto foi inserido numa lista de vigilância. Esta lista foi criada com o intuito de recolher mais dados de monitorização, de modo a estabe-

lecer o risco que a substância apresenta para o ambiente e recolher dados para definir futuras prioridades [29,30,49].

Na Decisão de Execução (UE) 2015/495 da Comissão, de 20 de março, foram estabelecidas as 10 substâncias a monitorizar, bem como os limites de deteção máximos aceitáveis, sendo que o limite estabelecido para o E2 foi de 0,4 ng/L [32].

Em 2018, a lista de vigilância foi atualizada através da Decisão de Execução (UE) 2018/840 da Comissão, de 5 de junho. Contudo o composto permaneceu na lista, devido às recuperações e aos efeitos de matriz obtidos, que não permitiram atingir a sensibilidade desejada [26,50,51].

Como o período máximo de monitorização contínua de uma substância não pode exceder os 4 anos, a obrigatoriedade de monitorização cessou em 2019, de acordo com a Decisão de Execução (UE) 2020/1161 da Comissão, de 4 de agosto. Assim, o  $\beta$ -estradiol já não se encontra na lista de substâncias prioritárias em águas de superfície, sendo que, até ao momento, nenhum valor paramétrico foi definido [31].

Mais recentemente, na Diretiva 2020/2184 do Parlamento Europeu e do Conselho, de 16 de dezembro, relativa à qualidade da água destinada ao consumo humano, o 17 $\beta$ -estradiol, por ser um EDC representativo, foi considerado como uma referência para avaliar a ocorrência de desreguladores endócrinos e a sua eficácia de tratamento sempre que necessário. Assim, foi estabelecido um valor de referência de 1 ng/L em águas para consumo humano. Esta diretiva entrou em vigor a 12 de janeiro de 2021 [33,52].

Tendo em conta a Diretiva supramencionada, será estabelecida uma primeira lista de vigilância de substâncias presentes em água para consumo, até 12 de janeiro de 2022, na qual o estradiol será incluído, devido às suas propriedades de desregulador endócrino e ao risco que representa para a saúde humana [33].

Portanto, o Decreto-Lei n.º 152/2017, de 7 de dezembro, atualmente em vigor, relativo à qualidade da água para consumo humano, não menciona nenhum valor limite para o  $\beta$ -estradiol, porém este composto já é monitorizado pela EPAL com um limite de quantificação de 50 ng/L [53].

## Capítulo 2 – Metodologia Analítica

Desde o início dos estudos da Química que os métodos analíticos têm sido muito importantes como forma de determinar que compostos estão presentes numa amostra [54].

A melhoria de métodos analíticos existentes ou o desenvolvimento de novos métodos advém do facto de ser necessário trabalhar com pequenas quantidades de amostra, com materiais mais complexos, com processos que ocorrem em períodos mais curtos e com compostos presentes em concentrações mais baixas [54].

A monitorização do  $\beta$ -estradiol em águas é um desafio devido à baixa concentração do analito e à complexidade da matriz. A maioria dos métodos utilizados para a determinação de estrogénios em amostras aquosas, requerem um passo de extração e pré-concentração, tais como Extração em Fase Sólida (SPE), Extração Líquido-Líquido (LLE) e Microextração em Fase Sólida (SPME) [38,55].

Os métodos de deteção de estrogénios em águas podem ser de três tipos: análises químicas, imunoensaios e bioensaios. A deteção química pode ser dividida em técnicas cromatográficas e ensaios eletroquímicos. As técnicas cromatográficas incluem, essencialmente, a combinação de cromatografia com espetrometria de massa, como por exemplo a cromatografia líquida de ultra eficiência acoplada a espetrometria de massa *tandem* (UPLC-MS/MS). Os imunoensaios dizem respeito a radioimunoensaios e a ensaios de imunoabsorção enzimática. Os bioensaios são divididos em ensaios *in vitro* e ensaios *in vivo* [38].

O procedimento mais utilizado para detetar e quantificar estrogénios em amostras ambientais inclui o passo de extração em fase sólida, seguido por técnicas instrumentais baseadas em cromatografia líquida, normalmente acoplada a espetrometria de massa [12,40,55].

Nas Tabelas 2.1 e 2.2, apresentam-se alguns estudos realizados em diferentes matrizes, incluindo as técnicas utilizadas e os resultados obtidos.

**Tabela 2.1 - Dados de estudos para determinação de estrogénios em águas.**

Estudo	Matriz	Método Analítico	Equipamento	Coluna	Preparação da amostra	Fator de concentração
Ripollés <i>et. al.</i> , 2014 [28]	Água superficial	UPLC-(ESI-)MS/MS (com PI - E2-D <sub>4</sub> )	Waters ACQUITY UPLC com Xevo TQ-S triple quadrupole mass spectrometer	UPLC BEH C18 (100 x 2,1 mm, 1,7 µm)	SPE (cartucho Oasis HLB, 6 mL, 200 mg)	500
Fu <i>et. al.</i> , 2016 [107]	Água para consumo humano	HPLC-(ESI-)MS/MS (com PI - <sup>13</sup> C <sub>6</sub> -estradiol)	Agilent 1290 Infinity LC com Agilent 6460 Triple Quadrupole LC/MS	Agilent InfinityLab Poroshell HPH-C18, 3,0 x 100 mm, 2,7 µm	SPE (disco SPEC 47 mm C18AR)	1000
Wu <i>et. al.</i> , 2019 [20]	Água para consumo humano, água superficial e água pluvial	UHPLC-(ESI-)MS/MS	PerkinElmer QSight LX50 UHPLC system com PerkinElmer QSight 420 triple quadrupole mass spectrometer	Bownlee, SPP C18, 50 x 3 mm, 2,7 µm	-	-
Pedrouzo <i>et. al.</i> , 2009 [108]	Água superficial	HPLC-(ESI-)MS/MS	Agilent Technologies HP1200 series LC-triple quadrupole mass spectrometer	Kromasil 100 C18 (25,0 cm x 0,46 cm, 5 µm)	SPE (cartucho Oasis HLB, 12 mL, 500 mg)	500
Kumar <i>et. al.</i> , 2009 [35]	Água superficial	UPLC-(ESI-)MS/MS (com PI - E2-D <sub>3</sub> )	Waters ACQUITY UPLC com Micromass Quattro Premier tandem MS	UPLC BEH C8 (100 x 2,1 mm, 1,7 µm)	SPE (cartucho Oasis HLB, 200 mg, 6 mL)	1000
Tavazzi <i>et. al.</i> , 2016 [39]	Água superficial	UPLC-(ESI-)MS/MS (com PI - <sup>13</sup> C <sub>2</sub> -estradiol)	Waters ACQUITY UPLC com SCIEX QTRAP 5500	UPLC BEH C18 (50 x 2,1 mm, 1,7 µm)	SPE (cartucho Oasis HLB, 200 mg, 6 mL)	2000

**Tabela 2.2 - Resultados obtidos de estudos para determinação de estrogénios em águas.**

Estudo	Transições MRM	Tempo de retenção (min)	Intervalo de linearidade (µg/L)	Recuperação (CV) (%)	Efeitos de Matriz (%)	LOQ (ng/L)	LOD (ng/L)
Ripollés <i>et. al.</i> , 2014 [28]	270,9→144,9; 270,9→182,9; 270,9→238,9	4,49	0,01 - 5	99 (11,1) [0,1 ng/L] 106 (1,89) [1 ng/L]	50	0,2*	0,06
Fu <i>et. al.</i> , 2016 [107]	271,2→145,1; 271,2→183,2	5,76	0,00125 - 0,05	87,8 (6,7) [12,5 ng/L]	-	1,2*	0,35
Wu <i>et. al.</i> , 2019 [20]	271,4→145,1; 271,4→143,1; 271,4→183,2	4,85	0,001 - 2	45,1 - 107 [5, 10 e 100 ng/L]	-	1,0	0,5
Pedrouzo <i>et. al.</i> , 2009 [108]	271→145; 271→183	17-22	0,075 - 1,5	32 (13) [100 ng/L]	-	100*	30
Kumar <i>et. al.</i> , 2009 [35]	271,0→144,8	8,14	0,1 - 100	75 (<8)	27	1,7*	0,5
Tavazzi <i>et. al.</i> , 2016 [39]	271→145; 271→143	4,5	0,00008 - 0,111	67,5 (10) [10 ng/L]	Não se verificaram	0,08	0,03

\* valores estimados a partir do LOD

## 2.1. Preparação da Amostra

A preparação da amostra é um passo fundamental que tem como objetivos remover os compostos interferentes, isolar ou enriquecer os analitos, ou melhorar as suas propriedades de detecção através de derivatização. Assim, o principal objetivo é transferir os analitos de interesse da matriz original para uma forma mais adequada para efetuar a detecção <sup>[56-58]</sup>.

Normalmente, uma amostra colhida não pode ser diretamente analisada, daí a importância da sua preparação, contudo este é um passo limitante na velocidade de obtenção de resultados. Este passo pode demorar até 80% do tempo total de um procedimento analítico. Para além disso, podem ser introduzidos erros, maioritariamente devido à perda de analito e à possibilidade de contaminação da amostra <sup>[59,62,67]</sup>.

A remoção dos compostos interferentes, evita não só a coeluição com os compostos de interesse, como também garante a longevidade das colunas cromatográficas e evita limpezas constantes ao sistema de injeção <sup>[67]</sup>.

O modo de preparação da amostra depende de vários fatores, tais como da matriz, das propriedades do analito, do nível de concentração em que a análise deve ser realizada, dos custos, do tempo de análise, da facilidade de automatização e do método de separação/detecção que se segue <sup>[56,60]</sup>. Portanto, idealmente, o método selecionado deve ser 1) fácil de manusear; 2) simples, de modo a evitar a introdução de erros; 3) seletivo, portanto, conter o menor número possível de interferentes, para que exista maior detetabilidade; 4) rápido e robusto; 5) automatizado; 6) consumir o menor volume possível de solventes, atendendo a Química “Verde”, e 7) operado a um baixo custo por amostra <sup>[61,67]</sup>.

Atualmente, a SPE é uma das ferramentas mais utilizadas para a extração e/ou concentração de analitos em matrizes complexas, que veio substituir muitas técnicas clássicas de LLE. Em comparação com as técnicas de LLE, a SPE é mais simples, demora menos tempo, utiliza menos solventes orgânicos, melhora a recuperação dos analitos, proporciona um melhor ajuste da seletividade devido à escolha apropriada da fase estacionária, é mais facilmente automatizada e evita a formação de emulsões <sup>[62,63]</sup>.

### 2.1.1. Extração em Fase Sólida

A técnica de SPE envolve a partição do soluto entre uma fase líquida (amostra) e uma fase sólida (adsorvente). Quando o objetivo é a concentração do analito, este é adsorvido, sendo que, posteriormente, é eluído do adsorvente com um solvente apropriado (eluente). Por

outro lado, quando o objetivo é a limpeza da amostra, os interferentes ficam retidos e os compostos de interesse são eluídos diretamente [65-68].

As primeiras aplicações experimentais desta técnica estão associadas ao início da análise de compostos orgânicos em água, a partir da década de 1950 [63,64].

Nas décadas de 1960 e de 1970 deu-se um grande desenvolvimento da SPE, por forma a encontrar a melhor fase sólida, sendo que se procedeu à introdução de materiais poliméricos, o primeiro dos quais poliestireno e, mais tarde, sílicas ligadas [57,64].

Após o desenvolvimento e a grande aplicação da técnica, ficou claro que não existe um material adsorvente universal adequado para reter uma variedade de compostos distintos para diversas aplicações. Assim, a investigação e desenvolvimento de novos materiais é focada na descoberta de um material ideal para uma certa aplicação [57,64].

O tipo de enchimento sólido deve ser selecionado tendo em conta os mecanismos de interação entre a fase sólida e o analito de interesse. Por sua vez, as interações dependem das propriedades hidrofóbicas, polares e iónicas do analito e do adsorvente. Os mecanismos de retenção mais comuns são baseados em forças de *van der Waals* (interações apolares ou hidrofóbicas), pontes de hidrogénio, ligações dipolo-dipolo (interações polares) e interações iónicas [68].

Existe uma grande variedade de enchimentos disponíveis desde carvão grafitizado, terras de diatomáceas, alumina, Florisil, sílica, sílica ligada (octadecil, octil, etil, ciclohexil, fenil, cianopropil, diol, aminopropil, entre outros) e polímeros porosos macroreticulares [71].

Ao contrário das sílicas ligadas, os polímeros podem ser usados a qualquer pH e não contêm grupos silanol (SiOH), que podem ser problemáticos, uma vez que podem reter irreversivelmente compostos básicos. A área superficial é, geralmente, superior e, portanto, a adsorção dos compostos tende a ser mais completa. Na maioria dos casos, os analitos adsorvidos são fácil e quase completamente eluídos do adsorvente polimérico com um pequeno volume de solvente [67,69]. Os polímeros mais utilizados são o poliestireno-divinilbenzeno e o poli(divinilbenzeno-co-N-vinilpirrolidona), devido ao facto de estes polímeros apresentarem um equilíbrio hidrofílico-lipofílico (HLB), sendo possível extrair uma grande variedade de analitos, quer estes sejam ácidos, básicos ou neutros, ou quer sejam polares ou apolares [60].

A extração em fase sólida pode classificar-se em três tipos: em fase reversa, em fase normal e em troca iónica. Neste caso, a extração efetuada foi em fase reversa [69].

A extração em fase reversa envolve uma matriz polar ou moderadamente polar, uma fase estacionária apolar e o analito de interesse, tipicamente, tem polaridade moderada a apolar. A retenção dos compostos orgânicos de soluções polares (por exemplo, água) ocorre, essencialmente, devido a forças de *van der Waals*, ou seja, devido a forças de atração entre as ligações carbono-hidrogénio do analito e os grupos funcionais do adsorvente. Assim, a retenção

dos compostos é favorecida por solventes polares, enquanto a eluição é favorecida por solventes apolares [68].

Existem certas propriedades que um adsorvente deve ter para que a extração seja bem sucedida, tais como uma grande área superficial, a adsorção deve ser reversível, um elevado grau de pureza e uma boa estabilidade química [69].

Em SPE, a adsorção do analito depende de um equilíbrio entre a amostra e a fase sólida. Este equilíbrio é deslocado mais fortemente para a fase sólida à medida que a área superficial se torna maior. O tamanho dos poros e a área superficial têm uma relação de proporcionalidade inversa, portanto maior área superficial implica menor tamanho de poros. Para além disso, uma percentagem alta e reprodutível do analito deve ser adsorvida, contudo este deve ser facilmente e totalmente eluído. Quanto maior o grau de pureza da fase sólida, menor a influência no resultado analítico. Por fim, as partículas sólidas devem ser estáveis tanto no solvente orgânico utilizado para a eluição, como na amostra aquosa [69].

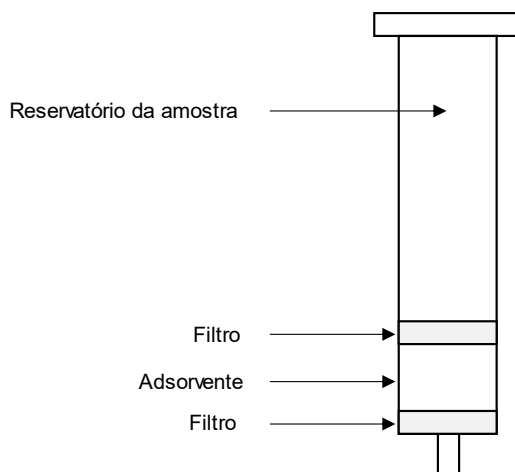
A Tabela 2.3 apresenta diversos materiais adsorventes, utilizados em fase reversa [67,69,71].

**Tabela 2.3** - Materiais adsorventes utilizados em fase reversa.

<b>Fases Apolares</b>	C18	Octadecil
	C8	Octil
	C2	Etil
	C4	Butil
	CH	Ciclohexil
	PH	Fenil
<b>Fases Poliméricas</b>	PS-DVB	Poliestireno-divinilbenzeno
	PVP-DVB	Poli(divinilbenzeno-co-N-vinilpirrolidona)

Esta técnica tipicamente é realizada em cartuchos ou discos. O cartucho é um pequeno recipiente aberto de polipropileno ou de vidro, que contém partículas adsorptivas, com uma massa entre 50 mg a 10 g, contidas entre dois filtros de polietileno ou de aço inoxidável, que têm uma porosidade de 20 µm (Figura 2.1) [65,68].

Os cartuchos são baratos, fáceis de usar e são descartáveis, contudo têm certas desvantagens para a análise de água. Por exemplo, a área da secção transversal é pequena, logo a taxa de processamento da amostra é lenta. Para além disso, existe a possibilidade de obstrução do disco superior, caso a amostra de água contenha sólidos suspensos [68,69].



**Figura 2.1** - Representação de um cartucho de SPE (adaptado de [66]).

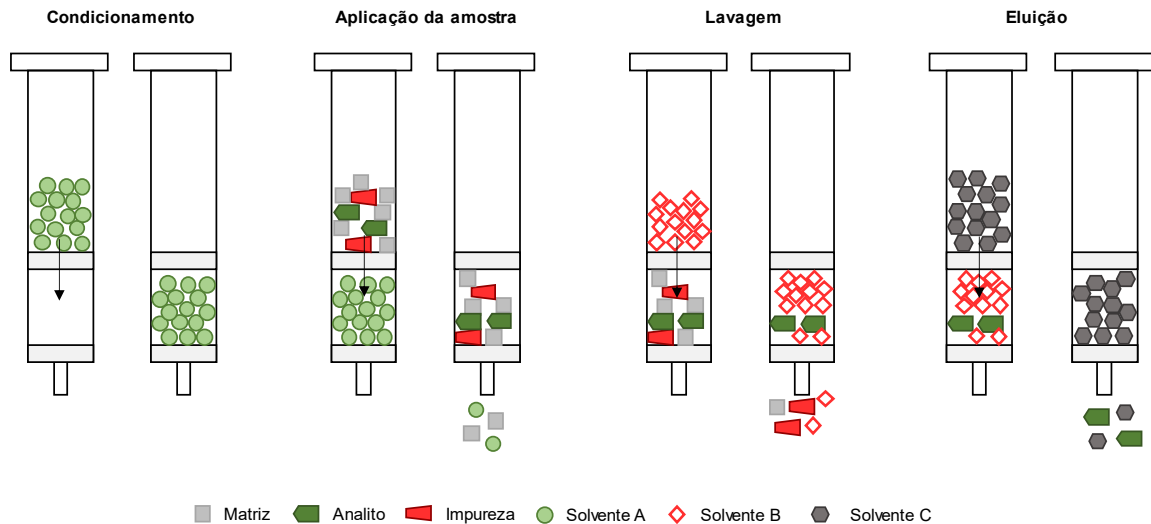
Os discos consistem numa membrana composta por microfibras de politetrafluoretileno (PTFE) ou vidro. Os discos de vidro são mais espessos e mais rígidos, portanto é possível obter fluxos mais elevados. Um disco típico tem 47 mm de diâmetro interno e 0,5 mm de espessura, contendo 500 mg de adsorvente. Os diâmetros disponíveis variam de 4 a 90 mm e são escolhidos tendo em conta o volume da amostra [67,68].

Em comparação com os cartuchos, os discos apresentam algumas vantagens. Primeiramente, como o tamanho de partícula é mais pequeno, a área superficial é maior e existe um menor volume de vazios, logo a partição é promovida. Assim é necessário um menor volume de eluente na remoção dos analitos e o fluxo pode ser mais elevado. Para além disso, o caminho que a amostra percorre é mais curto, o leito é mais homogéneo, são necessárias menores pressões durante a aplicação e eluição, e o tempo da extração é mais curto. Por outro lado, fluxos elevados podem resultar numa má recuperação do analito, uma vez que existe um menor tempo de interação entre este e a fase sólida [67,68].

Os cartuchos são os mais escolhidos para aplicações de rotina em laboratórios de controlo de qualidade em análises ambientais, sendo a configuração mais disponível comercialmente [63].

Normalmente, a técnica de SPE inclui quatro etapas: condicionamento da fase estacionária, introdução da amostra, lavagem e secagem do material adsorvente e eluição [57,65].

Na Figura 2.2 estão ilustradas as diversas fases da técnica de SPE em cartuchos, quando o objetivo é isolar e/ou concentrar o analito de interesse.



**Figura 2.2** - Principais passos da SPE (adaptado de [70]).

A fase de condicionamento do enchimento tem a finalidade de o ativar, sendo determinada pela natureza do analito, ou seja, é necessário preparar a fase sólida para que seja mais compatível com a fase líquida, assim utiliza-se um solvente que promova uma melhor superfície de contacto entre as duas fases [57,69].

A fase de aplicação da amostra consiste na passagem de um volume adequado de líquido pelo enchimento com o auxílio de vácuo ou pressão positiva, a um fluxo constante. O fluxo usado depende das dimensões do cartucho e do tamanho das partículas sólidas. Enquanto a amostra é adicionada, é importante que o mecanismo de retenção permita a adsorção do analito à fase sólida. Durante este passo, o analito é concentrado e purificado no adsorvente, contudo alguns compostos presentes na matriz também ficam retidos, enquanto outros são eluídos [66,69,70].

O terceiro passo consiste na lavagem do enchimento com um solvente adequado, de modo a que sejam removidos os interferentes indesejáveis. A lavagem deve remover a matriz da amostra dos espaços intersticiais, enquanto o analito fica retido [57,66].

Efetua-se ainda uma etapa de secagem para remover o máximo de líquido possível, de modo a que o eluído esteja mais concentrado. Para tal, procede-se à aplicação de vácuo ligeiro, ou à passagem de uma corrente de ar comprimido ou azoto, durante alguns minutos [69].

Na etapa de eluição, os analitos adsorvidos são removidos da fase sólida com a ajuda de um solvente orgânico adequado. O solvente de eluição escolhido deve eluir completamente os analitos usando o menor volume possível do eluente, para que o eluído já tenha uma concentração apropriada para análise. Caso não seja possível, deve utilizar-se um solvente volátil, para que este possa ser facilmente evaporado [67,69]. A eficiência de eluição é maior quando o



Se a secagem não for completa, obtém-se um extrato “molhado”, o que pode afetar negativamente os resultados obtidos ou interferir na estabilidade da coluna cromatográfica [72].

O passo final da SPE é, normalmente, a passagem de um solvente, tipicamente orgânico, pelo cartucho, sendo que este é escolhido, especificamente, para quebrar as ligações entre a fase sólida e o analito, de modo a garantir a eluição. Uma elevada afinidade do analito para o enchimento implica um alto rendimento de retenção, contudo pode influenciar negativamente a eluição e levar a uma recuperação final baixa [72].

Os adsorventes mais utilizados no passo de preparação da amostra, para a análise de estrogénios são o copolímero de poli(divinilbenzeno-co-N-vinilpirrolidona), mais especificamente Oasis HLB, copolímero estireno-divinilbenzeno e sílicas ligadas a C<sub>18</sub> [25,26].

Segundo *Barreiros et al.* (2015), de entre 50 estudos acerca da quantificação de estrogénios em matrizes aquosas, 46% utilizaram Oasis HLB como adsorvente de fase reversa. Este adsorvente é descrito por vários autores como o que permite melhores recuperações do analito desejado, devido às suas propriedades hidrofílicas e lipofílicas [25].

Os solventes de eluição mais utilizados com este tipo de adsorvente são metanol e acetato de etilo, contudo outros solventes ou mistura de solventes podem ser utilizados, como por exemplo, acetona e diclorometano:metanol (50:50,v/v) [25].

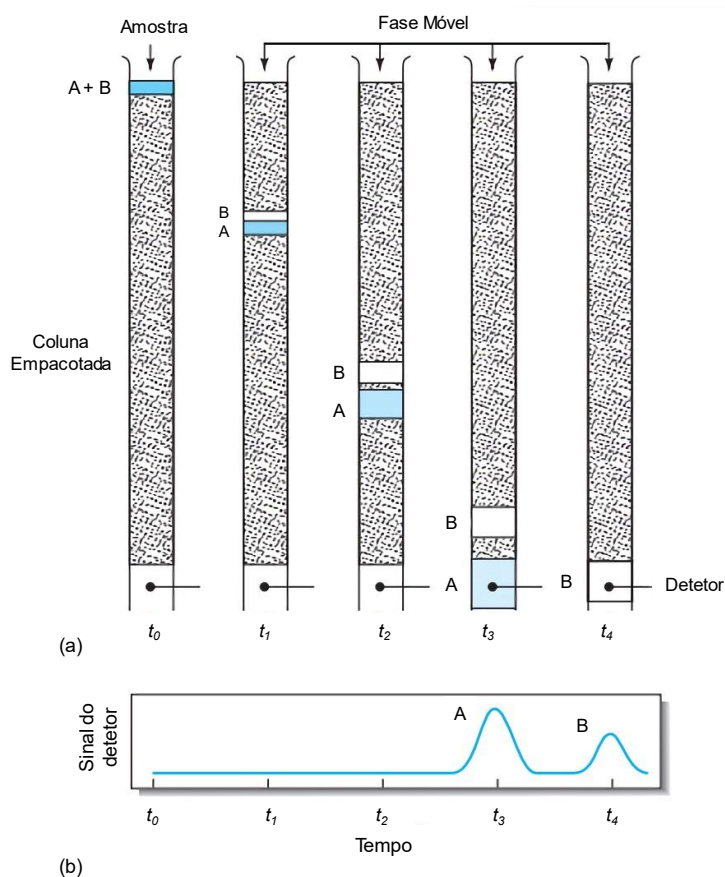
## 2.2. Cromatografia

Em 1906, Mikhail Tswett definiu o termo “cromatografia” através das palavras gregas *chroma*, que significa cor, e *graphein*, que significa escrever [73,75].

A cromatografia é um método físico de separação em que os componentes a serem separados estão distribuídos entre duas fases, uma das quais está imóvel, a fase estacionária, enquanto outra se move numa determinada direção, a fase móvel. Os componentes de uma mistura são transportados devido à fase móvel, que tem um determinado fluxo, através da fase estacionária, sendo que a separação depende da interação dos compostos com a fase estacionária [73,74].

A cromatografia pode ser classificada de acordo com diversos critérios. Tendo em conta a natureza da fase móvel, a sua classificação divide-se em cromatografia gasosa (GC), cromatografia líquida (LC) e cromatografia de fluido supercrítico [74,75].

Na Figura 2.4 encontra-se uma representação de um processo cromatográfico em coluna.



**Figura 2.4** - (a) Esquema de separação de uma mistura de componentes A e B. (b) Sinal do detector ao longo do tempo de eluição (adaptado de [74]).

De acordo com a Figura 2.4, uma amostra contendo os componentes A e B, presentes em fase móvel, é introduzida no topo da coluna, no tempo  $t_0$ . Os dois componentes distribuem-se entre a fase estacionária e a fase móvel. Com a primeira adição da nova fase móvel, o eluente move-se na coluna, sendo que ocorre partição dos componentes entre as fases, como se observa no tempo  $t_1$ . Através da adição contínua de solvente, a eluição ocorre, ou seja, os componentes são forçados a atravessar a coluna, devido a uma série de transferências entre as duas fases. Como o movimento do soluto só pode ocorrer na fase móvel, a velocidade a que o soluto se desloca, depende do tempo que este passa nessa fase. Se a força da interação de cada soluto com a fase estacionária é diferente, então os solutos separam-se em bandas individuais. Assim, é possível observar que o composto B é mais fortemente retido pela fase estacionária do que o composto A. À medida que ocorre a eluição dos compostos separados, dá-se a sua detecção, obtendo-se um cromatograma com os picos correspondentes a cada componente (tempos  $t_3$  e  $t_4$ ) [74,76].

## 2.2.1 Princípios Teóricos

De modo a entender melhor a técnica cromatográfica é necessário compreender diversos conceitos teóricos.

### Coeficiente de partição

Na separação cromatográfica ocorre a distribuição dos solutos entre a fase móvel e a fase estacionária, que é caracterizada pelo coeficiente de partição, também conhecido por constante de distribuição,  $K_c$ :

$$K_c = \frac{c_S}{c_M} \quad (2.1)$$

Onde  $c_S$  é a concentração do analito na fase estacionária e  $c_M$  é a concentração na fase móvel.

Esta razão controla a velocidade de migração do analito. Portanto, à medida que o analito se desloca pelo sistema, a uma dada temperatura, dá-se a sua partição entre as duas fases, sendo que a sua retenção depende da afinidade para a fase estacionária [77].

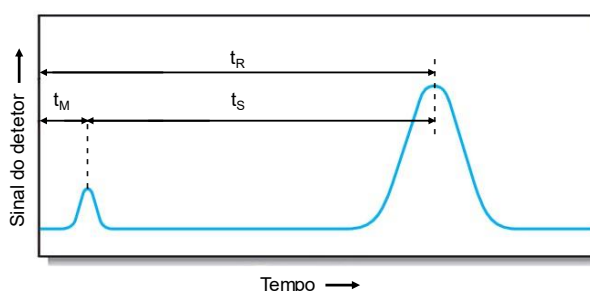
### Tempo de retenção

O tempo de retenção,  $t_R$ , é o tempo entre a injeção de uma amostra e o aparecimento de um pico do soluto no detetor associado à coluna cromatográfica [74]. O tempo de retenção pode ser expresso pela equação 2.2:

$$t_R = t_S + t_M \quad (2.2)$$

Onde  $t_S$  é o tempo que o analito passa na fase estacionária e  $t_M$  é o tempo morto, ou seja, é o tempo que um composto não retido demora a atravessar a coluna cromatográfica. Portanto, todos os analitos ficam, pelo menos, esse tempo na fase móvel [74].

Na Figura 2.5 é possível observar um cromatograma de uma mistura com dois componentes, bem como os tempos supramencionados.



**Figura 2.5** - Cromatograma típico para uma mistura de dois componentes (adaptado de [74]).

### Fator de retenção

O fator de retenção, também conhecido por fator de capacidade,  $k$ , é uma medida que está relacionada com a velocidade a que um analito migra pela coluna. Ou seja, este parâmetro avalia a quantidade de tempo que um soluto passa na fase estacionária em relação ao tempo que passa na fase móvel [74,76].

$$k = \frac{1 - f_M}{f_M} \quad (2.3)$$

Sendo  $f_M$  a fração de soluto na fase móvel. Assumindo que a velocidade da fase móvel é constante, pode definir-se  $f_M$  pela seguinte expressão [76].

$$f_M = \frac{t_M}{t_R} \quad (2.4)$$

Substituindo a expressão de  $f_M$  na equação 2.3 obtém-se a equação 2.5:

$$k = \frac{t_R - t_M}{t_M} = \frac{t_S}{t_M} \quad (2.5)$$

### Fator de seletividade

A seletividade é uma medida relativa da retenção de dois solutos, que é definida através do fator de seletividade,  $\alpha$  [76]:

$$\alpha = \frac{K_B}{K_A} \quad (2.6)$$

Onde  $K_B$  é o coeficiente de partição da espécie mais fortemente retida, B, e  $K_A$  é o coeficiente de partição para a espécie menos fortemente retida, A. De acordo com esta definição,  $\alpha$  é sempre superior à unidade [74].

### Eficiência da coluna

A eficiência da coluna cromatográfica pode ser medida, quantitativamente, através da altura do prato teórico,  $H$ , e do número de pratos teóricos,  $N$ , sendo que os dois termos se relacionam pela equação 2.7 [74]:

$$H = \frac{L}{N} \quad (2.7)$$

Onde  $L$  é o comprimento da coluna.

O número de pratos pode também ser expresso pela equação 2.8:

$$N = \left( \frac{t_R}{\sigma} \right)^2 \quad (2.8)$$

Onde  $\sigma$  é o desvio padrão, que tem unidades de tempo.

Como a largura da base do pico ( $W$ ) corresponde a  $4\sigma$ , e a meia altura da base ( $W_{1/2}$ ) corresponde a  $2,355\sigma$ , podem obter-se duas equações diferentes <sup>[73]</sup>:

$$N = 16 \left( \frac{t_R}{W} \right)^2 \quad (2.9)$$

$$N = 5,545 \left( \frac{t_R}{W_{1/2}} \right)^2 \quad (2.10)$$

### Resolução

A resolução de uma coluna,  $R_S$ , é uma medida quantitativa da capacidade que esta tem em separar dois analitos. Este parâmetro mede o quão distantes dois picos adjacentes estão, em relação às suas larguras, sendo definida pela equação 2.11 <sup>[73,74]</sup>.

$$R_S = \frac{t_{R,B} - t_{R,A}}{\frac{W_B}{2} + \frac{W_A}{2}} \quad (2.11)$$

Onde  $t_{R,B}$  e  $t_{R,A}$  são os tempos de retenção dos dois picos, sendo que o analito A elui primeiro, e  $W_B$  e  $W_A$  são as larguras ao nível da linha da base.

A resolução da coluna também pode ser expressa em função do número de pratos teóricos, dos fatores de retenção e de seletividade:

$$R_S = \frac{\sqrt{N}}{4} \left( \frac{\alpha - 1}{\alpha} \right) \left( \frac{k_B}{1 + k_B} \right) \quad (2.12)$$

Onde  $k_B$  é o fator de retenção da espécie que se movimenta mais devagar.

Quando a resolução é igual ou superior a 1,5, há separação completa entre os dois picos <sup>[58]</sup>.

A resolução pode ser otimizada, por exemplo, através do aumento do fator de retenção do analito B, contudo, normalmente, o tempo de análise aumenta. De modo a aumentar  $k_B$  sem alterar  $\alpha$ , as alterações efetuadas, às condições cromatográficas, devem resultar num aumento não seletivo no fator de retenção para ambos os solutos. Em cromatografia líquida, é possível aumentar o fator de retenção utilizando uma fase móvel mais fraca como solvente, pois, assim, os solutos demoram mais tempo a eluir <sup>[76]</sup>.

## 2.3 Cromatografia Líquida

A cromatografia líquida é bastante utilizada para a separação e análise de misturas de compostos de todos os tipos. Esta divide-se em cromatografia líquida clássica, na qual a fase móvel se desloca através da força da gravidade, e cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), na qual se utilizam fases estacionárias com partículas menores, logo é necessária uma bomba de alta pressão para a eluição da fase móvel <sup>[75]</sup>.

Desde o início da cromatografia líquida, em 1950, até aos dias de hoje, muitos avanços foram realizados, sendo que todos eles foram estimulados pelo desenvolvimento contínuo de novas partículas de fase estacionária, com o propósito de obter colunas com maior seletividade, mais eficientes e mais estáveis tanto quimicamente como mecanicamente <sup>[79]</sup>.

Os métodos de cromatografia líquida são classificados tendo em conta os mecanismos químicos e físicos pelos quais os compostos são separados. Com base no mecanismo de separação, os tipos de cromatografia líquida são a cromatografia de adsorção, a cromatografia de partição, a cromatografia de troca iónica, a cromatografia de exclusão molecular e a cromatografia de afinidade. Neste trabalho, a cromatografia é de partição, mais concretamente em fase reversa <sup>[81]</sup>.

Na cromatografia de partição, os solutos são separados com base na sua distribuição entre a fase móvel, que é líquida, e a fase estacionária, que é um líquido adsorvido ou ligado a um sólido <sup>[73]</sup>.

A fase reversa é utilizada para separar compostos solúveis em água, tendo em conta as diferentes hidrofobicidades, sendo o modo mais comum <sup>[73]</sup>.

No modo reverso de operação, a fase estacionária é apolar e a fase móvel é polar. Assim, o composto mais polar elui primeiro e o aumento da polaridade da fase móvel, aumenta o tempo de eluição <sup>[74]</sup>.

Existem diversas fases estacionárias e suportes disponíveis para separações em fase reversa, sendo que as mais comuns são constituídas por grupos octadecilo, octilo, fenilo, ou butilo ligados a um suporte de sílica, à semelhança dos adsorventes usados na SPE. As características de retenção nas colunas à base de sílica dependem da natureza e da quantidade da fase ligada, da área superficial do suporte, do tamanho dos poros do suporte e da quantidade de grupos acessíveis no suporte <sup>[81]</sup>.

### 2.3.1 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

A cromatografia líquida de alta eficiência é uma das técnicas analíticas mais utilizadas na determinação de compostos não voláteis e termicamente instáveis. Esta foi desenvolvida com o propósito de diminuir o tempo de separação e aumentar a eficiência. No final dos anos de 1960, introduziram-se enchimentos com partículas de tamanho menor, contudo, esta introdução levou ao aumento da pressão, sendo necessário utilizar instrumentos mais sofisticados. Assim, os sistemas de HPLC podem operar até pressões de 6.000 psi (400 bar), sendo que o diâmetro das partículas de enchimento se situa entre 3 e 10  $\mu\text{m}$  [58,80,82,83].

Devido à elevada utilização da HPLC, como uma técnica de análise de rotina em laboratório, progressos significativos foram efetuados de modo a realizar análises mais rápidas. O uso de partículas menores que 2  $\mu\text{m}$ , num sistema cromatográfico com pressões convencionais, diminuiu o tempo de análise, contudo a pressão limitou o máximo desempenho da coluna. De forma a contornar este problema, foram desenvolvidos sistemas capazes de operar a altas pressões (15.000 psi ou mais), tornando as análises cromatográficas até 20 vezes mais rápidas. Este sistema foi denominado de cromatografia líquida de ultra eficiência (UPLC) [79].

### 2.3.2 Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência

Desde a sua introdução, em 2004, que a UPLC tem sido adotada em diversos laboratórios, devido à sua resolução e sensibilidade elevadas, ao menor tempo de análise e à economia de solventes. Em comparação com uma coluna convencional de HPLC com 3,5  $\mu\text{m}$ , uma coluna UPLC com sub-2  $\mu\text{m}$  pode reduzir o tempo de análise até 80% e economizar o consumo de fase móvel em, pelo menos, 80%, sem prejudicar o desempenho de separação [84].

A transferência do método de HPLC para UPLC baseou-se na redução do tamanho das partículas da fase estacionária e das colunas, tendo por base a equação de *van Deemter*, que descreve a relação entre eficiência, expressa pela altura do prato,  $H$ , e a velocidade linear da fase móvel,  $u$ , como se observa na equação 2.13 [79,84].

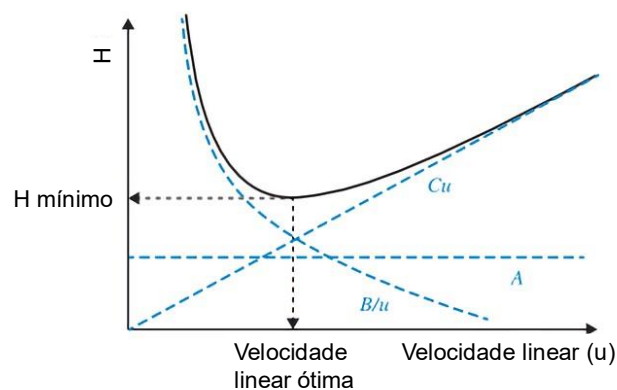
$$H = A + \frac{B}{u} + Cu \quad (2.13)$$

O termo  $A$  diz respeito ao alargamento dos picos devido aos diferentes caminhos seguidos pelas moléculas do analito. Este pode ser reduzido através da utilização de colunas com tamanho menor, com diâmetros internos menores, com enchimentos eficientes e partículas uniformes [79].

O termo  $B$  refere-se à difusão longitudinal. Este termo pode ser minimizado através do uso de velocidades lineares elevadas da fase móvel [79].

O termo C está relacionado com a transferência de massa do analito entre as fases móvel e estacionária [79].

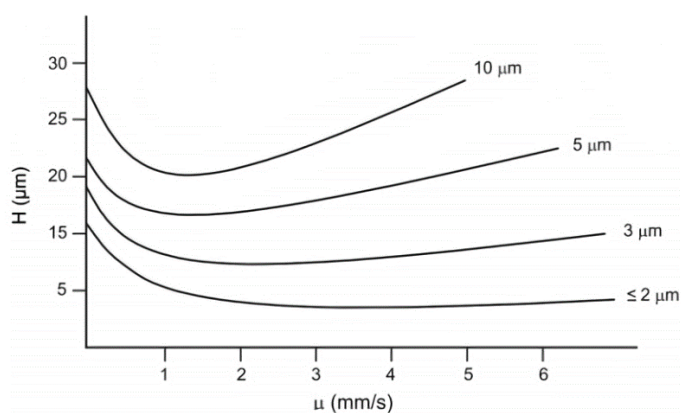
Na Figura 2.6 é possível observar a contribuição de cada termo para a equação de *van Deemter*.



**Figura 2.6** - Contribuições ilustrativas de cada termo da equação de *van Deemter* (adaptado de [73]).

O mínimo da curva de *van Deemter* representa a velocidade linear ótima onde se obtém a eficiência máxima da coluna, o que corresponde a um valor mínimo de H. As partículas de menor tamanho tendem a reduzir a altura do prato, o que significa que a coluna tem um maior número de pratos teóricos, portanto é mais eficiente [79].

Na Figura 2.7 observa-se que, para partículas com tamanho inferior a 2  $\mu\text{m}$ , o aumento da velocidade linear da fase móvel, não provoca um aumento da altura do prato teórico e, conseqüentemente, uma diminuição da eficiência da coluna, como se verifica em colunas com partículas com tamanho superior, uma vez que existe menor resistência à transferência de massa. Assim, estas partículas podem ser usadas para efetuar separações rápidas, pois é possível manter a eficiência com o uso de colunas curtas e com velocidades lineares elevadas [79,85].



**Figura 2.7** - Curva de *van Deemter* para partículas de 10, 5, 3 e  $\leq 2 \mu\text{m}$  [79].

A diminuição do tamanho das partículas provoca um aumento de pressão do sistema, de acordo com a equação 2.14.

$$\Delta P = \phi \frac{L \eta u}{100 d_p^2} \quad (2.14)$$

onde  $\Delta P$  é a queda de pressão ao longo da coluna (em bar),  $\phi$  é a resistência ao fluxo,  $L$  é o comprimento da coluna (em mm),  $\eta$  é a viscosidade da fase móvel (mPa/s),  $u$  é a velocidade linear (em mm/s) e  $d_p$  é o tamanho da partícula (em  $\mu\text{m}$ ) [79,84].

Através da equação 2.14, é possível deduzir que se o tamanho da partícula for reduzido duas vezes, então a queda de pressão irá aumentar quatro vezes. Contudo, a utilização de partículas menores está associada ao uso de colunas também menores, portanto o aumento de pressão é menor do que quatro vezes, porém não é suficiente para que haja compatibilidade com um sistema convencional de HPLC [79,84].

A UPLC é uma versão especial da HPLC que apresenta um aumento significativo na resolução, sensibilidade e eficiência, obtendo-se resultados mais rápidos. Para além disso, o volume de injeção e o consumo de solventes são menores, o que diminui custos de operação. Por outro lado, a utilização de pressões elevadas exige que exista maior manutenção do equipamento e reduzem o tempo de vida das colunas [86].

### 2.3.3 Constituintes do Sistema

Os principais constituintes de um sistema de UPLC são um reservatório de fase móvel, uma bomba, um injetor, uma coluna cromatográfica, um detetor e um sistema de recolha de dados e controlo, como se observa na Figura 2.8.

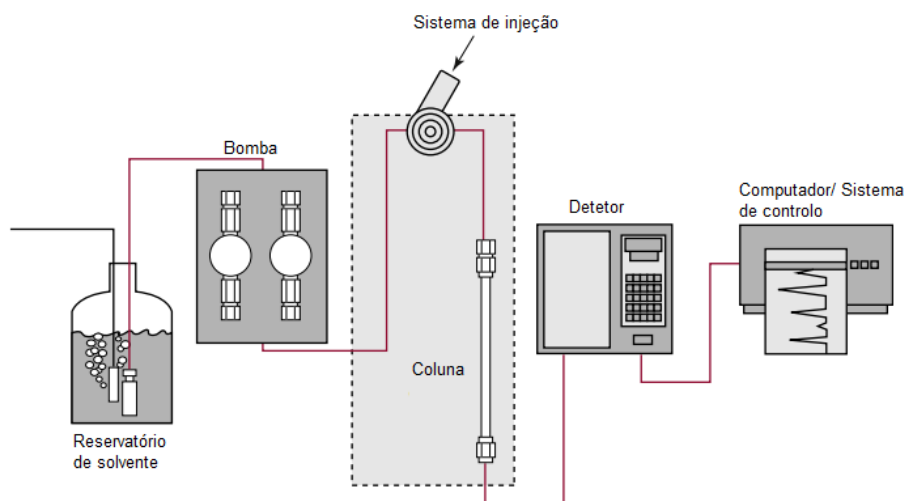


Figura 2.8 - Componentes de um sistema de UPLC (adaptado de [81]).

### Reservatório de fase móvel

As fases móveis e os solventes de lavagem são armazenados em recipientes fechados, limpos e inertes. Os reservatórios mantêm a pureza dos solventes, impedindo que contaminantes sejam introduzidos e minimizam a evaporação de componentes voláteis. O material utilizado deve ser compatível com os solventes usados, portanto o vidro é, normalmente, utilizado [87].

A composição e a força da fase móvel são fatores que podem ser usados para ajustar e controlar a separação cromatográfica. Se a composição do solvente é mantida constante ao longo da corrida cromatográfica, então a eluição é denominada de isocrática. Por outro lado, se a composição da fase móvel varia ao longo do tempo, então a eluição é denominada de gradiente. Na eluição isocrática, os compostos que têm polaridade semelhante à fase móvel, não são bem separados da mistura e a eluição de todos os compostos é muito demorada. Já na eluição por gradiente, dois ou mais solventes, com polaridades significativamente diferentes, são utilizados, de modo a que a separação dos analitos seja efetuada num menor tempo de análise, sendo que a força de eluição aumenta ao longo do tempo. Assim, a variação na composição pode ser realizada de forma linear ou não linear [81,82].

Uma vez que a retenção de compostos ionizáveis é muito sensível ao pH da fase móvel, normalmente, é adicionado um tampão apropriado, de modo a controlar e manter o pH, para que a retenção seja reprodutível [87].

### Bomba

Os solventes da fase móvel são retirados dos reservatórios através da ação de uma ou mais bombas. Assim, estas devem gerar fluxos exatos e precisos dentro das especificações, ter elevada estabilidade (fluxo livre de pulsação), impulsionar a fase móvel de forma suave e reprodutível, operar tanto no modo isocrático como por gradiente e gerar altas pressões [76,79,87].

A grande maioria dos sistemas utiliza bombas recíprocas, que consistem numa câmara cilíndrica pequena que é preenchida e esvaziada através da movimentação de um pistão, visto que cumprem os requisitos necessários, mesmo a pressões muito elevadas, para além de serem fáceis de usar e possibilitarem a operação em modo de gradiente [74,87]. A ação recíproca do pistão gera alguma pulsação na pressão e no fluxo da fase móvel, que pode aumentar o ruído da linha de base no cromatograma. Estas pulsações podem ser minimizadas através de controlo eletrónico da bomba e pela colocação de amortecedores no caminho do fluxo [81].

### Injetor

A introdução da amostra na coluna requer que uma certa quantidade de amostra seja adicionada à corrente da fase móvel, entre a bomba e a coluna. Esta é uma tarefa difícil, pois,

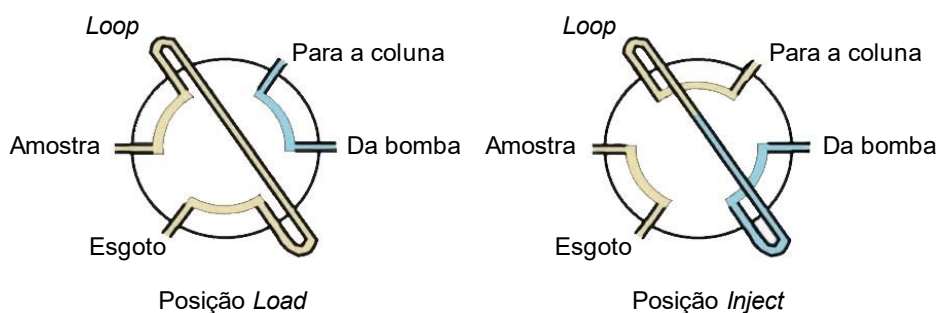
inicialmente a amostra encontra-se à pressão atmosférica, enquanto a corrente de fluido está a alta pressão. Este é o passo que mais contribui para a imprecisão da análise, daí a importância da injeção ser rigorosa, precisa e rápida [87,88].

A injeção da amostra pode ser realizada de forma manual ou através de um amostrador automático. Os amostradores automáticos têm a capacidade de injetar diversas alíquotas da mesma amostra e de controlar a temperatura das amostras antes da injeção, entre 4 e 40 °C [79,81].

O volume de injeção deve ser reduzido para evitar a dispersão da amostra, o que provoca o alargamento dos picos cromatográficos. Assim, os instrumentos de UPLC, possuem volumes de injeção de 0,1 a 50 µL [79].

O tipo de injetor mais utilizado é o injetor em *loop*. Apesar de existirem outros *designs*, a válvula rotativa de seis orifícios e duas posições é a mais usada. Quando a válvula está na posição de *load*, a fase móvel passa diretamente da bomba para a coluna, enquanto o *loop* é preenchido com a amostra. A boa prática requer a passagem de vários volumes de amostra pelo *loop*, para que haja equilíbrio e para remover os componentes de injeções anteriores. Quando a válvula passa à posição de injeção, existe a conexão entre o *loop* e o solvente a alta pressão, sendo a amostra transportada para a coluna [81,87,88].

Na Figura 2.9 é possível observar uma válvula de injeção com seis orifícios e as suas posições.



**Figura 2.9** - Posições da válvula de injeção (adaptado de [58]).

### Coluna cromatográfica

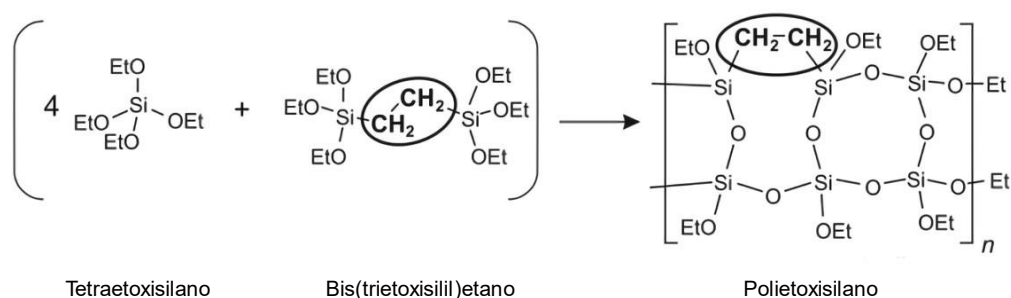
A coluna cromatográfica é o componente do sistema onde ocorre a separação, sendo que existe uma grande variedade de colunas com diferentes enchimentos, diâmetros e comprimentos. Normalmente, estas são feitas de aço inoxidável, têm um diâmetro interno de 1,0 a 2,1 mm e os comprimentos mais comuns são de 50 e 100 mm, mas diferentes comprimentos podem ser selecionados dependendo da complexidade da separação [81,84].

Cada extremidade da coluna é composta por filtros, de modo a filtrar partículas, distribuir uniformemente o fluxo e manter a fase estacionária no lugar [73].

Algumas separações são realizadas à temperatura ambiente. Porém, o controlo de temperatura permite aumentar a reprodutibilidade, reduzir a contrapressão, pois a viscosidade da fase móvel diminui, aumentar a velocidade de transferência de massa entre a fase móvel e a fase estacionária, aumentar o fluxo da fase móvel, o que leva a um menor tempo de análise, e ajustar a seletividade para alguns compostos. O aumento de temperatura é determinado pelo ponto de ebulição e pela pressão de vapor da fase móvel, bem como pela estabilidade térmica dos analitos na amostra [73,81,87].

Existem diversos enchimentos utilizados na técnica de UPLC, sendo que a maioria são à base de sílica gel, porém este enchimento é instável em pH básico. Deste modo, algumas colunas são empacotadas com partículas híbridas (orgânicas e inorgânicas), tais como a tecnologia híbrida de pontes de etileno (BEH), que são resistentes numa gama de pH entre 1 e 12. A combinação de material orgânico e inorgânico confere maior estabilidade mecânica, devido às ligações silício-carbono, e confere maior estabilidade química, devido às pontes de carbono que se encontram na superfície da sílica. Para além disso, estas partículas também são estáveis a temperaturas até 60 °C e permitem obter uma boa simetria de pico, devido à quantidade reduzida de silanóis residuais [79,84].

Estas partículas são produzidas através da reação de tetraetoxisilano com bis(trietoxisilil)etano, dando origem a uma partícula de sílica com pontes de etano presentes na sua estrutura (polietoxisilano), chamada de sílica híbrida de segunda geração, como se observa na Figura 2.10.



**Figura 2.10** - Reação química de síntese da sílica híbrida de segunda geração (adaptado de [79]).

A tecnologia de BEH foi desenvolvida pela Waters, sendo que se encontram no mercado várias colunas do tipo ACQUITY™ UPLC BEH, com diferentes características. As colunas BEH C<sub>18</sub> e C<sub>8</sub> são as mais selecionadas universalmente, por fornecerem estabilidade numa ampla gama de pH [79,84].

### Detetor

O detetor é colocado imediatamente após a coluna, de modo a que os compostos sejam detetados à medida que são eluídos. Portanto, o papel deste componente é emitir uma resposta gerada pelo composto eluído e, posteriormente, transformar os sinais em picos observados no cromatograma [82].

Um detetor deve apresentar certas características tais como sensibilidade a baixa concentração do analito, baixo volume morto para evitar alargamento adicional dos picos, resposta rápida à mudança de concentração, desvios e níveis de ruído baixos, deteção não destrutiva para o soluto, de modo a que outros detetores possam ser colocados em série, robustez, simplicidade e fiabilidade. Para além disso, o detetor não deve ser sensível a pequenas mudanças de fluxo e de temperatura, deve apresentar resposta independentemente da fase móvel, deve apresentar uma ampla gama linear dinâmica, pois facilita a quantificação numa grande gama de concentrações, e fornecer informações qualitativas para o pico detetado [73,82,87].

Muitos tipos de detetores podem ser usados em LC, sendo que os mais comuns são detetores de absorvância, fluorescência, eletroquímicos, índice de refração e espetrometria de massa. Não existe um detetor universal altamente sensível, portanto o detetor escolhido é influenciado pela natureza da amostra [74,81].

### Sistema de recolha de dados e controlo

O detetor está ligado a um sistema de dados que é utilizado para recolha e tratamento, bem como para controlo instrumental. O sistema de controlo possibilita gerir as injeções das amostras, o fluxo, a composição da fase móvel, a temperatura da coluna, o detetor, a aquisição de dados, entre outros. O sistema de aquisição de dados pode recolher inúmeros pontos numa análise individual, sendo que estes podem ser usados para identificar e caracterizar um conjunto de picos, tendo em conta parâmetros como o tempo de retenção, a área, a altura e a largura de pico [58,81,88].

## 2.4 Cromatografia Líquida associada a Espetrometria de Massa

A combinação da cromatografia líquida com a espetrometria de massa (LC/MS) tornou-se numa ferramenta de análise bastante poderosa para deteção sensível e seletiva de massa, de forma a caracterizar amostras complexas [73].

A técnica de LC/MS é cada vez mais utilizada, devido à sua maior robustez, automação e desempenho. A maioria dos compostos são determinados através de espetrometria de massa, desde que possam ser ionizados e transferidos para a fase gasosa [58].

A cromatografia líquida permite a separação efetiva dos analitos, enquanto a espectrometria de massa permite a sua identificação e confirmação.

### 2.4.1 Espetrometria de Massa

A espectrometria de massa é uma técnica instrumental sofisticada que permite produzir, separar e detetar iões na fase gasosa [73]. A maioria dos dados são apresentados em unidades de razão  $m/z$ , onde  $m$  é a massa molecular do ião, em *Daltons*, e  $z$  é o número de cargas presentes na molécula analisada. Para moléculas pequenas ( $< 1000$  Da), normalmente, existe apenas uma carga, logo o valor de  $m/z$  é igual à massa molecular [90].

Um espectrómetro de massa é constituído pela fonte de ionização, pelo analisador de massas e pelo detetor [90].

#### Fonte de ionização

Durante muito tempo, a combinação de LC com MS foi impedida devido à dificuldade de transferência das moléculas do analito da fase líquida para a fase gasosa como iões. Porém, estas dificuldades foram resolvidas através da introdução de fontes de ionização à pressão atmosférica (API), em vez de vácuo. Portanto, estas fontes permitem a formação de iões na fase gasosa diretamente a partir do fluxo de líquido. As fontes API mais comuns são Ionização *Electrospray* (ESI), Ionização Química à Pressão Atmosférica (APCI) e Fotoionização à Pressão Atmosférica (APPI), sendo que, de entre estas, a *Electrospray* é a mais utilizada [78,89].

A ionização em fontes API é considerada *soft*, uma vez que os iões formados têm pouco excesso de energia e, portanto, sofrem pouca ou nenhuma fragmentação [73].

A escolha da técnica a utilizar depende, essencialmente, da polaridade e da estabilidade térmica do analito, sendo que a ESI é a técnica preferida para compostos polares e iónicos e que têm baixa estabilidade térmica, e a APCI para compostos menos polares. Os estrogénios naturais são analisados em modo negativo e podem ser ionizados através de APCI, contudo os limites de deteção, normalmente, são mais baixos quando a fonte de ionização utilizada é *Electrospray* [73,78,92].

A ESI é produzida através da aplicação de um campo elétrico forte, sob pressão atmosférica, no efluente da coluna cromatográfica (amostra líquida) que passa por um capilar metálico com um fluxo baixo, circundado por um gás nebulizador (normalmente azoto). O campo elétrico é obtido através da aplicação de uma diferença de potencial elevada entre o capilar e o contraelétrodo. Este campo induz uma acumulação de carga na superfície do líquido (chamada de cone de Taylor), localizada na extremidade do capilar, que rompe e forma um aerossol de

gotas altamente carregadas positiva ou negativamente. No caso da formação dos iões ocorrer no modo negativo, é aplicada uma tensão negativa no capilar e positiva no contraelétrodo [78,87,91].

O gás injetado coaxialmente, com um fluxo baixo, permite que a dispersão do *spray* formado seja limitada no espaço. O aerossol carregado é, posteriormente, dessolvatado, ou seja, o solvente é evaporado com o auxílio de um gás de dessolvatação aquecido, que é o mesmo que o gás nebulizador [78,88].

Existem dois mecanismos propostos para explicar a formação de iões a partir de pequenas gotas carregadas [87].

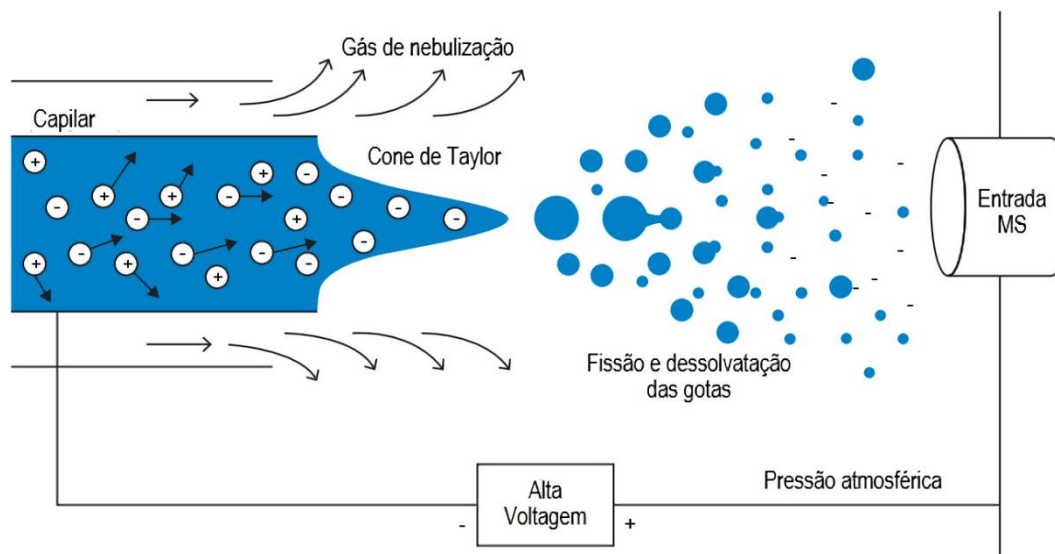
De acordo com o modelo proposto por Dole, em 1968, as gotas sofrem evaporação, mas a sua carga mantém-se inalterada, sendo que existe a redução do seu tamanho e podem ocorrer subdivisões, denominadas de explosões coulombicas, quando a densidade de carga supera a tensão superficial. A contínua redução do tamanho das gotas, quer por evaporação do solvente, quer por fissões, resulta na formação de apenas um ião do analito, em fase gasosa. Este modelo é denominado de Mecanismo de Carga Residual [78,87].

O segundo modelo, proposto por Iribarne e Thomson, em 1976, considera que, devido à evaporação do solvente e às explosões coulombicas, as gotas atingem um raio crítico, em que a força do campo elétrico é elevada o suficiente para permitir a dessorção dos iões da superfície das gotas. Este processo é denominado de Mecanismo de Evaporação Iónica [78,87].

Mais recentemente, foi proposto que os dois modelos podem operar simultaneamente, sendo que o modelo de carga residual seria predominante em massas superiores a 3.000 Da e o modelo de evaporação iónica seria predominante em massas inferiores [78].

Dependendo da configuração, a deteção pode ser realizada no modo positivo, onde os iões detetados estão protonados, ou no modo negativo, onde os iões detetados estão desprotonados. Os iões são chamados de moleculares:  $[M+nH]^{n+}$  para iões positivos e  $[M-nH]^{n-}$  para iões negativos, onde M é a massa monoisotópica do composto, H é a massa do protão, e n é o número de protões aceites ou doados. Na maioria dos casos,  $n=1$ , produzindo um ião molecular com carga de +1 ou -1 [58].

Na Figura 2.11, observa-se a representação esquemática do funcionamento da ionização por *Electrospray* no modo negativo.

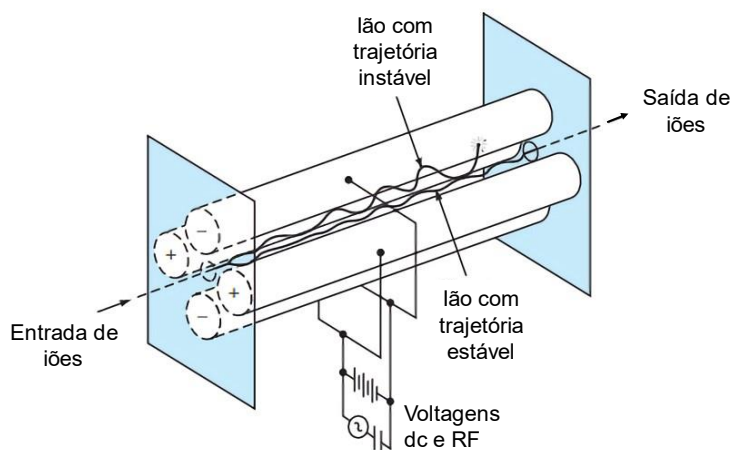


**Figura 2.11** - Representação esquemática do funcionamento da ionização por *Electrospray* no modo negativo (adaptado de [73]).

### Analizador de massas

Após os íons serem gerados, na fonte de ionização, são transferidos para o analisador de massas, passando pelo cone de amostragem e sendo direcionados para o cone de extração e, de seguida para um sistema de transferência ótica, que servem para orientar os íons. Da mesma maneira que existem vários tipos de fontes de ionização, também foram desenvolvidos diversos analisadores de massas, sendo que a separação dos íons, de acordo com a sua razão  $m/z$ , pode ser baseada em diversos princípios. Assim, a escolha do analisador deve ser feita tendo em conta a aplicação, o desempenho desejado e o custo [73,78,91].

Um dos analisadores de massas mais utilizados é o analisador de quadrupolo, devido à sua simplicidade, preço relativamente baixo, boa linearidade em análises quantitativas, facilidade de ser entendido e operado [78]. Na Figura 2.12 é possível observar um esquema de um analisador de quadrupolo.



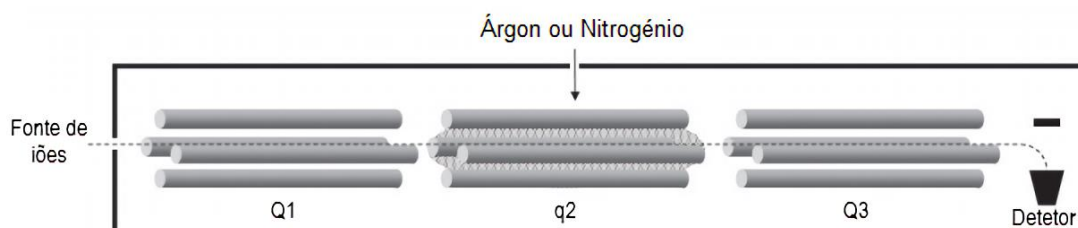
**Figura 2.12** - Representação esquemática de um quadrupolo (adaptado de [74]).

Este analisador é composto por quatro barras cilíndricas, metálicas e paralelas, dispostas aos pares, sendo que um par apresenta potencial elétrico positivo e outro par potencial elétrico negativo. Uma combinação de corrente contínua (dc) e radiofrequência (RF) é aplicada, gerando-se um campo elétrico. O ajuste adequado das voltagens permite criar uma trajetória estável para íons com uma determinada razão  $m/z$ , o que possibilita a passagem dos íons pelas barras do quadrupolo. Os íons que apresentem trajetórias instáveis, atingem as barras e são eliminados pela bomba de vácuo [74,78].

O quadrupolo pode operar em modo *Full Scan*, onde é possível detectar todos os íons numa gama previamente definida, obtendo-se assim um espectro de massas completo, ou pode operar em modo Monitorização Seletiva de Íons (SIM), onde um determinado íon é selecionado para ser detectado, oferecendo maior sensibilidade e evitando os efeitos de analitos indesejados [93].

É possível também utilizar três quadrupolos em série, ou seja, um triplo quadrupolo, obtendo-se uma configuração do tipo MS/MS, que pode designar-se por espectrometria de massa *tandem*. A espectrometria de massa *tandem* é um método que envolve, pelo menos, dois estágios de análise de massa, em conjunto com um processo de dissociação ou com uma reação química que provoca uma mudança na massa ou na carga de um íon. Esta técnica permite obter uma elevada seletividade, medir concentrações muito baixas de analito e medir vários analitos num único método [90,91].

Num triplo quadrupolo, tipicamente, o primeiro (Q1) e o terceiro (Q3) quadrupolos são utilizados como analisadores de massas e o segundo (q2) é utilizado como célula de colisão. Assim, no segundo quadrupolo, os íons podem ser induzidos a sofrer fragmentações devido a colisões com um gás inerte, como o árgon ou o nitrogénio, num processo chamado de dissociação induzida por colisão (CID). Na Figura 2.13 é possível observar um triplo quadrupolo [91,94].



**Figura 2.13** - Representação esquemática de um triplo quadrupolo (adaptado de [94]).

Existem diversos modos de operação para um triplo quadrupolo, sendo que os quatro principais se encontram representados na Tabela 2.4.

**Tabela 2.4** - Modos de operação de um triplo quadrupolo.

	Q1	q2	Q3
Scan do íon produto ( <i>Daughter Scan</i> )	SIM	CID	<i>Full Scan</i>
Scan do íon precursor ( <i>Parent Scan</i> )	<i>Full Scan</i>	CID	SIM
<i>Constant Neutral Loss Scan</i>	<i>Full Scan</i>	CID	<i>Full Scan</i>
<i>Multiple Reaction Monitoring</i> (MRM)	SIM	CID	SIM

No modo *Daughter Scan*, seleciona-se um íon precursor tendo em conta a razão  $m/z$ , e determinam-se todos os íões produto resultantes da fragmentação. Esta função é, normalmente, usada para caracterização estrutural <sup>[90,91]</sup>.

No modo *Parent Scan*, seleciona-se um íon produto e determinam-se todos os íões precursores que permitem produzir esse fragmento. Esta função é muitas vezes utilizada para analisar classes específicas de compostos <sup>[90,91]</sup>.

No modo *Constant Neutral Loss Scan*, os filtros de massa estão sincronizados, com um deslocamento de massa constante entre os dois. Este modo permite identificar quais os íões que perdem um fragmento neutro específico <sup>[90,91]</sup>.

O modo mais utilizado em MS/MS é o MRM, sendo que ambos os quadrupolos são programados para funcionar em modo SIM, portanto, selecionam-se íões produto característicos de um respetivo íon precursor. Este tipo de aquisição permite monitorizar uma série de pares de íões precursor/produto, sendo principalmente utilizado para análise quantitativa de compostos alvo, permitindo obter maior seletividade e sensibilidade <sup>[90,91]</sup>.

Para identificação do composto alvo, normalmente, monitorizam-se duas transições entre o íon precursor e os dois íões produto mais abundantes. Assim, a primeira transição (MRM1) é utilizada para quantificação, enquanto a segunda (MRM2) é utilizada para confirmação <sup>[39]</sup>.

### Detetor de íões

O detetor tem como função detetar e amplificar o sinal da corrente de íões, que vem do analisador de massas, e converter a abundância dos íões num sinal elétrico que pode ser lido por um sistema de tratamento de dados <sup>[73,91,95]</sup>.

Os detetores de íões mais utilizados são o multiplicador de íões e o fotomultiplicador, sendo que a escolha depende do *design* do equipamento e das aplicações analíticas que serão realizadas. Neste caso, o detetor é um fotomultiplicador <sup>[91]</sup>.

Num fotomultiplicador, os íões colidem com o dínodo de conversão, o que provoca a emissão de eletrões. No modo negativo, os íões são acelerados em direção ao dínodo positivo.

Os elétrons que se formam são, posteriormente, acelerados para uma tela fosforescente que emite fótons. Os fótons são detetados pelo fotomultiplicador e são convertidos em corrente elétrica que é amplificada [91,95].

Na Figura 2.14 é possível observar uma representação esquemática de um fotomultiplicador.

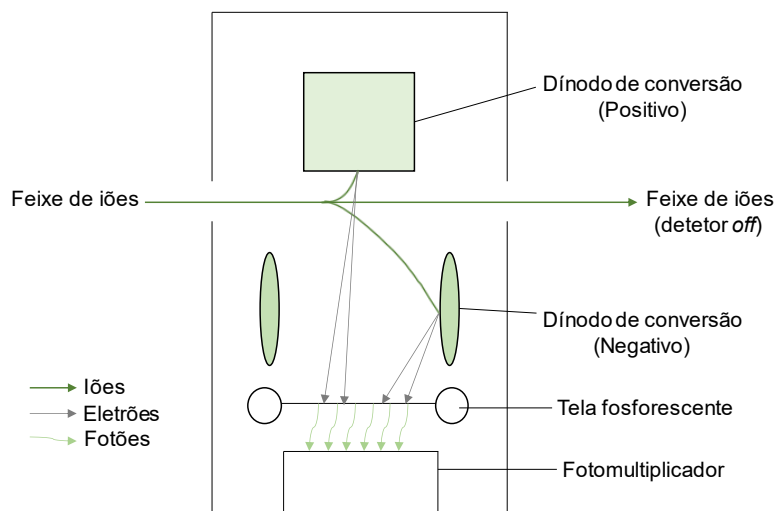


Figura 2.14 - Representação esquemática de um fotomultiplicador (adaptado de [91]).

### 2.4.2 Efeitos de Matriz

Apesar da técnica analítica LC/MS/MS ser das mais sensíveis e seletivas, podem ocorrer efeitos de matriz, especialmente, devido à utilização da fonte de ionização por *Electrospray* para a análise de matrizes complexas. Normalmente, os efeitos de matriz são causados pela alteração da eficiência na ionização dos compostos alvo, devido à presença de interferentes na amostra. Assim, pode ocorrer um decréscimo no sinal da resposta (supressão iônica) ou um aumento (enriquecimento iônico) [96,97].

Em análises quantitativas, este fenómeno é responsável pela obtenção de dados pouco confiáveis, sendo que afeta a reprodutibilidade, a linearidade e a precisão, daí a importância da avaliação destes efeitos no desenvolvimento e validação de um método de ensaio que utiliza LC/MS/MS [97].

O processo que provoca efeitos de matriz não é totalmente compreendido, contudo assume-se que compostos presentes na matriz coeluem com os analitos de interesse e influenciam a intensidade do sinal da resposta, durante o passo de ionização. Os efeitos de matriz são muito variáveis e dependem da natureza da amostra [96,97].

Muitos mecanismos foram propostos para explicar o fenómeno de supressão iónica, enquanto, por outro lado, pouca informação existe para explicar o enriquecimento iónico. Contudo, os mecanismos dependem da técnica de ionização utilizada <sup>[97]</sup>.

Na técnica ESI, qualquer fenómeno que possa diminuir a taxa de produção de gotas e a formação de iões na fase gasosa, pode provocar supressão de sinal. Assim, os mecanismos que provocam uma diminuição na eficiência da ionização podem ser divididos em dois grupos: supressão iónica que se processa na fase líquida e na fase gasosa <sup>[97]</sup>.

Os efeitos de matriz podem ser avaliados, quantitativamente, através do método de adição pós-extração <sup>[96]</sup>.

Neste método, compara-se a resposta do analito em solução padrão com a resposta de uma solução fortificada com o analito, após a extração, na mesma concentração. A diferença na resposta entre a solução da amostra fortificada pós-extração e a solução preparada em solvente, dividida pela resposta da solução preparada em solvente determina o grau do efeito de matriz, como se pode observar na equação 2.15 <sup>[96,97]</sup>.

$$\text{Efeitos de Matriz (\%)} = \frac{B - A}{A} \times 100 \quad (2.15)$$

Onde A é a área do pico do analito na solução padrão e B é a área do pico do analito na amostra. Assim, se o resultado obtido for, aproximadamente, igual a 0%, não existem efeitos de matriz. Se o resultado for superior a 0%, ocorre enriquecimento iónico e se for inferior a 0%, ocorre supressão iónica <sup>[96,97]</sup>.

Os efeitos de matriz não se conseguem eliminar totalmente, contudo estes podem ser minimizados ou compensados. É possível otimizar o procedimento de preparação da amostra, de modo a reduzir a presença de interferentes no extrato final. Em matrizes complexas, esta tarefa é mais complicada, devido à presença de diversos interferentes com propriedades químicas diferentes. Outra opção é modificar as condições cromatográficas, de maneira a deslocar o tempo de retenção dos compostos alvo para longe da zona do cromatograma afetada por efeitos de matriz. Alternativamente, é possível utilizar um padrão interno para compensar as alterações no sinal. Por último, caso seja possível e se a sensibilidade não for alterada, pode utilizar-se outra fonte de ionização que seja menos afetada por efeitos de matriz <sup>[96,97]</sup>.

### 2.4.2.1 Padrão Interno

A utilização de um padrão interno (PI) é muito importante para ajudar a corrigir perdas do analito que ocorrem ao longo do método analítico. Assim, durante o desenvolvimento de um novo método, a escolha de um PI apropriado pode melhorar a exatidão e a precisão [80,98].

No desenvolvimento deste método, procedeu-se à utilização de PI, uma vez que já se sabia à partida que, sem a sua utilização, existiriam grandes variações de resultados.

No método do padrão interno, uma quantidade conhecida de PI é adicionada às amostras, aos padrões e aos ensaios em branco. Um padrão interno adicionado à amostra é designado de *surrogate*. O sinal de resposta obtido não é o sinal do analito em si, mas a razão entre o sinal do analito e do padrão interno [74].

A escolha do padrão interno deve ter em conta certas características, tais como [97,98]:

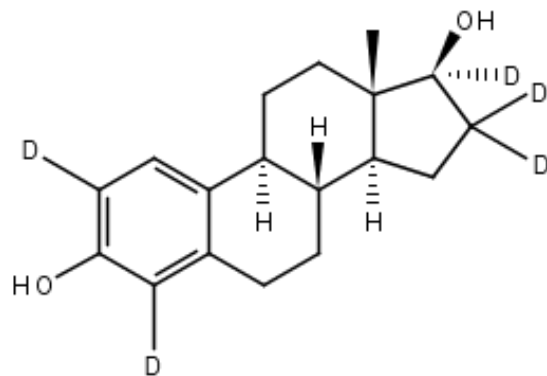
- Nunca estar naturalmente presente na amostra;
- Ser bem resolvido, ou seja, os picos do analito e do PI devem ser medidos independentemente;
- Eluir perto do analito de interesse;
- Ser estável quimicamente, de modo a, no mínimo, não degradar durante a preparação da amostra e na análise cromatográfica;
- Estar disponível com uma pureza adequada;
- Ser compatível com a resposta do detetor;
- Apresentar estrutura química semelhante à do analito.

O padrão interno utilizado pode ser um análogo estrutural ou um composto estável e marcado isotopicamente, mas os últimos são preferidos pois apresentam a mesma estrutura e propriedades cromatográficas semelhantes ao composto nativo [96].

O PI estável e marcado isotopicamente é um composto onde vários átomos do analito são substituídos por isótopos, como por exemplo,  $^2\text{H}$  (D),  $^{13}\text{C}$  e  $^{15}\text{N}$ . Este PI exige recuperações semelhantes na extração, resposta semelhante na ionização em ESI-MS/MS e um tempo de retenção idêntico. Porém, estes são dispendiosos e nem sempre se encontram comercialmente disponíveis [96,99].

Os compostos marcados com  $^{13}\text{C}$  e  $^{15}\text{N}$  são mais apropriados do que os compostos deuterados, uma vez que o hidrogénio e o deutério têm diferenças maiores nas propriedades físicas do que, por exemplo,  $^{12}\text{C}$  e  $^{13}\text{C}$ , porém estes são mais dispendiosos [97].

Neste estudo, o PI utilizado foi um deuterado: o estradiol-D<sub>5</sub> (C<sub>18</sub>H<sub>19</sub>D<sub>5</sub>O<sub>2</sub>), que apresenta uma massa molecular de 277,41 g/mol. Na Figura 2.15 é possível observar a sua estrutura molecular.



**Figura 2.15** - Estrutura molecular do PI.

## Capítulo 3 – Validação do Método Analítico

A validação de um método de ensaio é fundamental em análises químicas, sendo indispensável para a obtenção de resultados credíveis, ou seja, os resultados devem satisfazer os requisitos de qualidade que lhes são exigidos <sup>[100,101]</sup>.

Um método de ensaio é um processo que envolve manipulações propícias a acumulação de erros, tanto sistemáticos como aleatórios, o que pode alterar, significativamente, o valor do resultado final <sup>[102]</sup>.

De acordo com a Norma NP ISO/IEC 17025, a validação diz respeito à confirmação, através de exame e apresentação de evidência objetiva, de que os requisitos específicos relativos a uma dada utilização são satisfeitos <sup>[102]</sup>.

A validação de um método interno deve ser adaptada a cada caso, tendo em conta o grau de exigibilidade. Assim, os parâmetros mínimos a avaliar são a gama de trabalho e a linearidade, os limiares analíticos, a sensibilidade, a precisão e a exatidão <sup>[101]</sup>.

De modo a efetuar a validação, devem estudar-se os parâmetros através de avaliação indireta ou direta.

### 3.1 Avaliação Indireta

#### 3.1.1 Seletividade e Especificidade

A seletividade diz respeito à capacidade de determinação de um analito, em particular numa matriz complexa, sem que exista interferência de outros componentes <sup>[101]</sup>.

Um método diz-se específico quando permite garantir que a grandeza medida advém somente do analito, portanto, quando é possível diferenciar o composto de interesse de outros compostos presentes na amostra. Assim, um método com elevada seletividade diz-se que é específico.

Este parâmetro pode ser avaliado através da realização de ensaios de recuperação utilizando diversas amostras. Portanto, um método analítico pode ser considerado específico e seletivo quando se verificam taxas de recuperação próximas de 100%, sendo que estes valores dependem do tipo de metodologia praticada, podendo, nalguns casos, admitir-se intervalos de recuperação mais ampliados. Também pode ser avaliado através de estudos de efeitos de matriz, sendo que o método é considerado específico e seletivo, caso não exista interferência de componentes presentes na matriz.

### 3.1.2 Quantificação

De modo a interpretar os resultados obtidos experimentalmente, é necessário calcular parâmetros como a curva de calibração, os limiares analíticos e a sensibilidade.

#### 3.1.2.1 Curva de Calibração

A calibração é o processo que relaciona a resposta de um sistema de medida com a concentração ou a quantidade de substância conhecida.

De modo a efetuar a calibração do equipamento, devem preparar-se soluções padrão com concentrações conhecidas, que são analisadas nas mesmas condições das amostras a analisar. Os pontos experimentais obtidos permitem a construção da curva de calibração, que relaciona a concentração e o sinal do equipamento, sendo que, a partir desta curva, se determina a concentração desconhecida do composto presente nas amostras, através de interpolação.

A calibração deve ser efetuada aquando da análise, devendo existir critérios definidos para aceitação. Como referência deve usar-se a norma ISO 8466-1, de forma a utilizar regressões lineares através do Método dos Mínimos Quadrados (Anexo I) <sup>[101,104]</sup>.

##### 3.1.2.1.1 Linearidade

A linearidade corresponde à proporcionalidade direta entre a resposta obtida e a concentração do composto em estudo, dentro de uma determinada gama de trabalho <sup>[103]</sup>.

Este parâmetro pode ser avaliado através de testes estatísticos, como análise de resíduos (Anexo II), teste de Mandel (Anexo III), teste de RIKILT (Anexo IV) ou teste das áreas normalizadas (Anexo V).

##### 3.1.2.1.2 Gama de Trabalho

A gama de trabalho de um método analítico é o intervalo compreendido entre a concentração máxima e mínima do analito onde se demonstrou que o procedimento analítico tem precisão, exatidão e linearidade <sup>[103]</sup>.

A gama de trabalho pode ser avaliada através do teste de homogeneidade de variâncias (Anexo VII). Assim, para modelos lineares, segue-se a norma ISO 8466-1 e, para modelos polinomiais de 2º grau, segue-se a norma ISO 8466-2 [101].

### 3.1.2.2 Limiares Analíticos

#### 3.1.2.2.1 Limite de Detecção

O limite de detecção (LOD) é a menor concentração do analito que é possível detetar com uma certeza estatística razoável, apesar de não ser possível quantificar com um valor exato [101].

Este parâmetro também pode ser definido como a concentração mínima que produz um sinal significativamente diferente do branco. Assim, tem que se verificar uma razão de sinal/ruído de 3:1 [101,103].

Para métodos que envolvam a utilização de uma calibração linear, o limite de detecção pode ser calculado a partir da equação 3.1:

$$LOD = \frac{3 \times S_{y/x}}{b} \quad (3.1)$$

Onde  $S_{y/x}$  é o desvio padrão residual da curva de calibração e  $b$  é o declive.

Também é possível calcular o LOD através de várias leituras do branco ou de uma concentração do composto ao limite inferior da gama de linearidade, pela equação 3.2:

$$LOD = 3 \times S_{x_0} \quad (3.2)$$

Onde  $S_{x_0}$  é o desvio padrão de várias leituras do branco ou da solução com concentração mais baixa.

#### 3.1.2.2.2 Limite de Quantificação

O limite de quantificação (LOQ) diz respeito à menor concentração a partir da qual é possível quantificar o analito, com exatidão e precisão adequadas. Neste caso, a razão de sinal/ruído deve ser de 10:1 [101,103].

O primeiro padrão de calibração deve, então, ser igual ou ligeiramente superior ao limite de quantificação [102].

O LOQ pode ser calculado pelos mesmos métodos referidos para o LOD, mas com algumas alterações. Se o método envolver a utilização de uma calibração linear, o limite de quantificação pode ser calculado através da equação 3.3:

$$LOQ = \frac{10 \times S_{y/x}}{b} \quad (3.3)$$

Também é possível calcular o valor a partir de ensaios em branco ou de soluções padrão com baixa concentração:

$$LOQ = 10 \times S_{x_0} \quad (3.4)$$

### 3.1.2.3 Sensibilidade

A sensibilidade mede a capacidade de um método para distinguir pequenas diferenças de concentração do analito em estudo. Esta pode ser definida pelo quociente entre o acréscimo do sinal e a variação da concentração correspondente ao acréscimo, como se observa na equação 3.5 <sup>[101]</sup>.

$$S = \frac{\Delta L}{\Delta C} \quad (3.5)$$

Onde  $\Delta L$  é a variação do sinal de resposta e  $\Delta C$  é a variação da concentração que provocou a variação do sinal.

No caso de o método apresentar calibração linear, então este parâmetro é constante ao longo da gama de trabalho e é igual ao declive da reta de calibração obtida <sup>[101]</sup>.

Este parâmetro permite determinar a evolução da grandeza ao longo do tempo, comparar a sensibilidade de diversos métodos analíticos para um mesmo analito, caso os modelos sejam lineares, e comparar a sensibilidade para vários analitos <sup>[101]</sup>.

### 3.1.3 Precisão

A precisão de um método avalia o grau de concordância entre os resultados de testes individuais, repetidos sobre uma mesma amostra, amostras semelhantes ou padrões, em condições definidas <sup>[101,103]</sup>.

Este parâmetro pode ser expresso pelo desvio padrão ou pelo coeficiente de variação <sup>[105]</sup>.

O desvio padrão é dado pela expressão:

$$s = \sqrt{\frac{\sum(x_i - \bar{x})^2}{n - 1}} \quad (3.6)$$

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

Já o coeficiente de variação é dado por:

$$CV(\%) = \frac{s}{\bar{x}} \times 100 \quad (3.7)$$

Para averiguar a precisão existem duas medidas extremas, denominadas por repetibilidade e reprodutibilidade. Entre estas existe uma situação intermédia que se designa por precisão intermédia <sup>[101]</sup>.

### 3.1.3.1 Repetibilidade

A repetibilidade expressa a precisão de um método realizado em condições semelhantes, isto é, no mesmo laboratório, pelo mesmo analista, utilizando o mesmo equipamento, com o mesmo tipo de reagentes, sobre a mesma amostra e num curto intervalo de tempo <sup>[101]</sup>.

### 3.1.3.2 Precisão Intermédia

A precisão intermédia refere-se à capacidade do método fornecer os mesmos resultados quando as análises são realizadas sobre a mesma amostra, amostras idênticas ou padrões, no mesmo laboratório, mas definindo quais são as condições a variar, por exemplo, em diferentes dias, por diferentes analistas, em diferentes equipamentos <sup>[101]</sup>.

Esta medida de precisão é reconhecida como a mais representativa da variabilidade dos resultados, sendo a mais aconselhável de usar <sup>[101]</sup>.

### 3.1.3.3 Reprodutibilidade

A reprodutibilidade diz respeito à capacidade do método fornecer os mesmos resultados em condições de ensaio diferentes, ou seja, em diferentes laboratórios, por diferentes analistas, por diferentes equipamentos e/ou em diferentes épocas, mas sobre uma mesma amostra. A reprodutibilidade é obtida a partir de ensaios interlaboratoriais <sup>[101]</sup>.

## 3.2 Avaliação Direta

A avaliação direta tem como objetivo determinar a exatidão dos métodos de ensaio. Assim, a exatidão é definida como a concordância entre o resultado do ensaio e o valor de referência aceite como convencionalmente verdadeiro <sup>[101]</sup>.

A exatidão de um método analítico pode ser determinada através da participação em ensaios interlaboratoriais, pelo estudo de materiais de referência certificados, através de testes comparativos ou através de ensaios de recuperação.

### 3.2.1 Ensaios de Recuperação

Sempre que não existam materiais de referência certificados ou ensaios interlaboratoriais para o composto a validar, a exatidão é avaliada através de ensaios de recuperação. Estes são também uma forma de avaliar a aplicabilidade do método e a eficiência da preparação da amostra.

Nos ensaios de recuperação adiciona-se uma quantidade conhecida de analito à amostra. Após a extração da amostra e análise do composto, verifica-se a concentração de analito obtida experimentalmente,  $C_a$ , em relação à concentração teórica,  $C_T$ , como se observa na equação 3.8:

$$\text{Recuperação (\%)} = \frac{C_a}{C_T} \times 100 \quad (3.8)$$

A recuperação do analito pode ser dependente da concentração, assim é necessário obter informações em diferentes níveis de concentrações da gama de trabalho.

Este parâmetro é avaliado através do cálculo do coeficiente de variação e definem-se critérios de aceitação, para as recuperações, em torno de 100%.

## 3.3 Estimativa da Incerteza

A avaliação da incerteza requer que se identifiquem todas as fontes possíveis de incerteza provenientes das várias etapas da validação do método. Existem diversas abordagens que permitem quantificar a incerteza da medição, sendo que as utilizadas foram:

- Abordagem de modelação, “passo-a-passo” ou *bottom-up*;
- Abordagem baseada em dados de validação e/ou controlo de qualidade do ensaio recolhidos em ambiente intralaboratorial ou *top-down*.

As fontes de incerteza consideradas neste trabalho, que se encontram descritas em detalhe no Anexo X, foram:

- Incerteza associada à preparação de padrões, sendo que se considera a incerteza do padrão de calibração de concentração mais baixa,  $u_{p_{cal}}$ ;
- Incerteza associada à interpolação da curva de calibração,  $u_{reta}$ ;
- Incerteza associada à precisão intermédia,  $u_{precisão}$ ;
- Incerteza associada à exatidão (ensaio de recuperação),  $u_{recup}$ ;
- Incerteza associada à concentração do padrão interno,  $u_{CPI}$ .

As componentes de incerteza padrão, utilizadas nas abordagens estudadas, podem ser combinadas de diferentes formas, sendo que, quando o método é aplicável a vários níveis de concentrações, estas devem ser contabilizadas como incertezas relativas. Assim, a incerteza padrão relativa combinada,  $u'_C$ , pode ser calculada pelas equações 3.9 e 3.10, tendo em conta se a abordagem é *bottom-up* ou *top-down*.

$$u'_C = \sqrt{u'_{reta}{}^2 + u'_{p_{cal}}{}^2 + u'_{precisão}{}^2 + u'_{CPI}{}^2} \quad (3.9)$$

Ou

$$u'_C = \sqrt{u'_{precisão}{}^2 + u'_{recup}{}^2} \quad (3.10)$$

A incerteza expandida, representada por  $U$ , permite obter o resultado sob a forma de um intervalo, para um nível de confiança elevado (normalmente 95% ou 99%), onde se pode admitir que os valores obtidos podem ser atribuídos com razoabilidade ao mensurando.

A incerteza expandida é igual à incerteza padrão combinada multiplicada por um fator de expansão,  $k$ , normalmente situado entre 2 e 3. Tipicamente, utiliza-se um valor de  $k$  igual a 2, o que corresponde a um nível de confiança de, aproximadamente, 95%.

$$U = u'_C \times k \quad (3.11)$$

O resultado da concentração deverá ser expresso por:

$$C \pm U(C) \text{ [unidades de concentração]} \quad (3.12)$$

A incerteza deve ser apresentada, no máximo, com dois algarismos significativos, portanto o resultado final é apresentado em função do número de algarismos significativos da incerteza.



## Capítulo 4 - Materiais e Métodos

### 4.1 Equipamento e Material

#### 4.1.1 Equipamento

- Cromatógrafo líquido de ultra eficiência: ACQUITY UPLC *System*, Waters Corporation, equipado com:
  - *Software* MassLynx versão 4.1 SCN 714, Micromass Ltd., para configuração e controlo do sistema e aquisição de dados;
  - Coluna cromatográfica, ACQUITY UPLC BEH C<sub>18</sub>, dimensões: 2,1 mm x 50 mm, tamanho de partícula: 1,7 µm, Waters;
  - Amostrador automático: ACQUITY – Sample Manager;
  - Misturador de solvente binário: ACQUITY – Binary Solvent Manager;
  - Compartimento termostaticado para a coluna;
- Espetrometro de massa: Waters TQ Detector, equipado com:
  - Sonda de ionização por *Electrospray*;
  - Analisador de massas de triplo quadrupolo;
  - Fotomultiplicador.
- Sistema automatizado de extração em fase sólida, Dionex, AutoTrace 280, Thermo Fisher Scientific;
- Sistema de evaporação com fluxo de azoto, TurboVap II *Concentration Workstation*, Zymark;
- Sistema de obtenção de água ultrapura, Milli-Q Advantage A-10, Millipore;
- Balança analítica, Mettler Toledo XS204;
- Balança analítica, Mettler Toledo NewClassic MS3002S/01;
- Agitador vortex MS 3 Digital, IKA;
- Banho de Ultrassons, VWR.

#### 4.1.2 Material

- Cartuchos de SPE Waters OASIS HLB, 6 mL, 200 mg, tamanho da partícula: 30  $\mu\text{m}$ ;
- Tubos de evaporação de 200 mL, Biotage;
- Vials com fundo cônico de âmbar de 1,5 mL, com tampa azul com fenda de PTFE/silicone, Supelco;
- Seringas analíticas automatizadas de 100  $\mu\text{L}$  e 500  $\mu\text{L}$ , eVol™ XCHANGE, SGE Analytical Science;
- Material de laboratório de uso corrente.

#### 4.2 Reagentes

##### 4.2.1 Gerais

- Água ultrapura (Millipore);
- Acetona,  $\text{CH}_3\text{COCH}_3$ , N.º CAS 67-64-1, grade HPLC-Isocratic, pureza  $\geq 99,9\%$ , Carlo Erba Reagents;
- Metanol,  $\text{CH}_3\text{OH}$ , N.º CAS 67-56-1, grade HPLC PLUS Gradient, pureza  $\geq 99,9\%$ , Carlo Erba Reagents;
- Solução de amoníaco 25%,  $\text{NH}_4\text{OH}$ , para análise, N.º CAS 1336-21-6, EMSURE ISO, Reag. Ph Eur, Supelco;
- Tiosulfato de sódio penta-hidratado,  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ , para análise, N.º CAS 10102-17-7, pureza 100,3%, PanReac AppliChem, ITW Reagents;
- Árgon BIP grade 6.0, pureza 99,9999%, GASIN (garrafa) – gás de colisão no espectrômetro de massa;
- Azoto, proveniente de gerador de azoto – gás de nebulização, de dessolvatação e de cone no espectrômetro de massa;
- Azoto Premier grade 5.2, pureza 99,9992%, GASIN (garrafa) – gás de auxílio na secagem dos cartuchos (SPE) e na concentração das amostras (TurboVap II).

##### 4.2.2 Padrões Comerciais

- $17\beta$ -Estradiol,  $\text{C}_{18}\text{H}_{24}\text{O}_2$ , N.º CAS 50-28-2, pureza 96,13%, Dr. Ehrenstorfer;

- 17 $\beta$ -Estradiol-D<sub>5</sub>, C<sub>18</sub>H<sub>19</sub>D<sub>5</sub>O<sub>2</sub>, N.º CAS 221093-45-4, concentração certificada 100 mg/L, Cerilliant.

### 4.3 Amostras

Neste trabalho foram analisadas amostras de água para consumo humano, de água subterrânea e de água superficial recolhidas em diferentes zonas de captação e de abastecimento da EPAL. Estas foram armazenadas em câmara frigorífica a  $5 \pm 3$  °C.

### 4.4 Preparação de Soluções

#### 4.4.1 Solventes e Fase móvel

- Fase móvel A: água ultrapura com 0,05% (v/v) de solução de amoníaco  
Adicionar 0,5 mL de solução de amoníaco de 25% a um balão volumétrico de 1000 mL, que contém água ultrapura. Agitar bem, de modo a homogeneizar a solução, e colocar em banho de ultrassons, para remover quaisquer bolhas de ar. O pH desta solução é de, aproximadamente, 10,5.
- Fase móvel B e solvente de lavagem forte (*strong wash solvent*): metanol  
As fases móveis possuem a validade de 3 dias.
- Solvente de lavagem fraca (*weak wash solvent*), lavagem de selo (*seal wash solvent*) e solvente na preparação de soluções: água:metanol (7:3)  
Num balão volumétrico de 1000 mL, adicionar 700 mL de água ultrapura e 300 mL de metanol. Agitar bem e colocar em banho de ultrassons.

#### 4.4.2 Soluções Padrão

##### 4.4.2.1 Solução Padrão Primária de $\beta$ -Estradiol

A solução padrão primária foi preparada através da pesagem de 0,0200 g do padrão comercial, numa balança analítica calibrada, para um balão volumétrico de 50 mL. A dissolução do padrão deu-se em metanol, sendo que, posteriormente, se agitou a solução no vortex e colocou-se no ultrassons, para garantir que a dissolução foi bem efetuada.

A concentração obtida seria de 400 mg/L, contudo, uma vez que a pureza do padrão é de 96,13%, a concentração é 385 mg/L. Esta solução possui a validade de 1 ano, tendo sido conservada num congelador a uma temperatura  $\leq -18$  °C.

#### 4.4.2.2 Solução Padrão Intermédia I de $\beta$ -Estradiol

Para preparar a solução padrão intermédia I pipetou-se 1,04 mL da solução padrão primária, para um balão volumétrico de 20 mL, que foi aferida com metanol, de modo a obter-se uma concentração de 20 mg/L. Esta solução foi guardada da mesma forma que a solução padrão primária, contudo a validade atribuída foi de 1 mês.

#### 4.4.2.3 Solução Padrão Intermédia II de $\beta$ -Estradiol

A solução padrão intermédia II foi preparada pipetando 1,0 mL da solução padrão intermédia I para um balão volumétrico de 25 mL, perfazendo-se o volume com metanol. A concentração obtida foi de 800  $\mu$ g/L. A sua preparação foi efetuada em cada dia de trabalho.

#### 4.4.2.4 Solução Padrão Intermédia III de $\beta$ -Estradiol

A solução padrão intermédia III foi preparada pipetando 1,25 mL da solução padrão intermédia II para um balão volumétrico de 50 mL, perfazendo-se o volume com água:metanol (7:3), de modo a obter uma concentração de 20  $\mu$ g/L. A sua preparação foi efetuada em cada dia de trabalho.

#### 4.4.2.5 Solução Padrão Primária de $\beta$ -Estradiol-D<sub>5</sub>

A solução padrão primária de  $\beta$ -estradiol-D<sub>5</sub> foi obtida transferindo 100  $\mu$ L de padrão comercial (100 mg/L) para um vial e diluindo em 400  $\mu$ L de metanol, para se obter uma concentração de 20 mg/L. Esta solução possui a validade de 1 ano, tendo sido conservada num congelador a uma temperatura  $\leq -18$  °C.

#### 4.4.2.6 Solução Padrão Intermédia I de $\beta$ -Estradiol-D<sub>5</sub>

De modo a obter uma concentração de 50  $\mu$ g/L de solução padrão intermédia I de PI, pipetou-se 62,5  $\mu$ L de solução padrão primária para um balão volumétrico de 25 mL, perfazendo-se o volume com metanol. A validade atribuída a esta solução foi de 2 meses.

#### 4.4.2.7 Soluções Padrão de Calibração

As soluções padrão de calibração foram preparadas pipetando diferentes volumes da solução intermédia III de estradiol e de solução intermédia I de padrão interno, sendo o solvente utilizado água:metanol (7:3). A concentração de PI em cada solução padrão de calibração é de 5 µg/L. Estas soluções foram preparadas diariamente, de modo a traçar a reta de calibração. Assim, os volumes adicionados e as concentrações de cada padrão encontram-se na Tabela 4.1.

**Tabela 4.1** - Volumes pipetados e concentração para cada solução padrão de calibração.

Solução Padrão	Volume de Solução Intermédia III de estradiol (µL)	Volume de Solução Intermédia I de estradiol-D <sub>5</sub> (µL)	Volume de Solvente água:metanol (7:3) (µL)	Volume final (µL)	Concentração de estradiol (µg/L)
P1	50	100	850	1000	1,0
P2	100	100	800	1000	2,0
P3	75	50	375	500	3,0
P4	100	50	350	500	4,0
P5	250	100	650	1000	5,0
P6	150	50	300	500	6,0
P7	180	50	270	500	7,2
P8	440	100	460	1000	8,8
P9	250	50	200	500	10

#### 4.4.2.8 Soluções Padrão para o Estudo de Linearidade do PI

De modo a estudar a linearidade do padrão interno foram preparadas 9 soluções padrão com as mesmas concentrações que as soluções padrão de β-estradiol. Para tal, preparou-se, primeiramente, uma solução intermédia de β-estradiol-D<sub>5</sub>, a partir da solução primária, descrita em 4.4.2.5, pipetando-se 25 µL para um volume final de 25 mL, em metanol, obtendo-se uma concentração de 20 µg/L.

As soluções padrão para estudo da linearidade do PI foram preparadas adicionando diferentes volumes de solução intermédia III de estradiol, de solução intermédia de PI acima descrita, e de solvente água:metanol (7:3), como se demonstra na Tabela 4.2.

**Tabela 4.2** - Volumes pipetados e concentração para cada solução padrão de PI.

Solução Padrão	Volume de Solução Intermédia III de estradiol ( $\mu\text{L}$ )	Volume de Solução Intermédia de estradiol- $\text{D}_5$ ( $\mu\text{L}$ )	Volume de Solvente água:metanol (7:3) ( $\mu\text{L}$ )	Volume final ( $\mu\text{L}$ )	Concentração de estradiol- $\text{D}_5$ ( $\mu\text{g/L}$ )
P1	50	50	900	1000	1,0
P2	100	100	800	1000	2,0
P3	75	75	350	500	3,0
P4	100	100	300	500	4,0
P5	250	250	500	1000	5,0
P6	150	150	200	500	6,0
P7	180	180	140	500	7,2
P8	220	220	60	500	8,8
P9	500	500	-	1000	10

#### 4.4.2.9 Soluções para a Otimização das Condições de Operação do Espectrómetro de Massa

##### 4.4.2.9.1 Solução Padrão de Estradiol para Infusão

Para um balão volumétrico de 5 mL, pipetou-se 1 mL da solução intermédia I de estradiol (4.4.2.2) e fez-se o volume com metanol:água com 0,05% (v/v) de solução de amoníaco (1:1), obtendo-se uma concentração de 4 mg/L. Transferiu-se o volume necessário para um vial, de modo a efetuar a infusão no espectrómetro de massa.

##### 4.4.2.9.2 Solução Padrão de Estradiol- $\text{D}_5$ para Infusão

De modo a obter a mesma concentração que a solução anterior (4 mg/L), pipetou-se 50  $\mu\text{L}$  da solução comercial do padrão interno (100 mg/L) e adicionou-se 1,2 mL de solvente metanol:água com 0,05% (v/v) de solução de amoníaco (1:1).

#### 4.4.2.10 Solução Padrão de Fortificação para Ensaio de Recuperação

A solução padrão de fortificação foi preparada através da adição de 0,75 mL de solução intermédia III (4.4.2.4) a um balão volumétrico de 5 mL, perfazendo-se o volume com água:metanol (7:3), com o objetivo de obter uma concentração de 3  $\mu\text{g/L}$ .

## 4.5 Condições do Espetrómetro de Massa

O desenvolvimento de um método analítico envolve a otimização e definição de diversos parâmetros. Primeiramente, é necessário definir as condições que permitem detetar o composto em análise, através da otimização das condições do espectrómetro de massa. Porém, existem alguns parâmetros previamente definidos, que se encontram na Tabela 4.3.

**Tabela 4.3** - Condições previamente definidas para o espectrómetro de massa.

Gás de nebulização, de dessolvatação e de cone	Azoto
Gás de colisão	Árgon
Extrator (V)	2
Radiofrequência (V)	0,1
Temperatura da Fonte (°C)	150
Temperatura de dessolvatação (°C)	350
Fluxo do gás de cone (L/h)	25
Fluxo do gás de dessolvatação (L/h)	900

O primeiro objetivo foi a obtenção do ião precursor, resultante da ionização do composto por *electrospray* em modo negativo, uma vez que este tem tendência para desprotonar. Para tal, procedeu-se à infusão da solução descrita em 4.4.2.9.1, com um fluxo de 20 µL/min, em modo de aquisição *full scan*, apenas com o primeiro quadrupolo em funcionamento, o que permitiu analisar todos os iões e identificar o ião precursor.

De seguida, otimizaram-se as condições de obtenção do ião precursor, através da alteração dos parâmetros que mais impacto têm na intensidade do sinal: tensão no capilar e voltagem de cone.

Primeiro, alterou-se a tensão no capilar para valores entre 0,5 e 3,5 kV. Após a obtenção do valor que permite obter a maior intensidade, alterou-se a voltagem de cone para valores entre 10 e 90 V.

Com o ião precursor identificado e as condições otimizadas, procedeu-se à identificação dos iões produto, pelo modo de aquisição *daughter scan*, ou seja, o primeiro quadrupolo opera em modo SIM e o terceiro quadrupolo em modo *full scan*. Por análise do espectro obtido, selecionaram-se os dois iões produto com maior intensidade de sinal, sendo que, de seguida, se alterou a energia de colisão, no segundo quadrupolo (célula de colisão), entre 5 e 60 eV.

Após a otimização de todos os parâmetros necessários à identificação dos iões precursor e produto, foi possível definir as transições do analito em estudo (MRM1 e MRM2).

Neste caso, como se procede à adição de padrão interno, também é necessária a sua monitorização, assim, também se procedeu à infusão direta da solução descrita em 4.4.2.9.2.

O procedimento foi semelhante, sendo que primeiro se identificou e otimizou as condições do ião precursor. Portanto, alterou-se a voltagem de cone entre 10 e 80 V e alterou-se a tensão no capilar para valores entre 0,5 e 3,5 kV, para confirmar que o melhor valor era igual ao definido anteriormente, uma vez que este não pode ser alterado ao longo da análise para cada composto.

De seguida, identificou-se um ião produto através da otimização da energia de colisão entre 5 e 60 eV. Por fim, definiu-se a transição MRM mais vantajosa em termos de sensibilidade.

## 4.6 Condições Cromatográficas

As condições cromatográficas utilizadas, que se observam nas Tabelas 4.4 e 4.5, foram as mesmas que já se utilizam em rotina na EPAL, para análise de desreguladores endócrinos, da qual o estradiol faz parte.

**Tabela 4.4** - Condições cromatográficas utilizadas para a análise do analito.

Coluna cromatográfica	ACQUITY UPLC BEH C <sub>18</sub> (2,1 mm x 50 mm; 1,7 µm)
Fase móvel	A: Água ultrapura com 0,05% (v/v) de solução de amoníaco B: Metanol
Fluxo do eluente (mL/min)	0,3
Temperatura da coluna (°C)	40
Temperatura do amostrador (°C)	10
Volume de injeção (µL)	20
Tempo de análise (min)	9

**Tabela 4.5** - Gradiente da fase móvel.

Tempo (min)	Solvente A (%)	Solvente B (%)
0,0	70	30
0,3	70	30
4,0	5	95
6,0	5	95
6,2	70	30
9,0	70	30

Assim, todos os dados necessários para definir o método de análise de estradiol no *software* do equipamento estão reunidos. Na Tabela 4.6, é possível observar as condições definidas, sendo que se definiram dois métodos de análise e tratamento de resultados. O primeiro considera o padrão interno, portanto a resposta obtida é a área relativa (área pico estradiol/ área pico PI), enquanto o segundo não considera o PI, logo a resposta obtida é a área absoluta de estradiol (método do padrão externo).

**Tabela 4.6** - Condições inseridas no método criado no *software* para análise de estradiol.

Composto	Modo de Ionização	Ião precursor (m/z)	Tensão no capilar (kV)	Voltagem de Cone (V)	Iões produto (m/z)	Transição MRM	Energia de Colisão (eV)
β-estradiol	ESI-	271,2	2,5	55	144,9	MRM1 (quantificação)	30
					182,9	MRM2 (qualificação)	30
β-estradiol-D <sub>5</sub>	ESI-	276,3		60	146,9	MRM1 (quantificação)	30

## 4.7 Validação do Método de Ensaio

### 4.7.1 Estudo da Linearidade

Para averiguar a linearidade na gama de trabalho definida analisaram-se as soluções padrão descritas em 4.4.2.7 e 4.4.2.8.

Os resultados obtidos foram tratados através do Método dos Mínimos Quadrados, de modo a se obter um ajuste linear. A estes resultados foram então aplicados os testes estatísticos referidos anteriormente, que para serem aceites devem cumprir certos critérios:

- Coeficiente de correlação ( $R$ )  $\geq 0,995$ ;
- Desvio do teste de análise de resíduos  $\pm 10\%$ ;
- Coeficiente de variação do método ( $CV_m$ )  $\leq 5\%$ ;
- Teste de Mandel  $VT < F_{(1, N-3, 95\%)}$ ;
- Valor do teste de RIKILT  $\geq 90\%$  e  $\leq 110\%$ ;
- Valor do teste das áreas normalizadas  $\geq 85\%$  e  $\leq 115\%$ .

Um dos critérios de qualificação é o valor da razão das transições MRM1/MRM2, assim avaliou-se ainda a sua estabilidade ao longo da gama de trabalho.

#### 4.7.2 Limiares Analíticos

Os limites de deteção e de quantificação instrumentais foram determinados, em condições de repetibilidade (n=10), através da injeção do padrão de concentração inferior do intervalo de linearidade (P1). Foram também calculados a partir da reta de calibração e através da razão sinal/ruído, tendo em conta o padrão de menor concentração. Os critérios de aceitação considerados foram que o LOQ deve ser inferior ao primeiro padrão da reta e que a razão sinal/ruído deve ser superior a 10.

#### 4.7.3 Precisão

A precisão foi avaliada em termos de repetibilidade e de precisão intermédia. Para estudar a precisão, em condições de repetibilidade, foram analisados quatro níveis de concentração diferentes, ou seja, analisaram-se os padrões de calibração do início da gama de trabalho (P1 e P2), o padrão a meio da gama (P5) e o padrão do fim (P9). A precisão intermédia foi avaliada, em diferentes dias de trabalho, através da análise de uma solução padrão de gama mais baixa (P2) e de uma solução padrão de gama mais alta (P8). Como critério de aceitação considerou-se que o coeficiente de variação deve ser sempre inferior a 15%.

### 4.8 Condições de Preparação da Amostra

As condições utilizadas para preparar a amostra, através da técnica de SPE, já eram utilizadas no laboratório, tendo sido otimizadas em estudos prévios. As tarefas executadas pelo programa encontram-se na Tabela 4.7.

**Tabela 4.7** - Condições da técnica de SPE.

<b>Condicionamento</b>	6,0 mL de metanol:acetona (3:2) a 10 mL/min
	6,0 mL de metanol a 10 mL/min
	5,0 mL de água ultrapura a 10 mL/min
<b>Aplicação da amostra</b>	500 mL de amostra a 30 mL/min
<b>Lavagem</b>	1,0 mL de água ultrapura a 10 mL/min
<b>Secagem</b>	20 minutos com corrente de azoto
<b>Eluição</b>	4+2 mL de metanol:acetona (3:2) a 2,0 mL/min

Como é necessário concentrar a amostra e o solvente de eluição não é o mais apropriado para análise do composto, procedeu-se à evaporação do solvente até à secura. Para tal utilizou-se um sistema TurboVap, sendo que as condições definidas se encontram na Tabela 4.8.

**Tabela 4.8** - Condições do sistema de concentração sob corrente de azoto.

Temperatura do banho de água (°C)	35
Pressão (bar)	0,2

O procedimento de preparação de amostras realizado foi o seguinte:

1. Colocaram-se os cartuchos OASIS HLB, os balões volumétricos com as amostras e os tubos de ensaio, para recolha, no sistema de SPE;
2. Ativou-se o programa descrito na Tabela 4.7;
3. No fim, transferiu-se o volume dos tubos de ensaio para tubos de evaporação;
4. Concentraram-se os extratos obtidos no sistema de concentração sob corrente de azoto, até à secura, de acordo com as condições da Tabela 4.8;
5. Reconstituíram-se os extratos com um volume de 0,2 mL e agitou-se no vortex;
6. Transferiu-se o volume para *vials*;
7. Procedeu-se à análise, tendo em conta as condições definidas nos pontos 4.5 e 4.6.

## 4.9 Ensaio de Recuperação

De modo a avaliar a eficiência do passo de preparação da amostra, bem como a exatidão e a aplicabilidade do método, realizaram-se ensaios de recuperação em diferentes matrizes e em diferentes níveis de fortificação, nomeadamente a 1 ng/L, o limite que se pretende atingir, a 2 ng/L e a 3 ng/L.

A cada 500 mL de água a analisar, adicionou-se 0,05 g de tiosulfato de sódio, de modo a eliminar o cloro residual.

Para o nível de fortificação de 1 ng/L, adicionou-se 334 µL de solução padrão de fortificação (3 µg/L), descrita em 4.4.2.10, por cada litro de volume de amostra.

Para o nível de fortificação de 2 ng/L, adicionou-se 0,67 mL de solução padrão de fortificação por cada litro de amostra.

Por fim, para o nível de fortificação de 3 ng/L, adicionou-se 1,0 mL de solução padrão de fortificação por cada litro de amostra.

Por cada amostra analisada, foram realizadas, no mínimo duas réplicas. Também se procedeu sempre à preparação e análise de um ensaio em branco, de modo a corrigir os resultados obtidos, caso o composto em estudo estivesse presente. Foi também necessário adicionar padrão interno a todas as preparações, para se obter uma concentração de 5 µg/L nos *vials*, a mesma concentração presente nas soluções padrão de calibração. Adicionou-se 20 µL de solução intermédia I de PI (50 µg/L) por cada 500 mL de volume de amostra, tendo em conta que o volume final, após concentração e reconstituição, é de 200 µL.

Como se parte de um volume inicial de 500 mL e o volume final é de 0,2 mL, o fator de concentração que se obtém é de 2500. Portanto, as concentrações finais obtidas nos *vials* são de 2,5 µg/L, 5,0 µg/L e 7,5 µg/L, respetivamente para cada nível de concentração. Estes valores encontram-se dentro da gama de trabalho, o que permite efetuar interpolação.

O procedimento realizado foi o descrito em 4.8, sendo que, após a concentração até à *secura*, se reconstituiu o extrato com 0,2 mL de água:metanol (7:3).

#### 4.10 Efeitos de Matriz

Os efeitos da matriz foram avaliados durante a validação do método de ensaio, por forma a justificar a necessidade de utilização de padrão interno.

Por cada 500 mL de amostra, procedeu-se à adição de 0,05 g de tiosulfato de sódio. De seguida, realizou-se a SPE e a concentração até à *secura*, como descrito anteriormente. No fim, adicionaram-se 150 µL de água:metanol (7:3) e 50 µL de solução intermédia III de estradiol (20 µg/L), de modo a obter uma concentração de 5 µg/L no *vial*. A solução obtida foi comparada com o padrão de calibração P5 (5 µg/L), através do método cromatográfico definido sem padrão interno. Se a área de amostra obtida fosse significativamente diferente da área do padrão de calibração, verificavam-se efeitos de matriz, ou seja, se o módulo da diferença percentual fosse superior a 20%.

## Capítulo 5 - Apresentação e Discussão dos Resultados

### 5.1 Otimização das Condições do Espectrômetro de Massa

O desenvolvimento do método analítico iniciou-se com a definição das condições do espectrômetro de massa, de modo a permitir a adequada identificação e quantificação do composto em estudo. Para tal, otimizaram-se três parâmetros: tensão no capilar, voltagem de cone e energia de colisão, de modo a maximizar a intensidade do sinal, ou seja, para obter o máximo de seletividade e sensibilidade.

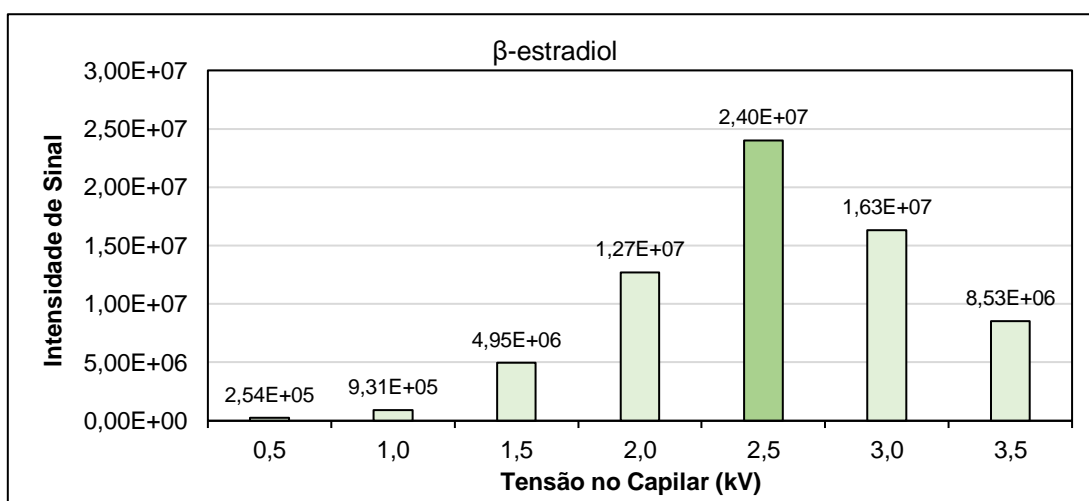
Numa primeira fase, otimizaram-se os parâmetros relacionados com a formação do ião precursor (tensão no capilar e voltagem de cone), que ocorre na fonte de ionização, e de seguida o parâmetro relacionado com a formação dos iões produto (energia de colisão), que ocorre na célula de colisão.

Para otimizar as condições da fonte de ionização, procedeu-se à infusão direta do composto de interesse e do seu padrão interno, como descrito no ponto 4.5.

Devido às suas propriedades ácidas, o estradiol tem tendência para desprotonar, assim o ião precursor formado será um ião molecular desprotonado ( $M-H^-$ ), daí a escolha de utilização do *Electrospray* em modo negativo.

Após a identificação do ião precursor, estudou-se a influência da variação da tensão no capilar na intensidade do ião formado, sendo que os resultados obtidos se encontram na Figura 5.1.

Como a tensão no capilar que permite obter a maior intensidade de sinal é de 2,5 kV para ambos os compostos, esse foi o valor selecionado. Após a fixação deste parâmetro, selecionou-se a melhor voltagem de cone, como se observa na Figura 5.2.



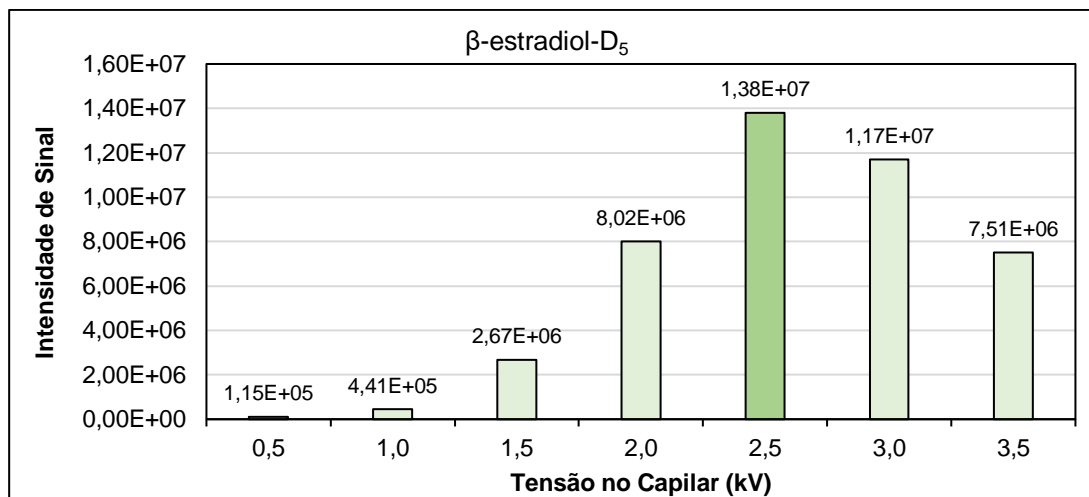


Figura 5.1 - Representação gráfica da variação da intensidade do sinal com a tensão no capilar para o íon precursor do estradiol ( $m/z=271,2$ ) e do padrão interno ( $m/z=276,3$ ).

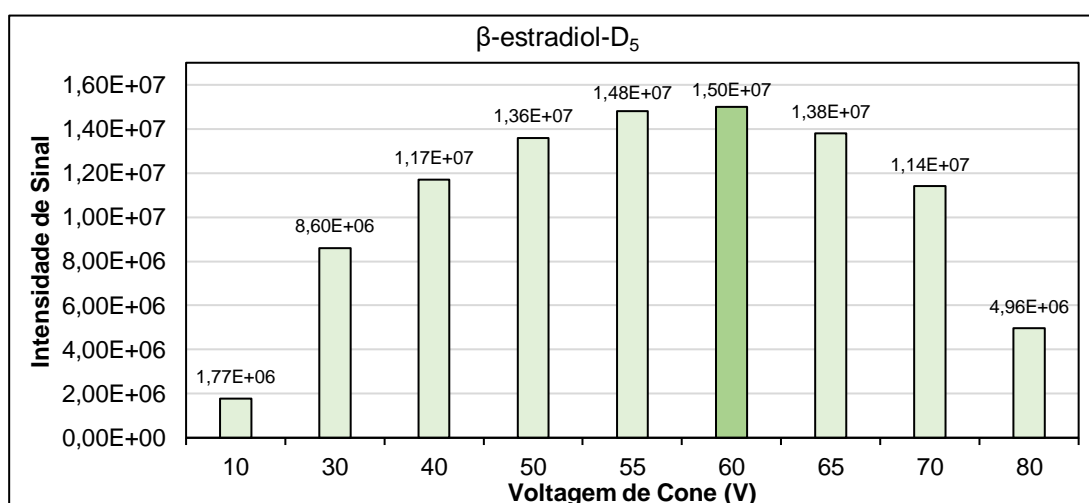
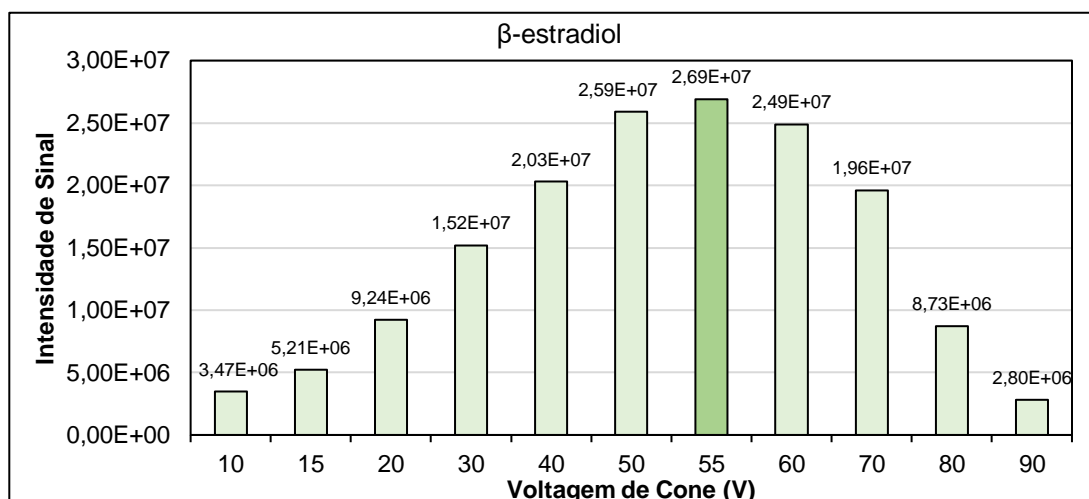


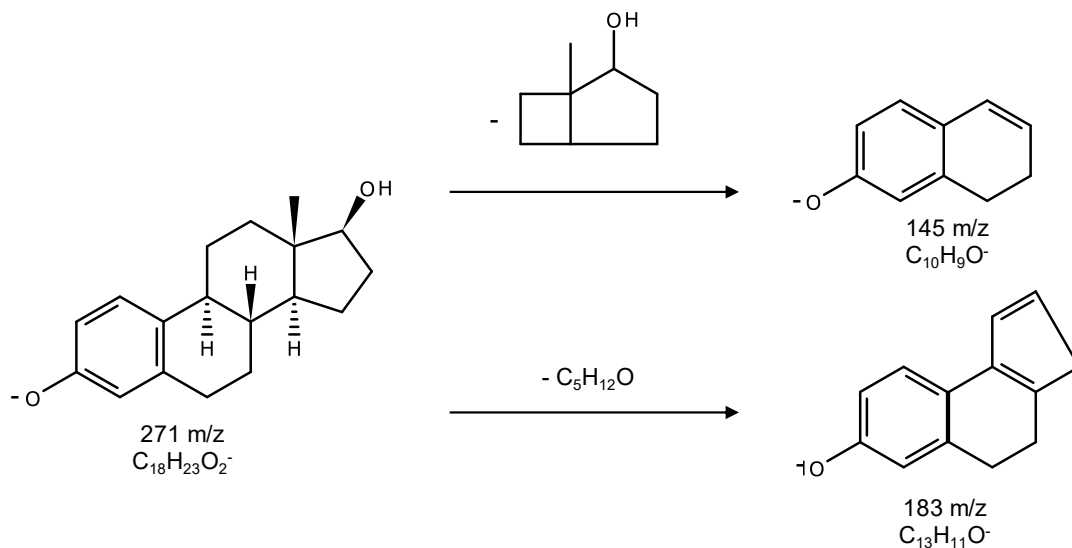
Figura 5.2 - Representação gráfica da variação da intensidade do sinal com a voltagem de cone para o íon precursor do estradiol ( $m/z=271,2$ ) e do padrão interno ( $m/z=276,3$ ).

Para o estradiol, avaliaram-se voltagens de cone compreendidas entre 10 e 90 V. Como se verificou que se obtinham intensidades maiores para valores de 50 e 60 V, analisou-se ainda a voltagem de 55 V, que se verificou ser a que possibilitava a maior intensidade de sinal.

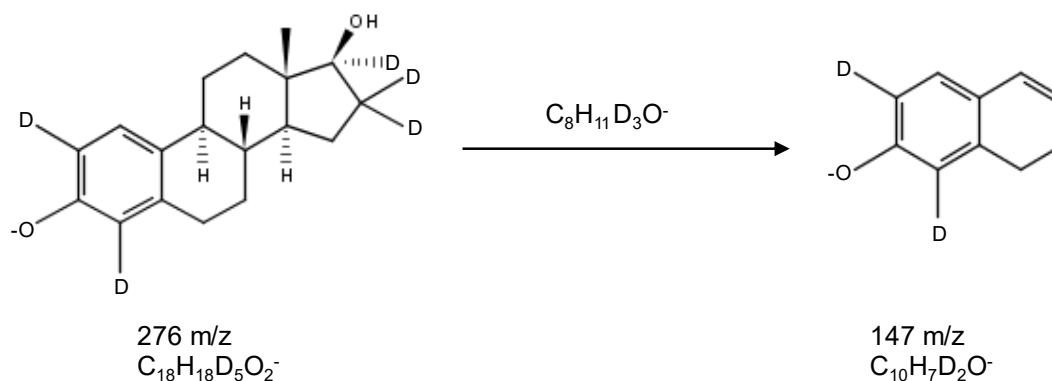
Para o estradiol-D<sub>5</sub>, alterou-se a voltagem de cone para valores entre 10 e 80 V. Como se verificou que se obtinham maiores intensidades para valores de 50 e 60 V, analisou-se ainda as voltagens de 55 e 65 V, sendo que se verificou que a voltagem de 60 V permitia uma maior intensidade de sinal.

Após a otimização dos parâmetros de ionização pôde proceder-se à otimização das condições de operação do analisador de massas. Para tal, procedeu-se à infusão direta do composto de interesse e do seu padrão interno, sendo que se avaliaram os espectros obtidos da fragmentação do ião precursor através da alteração da energia de colisão, por análise em modo *Daughter Scan*.

O modo de operação do triplo quadrupolo a ser utilizado em rotina é o MRM. Assim, selecionaram-se dois iões produto para o estradiol e um ião produto para o padrão interno. Os iões produto selecionados para o estradiol apresentam uma razão m/z de 144,9 e 182,9, o que está de acordo com a Tabela 2.2, sendo que a fragmentação proposta se encontra na Figura 5.3. Para o padrão interno, o ião produto selecionado apresenta uma razão m/z de 146,9. A fragmentação proposta encontra-se na Figura 5.4.

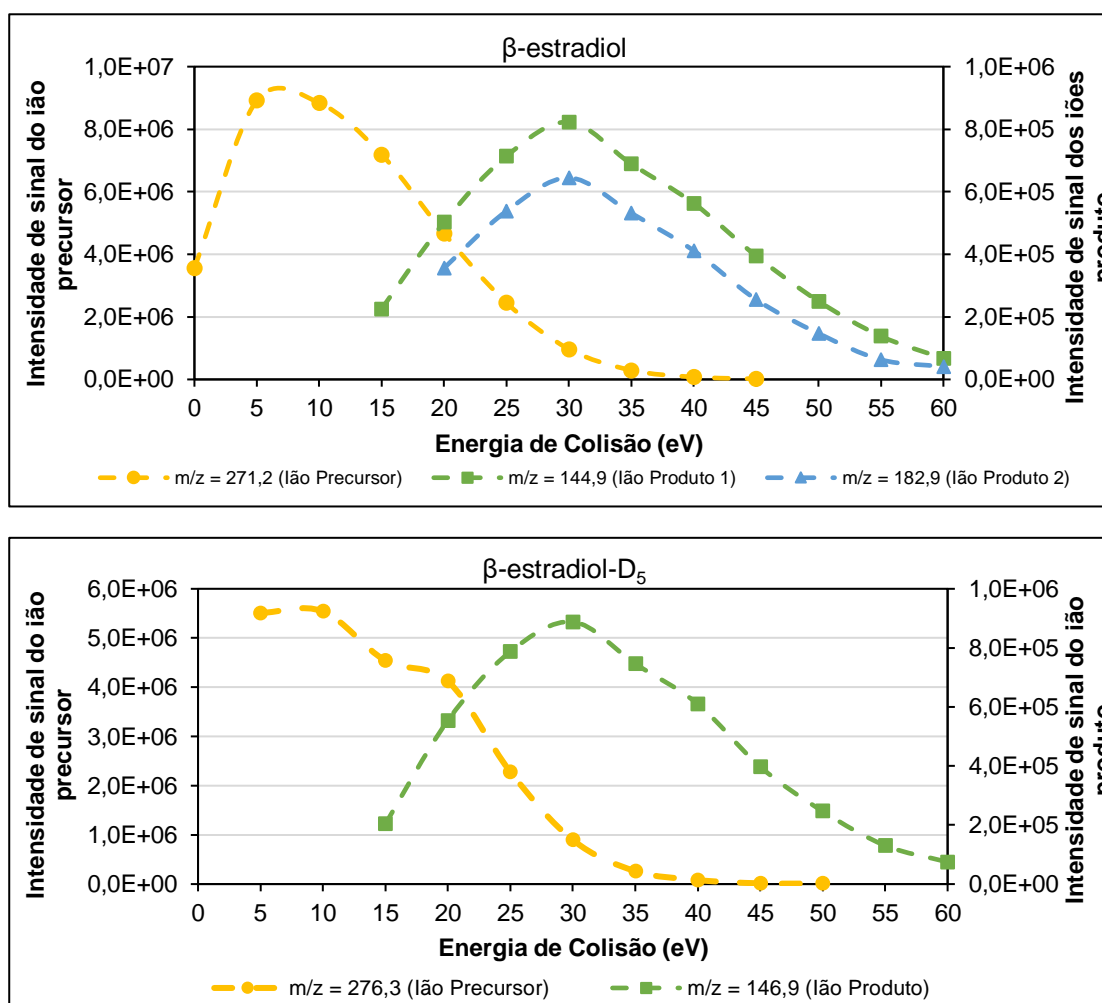


**Figura 5.3** - Fragmentação proposta do ião precursor de estradiol (adaptado de [106]).



**Figura 5.4** - Fragmentação proposta do íon precursor de estradiol-D<sub>5</sub>.

Na Figura 5.5, é possível observar a evolução da fragmentação do íon precursor nos íões produto selecionados em função da energia de colisão.



**Figura 5.5** - Representação gráfica da variação da intensidade do sinal com a energia de colisão para os íões precursor e produto selecionados para o β-estradiol e para o β-estradiol-D<sub>5</sub>.

A partir da Figura 5.5 é possível observar que o aumento da energia de colisão promove a fragmentação do ião precursor, uma vez que existe diminuição da intensidade do seu sinal. A energia de colisão ótima permite a formação dos iões produto com intensidade de sinal máxima, contudo ainda deve ser possível detetar o ião precursor, de forma a garantir que os fragmentos formados advêm deste. A energia de colisão ótima para o estradiol e para o PI é de 30 eV, para todos os iões produto.

Nas Figuras 5.6 e 5.7, estão representados os espectros de massa obtidos para as condições ótimas definidas.

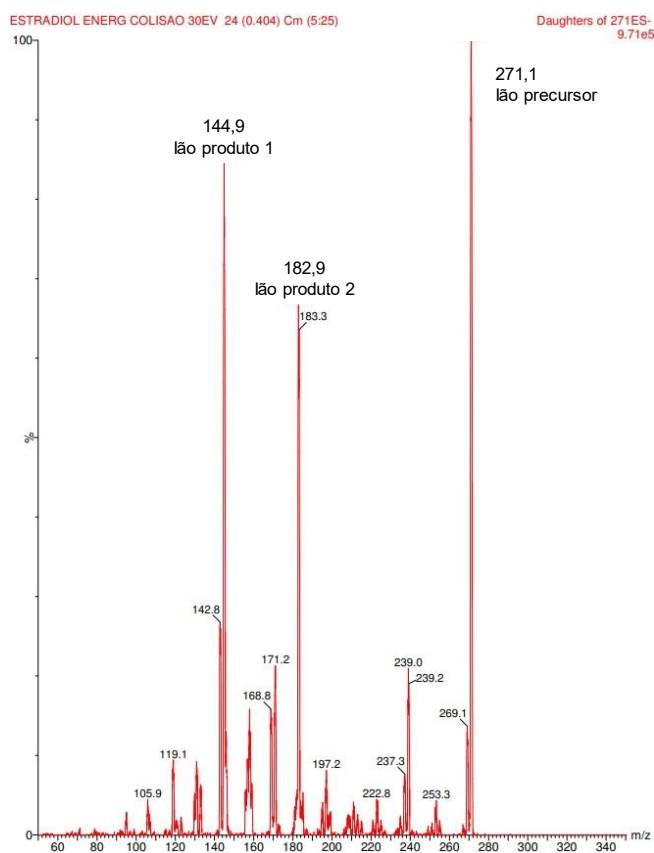
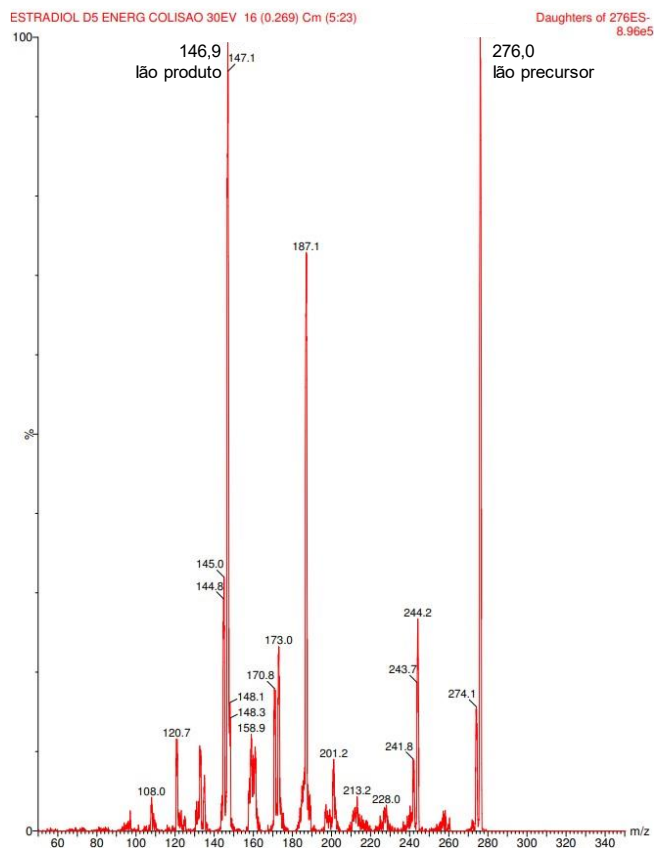


Figura 5.6 - Espectro de massa do estradiol obtido no modo *Daughter Scan* para uma energia de colisão de 30 eV.



**Figura 5.7** - Espectro de massa do estradiol-D<sub>5</sub> obtido no modo *Daughter Scan* para uma energia de colisão de 30 eV.

Os parâmetros utilizados no modo MRM encontram-se resumidos na Tabela 5.1.

**Tabela 5.1** - Resumo das condições ótimas para a obtenção do íon precursor e dos íões produto.

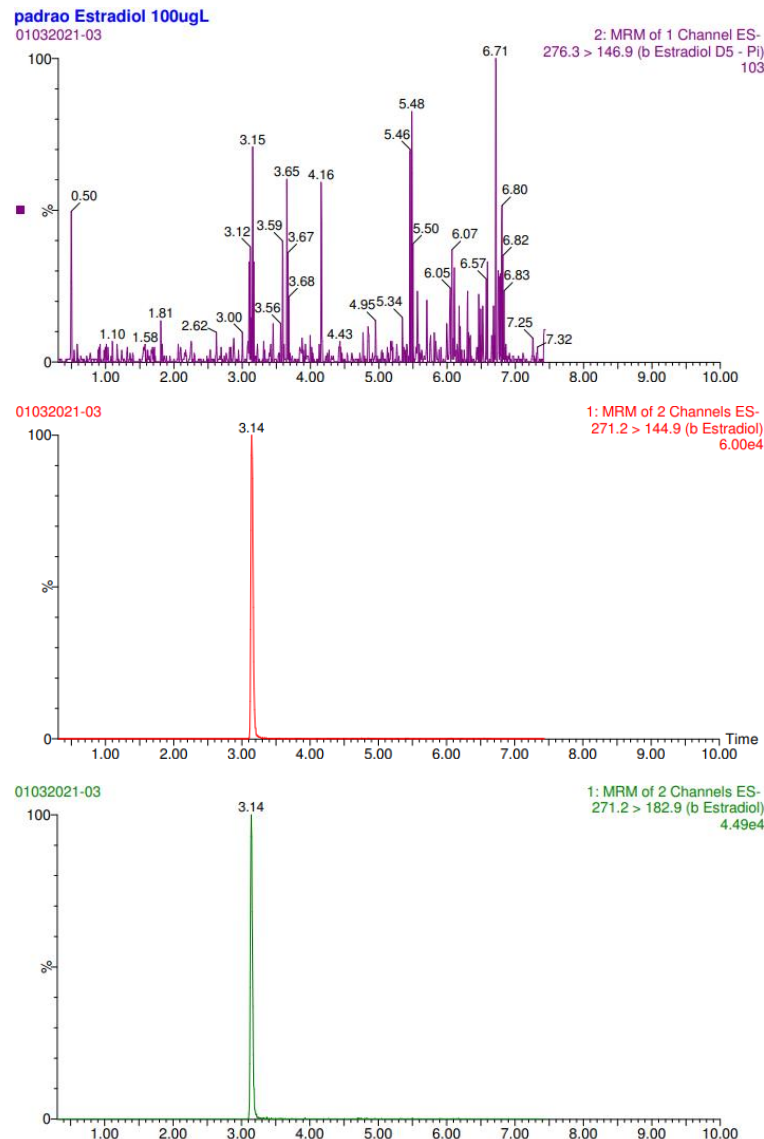
Composto	Massa molecular (g/mol)	ESI-				
		Tensão no capilar (kV)	Voltagem de cone (V)	Transição MRM (m/z)	Energia de colisão (eV)	
Estradiol	272,38	2,5	55	MRM1	271,2→144,9	30
				MRM2	271,2→182,9	30
Estradiol-D <sub>5</sub>	277,41		60	MRM1	276,3→146,9	30

## 5.2 Condições Cromatográficas

Após se terem determinado as condições de monitorização do composto no espectrômetro de massa, injetou-se uma solução padrão de estradiol e uma de PI, com 100 µg/L, nas condições descritas no ponto 4.6, de modo a determinar um tempo de retenção típico e avaliar a

existência de interferentes. Analisou-se também o solvente água:metanol (7:3), ou seja um branco, de modo a garantir que os compostos não se encontravam presentes.

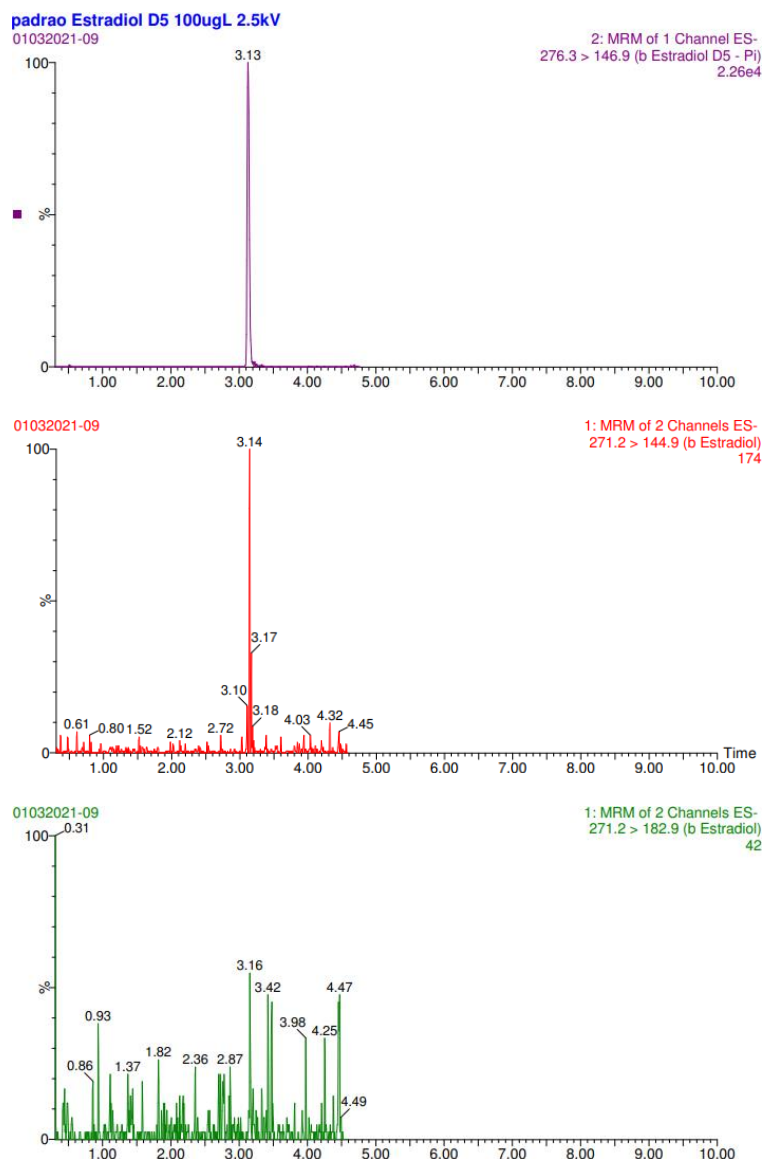
Nas Figuras 5.8 a 5.10 é possível observar os cromatogramas obtidos da injeção do padrão de estradiol, do padrão de PI e do solvente, respetivamente, sendo que, em cada conjunto de cromatogramas, o primeiro diz respeito à transição do PI e os outros às transições do estradiol, MRM1 e MRM2.



**Figura 5.8** - Cromatogramas obtidos da injeção de uma solução padrão de estradiol.

A partir da Figura 5.8, é possível observar que, na janela do PI, apenas existe ruído, logo confirma-se que não existe interferência do estradiol na janela de monitorização do estradiol-D<sub>5</sub>. Já nas outras janelas, observam-se os picos cromatográficos nas transições de quantifica-

ção e qualificação esperadas para o estradiol com um tempo de retenção de 3,14 min. Por comparação com a Tabela 2.2, observa-se que o composto tem um menor tempo de retenção. Em comparação com os estudos efetuados em HPLC já era expectável que tal acontecesse. Já em comparação com os estudos em UPLC, o tempo de retenção é menor, pois as colunas utilizadas são de maior dimensão (Tabela 2.1), exceto uma. Contudo, existem outras características que têm influência, como o gradiente de eluição, as fases móveis e a temperatura da coluna.



**Figura 5.9** - Cromatogramas obtidos da injeção de uma solução padrão de PI.

A partir da Figura 5.9, é possível observar a transição esperada do PI, com um tempo de retenção de 3,13 min, portanto conclui-se que a eluição é perto do analito de interesse. Na janela que diz respeito à transição MRM1 do estradiol, observa-se uma interferência de estra-

diol-D<sub>5</sub> que não é significativa, uma vez que a intensidade do sinal é muito baixa. Já na janela relativa à transição MRM de qualificação, não se observam interferências.

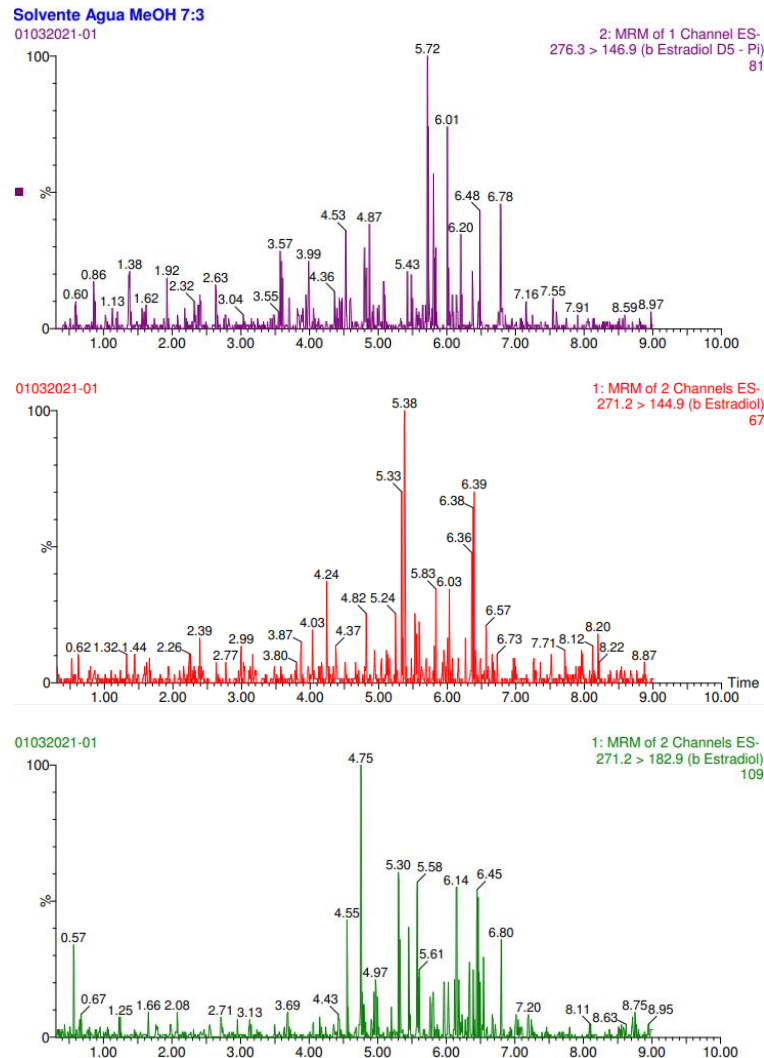


Figura 5.10 - Cromatogramas obtidos da injeção do solvente.

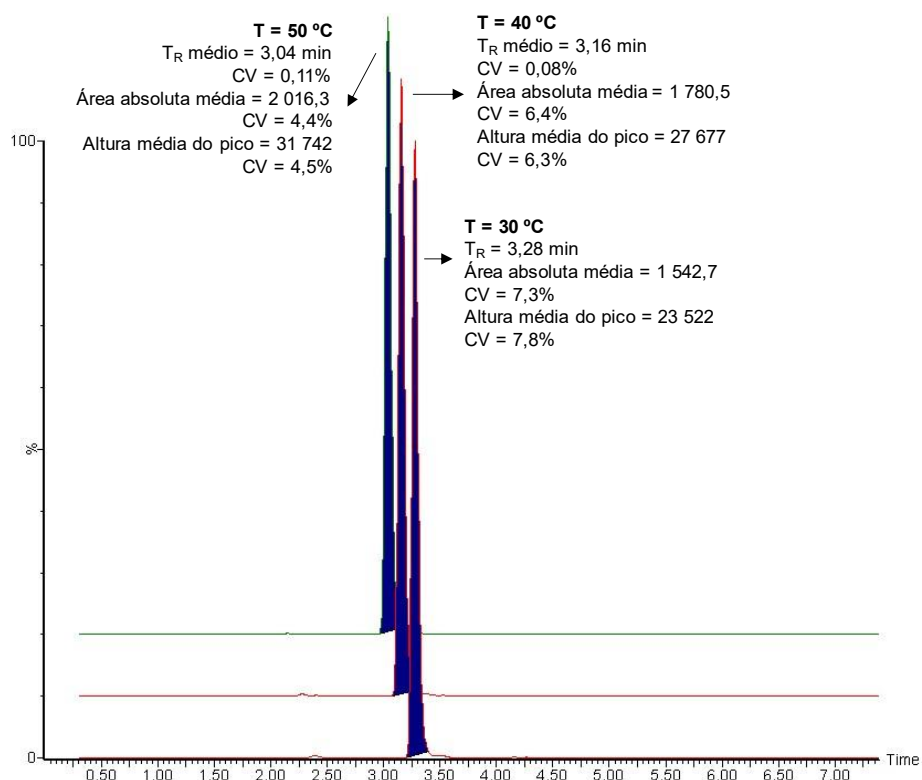
Por fim, a partir da Figura 5.10, pode observar-se que o solvente utilizado não apresenta qualquer presença de interferentes ao tempo de retenção dos analitos.

### 5.2.1 Estudo do Efeito da Temperatura da Coluna

Apesar das condições cromatográficas se encontrarem previamente definidas, estudou-se qual o efeito da temperatura da coluna no processo cromatográfico, mais especificamente na área de pico absoluta, na altura de pico e no tempo de retenção do analito. Para tal, injetou-

-se o padrão P9 (10 µg/L), em condições de repetibilidade (n=4), alterando-se a temperatura da coluna para valores de 30, 40 e 50 °C.

Na Figura 5.11 observa-se os cromatogramas obtidos, bem como a média dos resultados, tendo em conta as diferentes temperaturas.



**Figura 5.11** - Cromatogramas representativos do efeito da temperatura no tempo de retenção, na área absoluta e na altura de pico.

O aumento da temperatura leva a uma diminuição da viscosidade da fase móvel, o que faz com que a transferência de massa aumente, o que permite que exista maior difusão do analito e, conseqüentemente, o tempo de retenção diminua e a sensibilidade aumente.

Deve haver um compromisso entre o sinal obtido e o tempo de retenção, uma vez que o composto não deve eluir demasiado cedo, pois é no início do cromatograma que se encontram a maioria dos interferentes. Para além disso, o limite máximo da coluna cromatográfica é de 60 °C, portanto a temperatura de 50 °C pode diminuir o seu tempo de vida.

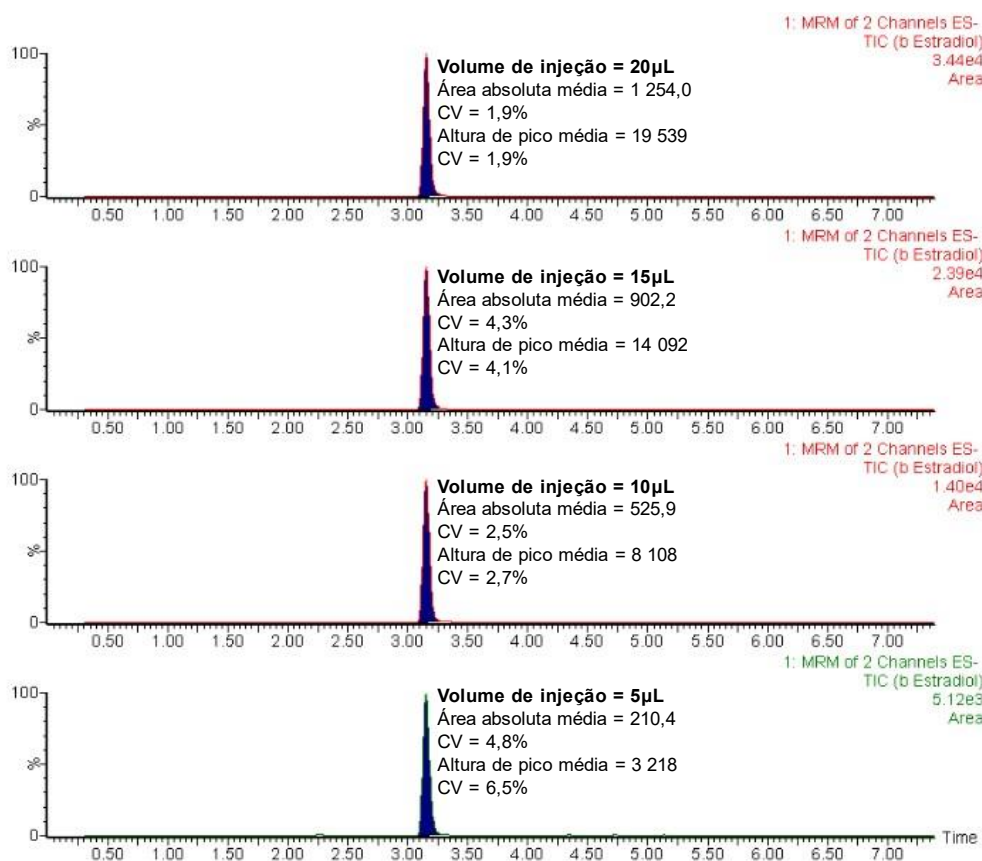
Portanto, comprova-se que a temperatura, previamente definida, de 40 °C é adequada.

### 5.2.2 Estudo do Efeito do Volume de Injeção

Para avaliar o efeito do volume de injeção no sinal obtido, injetou-se o padrão P9, em condições de repetibilidade (n=4), alterando-se o volume para valores de 5, 10, 15 e 20 µL.

O volume de injeção deve ser reduzido para evitar a dispersão da amostra e, conseqüentemente, o alargamento do pico cromatográfico. O valor máximo permitido pelo equipamento utilizado é de 20  $\mu\text{L}$ .

A alteração deste parâmetro tem influência na área e na altura de pico obtidas. Os resultados encontram-se na Figura 5.12.



**Figura 5.12** - Cromatogramas representativos do efeito do volume de injeção na área absoluta e na altura de pico.

Os resultados obtidos demonstram que o aumento do volume de injeção provoca um aumento de sensibilidade. Através do cromatograma, sabe-se que o volume máximo permitido não provoca alargamento dos picos, portanto comprova-se que o volume de 20  $\mu\text{L}$ , previamente definido, é adequado.

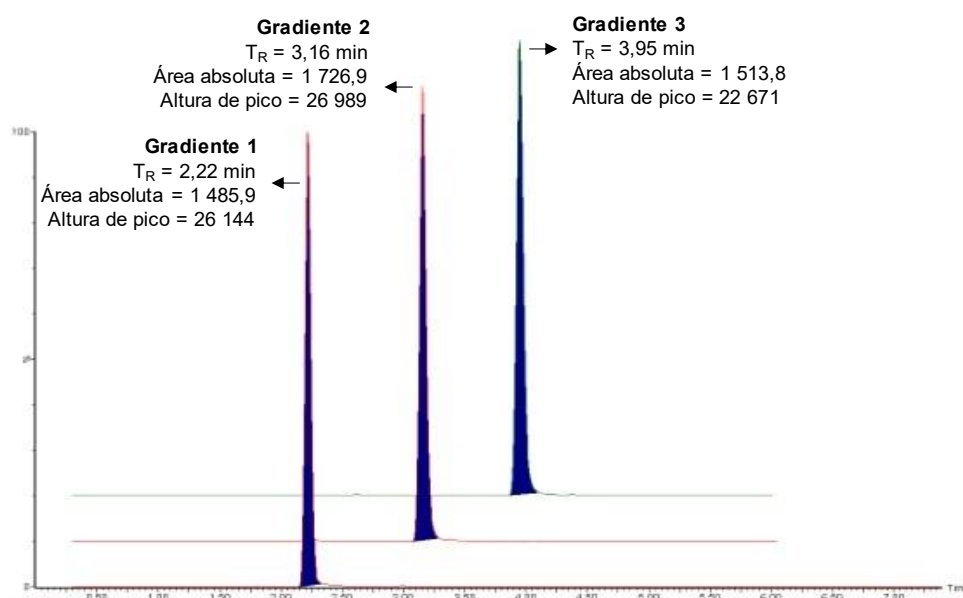
### 5.2.3 Estudo do Efeito do Gradiente de Eluição

Para avaliar o efeito do gradiente de fase móvel na intensidade de sinal obtida e no tempo de retenção, injetou-se o padrão P9, alterando-se o tempo do gradiente para solvente mais orgânico (5% A–95% B) aos 2, 4 e 6 min, como se observa na Tabela 5.2.

**Tabela 5.2** - Gradientes utilizados para o estudo do efeito do gradiente.

Gradiente 1			Gradiente 2			Gradiente 3		
Tempo (min)	Solvente A (%)	Solvente B (%)	Tempo (min)	Solvente A (%)	Solvente B (%)	Tempo (min)	Solvente A (%)	Solvente B (%)
0	70	30	0	70	30	0	70	30
0,3	70	30	0,3	70	30	0,3	70	30
2	5	95	4	5	95	6	5	95
6	5	95	6	5	95	6,2	5	95
6,2	70	30	6,2	70	30	6,3	70	30
9	70	30	9	70	30	9	70	30

Os resultados obtidos encontram-se na Figura 5.13.



**Figura 5.13** - Cromatogramas representativos do efeito da alteração do tempo do gradiente.

Através da Figura 5.13, observa-se que o gradiente 2 apresenta maior área absoluta e maior altura de pico, apesar de as diferenças não serem muito significativas. No gradiente 3, verificou-se diminuição na sensibilidade, sendo que ocorreu diminuição da altura e da área de pico.

Quanto maior a polaridade da fase móvel, maior o tempo de retenção. Como referido anteriormente, deve haver um compromisso entre o sinal obtido e o tempo de retenção, para o composto não eluir demasiado cedo. Portanto comprova-se que o gradiente 2, previamente definido, foi uma opção adequada.

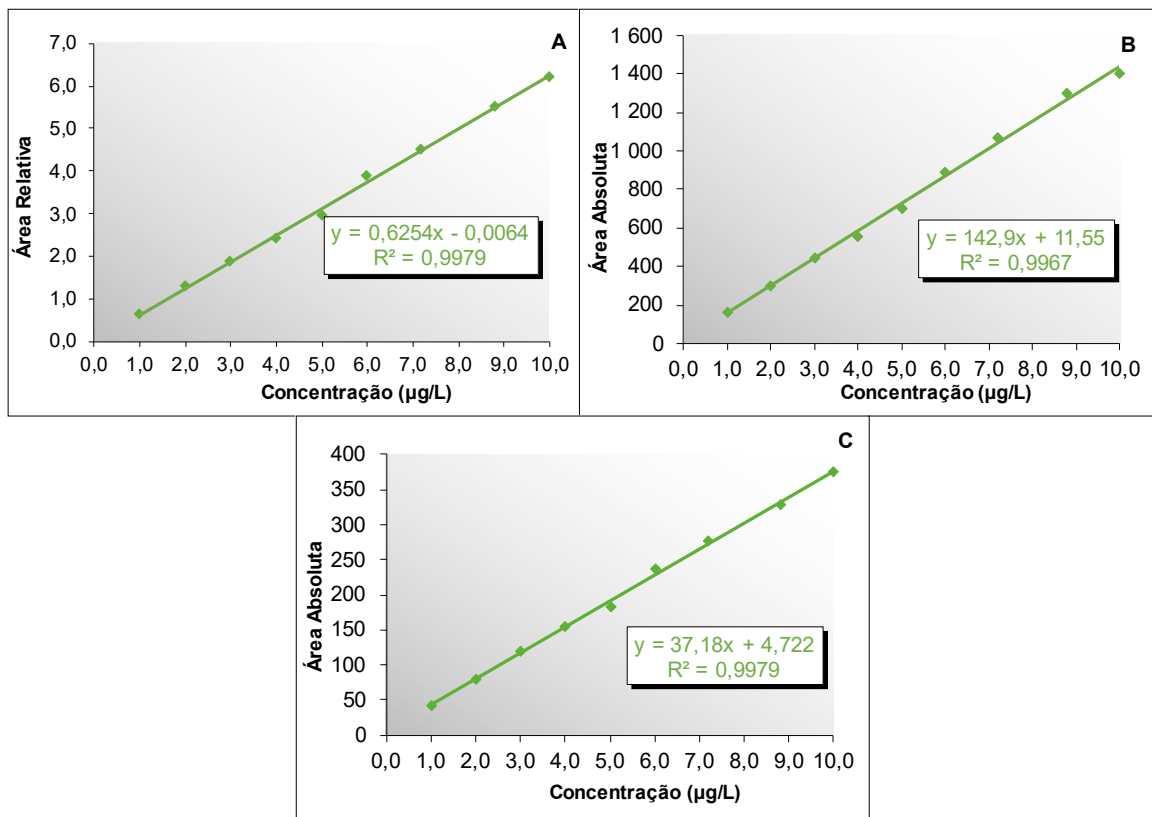
## 5.3 Validação do Método de Ensaio

### 5.3.1 Estudos de Linearidade

O primeiro passo na validação de um método de ensaio consiste na avaliação da linearidade. Para tal, procedeu-se à injeção de soluções padrão de estradiol, descritas em 4.4.2.7, e de estradiol-D<sub>5</sub>, descritas em 4.4.2.8. Assim, avaliou-se a linearidade do analito de interesse, bem como do seu PI.

Começou-se por representar, graficamente, a dependência do sinal instrumental em função da concentração, sendo que, para o estradiol, o sinal pode ser obtido em termos relativos ou absolutos. A linearidade foi avaliada através do Método dos Mínimos Quadrados.

Na Figura 5.14, apresentam-se as retas de calibração obtidas.



**Figura 5.14** – Representação gráfica das retas de calibração: Estradiol - com PI (A); Estradiol - sem PI (B) e PI (C).

Na Tabela 5.3, apresentam-se as equações da reta obtidas, os coeficientes de determinação para a gama de trabalho definida, bem como os coeficientes de variação do método ( $CV_m$ ).

**Tabela 5.3** - Gama de trabalho, equação da reta, coeficiente de determinação e coeficiente de variação do método.

Composto	Gama de trabalho (µg/L)	Nº de pontos	Equação da Reta		R <sup>2</sup>	CV <sub>m</sub> (%)
			a	b		
Estradiol – com PI	1,0 – 10	9	-0,0064	0,6254	0,9979	2,9
Estradiol – sem PI	1,0 – 10	9	11,55	142,9	0,9967	3,6
Estradiol-D <sub>5</sub>	1,0 – 10	9	4,722	37,18	0,9979	2,9

Através da Tabela 5.3 e da Figura 5.14, é possível observar que os coeficientes de determinação obtidos são superiores ao critério de aceitação de 0,990 e que os coeficientes de variação do método são inferiores a 5%.

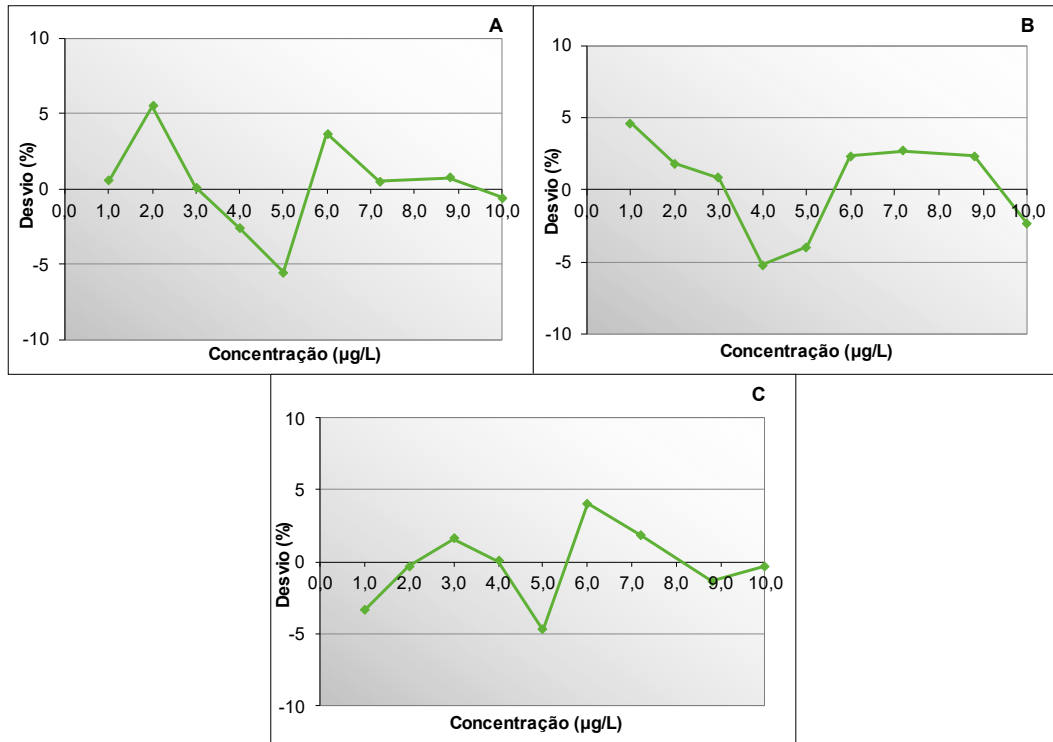
Por comparação com as Tabelas 2.1 e 2.2, de uma maneira geral, a gama de trabalho escolhida é mais elevada, mas o fator de concentração também é mais elevado, o que significa que a preparação da amostra é um passo essencial para que se atinjam limites de quantificação tão baixos.

Como o coeficiente de determinação não garante, por si só, a existência de linearidade foi necessário realizar outros testes estatísticos.

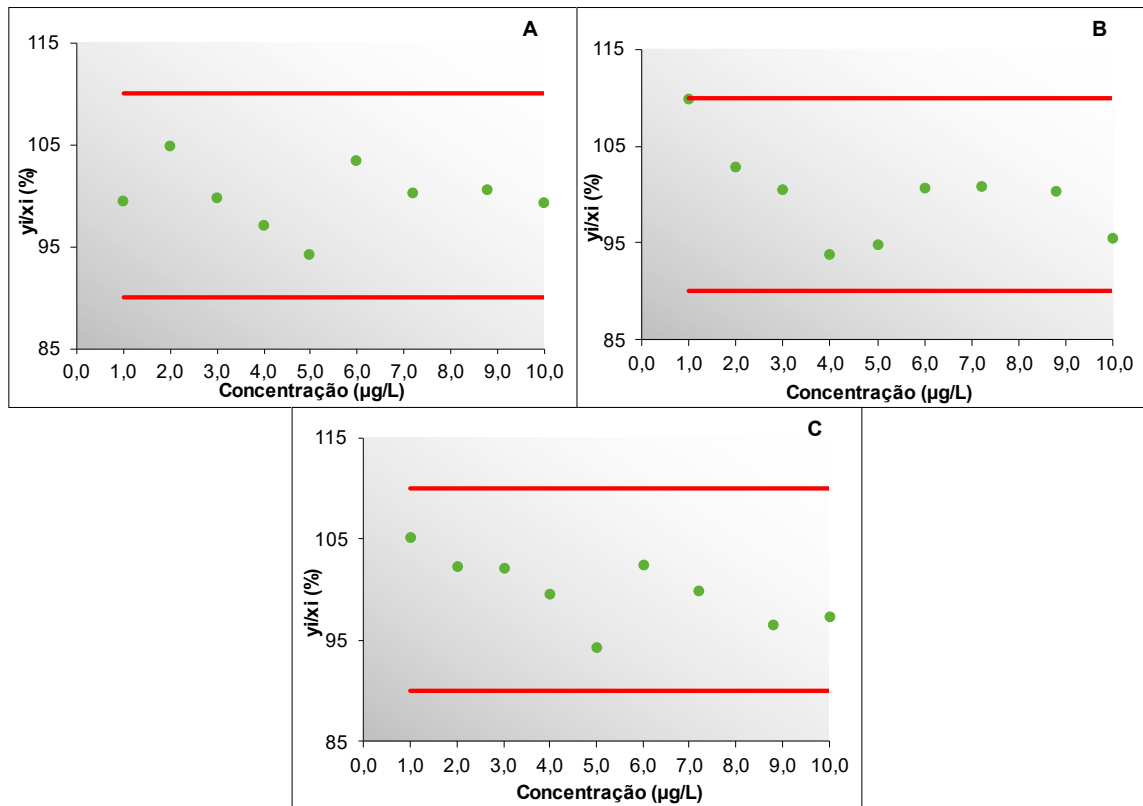
O primeiro teste estatístico aplicado foi a análise de resíduos (Anexo II), sendo que se considera um bom ajuste linear quando os desvios entre os pontos experimentais e estimados são inferiores a 10%. Na Figura 5.15 apresentam-se os resultados obtidos, onde é possível observar uma distribuição aleatória dos desvios acima e abaixo da linha central (0%), o que demonstra a ausência de tendências.

Aplicou-se também o teste de Mandel (Anexo III), de modo a avaliar se a função de calibração polinomial de 2º grau é ou não significativamente melhor que a função linear. Calculou-se o valor de teste (VT) e comparou-se o resultado obtido com o valor tabelado da função da distribuição de Fischer-Snedecor (Tabela 5.5). Se  $VT \leq F$ , conclui-se que a função de calibração polinomial não conduz a um ajuste significativamente melhor, por isso assume-se uma função de calibração linear.

Foi também aplicado o teste de RIKILT (Anexo IV), sendo que o intervalo de aceitação dos valores obtidos se encontra entre 90 e 110%. Na Figura 5.16 apresentam-se os resultados obtidos para o teste de RIKILT.

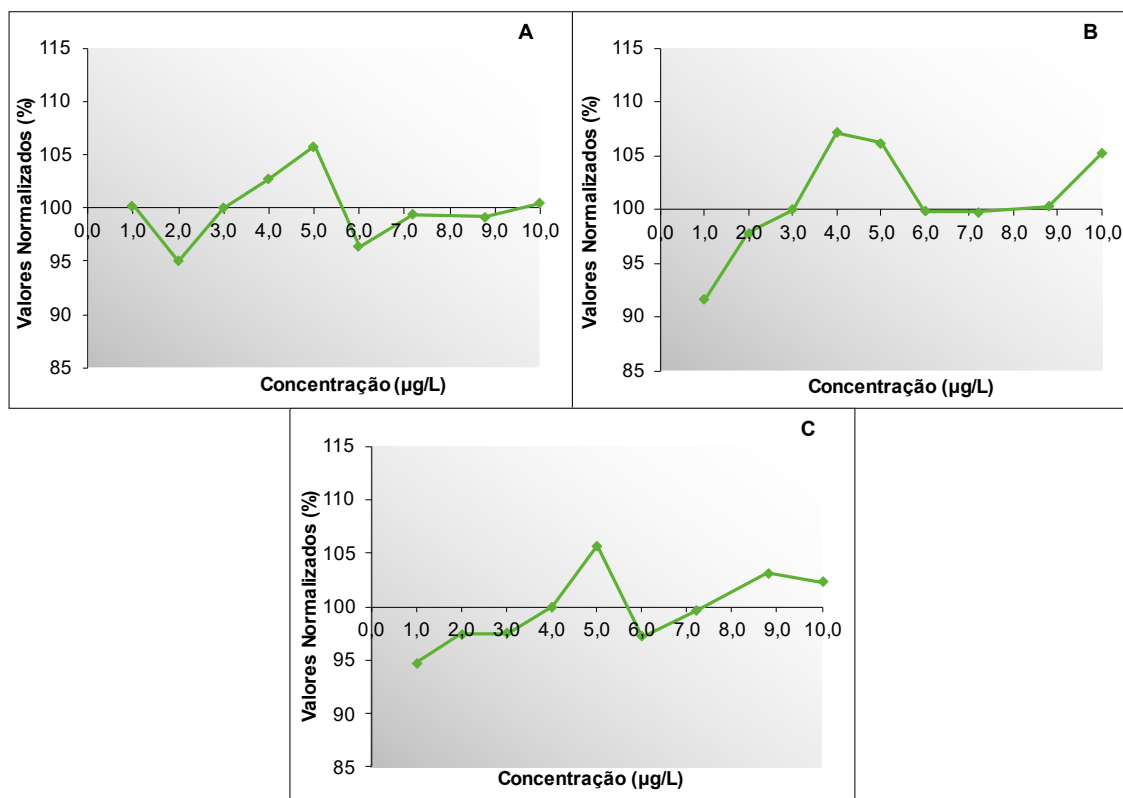


**Figura 5.15 -** Representação gráfica da análise de resíduos: Estradiol - com PI (A); Estradiol - sem PI (B); PI (C).



**Figura 5.16 -** Representação gráfica do teste de RIKILT: Estradiol - com PI (A); Estradiol - sem PI (B); PI (C).

Aplicou-se ainda o teste das áreas normalizadas (Anexo V), onde os valores normalizados que não se situem entre 85 e 115% são rejeitados. Na Figura 5.17 apresentam-se os resultados obtidos para o teste das áreas normalizadas.



**Figura 5.17** - Representação gráfica do teste das áreas normalizadas: Estradiol - com PI (A); Estradiol - sem PI (B); PI (C).

Por fim, avaliou-se ainda a homogeneidade de variâncias (Anexo VII). Caso o valor de teste, PG, seja inferior ao valor tabelado da função F, então existe homogeneidade de variâncias na gama de trabalho (Tabela 5.5). Antes de se realizar o teste, avaliou-se a normalidade pelo teste de Kolmogorov-Smirnov (Anexo VI). Os resultados encontram na Tabela 5.4.

**Tabela 5.4** - Resultados do teste de normalidade para valores da gama de trabalho.

Composto	Concentração (µg/L)	D	D <sub>crítico</sub>
Estradiol - com PI	1,0	0,145	0,489
	10,0	0,156	
Estradiol - sem PI	1,0	0,196	
	10,0	0,138	
Estradiol-D <sub>5</sub>	1,0	0,251	0,576
	10,0	0,246	

Como os valores da estatística de teste (D) são inferiores aos valores tabelados ( $D_{crítico}$ ), para  $n=10$  ou  $n=7$  e com um erro de 1%, pode assumir-se que os dados se regem por uma distribuição Normal.

Na Tabela 5.5 encontram-se resumidos os resultados da aplicação dos testes estatísticos.

**Tabela 5.5** - Resultados da aplicação dos testes estatísticos.

Composto	Análise de Resíduos (%) [ $\pm 10\%$ ]	Teste de Mandel	Teste de RIKILT (%) [90 - 110 %]	Teste das Áreas Normalizadas (%) [85 - 115 %]	Homogeneidade de Variâncias
		$VT < F_{(1,N-3)95\%}$			$PG < F_{99\%}$
Estradiol – com PI	[-5,5; 5,5]	0,056 < 5,99	[94; 105]	[95; 106]	72,95 > 5,35
Estradiol – sem PI	[-5,2; 4,6]	0,042 < 5,99	[94; 110]	[92; 107]	29,58 > 5,35
Estradiol – D <sub>5</sub>	[-4,7; 4,0]	0,338 < 5,99	[94; 105]	[95; 106]	188,08 > 8,47

A partir da Tabela 5.5 e das representações gráficas, observa-se que os critérios definidos são cumpridos, exceto para a homogeneidade de variâncias, o que significa que existem diferenças significativas entre as variâncias do padrão de menor concentração e o de maior concentração. Já era expectável que este critério não fosse cumprido, pois iria implicar intervalos de trabalho muito curtos. Assim, a gama de trabalho foi aceite, uma vez que se demonstrou a linearidade pelos restantes testes, que se consideram mais importantes.

### 5.3.2 Limiares Analíticos Instrumentais

Depois de se definir a gama de trabalho e de efetuados os testes estatísticos, foi possível calcular o LOD e o LOQ para o estradiol, tendo em conta ou não o PI. Estes parâmetros foram determinados como descrito no ponto 4.7.2, sendo que são somente uma estimativa (Anexo VIII). Na Tabela 5.6 apresentam-se os resultados obtidos.

**Tabela 5.6** - Limiares analíticos obtidos com base na reta de calibração, em condições de repetibilidade e pela razão sinal/ruído.

Estradiol	Limite inferior da gama de linearidade ( $\mu\text{g/L}$ )	Reta de calibração		Ensaio de Repetibilidade (n=10)				Razão Sinal/Ruído	
		LOD ( $\mu\text{g/L}$ )	LOQ ( $\mu\text{g/L}$ )	LOD ( $\mu\text{g/L}$ )	LOQ ( $\mu\text{g/L}$ )	CV (%)	Erro relativo (%)	LOD ( $\mu\text{g/L}$ )	LOQ ( $\mu\text{g/L}$ )
Com PI	1,0	0,45	1,5	0,15	0,49	4,5	9,7	0,005	0,017
Sem PI	1,0	0,57	1,9	0,13	0,43	4,0	6,8		

O LOQ determinado a partir da reta de calibração nunca é inferior ao primeiro ponto da reta de calibração, sendo que este método costuma dar valores por excesso, logo o critério não é cumprido. Contudo, não se efetuaram alterações à gama de trabalho, sendo que os limiares analíticos foram calculados a partir de ensaios de repetibilidade e pela razão sinal/ruído. Pela repetibilidade, os valores obtidos são mais baixos, pois o desvio padrão obtido é menor, e o critério definido é cumprido. O erro relativo diz respeito à diferença relativa entre a média das concentrações obtidas e o valor teórico, sendo que os valores obtidos são inferiores a 10%. Pela razão sinal/ruído, os resultados obtidos são muito mais baixos, contudo, dificilmente, é possível detetar o composto a 0,005 µg/L, portanto considerou-se que a melhor estimativa é a da repetibilidade.

A etapa de preparação da amostra é extremamente importante para que se atinja o limite definido pela Diretiva 2020/2184 do Parlamento Europeu e do Conselho, de 16 de dezembro.

Nos estudos das Tabelas 2.1 e 2.2, os valores de LOD e LOQ são calculados pela razão sinal/ruído, com exceção do estudo de *Tavazzi et. al*, que calcula em condições de repetibilidade. Os limites obtidos, nesta dissertação, são mais elevados, pois o primeiro padrão da gama de linearidade tem uma concentração mais elevada, uma vez que o passo de concentração da amostra é que possibilita diminuir mais os limites. Assim, pode dizer-se que, provavelmente, o equipamento não é tão sensível.

### 5.3.3 Razão MRM1/MRM2

Para além da confirmação da presença de um composto numa amostra pelo tempo de retenção, é possível também identificar a presença do composto através da razão entre o sinal instrumental da transição MRM1 e da transição MRM2. Porém, este critério só pode ser utilizado caso se verifique que não existe variabilidade ao longo do intervalo de linearidade. Na Tabela 5.7, apresentam-se os resultados obtidos.

**Tabela 5.7** - Variabilidade da razão MRM1/MRM2 ao longo do intervalo de linearidade.

Composto	Intervalo de linearidade (µg/L)	Média da razão MRM1/MRM2	CV (%)
Estradiol	1,0 - 10	1,4	4,8

A variabilidade da razão MRM1/MRM2 ao longo do intervalo de linearidade é inferior a 5%, o que permite afirmar que existe estabilidade, portanto este critério pode ser utilizado para confirmação do composto numa amostra.

Na Figura 5.18, observa-se a estabilidade da razão das intensidades das transições MRM1/MRM2 ao longo da gama de linearidade para o estradiol, tendo em conta o padrão interno.

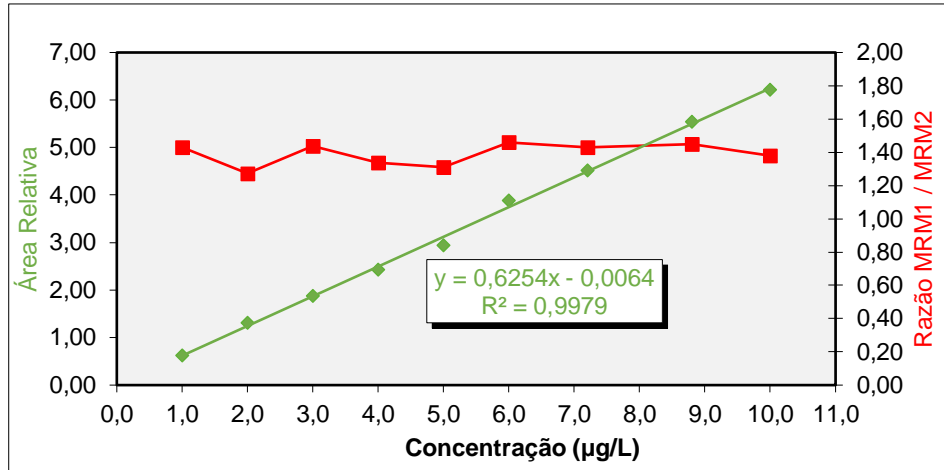


Figura 5.18 - Variabilidade da razão MRM1/MRM2 ao longo da gama de linearidade.

### 5.3.4 Precisão

#### 5.3.4.1 Repetibilidade

De modo a estudar a repetibilidade, efetuou-se uma série de medições, nas mesmas condições, sobre um mesmo padrão. Neste caso, avaliaram-se as concentrações mais baixas da gama de trabalho, a concentração intermédia e a concentração mais elevada. Para o estradiol efetuaram-se 10 medições de cada padrão, enquanto para o PI efetuaram-se 7 (Anexo IX).

Na Tabela 5.8 apresentam-se os resultados obtidos.

Tabela 5.8 - Estudo da precisão instrumental, em termos de repetibilidade.

Composto	Concentração inferior				Concentração intermédia		Concentração superior	
	Concentração (µg/L)	CV (%)	Concentração (µg/L)	CV (%)	Concentração (µg/L)	CV (%)	Concentração (µg/L)	CV (%)
Estradiol - com PI	1,0	4,5	2,0	4,5	5,0	5,6	10	4,1
Estradiol - sem PI		3,7		4,2		1,8		2,5
Estradiol – D <sub>5</sub>		7,0		6,8		7,8		13

Por análise dos resultados obtidos, pode concluir-se que o método apresenta boa repetibilidade, uma vez que os coeficientes de variação são sempre inferiores a 15%. Para além disso, observa-se que os coeficientes de variação são estatisticamente semelhantes ao longo da gama de trabalho, para um mesmo composto.

### 5.3.4.2 Precisão Intermédia

A precisão intermédia foi avaliada através da injeção de um padrão de concentração inferior (P2) e de um padrão de concentração superior (P8) ao longo de 28 dias de trabalho, com intervalos temporais diferentes (n=202) (Anexo IX). Como em rotina, os resultados são analisados tendo em conta o padrão interno, a precisão intermédia foi avaliada através desse método.

Para avaliar este parâmetro, calculou-se o CV e o erro relativo, pela média das concentrações e pelo valor teórico, para cada concentração, como se observa na Tabela 5.9.

**Tabela 5.9** - Resultados obtidos para o estudo da precisão intermédia.

Composto	Concentração inferior (µg/L)	Média das concentrações (µg/L)	CV (%)	Erro relativo (%)	Concentração superior (µg/L)	Média das concentrações (µg/L)	CV (%)	Erro relativo (%)
Estradiol - com PI	2,0	2,0	5,4	0,90	8,8	9,0	4,2	1,8

Todas as concentrações consideradas apresentavam um desvio inferior a 15%. Através da Tabela 5.9, observa-se que os coeficientes de variação e os erros relativos obtidos são baixos, logo podemos afirmar que existe boa precisão intermédia.

### 5.3.5 Estudo de Competição entre os Compostos

Como se verificou que o tempo de retenção do composto e do PI é o mesmo, de modo a garantir que não existe competição entre eles, na etapa de deteção no espectrómetro de massa, avaliou-se o padrão de calibração P6 (com 6 µg/L em estradiol), com a presença de diferentes concentrações de padrão interno. Considerou-se um padrão sem a presença de PI, um com uma concentração de 2,5 µg/L em PI, outro com uma concentração de 5,0 µg/L e outro com 10 µg/L.

Caso a resposta obtida de estradiol varie, significativamente, com o aumento da concentração de PI, conclui-se que existe competição entre os compostos. A média de todas as áreas obtidas de estradiol (n=11) e o coeficiente de variação encontram-se na Tabela 5.10.

**Tabela 5.10** - Média da área absoluta de estradiol e coeficiente de variação.

Área absoluta média (n=11)	CV (%)
157,7	6,6

Podem concluir-se que não existe competição entre o composto de interesse e o seu PI, uma vez que o coeficiente de variação alcançado foi inferior a 15%.

### 5.3.6 Estabilidade do Padrão Interno

Como todas as soluções padrão de calibração da reta têm a mesma concentração de padrão interno, estudou-se a variabilidade do sinal do composto ao longo do intervalo definido.

Na Figura 5.19, apresentam-se os resultados obtidos.

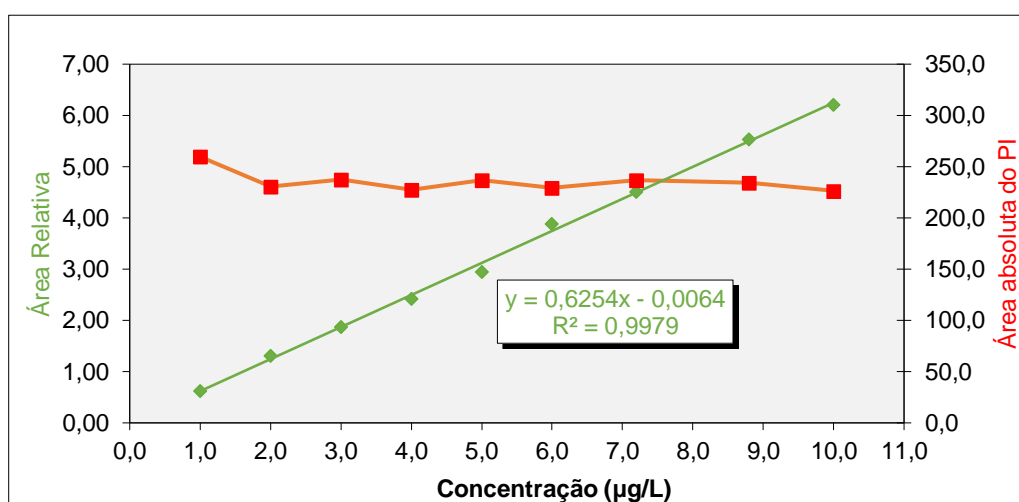


Figura 5.19 - Estabilidade do PI ao longo do intervalo de linearidade.

Através dos resultados obtidos, é possível observar que existe estabilidade do PI ao longo do intervalo de linearidade, sendo que a média das áreas obtidas foi de 235,4 com um coeficiente de variação de 4,2%, o que é aceitável.

### 5.3.7 Ensaios de Recuperação

Os ensaios de recuperação foram realizados no período compreendido entre 16 abril e 17 de setembro de 2021, com amostras de diferentes tipos de água, de modo a avaliar o procedimento de preparação da amostra, o efeito da matriz e da concentração na recuperação do analito em estudo. O procedimento efetuado encontra-se descrito no ponto 4.9.

Os resultados obtidos para as recuperações foram corrigidos pelo padrão interno, uma vez que, caso não se procedesse à correção verificavam-se recuperações muito baixas, como se observa na Figura 5.20. Sem o tratamento com PI as recuperações variaram de 3,5 a

58,8%, com uma recuperação média global de 27,6% e um CV de 39,1%, enquanto com a normalização variaram de 75,3 a 134,4%.

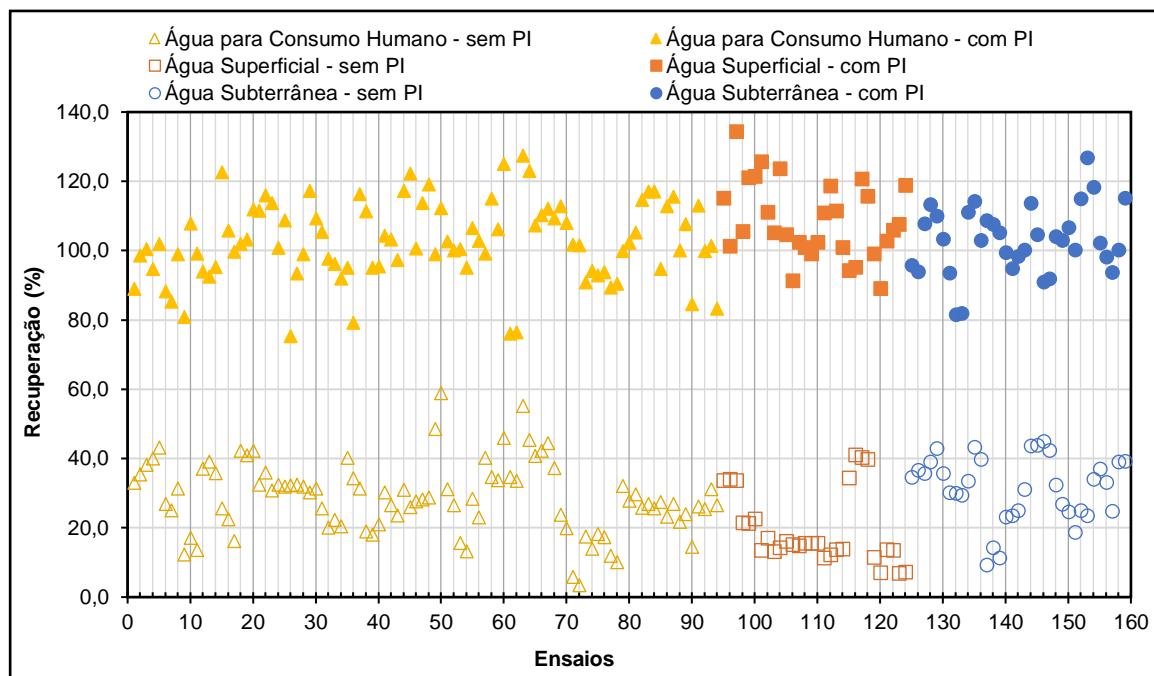


Figura 5.20 – Recuperações obtidas através dos métodos com e sem padrão interno.

De entre as amostras analisadas (n=67), apenas 9 apresentaram quantidades vestigiais do composto em estudo, sendo que esses resultados foram corrigidos. O valor mais elevado observado foi de 0,34 ng/L, considerando o fator de concentração, como se observa na Tabela 5.11.

Tabela 5.11 – Amostras com presença de estradiol.

Amostra	Concentração (ng/L)
Água para consumo humano 1	0,34
Água para consumo humano 2	0,19
Água para consumo humano 3	0,15
Água para consumo humano 4	0,21
Água para consumo humano 5	0,14
Água para consumo humano 6	0,11
Água para consumo humano 7	0,34
Água subterrânea 1	0,21
Água subterrânea 2	0,11

Os resultados obtidos para as três matrizes em estudo e para os três níveis de fortificação encontram-se nas Tabelas 5.12 a 5.14 e na Figura 5.21.

**Tabela 5.12** - Recuperação média obtida na matriz de água para consumo humano.

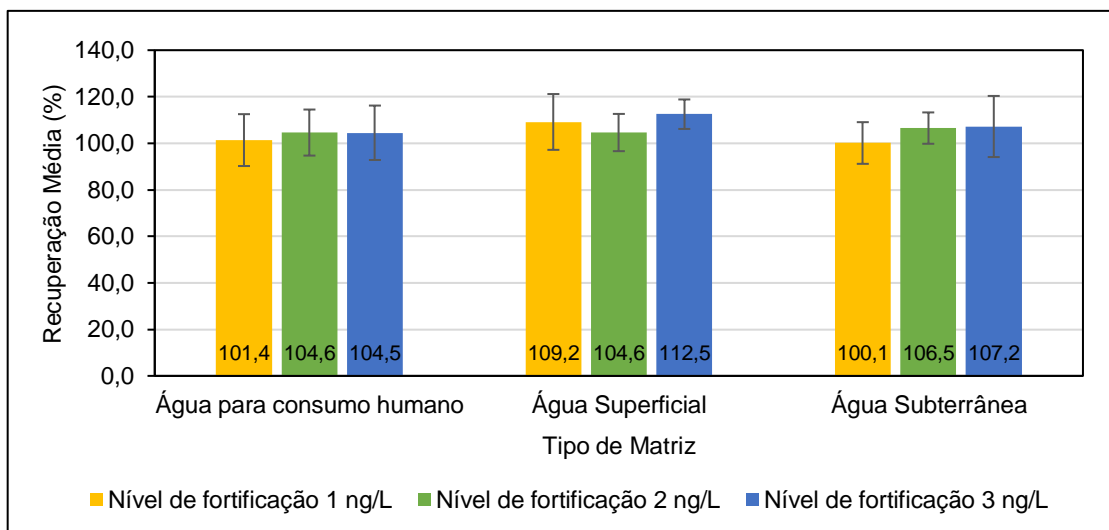
Água para consumo humano						
Composto	Nível de fortificação de 1 ng/L		Nível de fortificação de 2 ng/L		Nível de fortificação de 3 ng/L	
	Recuperação média (%) (n=62)	CV (%)	Recuperação média (%) (n=15)	CV (%)	Recuperação média (%) (n=17)	CV (%)
Estradiol - com PI	101,4	11,1	104,6	9,89	104,5	11,7

**Tabela 5.13** - Recuperação média obtida na matriz de água superficial.

Água superficial						
Composto	Nível de fortificação de 1 ng/L		Nível de fortificação de 2 ng/L		Nível de fortificação de 3 ng/L	
	Recuperação média (%) (n=16)	CV (%)	Recuperação média (%) (n=8)	CV (%)	Recuperação média (%) (n=6)	CV (%)
Estradiol - com PI	109,2	12,0	104,6	8,00	112,5	6,34

**Tabela 5.14** - Recuperação média obtida na matriz de água subterrânea.

Água subterrânea						
Composto	Nível de fortificação de 1 ng/L		Nível de fortificação de 2 ng/L		Nível de fortificação de 3 ng/L	
	Recuperação média (%) (n=19)	CV (%)	Recuperação média (%) (n=10)	CV (%)	Recuperação média (%) (n=6)	CV (%)
Estradiol - com PI	100,1	8,96	106,5	6,74	107,2	13,1



**Figura 5.21** - Representação gráfica das recuperações médias obtidas e do coeficiente de variação por tipo de matriz e por nível de fortificação.

Através dos resultados obtidos, é possível observar que todas as recuperações obtidas se encontram, relativamente, perto de 100% e que os coeficientes de variação se encontram abaixo de 15%, logo é possível afirmar que as recuperações são aceitáveis.

Observa-se também que não existem diferenças significativas entre a média das recuperações para os três níveis analisados, o que permite concluir que a presença de maior ou menor concentração do analito na amostra não influencia a recuperação.

Dos estudos das Tabelas 2.1 e 2.2 é possível observar que, sem padrão interno, as recuperações são mais baixas, o que também se comprova. No estudo de *Wu et. al*, como não existe preparação da amostra, as recuperações baixas indicam que existe supressão iônica durante a análise. As recuperações observadas não são realizadas ao nível do LOQ, logo não se comprova que é possível atingir esse valor. Portanto, observa-se que, as recuperações obtidas, nesta dissertação, encontram-se perto de 100% com coeficientes de variação baixos.

Avaliou-se a precisão do método em função da concentração do analito, sem ter em conta o tipo de matriz analisada, de acordo com o Guia VAM 3.2.1<sup>[110]</sup>. Para tal, estudou-se a homogeneidade de variâncias entre os níveis de concentração (n=25), sendo que antes se demonstrou a normalidade dos valores pelo teste de Kolmogorov-Smirnov (Anexo VI). Os resultados encontram-se na Tabela 5.15.

**Tabela 5.15** - Resultados do teste de normalidade para concentrações de fortificação.

Concentração (ng/L)	D	D <sub>crítico</sub> (25; 1%)
1,0	0,162	0,317
2,0	0,129	
3,0	0,132	

Como os valores da estatística de teste (D) são inferiores ao valor tabelado, para n=25 e com um erro de 1 %, pode assumir-se que os dados se regem por uma distribuição Normal.

Na Tabela 5.16 apresentam-se os resultados obtidos para a recuperação, o desvio padrão relativo (RSD) e a variância (s<sup>2</sup>).

**Tabela 5.16** - Recuperação média, desvio padrão relativo e variância obtidos por nível de concentração.

Concentração (ng/L)	Recuperação média (%) (n=25)	RSD (%)	s <sup>2</sup> (ng/L) <sup>2</sup>
1,0	104,0	12,5	0,017
2,0	103,8	8,64	0,032
3,0	108,1	10,5	0,117

Comparando a variância da concentração de 1 ng/L com a de 2 ng/L, o valor de teste obtido é de 0,52, e comparando a variância da concentração de 2 ng/L com a de 3 ng/L, o valor de teste obtido é 0,28. Como o valor tabelado da distribuição de F para n-1 graus de liberdade e 99% de nível de confiança é de 2,7, então  $VT < F_{(24,24,99\%)}$ , logo é possível assumir que existe homogeneidade de variâncias e o desvio padrão relativo pode ser agrupado para dar uma única estimativa pela equação 5.1, sendo que o valor obtido é de 10,7%.

$$RSD_{pool} = \sqrt{\frac{(n_1 - 1) \times RSD_1^2 + (n_2 - 1) \times RSD_2^2 + (n_3 - 1) \times RSD_3^2}{(n_1 - 1) + (n_2 - 1) + (n_3 - 1)}} \quad (5.1)$$

Como se comprovou que não existem diferenças significativas entre as concentrações, agruparam-se os resultados obtidos por tipo de matriz. Os resultados obtidos encontram-se na Tabela 5.17, onde se observa que os coeficientes de variação estão abaixo de 15%.

**Tabela 5.17** – Recuperações médias obtidas por tipo de matriz.

Composto	Água para consumo humano		Água superficial		Água subterrânea	
	Recuperação média (%) (n=94)	CV (%)	Recuperação média (%) (n=30)	CV (%)	Recuperação média (%) (n=35)	CV (%)
Estradiol - com PI	102,4	11,0	108,6	10,2	103,1	9,5

Estudou-se também a homogeneidade de variâncias entre as matrizes para um nível de concentração de 1 ng/L, de acordo com o Guia VAM 3.2.1<sup>[110]</sup>, sendo que antes se verificou a normalidade dos valores pelo teste de Kolmogorov-Smirnov (Anexo VI). Os resultados obtidos encontram-se na Tabela 5.18.

**Tabela 5.18** - Resultados do teste de normalidade para cada matriz.

Matriz	D	D <sub>crítico</sub>
Água para consumo humano	0,127	0,290
Água superficial	0,169	0,392
Água subterrânea	0,129	0,361

Como os valores da estatística de teste (D) são inferiores ao valor tabelado, pode assumir-se que os dados se regem por uma distribuição Normal.

Na Tabela 5.19 apresentam-se os resultados obtidos para a recuperação, o RSD e a variância.

**Tabela 5.19** - Recuperação média, desvio padrão relativo e variância obtidos por tipo de matriz para 1 ng/L.

Tipo de matriz	Recuperação média (%)	RSD (%)	s <sup>2</sup> (ng/L) <sup>2</sup>
Água para consumo humano	99,78 (n=30)	10,2	0,010
Água superficial	109,2 (n=16)	12,0	0,017
Água subterrânea	100,1 (n=19)	8,96	0,008

Comparando-se a variância máxima e mínima obtidas, o valor de teste é de 2,1. Como o valor tabelado de F<sub>(29,15,99%)</sub> é 3,2, então VT<F, logo existe homogeneidade variâncias e o desvio padrão pode ser agrupado para dar uma única estimativa, pela equação 5.2, sendo que o valor obtido é de 0,107 ng/L.

$$s_{pool} = \sqrt{\frac{(n_1 - 1) \times s_1^2 + (n_2 - 1) \times s_2^2 + (n_3 - 1) \times s_3^2}{(n_1 - 1) + (n_2 - 1) + (n_3 - 1)}} \quad (5.2)$$

Portanto, não existem diferenças significativas entre os três tipos de matrizes analisadas, o que permite concluir que o tipo de matriz não tem muita influência na recuperação obtida.

Por fim, apresenta-se a recuperação global do método e o respectivo coeficiente de variação (Tabela 5.20).

**Tabela 5.20** – Recuperação e CV globais do método.

Recuperação Global (%) (n=159)	CV Global (%)
103,8	10,7

Para trabalho em rotina, considerou-se que o critério de aceitação das recuperações se deve situar entre 80 e 120%.

Com o valor global das recuperações foi possível calcular o limite de quantificação do método (MQL), através da equação 5.3, como se observa na Tabela 5.21.

$$MQL = \frac{C_p}{FC} \times \frac{100}{Rec} \quad (5.3)$$

Onde  $C_p$  é a concentração do menor padrão de calibração,  $FC$  é o fator de concentração e  $Rec$  é a recuperação média global (%).

**Tabela 5.21** - Estimativa do limite de quantificação do método global.

Padrão de menor concentração ( $\mu\text{g/L}$ )	FC	MQL ( $\text{ng/L}$ )
1,0	2500	0,39

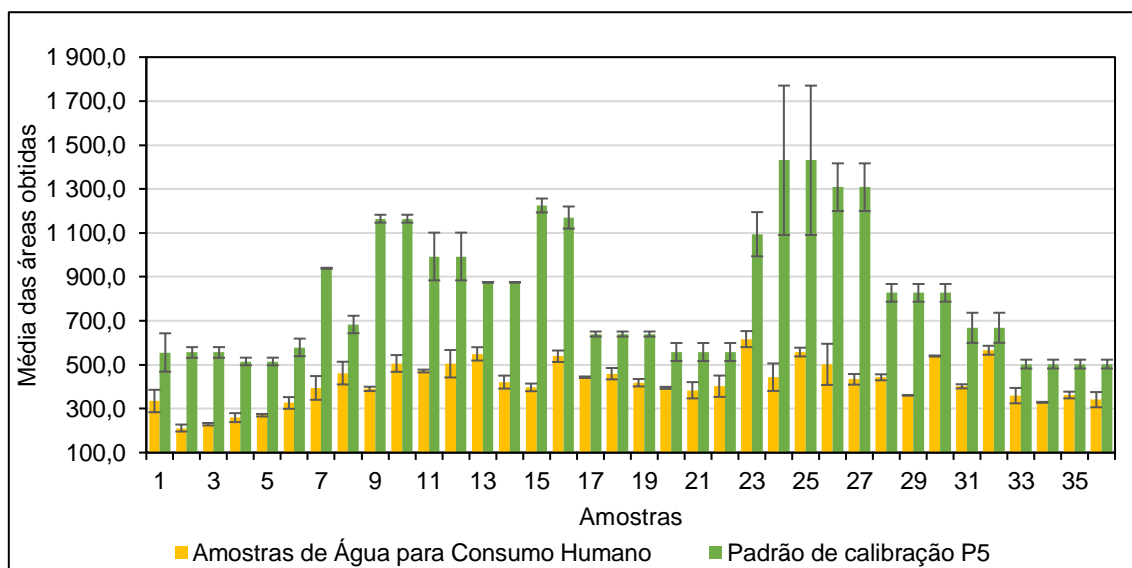
O limite de quantificação pretendido é de 1  $\text{ng/L}$ , mas como as recuperações podem dar abaixo de 100%, existe um intervalo de margem, de modo a que as concentrações obtidas não fiquem fora da reta de calibração.

### 5.3.8 Efeitos de Matriz

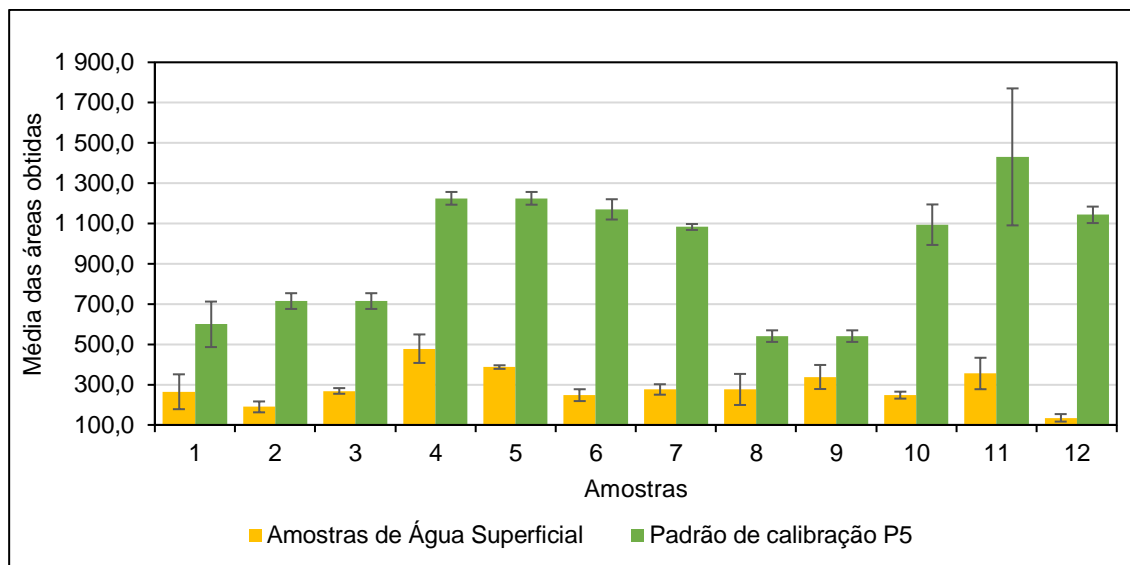
De modo a estudar a necessidade de utilização de padrão interno, avaliaram-se os efeitos de matriz, de acordo com o descrito no ponto 4.10, em diversas amostras das matrizes consideradas, sendo que se efetuaram, no mínimo duas medições.

Os resultados obtidos, apresentados por tipo de matriz, encontram-se nas Figuras 5.22 a 5.24.

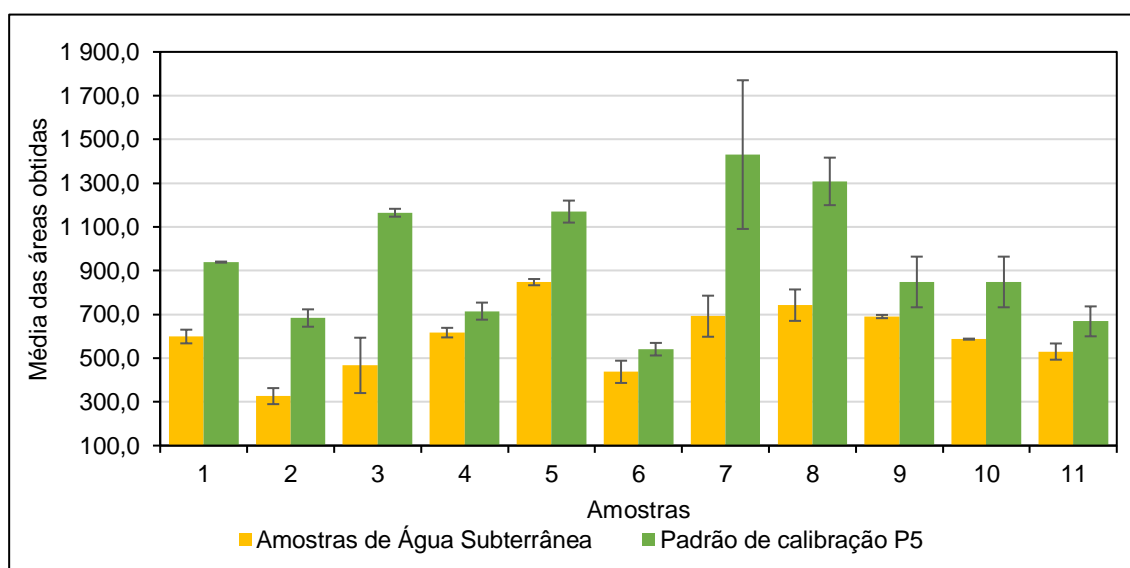
Por observação dos gráficos obtidos, pode concluir-se que ocorreram efeitos de matriz, mais concretamente supressão de sinal, em todas as amostras, uma vez que a média das áreas obtidas em matriz é sempre inferior à média das áreas do padrão de calibração. Também é possível concluir que os efeitos de matriz dependem muito de amostra para amostra, o que significa que esta tem muita influência no sinal do analito.



**Figura 5.22** - Representação gráfica da média das áreas obtidas e dois desvios padrão (nível de confiança de 95,4%) para as amostras de água para consumo humano analisadas ( $n=36$ ) e para o padrão de calibração P5.



**Figura 5.23** - Representação gráfica da média das áreas obtidas e dois desvios padrão (nível de confiança de 95,4%) para as amostras de água superficial analisadas (n=12) e para o padrão de calibração P5.



**Figura 5.24** - Representação gráfica da média das áreas obtidas e dois desvios padrão (nível de confiança de 95,4%) para as amostras de água subterrânea analisadas (n=11) e para o padrão de calibração P5.

Os efeitos de matriz foram calculados através da equação 2.15. Assim, para as amostras de água para consumo humano, os valores variaram de -15,9 até -69,0%. Para as amostras de água superficial, variaram de -37,5 até -88,2% e, para amostras de água subterrânea, variaram entre -13,7 e -59,9%. Portanto, é possível concluir que a matriz água superficial conduz a maiores efeitos de matriz. Todas as amostras de água superficial analisadas apresentavam uma tonalidade amarelada, o que pode indicar a presença de ácidos húmicos e fúlvicos, que se pensa que são a maior causa para os efeitos de supressão iônica [92].

Da Tabela 2.2, é possível observar que muitos estudos não avaliam efeitos de matriz. Observa-se que os efeitos de matriz obtidos são muito variáveis, possivelmente devido à natureza das amostras.

### 5.3.8.1 Estudo dos Efeitos de Matriz em Função do Fator de Concentração

Para avaliar se o fator de concentração tem influência nos efeitos de matriz, efetuou-se a preparação da amostra alterando o método descrito em 4.8, para realizar a passagem de diferentes volumes de amostra (1500 mL, 1000 mL, 500 mL e 200 mL). Tendo em conta um volume final de 0,2 mL, os fatores de concentração obtidos foram de 7500, 5000, 2500 e 1000 vezes. Este estudo foi realizado com água da torneira do laboratório, sendo que as amostras não foram fortificadas antes da extração. O procedimento realizado foi o descrito no ponto 4.10, portanto os resultados obtidos em extrato da amostra de água da torneira foram comparados com o padrão de calibração P5. Para cada volume de amostra realizaram-se três réplicas.

Na Tabela 5.22 apresentam-se os resultados obtidos, sendo que os coeficientes de variação encontram-se sempre abaixo do valor de aceitação de 15%.

**Tabela 5.22** - Avaliação dos efeitos de matriz com o fator de concentração.

Fator de concentração	Média da área absoluta (n=3)	CV (%)	Efeitos de Matriz (%)
7500	177,9	11,8	-81,4
5000	284,9	2,54	-70,1
2500	392,8	1,28	-58,8
1000	700,7	2,16	-26,6
Padrão de calibração P5	954,1	2,08	

Através dos resultados obtidos, é possível concluir que à medida que se aumenta o volume de passagem de amostra, ou seja à medida que se aumenta o fator de concentração, a área de pico do estradiol no respetivo extrato diminui. Consequentemente, os efeitos de matriz (supressão iónica) são maiores, uma vez que se aumenta a concentração dos interferentes presentes na amostra, o que significa que pode existir maior competição na ionização.

### 5.3.8.2 Avaliação de Efeitos de Matriz provenientes do SPE

Para perceber se o solvente de eluição e o cartucho utilizados no SPE têm influência nos efeitos de matriz, procedeu-se à realização da SPE, como apresentado na Tabela 4.7, contudo sem o passo de passagem da amostra. Efetuou-se também a preparação do solvente de elui-

ção metanol:acetona (3:2), sendo que se colocaram 6 mL, volume final do SPE, em tubos de evaporação e se concentrou no TurboVap. Por fim, realizou-se a técnica de SPE com água ultrapura, através do procedimento realizado normalmente. A todos os extratos obtidos adicionaram-se 150 µL de solvente água:metanol (7:3) e 50 µL de solução intermédia III de estradiol (20 µg/L), de modo a se obter uma concentração de 5 µg/L no *vial*. As soluções obtidas foram comparadas com o padrão de calibração P5 (5 µg/L). Os resultados obtidos foram analisados através do método do padrão externo e encontram-se na Tabela 5.23.

**Tabela 5.23** - Avaliação do efeito de matriz associado às várias etapas do SPE.

	Média das áreas de pico absolutas	CV (%)	Efeitos de Matriz (%)
Solvente de eluição (n=5)	1 142,1	2,9	-
SPE sem passagem de amostra (n=4)	967,6	5,4	-10,6
SPE com passagem de Água Ultrapura como amostra (n=5)	539,5	9,1	-50,1
Padrão de calibração P5 (n=3)	1 082,2	3,2	

Pela Tabela 5.23, observa-se que todos os coeficientes de variação se encontram abaixo de 15%. Os resultados obtidos para o solvente de eluição são muito semelhantes aos do padrão de calibração, por isso considerou-se que o solvente de eluição concentrado não provoca efeitos de matriz. Já os resultados para a SPE sem a passagem da amostra, mostram que existem ligeiros efeitos de matriz, que podem ser provocados pelo cartucho. Por fim, os resultados que dizem respeito à água ultrapura, demonstram que os efeitos de matriz são provocados, maioritariamente, pela própria matriz.

### 5.3.9 Avaliação das Perdas do Processo

De modo a perceber qual o passo do procedimento que gera mais perdas de sinal instrumental (SPE, concentração ou UPLC-MS/MS) analisou-se água da torneira do laboratório, de acordo com o seguinte procedimento:

- Realizaram-se 5 ensaios de recuperação com fortificação de 1 ng/L, de acordo com o procedimento descrito em 4.9, para verificar as perdas totais do processo;
- Realizaram-se 3 ensaios que foram fortificados a 1 ng/L após o passo de SPE e antes da concentração no TurboVap, para verificar as perdas da concentração e do UPLC-MS/MS;

- Realizaram-se 2 ensaios que foram fortificados com 150 µL de solvente água:metanol (7:3) e 50 µL de solução intermédia III de estradiol (20 µg/L), depois do passo de SPE e de concentração, para verificar as perdas ocorridas na ionização.

Os resultados obtidos foram analisados tendo em conta o método sem PI.

As recuperações obtidas do processo total encontram-se na Tabela 5.24.

**Tabela 5.24** - Recuperações obtidas do processo completo.

	Recuperação total (%)
Ensaio 1	32,4
Ensaio 2	35,9
Ensaio 3	30,7
Ensaio 4	32,4
Ensaio 5	31,9
Média	32,7
Desvio Padrão	1,9
CV (%)	5,9

Como não se verificam discrepâncias entre os resultados, uma vez que o valor de CV é menor do que 15%, consideraram-se que as perdas totais do processo seriam calculadas tendo em conta o valor médio, logo as perdas totais do processo foram de 67,3%.

As perdas referentes ao UPLC-MS/MS foram avaliadas por comparação da amostra fortificada com o padrão de calibração P5, assim os resultados obtidos foram:

**Tabela 5.25** - Resultados das áreas e CV para a amostra fortificada após preparação e padrão de calibração.

	Média da área absoluta	CV (%)
Água da Torneira (n=2)	212,0	3,7
Padrão de calibração P5 (n=3)	555,9	2,2

Por comparação dos valores, obtém-se que as perdas referentes ao UPLC-MS/MS foram de 61,9%, portanto assume-se que no processo completo ocorreram as mesmas perdas.

As perdas das amostras fortificadas após a SPE, permitem deduzir as perdas que ocorreram na concentração e no UPLC-MS/MS. As recuperações obtidas dos ensaios fortificados após o passo de SPE, encontram-se na Tabela 5.26.

**Tabela 5.26** - Recuperações obtidas do processo sem o passo de extração.

	Recuperação (%)
Ensaio 1	26,7
Ensaio 2	24,3
Ensaio 3	29,5
Média	26,8
Desvio Padrão	2,6
CV (%)	9,7

Por observação das Tabelas 5.24 e 5.26, pode concluir-se que não existem diferenças significativas entre os valores obtidos, portanto assume-se que não existem perdas no passo de extração. Assim, por fim, é possível estimar as perdas do passo de concentração, subtraindo as perdas do UPLC-MS/MS às perdas obtidas, sendo que o valor é de 5,5%. As maiores perdas do processo ocorrem, então, no processo de ionização.

## 5.4 Incerteza do Método

Concluída a validação, procedeu-se à determinação da incerteza através de duas metodologias, de acordo com o ponto 3.3.

Na primeira abordagem, chamada de abordagem *bottom-up*, as componentes da incerteza consideradas foram a incerteza associada à interpolação da reta ( $u_{reta}$ ), a incerteza associada à preparação de padrões, sendo que se considera a incerteza do padrão de calibração com concentração mais baixa ( $u_{P_{cal}}$ ), a incerteza associada à precisão intermédia ( $u_{precisão}$ ) e a incerteza associada à concentração do padrão interno ( $u_{CPI}$ ).

Nas segunda e terceira abordagens, chamadas de abordagens *top-down*, as componentes da incerteza consideradas foram a incerteza associada à precisão intermédia ( $u_{precisão}$ ) e incerteza associada à exatidão ( $u_{exatidão}$ ), mais propriamente a ensaios de recuperação, de acordo com a ISO 11352 e com o Guia Nordest, respetivamente.

Na Tabela 5.27, encontram-se os resultados obtidos para a abordagem de *bottom-up*.

**Tabela 5.27** – Incerteza expandida do método pela abordagem *bottom-up*.

Composto	$u_{reta}$ (%)	$u_{P_{cal}}$ (%)	$u_{precisão}$ (%)	$u_{CPI}$ (%)	$u_c$ (%)	U (%) (k=2)
β-estradiol - com PI	17,2	3,05	0,57	0,64	17,5	35,1

Nas Tabelas 5.28 e 5.29 apresentam-se os resultados obtidos pela abordagem *top-down*.

**Tabela 5.28** – Incerteza expandida do método de acordo com a ISO 11352.

Composto	$u_{\text{precisão}}$ (%)	$u_{\text{exatidão}}$ (%)	$u_c$ (%)	$U$ (%) ( $k=2$ )
$\beta$ -estradiol - com PI	0,57	11,6	11,6	23,2

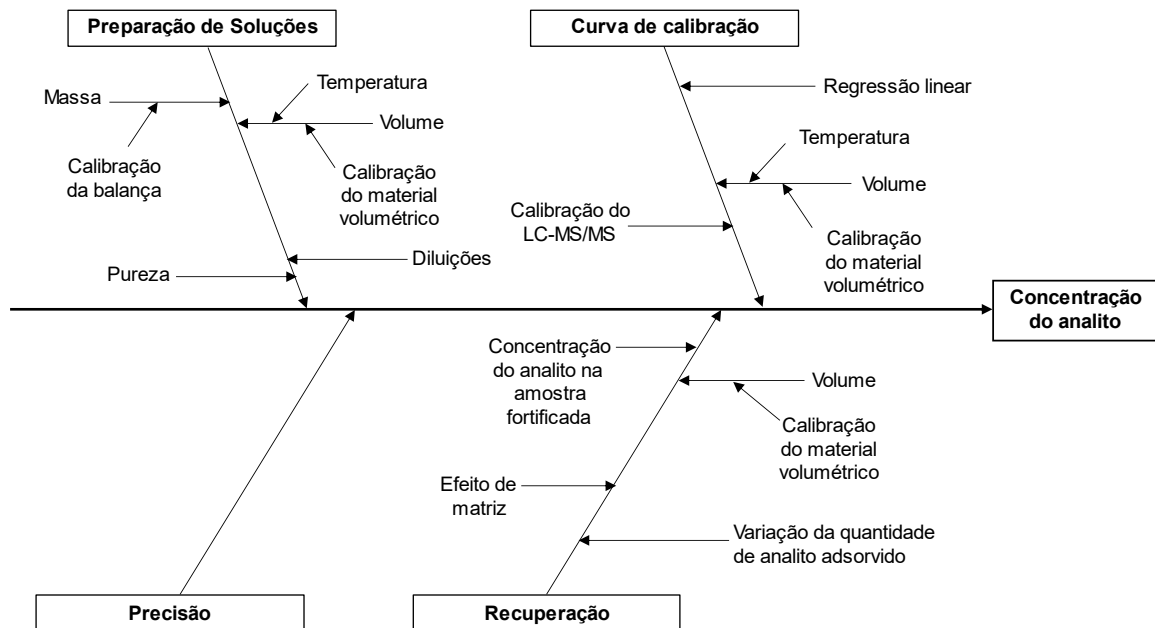
**Tabela 5.29** – Incerteza expandida do método de acordo com o Guia Nordest.

Composto	$u_{\text{precisão}}$ (%)	$u_{\text{exatidão}}$ (%)	$u_c$ (%)	$U$ (%) ( $k=2$ )
$\beta$ -estradiol - com PI	0,57	3,2	3,3	6,5

Como o  $\beta$ -estradiol não se encontra em nenhuma legislação e na Diretiva 2020/2184 não se estipula um valor de incerteza, de forma a estabelecer um critério de aceitação para os valores obtidos, teve-se em conta o Decreto-Lei n.º 152/2017, relativo à qualidade da água para consumo humano e o Decreto-Lei n.º 83/2011, relativo às águas superficiais e subterrâneas. O DL n.º 152/2017 estipula que a incerteza associada à medição, para pesticidas e hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (HAP) é de 30 e 50%, respetivamente. Estes compostos são orgânicos e, normalmente, são analisados pelas mesmas técnicas que o estradiol. O DL n.º 83/2011 estipula que a incerteza de uma medição deve ser  $\leq 50\%$  para um fator de expansão de 2. Assim, definiu-se o valor de 50% como máximo admissível.

Através das Tabelas 5.27 a 5.29, é possível concluir que as incertezas expandidas apresentam valores satisfatórios, contudo a abordagem *bottom-up* apresenta um valor mais elevado devido à contribuição da reta de calibração.

Na Figura 5.25 apresentam-se os fatores que podem ter contribuído para a variabilidade dos resultados obtidos.



**Figura 5.25** - Diagrama de causa-e-efeito para a variabilidade dos resultados obtidos.

De acordo com o Guia Nordest (Anexo X.4), avaliou-se ainda se a recuperação média obtida é significativamente diferente de 100%. Para tal, calculou-se uma estatística de teste, que foi comparada com o valor tabelado. Portanto, para 96 graus de liberdade e 95% de confiança, o valor crítico de t de Student é de 1,985, sendo que o valor calculado foi de 0,73. Como  $t < t_{\text{crítico}}$ , a recuperação média não é significativamente diferente de 100%, logo os resultados das amostras não devem ser corrigidos.

Por fim, com base na incerteza do método calculada pela abordagem *top-down*, de acordo com a ISO 11352, expressou-se ainda o limite de quantificação do método, que foi majorado, utilizando um algarismo significativo.

$$\text{MQL} = 1,0 \pm 0,2 \text{ ng/L}$$

## Capítulo 6 - Conclusões e Perspetivas Futuras

Os estudos realizados, no decorrer desta dissertação, permitem concluir que a metodologia analítica SPE-UPLC-MS/MS é adequada para a análise em rotina de 17 $\beta$ -estradiol em águas (água para consumo humano, água superficial e água subterrânea), para atingir um LOQ de 1 ng/L.

A realização deste trabalho iniciou-se com a otimização das condições do espectrómetro de massa, para identificar os iões precursores e produto e obter a melhor sensibilidade possível. Para o  $\beta$ -estradiol, as duas transições definidas foram 271,2 $\rightarrow$ 144,9 m/z (MRM1) e 271,2 $\rightarrow$ 182,9 m/z (MRM2). A voltagem de cone ótima obtida foi de 55 V e a energia de colisão ótima foi de 30 eV, para ambos os iões produto. Para o padrão interno, definiu-se uma transição 276,3 $\rightarrow$ 146,9 m/z (MRM1), sendo que a voltagem de cone ótima obtida foi de 60 V e a energia de colisão de 30 eV. A tensão no capilar ótima foi de 2,5 kV. Após a definição das condições de monitorização, procedeu-se à validação do método de ensaio.

O método desenvolvido (UPLC-ESI-MS/MS), através do método de padrão interno, apresenta boa linearidade para a gama de trabalho escolhida (1,0–10  $\mu$ g/L), com um coeficiente de determinação de 0,9979 e um coeficiente de variação do método de 2,9%. Os restantes testes estatísticos realizados, nomeadamente a análise de resíduos, teste de Mandel, teste de RIKILT e teste das áreas normalizadas, comprovaram a linearidade do método. Embora a homogeneidade de variâncias entre o primeiro e o último padrão da gama não tenha sido verificada, a linearidade foi aceite devido ao cumprimento dos critérios de aceitação associados aos testes referidos anteriormente.

Os limites de deteção e de quantificação instrumentais foram calculados por três metodologias diferentes, designadamente a partir da reta de calibração (LOD = 0,45  $\mu$ g/L e LOQ = 1,5  $\mu$ g/L), a partir de estudos de repetibilidade (LOD = 0,15  $\mu$ g/L e LOQ = 0,49  $\mu$ g/L) e pela razão sinal/ruído (LOD = 0,005  $\mu$ g/L e LOQ = 0,017  $\mu$ g/L). Conclui-se que os limites obtidos são muito diferentes, sendo que, a partir da reta de calibração, se obtêm valores elevados e, pela razão sinal/ruído, se obtêm valores muito baixos, portanto considerou-se que o cálculo pela repetibilidade do padrão de menor calibração é a melhor estimativa. Como o primeiro padrão da gama de trabalho é superior ao valor estabelecido de 1 ng/L, o passo de preparação da amostra é fundamental para baixar os limites.

A razão entre as transições MRM1/MRM2 demonstrou ser estável ao longo da gama de trabalho, logo esta pode ser utilizada como ferramenta adicional para identificação do composto, em conjunto com o tempo de retenção cromatográfico.

Em relação aos estudos de precisão, constatou-se que o método apresenta boa repetibilidade, com coeficientes de variação inferiores a 15%. Em termos de precisão intermédia, os

coeficientes de variação são inferiores a 10% e o erro relativo, para as duas concentrações estudadas foi inferior a 2%.

Como se procedeu à adição de padrão interno, o qual apresentava o mesmo tempo de retenção do composto em análise, avaliou-se a possibilidade de competição entre este e o analito de interesse no sistema de deteção, sendo que se verificou que tal não acontece. Também foi avaliado se o sinal instrumental do padrão interno era estável ao longo da gama de trabalho, o que foi comprovado, uma vez que o coeficiente de variação obtido foi inferior a 5%.

Os ensaios de recuperação, sem recurso a padrão interno, apresentaram uma recuperação média global muito baixa, de 27,6% e uma grande variabilidade, com um coeficiente de variação de 39,1%. Verificando-se que a utilização de PI era essencial para que existisse uma normalização dos valores.

Com a utilização de PI, a recuperação média global do método foi de 103,8% com um coeficiente de variação de 10,7%, sendo que se comprovou que não existem diferenças significativas entre as matrizes e entre as diferentes concentrações de fortificação estudadas.

O limite de quantificação do método, calculado com base no valor médio de recuperação, foi de 0,39 ng/L. Este valor encontra-se, assim, abaixo do limite estipulado pela Diretiva 2020/2184, de 16 de dezembro (1 ng/L).

Através dos estudos de efeitos de matriz, foi possível identificar que o composto sofre efeitos de supressão iónica, que são variáveis de acordo com o tipo de matriz e com a amostra em estudo, o que justifica, mais uma vez, a utilização do PI para efeitos de correção. Também foi possível concluir que os efeitos de supressão iónica observados são maiores, quanto maior for o fator de concentração. Comprovou-se também que as maiores perdas do processo ocorrem no passo de análise instrumental (etapa de ionização).

O último passo da validação foi o cálculo da incerteza expandida do método com recurso a duas metodologias diferentes, *bottom-up* e *top-down*. As estimativas da incerteza obtidas são aceitáveis (35,1%; 23,2% e 6,5%), uma vez que se encontram abaixo do limite autoproposto de 50%, tendo em conta o DL n.º 83/2011 e o DL n.º 152/2017. É possível concluir que a componente de incerteza com maior contribuição para a incerteza combinada está associada à reta de calibração e a menor está associada à precisão intermédia do padrão de controlo de menor concentração.

Em suma, o método de ensaio SPE-UPLC-MS/MS pode ser implementado como método de rotina no controlo de qualidade da água, uma vez que se demonstrou a seletividade, especificidade, linearidade, precisão e exatidão, apresentando um limite de quantificação abaixo do limite imposto pela Diretiva 2020/2184.

Por fim, como propostas futuras, sugere-se a validação do método num equipamento mais sensível, sendo que seria interessante testar uma fonte de ionização diferente, de modo a

reduzir os efeitos de matriz observados. Sugere-se também a participação em ensaios interlaboratoriais, quando estes estiverem disponíveis, para avaliar a reprodutibilidade e exatidão do método. Para além disso, sugere-se a implementação do método na matriz “água residual”, uma vez que os processos de tratamento de águas residuais não são, normalmente, eficazes na remoção de estradiol, logo esta é a principal fonte de contaminação do meio recetor. Como se verificou que a coluna se degrada rapidamente ao longo do tempo, possivelmente devido à amónia presente na fase móvel, seria benéfico utilizar uma pré-coluna, para proteger a coluna principal e prolongar o seu tempo de vida, ou então estudar a utilização de outras fases móveis.



## Referências Bibliográficas

- [1] Brenniman G.R. (1999). "Potable Water". Em *Environmental Geology*. Encyclopedia of Earth Science. Springer, Dordrecht. [https://doi.org/10.1007/1-4020-4494-1\\_265](https://doi.org/10.1007/1-4020-4494-1_265)
- [2] WWF. *A Nossa Água Doce*. Citado a 14 de abril de 2021, disponível em [http://awsassets.panda.org/downloads/a\\_nossa\\_agua\\_doce.pdf](http://awsassets.panda.org/downloads/a_nossa_agua_doce.pdf)
- [3] Hartmann, J., Beyer, R., & Harm, S. (2014). "Effective Removal of Estrogens from Drinking Water and Wastewater by Adsorption Technology". *Environmental Processes*, 1, 87–94. <https://doi.org/10.1007/s40710-014-0005-y>
- [4] *Human Rights to Water and Sanitation*. Citado a 14 de abril de 2021, disponível em <https://www.unwater.org/water-facts/human-rights/>
- [5] *Importância da Água*. (2011). Citado a 15 de abril de 2021, disponível em [https://www.fagar.pt/index.php?option=com\\_content&view=article&id=52&Itemid=76](https://www.fagar.pt/index.php?option=com_content&view=article&id=52&Itemid=76)
- [6] *Água - Nações Unidas - ONU Portugal*. Citado a 15 de abril de 2021, disponível em <https://unric.org/pt/agua/>
- [7] *Water Sources | CDC*. Citado a 15 de abril de 2021, disponível em [https://www.cdc.gov/healthywater/drinking/public/water\\_sources.html](https://www.cdc.gov/healthywater/drinking/public/water_sources.html)
- [8] *Your Drinking Water Source | Drinking Water in New England | US EPA*. Citado a 15 de abril de 2021, disponível em [https://www3.epa.gov/region1/ecc/drinkwater/your\\_drinkwater\\_source.html](https://www3.epa.gov/region1/ecc/drinkwater/your_drinkwater_source.html)
- [9] *Água para consumo humano*. (2018). Citado a 15 de abril de 2021, disponível em <https://rea.apambiente.pt/content/agua-para-consumo-humano>
- [10] Omer, N. H. (2019). "Water Quality Parameters". *Water Quality - Science, Assessments and Policy*, 18. <https://doi.org/10.5772/intechopen.89657>
- [11] Daniels, M., Scott, T., Haggard, B., Sharpley, A., & Daniel, T. (2009). "What Is Water Quality?". *University of Arkansas, United States Department of Agriculture, and County Governments Cooperating, Arkansas*.
- [12] Guedes-Alonso, R., Sosa-Ferrera, Z., & Santana-Rodríguez, J. J. (2013). "Simultaneous determination of hormonal residues in treated waters using ultrahigh performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry". *Journal of Analytical Methods in Chemistry*, 2013. <https://doi.org/10.1155/2013/210653>
- [13] Bila, D. M., & Dezotti, M. (2007). "Desreguladores endócrinos no meio ambiente: efeitos e consequências". *Química Nova*, 30(3), 651–666. <https://doi.org/10.1590/s0100-40422007000300027>
- [14] *What are endocrine disruptors - Environment - European Commission*. Citado a 16 de abril de 2021, disponível em [https://ec.europa.eu/environment/chemicals/endocrine/definitions/endodis\\_en.htm](https://ec.europa.eu/environment/chemicals/endocrine/definitions/endodis_en.htm)
- [15] WHO | Global assessment of the state-of-the-science of endocrine disruptors. (2002). *International Programme on Chemical Safety*.
- [16] Mills, L. J., & Chichester, C. (2005). "Review of evidence: Are endocrine-disrupting chemicals in the aquatic environment impacting fish populations?". *Science of the Total Environment*, 343(1–3), 1–34. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2004.12.070>
- [17] Marieb, E. N.; & Keller, S. M. (2017). *Essentials of Human Anatomy & Physiology* (Twelfth). Pearson Education Inc.
- [18] Nazari, E., & Suja, F. (2016). "Effects of 17 $\beta$ -estradiol (E2) on aqueous organisms and its treatment problem: A review". *Reviews on Environmental Health*, 31(4), 465–491. <https://doi.org/10.1515/reveh-2016-0040>
- [19] Kim, S. H., Tian, Q., Fang, J., & Sung, S. (2015). "Removal of 17- $\beta$  estradiol in water by sonolysis". *International Biodeterioration and Biodegradation*, 102, 11–14. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2015.03.017>
- [20] Wu, J., & Qin, F. (2019). "High Sensitivity Analysis of Estrogens in Water and Urine Without Derivatization by Direct Injection UHPLC/MS/MS". PerkinElmer.
- [21] Grdulaska, A., & Kowalik, R. (2020). "Estrogen Removal From Wastewater". *Structure and Environment*, 12(3), 133–141. <https://doi.org/10.30540/sae-2020-014>

- [22] Baker, D. R., & Loftus, N. (2015). "Direct Determination of Trace Hormones in Drinking Water by Large Volume Injection using the LCMS-8050 Triple Quadrupole Mass Spectrometer". Simadzu Corporation.
- [23] Hamid, H., & Eskicioglu, C. (2012). "Fate of estrogenic hormones in wastewater and sludge treatment: A review of properties and analytical detection techniques in sludge matrix". *Water Research*, 46(18), 5813–5833. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2012.08.002>
- [24] Birkett, J. W.; & Lester, J. N. (2003). *Endocrine Disruptors in Wastewater and Sludge Treatment Processes*. CRC Press.
- [25] Barreiros, L., Queiroz, J. F., Magalhães, L. M., Silva, A. M. T., & Segundo, M. A. (2016). "Analysis of 17- $\beta$ -estradiol and 17- $\alpha$ -ethinylestradiol in biological and environmental matrices - A review". *Microchemical Journal*, 126, 243–262. <https://doi.org/10.1016/j.microc.2015.12.003>
- [26] Glineur, A., Nott, K., Carbonnelle, P., Ronkart, S., & Purcaro, G. (2020). "Development And Validation Of A Method For Determining Estrogenic Compounds In Surface Water At The Ultra-Trace Level Required By The EU Water Framework Directive Watch List". *Journal of Chromatography A*, 1624, 461242. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2020.461242>
- [27] Adeel, M., Song, X., Wang, Y., Francis, D., & Yang, Y. (2016). "Environmental impact of estrogens on human, animal and plant life: A critical review". *Environment International*, 99, 107–119. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2016.12.010>
- [28] Ripollés, C., Ibáñez, M., Sancho, J. V., López, F. J., & Hernández, F. (2014). "Determination of 17 $\beta$ -estradiol and 17 $\alpha$ -ethinylestradiol in water at sub-ppt levels by liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry". *Analytical Methods*, 6(14), 5028–5037. <https://doi.org/10.1039/c4ay00479e>
- [29] Diretiva 2013/39/UE do Parlamento Europeu e do Conselho de 12 de agosto de 2013. (2013). *Jornal Oficial Da União Europeia*, L 226, 1–17.
- [30] *Updated surface water Watch List adopted by the Commission | EU Science Hub*. (2018). Citado a 20 de abril de 2021, disponível em <https://ec.europa.eu/jrc/en/science-update/updated-surface-water-watch-list-adopted-commission>
- [31] Decisão de execução (EU) 2020/1161 da Comissão de 4 de agosto de 2020. (2020). *Jornal Oficial Da União Europeia*, L 257, 32–35.
- [32] Decisão de Execução (UE) 2015/495 da Comissão de 20 de março de 2015. (2015). *Jornal Oficial Da União Europeia*, L 78, 40–42.
- [33] Diretiva (UE) 2020/2184 do Parlamento Europeu e do Conselho de 16 de dezembro de 2020. (2020). *Jornal Oficial Da União Europeia*, L 435, 1–62.
- [34] EPAL - Empresa Portuguesa das Águas Livres, SA. Citado a 15 de março de 2021, disponível em <https://www.epal.pt/EPAL/homepage>
- [35] Kumar, V., Nakada, N., Yasojima, M., Yamashita, N., Johnson, A. C., & Tanaka, H. (2009). "Rapid determination of free and conjugated estrogen in different water matrices by liquid chromatography-tandem mass spectrometry". *Chemosphere*, 77(10), 1440–1446. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2009.08.052>
- [36] Shore, L. S., & Shemesh, M. (2003). "Naturally produced steroid hormones and their release into the environment". *Pure and Applied Chemistry*, 75(11–12), 1859–1871. <https://doi.org/10.1351/pac200375111859>
- [37] Briciu, R. D., Kot-Wasik, A., & Namiesnik, J. (2009). "Analytical challenges and recent advances in the determination of estrogens in water environments". *Journal of Chromatographic Science*, 47(2), 127–139. <https://doi.org/10.1093/chromsci/47.2.127>
- [38] Li, C., Wei, Y., Zhang, S., & Tan, W. (2020). "Advanced methods to analyze steroid estrogens in environmental samples". *Environmental Chemistry Letters*, 18(3), 543–559. <https://doi.org/10.1007/s10311-019-00961-2>
- [39] Tavazzi, S., Comero, S., Ricci, M., Paracchini, B., Mariani, G., & Gawlik, B. M. (2016). "Water Framework Directive Watch List Method Analysis of 17 $\beta$ -estradiol and estrone". *Publications Office of the European Union*. <https://doi.org/10.2788/46705>
- [40] Naldi, A. C., Fayad, P. B., Prévost, M., & Sauvé, S. (2016). "Analysis of steroid hormones and their conjugated forms in water and urine by on-line solid-phase extraction coupled to liquid chromatog-

- raphy tandem mass spectrometry". *Chemistry Central Journal*, 10(1), 1–17. <https://doi.org/10.1186/s13065-016-0174-z>
- [41] Combalbert, S., & Hernandez-Raquet, G. (2010). "Occurrence, fate, and biodegradation of estrogens in sewage and manure". *Applied Microbiology and Biotechnology*, 86(6), 1671–1692. <https://doi.org/10.1007/s00253-010-2547-x>
- [42] Ingerslev, F., & Halling-Sørensen, B. (2003). "Evaluation of Analytical Chemical Methods for Detection of Estrogens in the Environment". Denmark: Danish Ministry of the Environment, Danish Environmental Protection Agency.
- [43] Johnson, A. C., Dumont, E., Williams, R. J., Oldenkamp, R., Cisowska, I., & Sumpter, J. P. (2013). "Do concentrations of ethinylestradiol, estradiol, and diclofenac in European rivers exceed proposed EU environmental quality standards?". *Environmental Science and Technology*, 47(21), 12297–12304. <https://doi.org/10.1021/es4030035>
- [44] Rocha, M. J., & Rocha, E. (2019). "Estrona, estradiol, etinilestradiol e diclofenac em águas superficiais portuguesas e sua contextualização internacional". *Recursos Hídricos*, 40(1), 19–39. <https://doi.org/10.5894/rh40n1-d2>
- [45] *Diretiva do Quadro da Água - Antecedentes*. Citado a 27 de abril de 2021, disponível em <https://ambiente.pt/dqa/antecedentes.html>
- [46] *Diretiva do Quadro da Água - Entrada*. Citado a 27 de abril de 2021, disponível em <https://apambiente.pt/dqa/index.html>
- [47] Gaffney, V., Cardoso, V. V., Rodrigues, A., Ferreira, E., Benoiel, M. J., & Almeida, C. M. M. (2014). "Análise de Fármacos em Águas por SPE-UPLC-ESI-MS/MS". *Química Nova*, 37(1), 138–149. <https://doi.org/10.1590/S0100-40422014000100023>
- [48] Proposta de Diretiva do Parlamento Europeu e do Conselho. (2012). *Comissão Europeia, COM 876, 32*.
- [49] Cunha, D. L., Silva, S. M. C., Bila, D. M., Oliveira, J. L. M., Sarcinelli, P. N., & Larentis, A. L. (2016). "Regulamentação do estrogênio sintético 17 $\alpha$ -etinilestradiol em matrizes aquáticas na Europa, Estados Unidos e Brasil". *Cadernos de Saúde Pública*, 32. <https://doi.org/10.1590/0102-311x00056715>
- [50] Decisão de Execução (UE) 2018/ 840 da Comissão de 5 de Junho de 2018. (2018). *Jornal Oficial Da União Europeia, L 141, 9–12*.
- [51] Loos, R., Marinov, D., Sanseverino, I., Napierska, D., & Lettieri, T. (2018). "Review of the 1st Watch List under the Water Framework Directive and recommendations for the 2nd Watch List". *Publications Office of the European Union*. <https://doi.org/10.2760/614367>
- [52] *Drinking water legislation - Environment - European Commission*. Citado a 28 de abril de 2021, disponível em [https://ec.europa.eu/environment/water/water-drink/legislation\\_en.html](https://ec.europa.eu/environment/water/water-drink/legislation_en.html)
- [53] Decreto-Lei n.º 152/2017 de 7 de dezembro. (2017). *Diário Da República, 1.ª série(235)*, 6555–6576.
- [54] *Analytical chemistry methods used in Biotechnology |Labtoo*. Citado a 6 de maio de 2021, disponível em <https://www.labtoo.com/en/page/analytical-chemistry-methods-used-in-biotechnology>
- [55] Fayad, P. B., Prévost, M., & Sauvé, S. (2013). "On-line solid-phase extraction coupled to liquid chromatography tandem mass spectrometry optimized for the analysis of steroid hormones in urban wastewaters". *Talanta*, 115, 349–360. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2013.05.038>
- [56] Mitra, S. (2003). *Sample Preparation Techniques in Analytical Chemistry*. John Wiley & Sons, Inc.
- [57] Almeida, C., Rosário, P., Serôdio, P., & Nogueira, J. M. F. (2004). "Novas perspectivas na preparação de amostras para análise cromatográfica". *Química*, 95, 69–77.
- [58] Lundanes, E., Reuhsaet, L., & Greibrokk, T. (2014). *Chromatography: Basic Principles, Sample Preparations and Related Methods*. Wiley-VCH.
- [59] Ahuja, S., & Jespersen, N. (2006). *Comprehensive Analytical Chemistry - Vol. 47: Modern Instrumental Analysis*. Elsevier.
- [60] Henriques, M. (2008). "Hormonas naturais e de síntese, bisfenol A, octilfenol e nonilfenol em águas para consumo humano: otimização do método de análise por SPE-LC-ESI-MS/MS". *Dissertação de Mestrado, Faculdade de Farmácia da Universidade de Lisboa*. <https://repositorio.ul.pt/handle/10451/252>

- [61] *Sample Preparation Perspectives - Steps of Analytical Process*. Citado a 17 de maio de 2021, disponível em <https://orochem.com/product-category/bioanalytical-sample-preparation/sample-preparation-perspectives/>
- [62] Abd-Talib, N., Mohd-Setapar, S. H., & Khamis, A. K. (2014). "The Benefits and Limitations of Methods Development in Solid Phase Extraction: Mini Review". *Jurnal Teknologi*, 69(4), 69–72. <https://doi.org/10.11113/jt.v69.3177>
- [63] Faraji, M., Yamini, Y., & Gholami, M. (2019). "Recent Advances and Trends in Applications of Solid-Phase Extraction Techniques in Food and Environmental Analysis". *Chromatographia*, 82, 1207–1249. <https://doi.org/10.1007/s10337-019-03726-9>
- [64] Liška, I. (2000). "Fifty years of solid-phase extraction in water analysis - historical development and overview". *Journal of Chromatography A*, 885(1–2), 3–16. [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(99\)01144-9](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(99)01144-9)
- [65] Dean, J. R. (1998). *Extraction Methods for Environmental Analysis*. John Wiley & Sons, Inc.
- [66] Thurman, E. M., & Mills, M. S. (1998). *Solid-Phase Extraction: Principles and Practice*. John Wiley & Sons, Inc.
- [67] Jardim, I. C. S. F. (2010). "Extração em Fase Sólida: Fundamentos Teóricos e Novas Estratégias para Preparação de Fases Sólidas". *Scientia Chromatographica*, 2(1), 13–25.
- [68] Zwir-Ferenc, A., & Biziuk, M. (2006). "Solid Phase Extraction Technique - Trends, Opportunities and Applications". *Polish Journal of Environmental Studies*, 15(5), 677–690.
- [69] Fritz, J. S. (1999). *Analytical Solid-Phase Extraction*. John Wiley & Sons, Inc.
- [70] SUPELCO. (1998). "Guide to Solid Phase Extraction". *Bulletin 910*.
- [71] Castilho, M. da C., Ramos, F., & Silveira, M. I. N. (1995). "Extração em Fase Sólida (EFS): - Tipos de Enchimento". *Química*, 59.
- [72] Moldoveanu, S. C., & David, V. (2002). *Sample Preparation in Chromatography*. Elsevier.
- [73] Christian, G. D., Dashupta, P. K., & Schug, K. A. (2013). *Analytical Chemistry* (Seventh Ed). John Wiley & Sons, Inc.
- [74] Skoog, D. A., West, D. M., Holler, F. J., & Crouch, S. R. (2013). *Fundamentals of Analytical Chemistry*. Cengage Learning.
- [75] Degani, A. L. G., Cass, Q. B., & Vieira, P. C. (1998). "Cromatografia: um breve ensaio". *Química Nova Na Escola*, 7, 21–25.
- [76] Harvey, D. (2016). *Analytical Chemistry 2.1*. Open Textbook Library. <https://open.umn.edu/opentextbooks/textbooks/486>
- [77] Miller, J. M. (2005). *Chromatography: Concepts and Contrasts*. John Wiley & Sons, Inc.
- [78] Lanças, F. M. (2009). "A Cromatografia Líquida Moderna e a Espectrometria de Massas: finalmente "compatíveis"?" *Scientia Chromatographica*, 1(2), 35–61.
- [79] Maldaner, L., & Jardim, I. C. S. F. (2009). "O estado da arte da cromatografia líquida de ultra eficiência". *Química Nova*, 32, 214–222. <https://doi.org/10.1590/S0100-40422009000100036>
- [80] Skoog, D. A., Holler, F. J., & Crouch, S. R. (2018). *Principles of Instrumental Analysis, Seventh Edition*. Cengage Learning.
- [81] Hage, D. S. (2018). *Chromatography. Principles and Applications of Clinical Mass Spectrometry: Small Molecules, Peptides, and Pathogens*. Elsevier.
- [82] Lozano-Sánchez, J., Borrás-Linares, I., Sass-Kiss, A., & Segura-Carretero, A. (2018). "Chromatographic Technique: High-Performance Liquid Chromatography (HPLC)". Em *Modern Techniques for Food Authentication*, 459–526. Elsevier. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-814264-6.00013-x>
- [83] Lanças, F. M. (2013). "A cromatografia líquida moderna e a espectrometria de massas: Finalmente "compatíveis"? II. A escolha do analisador de massas". *Scientia Chromatographica*, 5(1), 27–46. <https://doi.org/10.4322/sc.2013.005>
- [84] Xu, Q. A. (2013). *Ultra-High Performance Liquid Chromatography and Its Applications*. John Wiley & Sons, Inc.

- [85] Nguyen, D. T., Guillaume, D., Rudaz, S., & Veuthey, J. L. (2006). "Fast analysis in liquid chromatography using small particle size and high pressure". *Journal of Separation Science*, 29(12), 1836–1848. <https://doi.org/10.1002/jssc.200600189>
- [86] Chawla, G., & Ranjan, C. (2016). "Principle, Instrumentation, and Applications of UPLC: A Novel Technique of Liquid Chromatography". *Open Chemistry Journal*, 3(1), 1–16. <https://doi.org/10.2174/1874842201603010001>
- [87] Fanali, S., Haddad, P., Poole, C., Schoenmakers, P., & Lloyd, D. (2013). *Liquid Chromatography: Fundamentals and Instrumentation*. Elsevier.
- [88] Snyder, L. R., Kirkland, J. J., & Dolan, J. W. (2010). *Introduction to Modern Liquid Chromatography, Third Edition*. John Wiley & Sons, Inc.
- [89] Kruve, A., Rebane, R., Kipper, K., Oldekop, M. L., Evard, H., Herodes, K., Ravio, P., & Leito, I. (2015). "Tutorial review on validation of liquid chromatography-mass spectrometry methods: Part I". *Analytica Chimica Acta*, 870, 29–44. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2015.02.017>
- [90] Rockwood, A. L., Kushnir, M. M., & Clarke, N. J. (2018). "Mass Spectrometry". Em *Principles and Applications of Clinical Mass Spectrometry: Small Molecules, Peptides, and Pathogens*. Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-816063-3.00002-5>
- [91] Hoffmann, E. de, & Stroobant, V. (2007). *Mass spectrometry: Principles and Applications*, 3rd Edition. John Wiley & Sons.
- [92] Aborkhees, G., Raina-Fulton, R., & Thirunavokkarasu, O. (2020). "Determination of Endocrine Disrupting Chemicals in Water and Wastewater Samples by Liquid Chromatography-Negative Ion Electrospray Ionization-Tandem Mass Spectrometry". *Molecules*, 25(17). <https://doi.org/10.3390/molecules25173906>
- [93] *Introduction to mass analyzers: SHIMADZU (Shimadzu Corporation)*. Citado a 9 de agosto de 2021, disponível em [https://www.shimadzu.com/an/service-support/technical-support/analysis-basics/fundamental/mass\\_analyzers.html](https://www.shimadzu.com/an/service-support/technical-support/analysis-basics/fundamental/mass_analyzers.html)
- [94] Pitt, J. J. (2009). "Principles and Applications of Liquid Chromatography - Mass Spectrometry in Clinical Biochemistry". *The Clinical Biochemist Reviews*, 30(1), 19–34.
- [95] Hoshi Iglesias, A. (2012). "Introdução ao Acoplamento Cromatografia Líquida-Espectrometria de Massas".
- [96] Zhou, W., Yang, S., & Wang, P. G. (2017). "Matrix effects and application of matrix effect factor". *Bioanalysis*, 9(23), 1839–1844. <https://doi.org/10.4155/bio-2017-0214>
- [97] Trufelli, H., Palma, P., Famigliani, G., & Cappiello, A. (2011). "An overview of matrix effects in liquid chromatography-mass spectrometry". *Mass Spectrometry Reviews*, 30(3), 491–509. <https://doi.org/10.1002/mas.20298>
- [98] Dolan, J. W. (2012). *When Should an Internal Standard be Used?*. Citado a 1 de setembro de 2021, disponível em <https://www.chromatographyonline.com/view/when-should-internal-standard-be-used-0>
- [99] *The Internal Standard*. (2016). Citado a 1 de setembro de 2021, disponível em <https://ionsource.com/tutorial/msquan/is.htm>
- [100] RELACRE. (1996). *Guia RELACRE 3: Validação de resultados em laboratórios químicos*.
- [101] RELACRE. (2000). *Guia RELACRE 13: Validação de Métodos Internos de Ensaio em Análise Química*.
- [102] Mendes, A. S. R. (2004). "Implementação e Validação de Métodos Analíticos". *Qualidade e Metrologia*.
- [103] Rao, T. N. (2018). "Validation of Analytical Methods". *Calibration and Validation of Analytical Methods - A Sampling of Current Approaches*, 131–141. <https://doi.org/10.5772/intechopen.72087>
- [104] ISO 8466-1: Water Quality - Calibration and Evaluation of Analytical Methods and Estimation of Performance Characteristics. Part 1: Statistical Evaluation of the Linear Calibration Function. (1990). *International Organization for Standardization*.
- [105] Eurachem. (2014). *The Fitness for Purpose of Analytical Methods - A Laboratory Guide to Method Validation and Related Topics*.

- [106] Sun, Y., Gu, C., Liu, X., Liang, W., Yao, P., Bolton, J. L., & van Breemen, R. B. (2005). "Ultrafiltration tandem mass spectrometry of estrogens for characterization of structure and affinity for human estrogen receptors". *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, 16(2), 271–279. <https://doi.org/10.1016/j.jasms.2004.11.002>
- [107] Fu, R., & Zhai, C.-H. (2016). "Determination of Hormones in Drinking Water by LC/MS/MS Using an Agilent InfinityLab Poroshell HPH Column (EPA 539)". Agilent Technologies.
- [108] Pedrouzo, M., Borrull, F., Pocurull, E., & Marcé, R. M. (2009). "Estrogens and their conjugates: Determination in water samples by solid-phase extraction and liquid chromatography-tandem mass spectrometry". *Talanta*, 78(4–5), 1327–1331. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2009.02.005>
- [109] RELACRE. (2018). *Guia RELACRE 31: Quantificação da incerteza de medição em ensaios químicos e físico-químicos*.
- [110] Barwick, V. J., & Ellison, S. L. R. (2000). *VAM Project 3.2.1 Development and Harmonisation of Measurement Uncertainty Principles Part (d): Protocol for uncertainty evaluation from validation data Protocol for uncertainty evaluation from validation data*.
- [111] Magnusson, B., Näykki, T., Hovind, H., Krysell, M., & Sahlin, E. (2017). *Handbook for Calculation of Measurement Uncertainty in Environmental Laboratories, Nordtest Technical Report 537*.
- [112] *ISO 11352 Water quality — Estimation of measurement uncertainty based on validation and quality control data*. (2012).
- [113] Romeu, J. L. (2003). "Kolmogorov-Smirnov: A Goodness of Fit Test for Small Samples". *Selected Topics in Assurance Related Technologies*, 10(6).

## Anexo I - Método dos Mínimos Quadrados

A linearidade pode ser demonstrada através do método dos Mínimos Quadrados, que é caracterizado pela equação da reta:

$$y = a + bx \quad (I.1)$$

em que  $a$  é a ordenada na origem e  $b$  é o declive da reta.

A reta obtida é composta por uma variável dependente,  $y$ , e por uma variável independente,  $x$ . Neste caso, o  $y$  diz respeito ao sinal do equipamento, e o  $x$  diz respeito ao valor da concentração das soluções padrão.

O coeficiente de correlação,  $R$ , é uma medida da direção e grau com que duas variáveis quantitativas se associam linearmente. O seu cálculo é feito através da equação I.2.

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

onde  $(x_i, y_i)$  representam um par ordenado,  $N$  representa o número de pontos utilizados na construção da reta,  $\bar{x}$  é a média dos valores das concentrações das soluções padrão e  $\bar{y}$  é a média dos valores do sinal instrumental.

Este coeficiente pode assumir valores entre -1 e 1. Quando o valor de  $R$  é igual a  $\pm 1$ , este parâmetro indica-nos que todos os pontos se encontram sobre uma linha de declive positivo ou negativo. Assim, quanto mais perto o valor do coeficiente de correlação estiver de  $\pm 1$ , melhor será a qualidade dos resultados.

De modo a que a linearidade dos valores obtidos seja aceite, o coeficiente de correlação deve ter um valor igual ou superior a 0,995. No entanto, este coeficiente, por si só, não é suficiente para demonstrar a linearidade, sendo necessário realizar testes adicionais.

O coeficiente de determinação,  $R^2$ , é dado pelo quadrado de  $R$ , sendo que o seu valor deve ser igual ou superior a 0,990.

Os coeficientes da reta de regressão linear,  $b$  e  $a$ , são calculados através das equações I.3 e I.4.

$$b = \frac{\sum_{i=1}^N (x_i - \bar{x})(y_i - \bar{y})}{\sum_{i=1}^N (x_i - \bar{x})^2} \quad (I.3)$$

$$a = \bar{y} - b\bar{x} \quad (I.4)$$

Os coeficientes  $b$  e  $a$  dão uma estimativa verdadeira da função que é limitada pela dispersão do método.<sup>[101]</sup> A precisão da estimativa é quantificada pelo desvio padrão residual ( $S_{y/x}$ ) da reta de regressão, que pode ser expresso pela equação I.5.

$$S_{y/x} = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^N [y_i - (b \times x_i + a)]^2}{N - 2}} \quad (1.5)$$

O valor do desvio padrão exprime a dispersão dos valores do sinal instrumental, tendo em conta a reta de calibração.

Com os valores de  $b$  e  $a$ , é ainda possível estimar a concentração de uma amostra, tendo em conta o sinal instrumental e efetuando uma interpolação:

$$\hat{x}_i = \frac{y_i - a}{b} \quad (1.6)$$

É possível ainda determinar o desvio padrão do método,  $S_m$ , que permite avaliar a qualidade dos resultados obtidos e o coeficiente de variação do método,  $CV_m$ , através das equações 1.7 e 1.8:

$$S_m = \frac{S_{y/x}}{b} \quad (1.7)$$

$$CV_m = \frac{S_m}{\bar{x}} \times 100 \quad (1.8)$$

## Anexo II – Análise de Resíduos

A análise de resíduos permite avaliar se existe ou não correlação entre os mesmos, ou seja, se eles são independentes ou não. Portanto, a representação gráfica obtida não deve apresentar nenhuma tendência especial, o que significa que os pontos obtidos se devem dispor de forma aleatória em torno do eixo dos  $x$ . Assim, uma distribuição aleatória dos valores dos resíduos indica a existência de linearidade.

Este indicador avalia a distância entre os valores experimentais de  $y$  e os valores previstos de  $y$  através da reta de calibração, em função dos valores de  $x$ .

Foi estabelecido que o desvio, entre os valores experimentais e os valores previstos, deve ser igual ou inferior a 10%, de modo a que se admita a existência de linearidade numa determinada gama de concentrações. Os resíduos que tenham valores superiores ao estabelecido, devem ser excluídos e a gama de concentrações deve ser reduzida até que se cumpram os requisitos.<sup>[102]</sup>

O valor da área de pico previsto é calculado através da equação da reta obtida pelo método dos mínimos quadrados.

O valor do resíduo é obtido através do quociente entre a área de pico experimental e a área de pico estimada, em percentagem. Por fim, traça-se um gráfico de resíduos (%) *versus* concentração ( $\mu\text{g/L}$ ).

### $\beta$ -estradiol – com PI

**Tabela II.1** - Desvios obtidos relativamente à concentração teórica, com o PI.

Área experimental	Área pico estimada	Área experimental/ Área estimada	Concentração ( $\mu\text{g/L}$ )	Desvio (%)
0,62	0,62	1,01	1,0	0,6
1,31	1,24	1,05	2,0	5,5
1,87	1,87	1,00	3,0	0,1
2,43	2,50	0,97	4,0	-2,6
2,95	3,12	0,94	5,0	-5,5
3,88	3,75	1,04	6,0	3,7
4,52	4,50	1,00	7,2	0,5
5,54	5,50	1,01	8,8	0,7
6,21	6,25	0,99	10,0	-0,6

β-estradiol – sem PI**Tabela II.2** - Desvios obtidos relativamente à concentração teórica, sem o PI.

Área experimental	Área pico estimada	Área experimental/ Área estimada	Concentração (µg/L)	Desvio (%)
161,6	154,5	1,05	1,0	4,6
302,8	297,4	1,02	2,0	1,8
444,1	440,4	1,01	3,0	0,8
552,7	583,3	0,95	4,0	-5,2
697,4	726,3	0,96	5,0	-4,0
889,7	869,2	1,02	6,0	2,4
1 068,6	1 040,7	1,03	7,2	2,7
1 298,8	1 269,5	1,02	8,8	2,3
1 406,6	1 441,0	0,98	10,0	-2,4

Padrão interno**Tabela II.3** - Desvios obtidos relativamente à concentração teórica para o PI.

Área experimental	Área pico estimada	Área experimental/ Área estimada	Concentração (µg/L)	Desvio (%)
40,5	41,9	0,97	1,0	-3,3
78,8	79,1	1,00	2,0	-0,3
118,2	116,3	1,02	3,0	1,6
153,5	153,4	1,00	4,0	0,1
181,7	190,6	0,95	5,0	-4,7
237,0	227,8	1,04	6,0	4,0
277,4	272,4	1,02	7,2	1,8
327,5	331,9	0,99	8,8	-1,3
375,3	376,5	1,00	10,0	-0,3

## Anexo III - Teste de Mandel

A linearidade pode ser avaliada através do teste de Mandel ou de Fisher-Snedecor, de acordo com a norma ISO 8466-1.

Neste método, calcula-se a função de calibração linear, pela ISO 8466-1, e a função de calibração não linear, mais especificamente polinomial do segundo grau, pela ISO 8466-2, bem como os respectivos desvios padrão residuais,  $S_{y/x}$  e  $S_{y2}$ , através das equações III.1 e III.2:

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

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

Sendo que:

$N$  – número de padrões de calibração;

$y_i$  – sinal obtido para um padrão de calibração com uma determinada concentração;

$\bar{y}_i$  – sinal estimado através da função de calibração linear para um padrão da mesma concentração;

$\bar{y}_{i2}$  – sinal estimado através da função de calibração polinomial do 2º grau para um padrão da mesma concentração;

De seguida, calcula-se a diferença de variâncias ( $DS^2$ ) através da equação seguinte:

$$DS^2 = (N - 2) \times S_{y/x}^2 - (N - 3) \times S_{y2}^2 \quad (\text{III.3})$$

Por último, determina-se o valor de teste, VT, através da equação III.4:

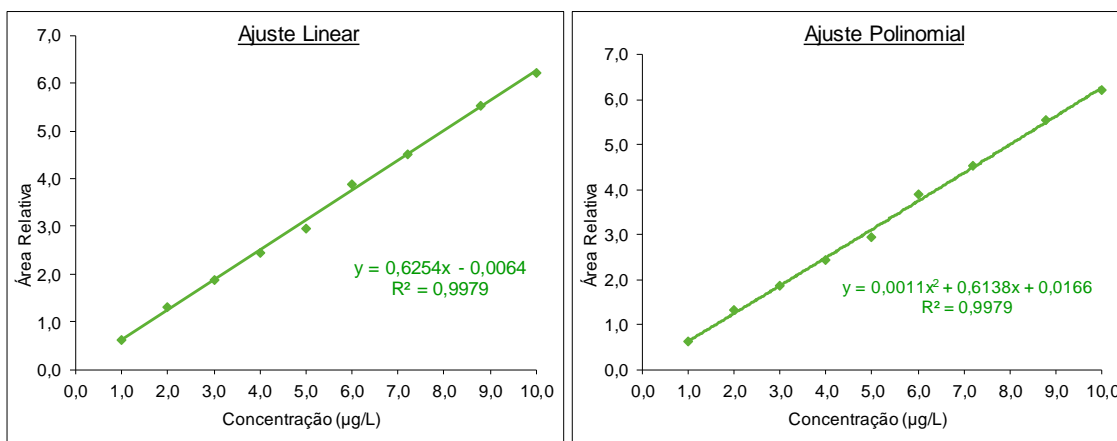
$$VT = \frac{DS^2}{S_{y2}^2} \quad (\text{III.4})$$

De modo a tomar uma decisão, compara-se o valor de teste com o valor tabelado da distribuição de Fisher-Snedecor, tendo em conta os graus de liberdade e um intervalo de confiança de 95%. Assim, se  $VT \leq F$ , a função de calibração é linear, uma vez que a função de calibração não linear não se ajusta adequadamente aos dados. Se  $VT > F$ , a função de calibração é não linear, logo a gama de trabalho deve ser reduzida até que se verifique a existência de linearidade. Caso não seja possível, deve-se trabalhar com uma função de calibração não linear.

β-estradiol – com PI

**Tabela III.1** - Áreas calculadas para o ajuste linear e polinomial, para E2 com PI.

Concentração (µg/L)	Área	Área ajuste linear	Área ajuste polinomial
1,0	0,62	0,62	0,63
2,0	1,31	1,24	1,25
3,0	1,87	1,87	1,87
4,0	2,43	2,50	2,49
5,0	2,95	3,12	3,11
6,0	3,88	3,75	3,74
7,2	4,52	4,50	4,49
8,8	5,54	5,50	5,50
10,0	6,21	6,25	6,26



**Figura III.1** - Representação gráfica dos ajustes linear e polinomial para E2 com PI.

**Tabela III.2** - Erros quadráticos obtidos para cada ajuste e respetivo desvio padrão residual para E2 com PI.

<u>Ajuste Linear</u>	<u>Ajuste Polinomial</u>
<u><math>(y-y_i)^2</math></u>	<u><math>(y-y_i)^2</math></u>
1,18E-05	8,20E-05
4,68E-03	4,14E-03
3,66E-06	1,74E-05
4,21E-03	3,41E-03
2,97E-02	2,68E-02
1,89E-02	2,14E-02
4,60E-04	7,43E-04
1,65E-03	1,44E-03
1,31E-03	2,38E-03
<hr/>	<hr/>
Soma = 6,09E-02	Soma = 6,04E-02
<hr/>	<hr/>
N-2 = 7	N-3 = 6
<hr/>	<hr/>
$S_{y/x} = 9,33E-02$	$S_{y/x(2^a)} = 1,00E-01$

$$DS^2 = (N - 2) S^2_{y/x} - (N - 3) S^2_{y/x(2^o)}$$

$$DS^2 = 5,64E-04$$

$$VT = DS^2 / S^2_{y/x(2^o)}$$

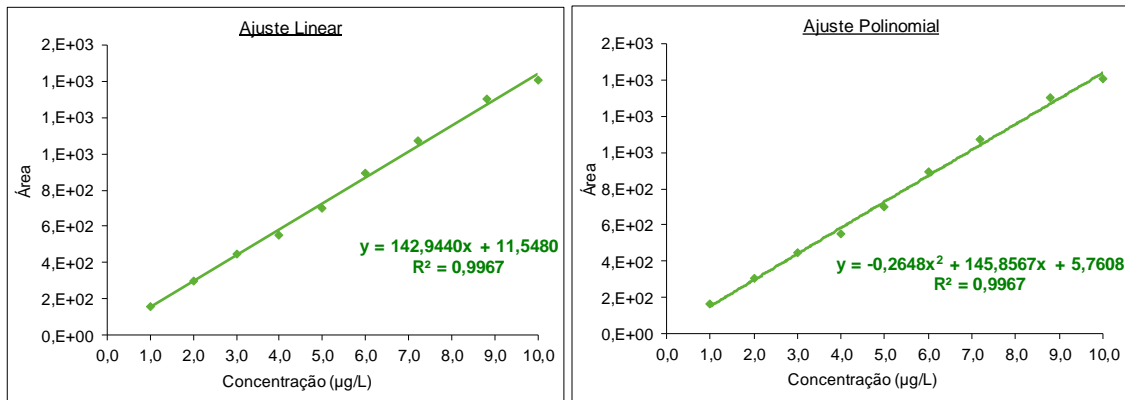
$$VT = 0,056$$

$$F_{(1,6)95\%} = 5,99$$

β-estradiol – sem PI

**Tabela III.3** - Áreas calculadas para o ajuste linear e polinomial, para E2 sem PI.

Concentração (µg/L)	Área	Área ajuste linear	Área ajuste polinomial
1,0	161,6	154,5	151,4
2,0	302,8	297,4	296,4
3,0	444,1	440,4	440,9
4,0	552,7	583,3	585,0
5,0	697,4	726,3	728,4
6,0	889,7	869,2	871,4
7,2	1 068,6	1 040,7	1 042,2
8,8	1 298,8	1 269,5	1 268,8
10,0	1 406,6	1 441,0	1 437,8



**Figura III.2** - Representação gráfica dos ajustes linear e polinomial para E2 sem PI.

**Tabela III.4** - Erros quadráticos obtidos para cada ajuste e respetivo desvio padrão residual para E2 sem PI.

<u>Ajuste Linear</u>		<u>Ajuste Polinomial</u>	
	<u><math>(y-y_i)^2</math></u>		<u><math>(y-y_i)^2</math></u>
	5,05E+01		1,05E+02
	2,88E+01		4,08E+01
	1,38E+01		9,94E+00
	9,38E+02		1,04E+03
	8,33E+02		9,63E+02
	4,20E+02		3,36E+02
	7,76E+02		6,97E+02
	8,61E+02		9,00E+02
	1,18E+03		9,76E+02
Soma =	5,10E+03	Soma =	5,07E+03
N-2 =	7	N-3 =	6
$S_{y/x}$ =	2,70E+01	$S_{y/x(2^a)}$ =	2,91E+01

$$DS^2 = (N - 2) S^2_{y/x} - (N - 3) S^2_{y/x(2^a)}$$

$$DS^2 = 35,59$$

$$VT = DS^2 / S^2_{y/x(2^a)}$$

$$VT = 0,042$$

$$F_{(1,6)95\%} = 5,99$$

Padrão interno

**Tabela III.5** - Áreas calculadas para o ajuste linear e polinomial, para PI.

Concentração (µg/L)	Área	Área ajuste linear	Área ajuste polinomial
1,0	40,5	41,9	40,1
2,0	78,8	79,1	78,5
3,0	118,2	116,3	116,6
4,0	153,5	153,4	154,4
5,0	181,7	190,6	191,8
6,0	237,0	227,8	229,0
7,2	277,4	272,4	273,2
8,8	327,5	331,9	331,5
10,0	375,3	376,5	374,7

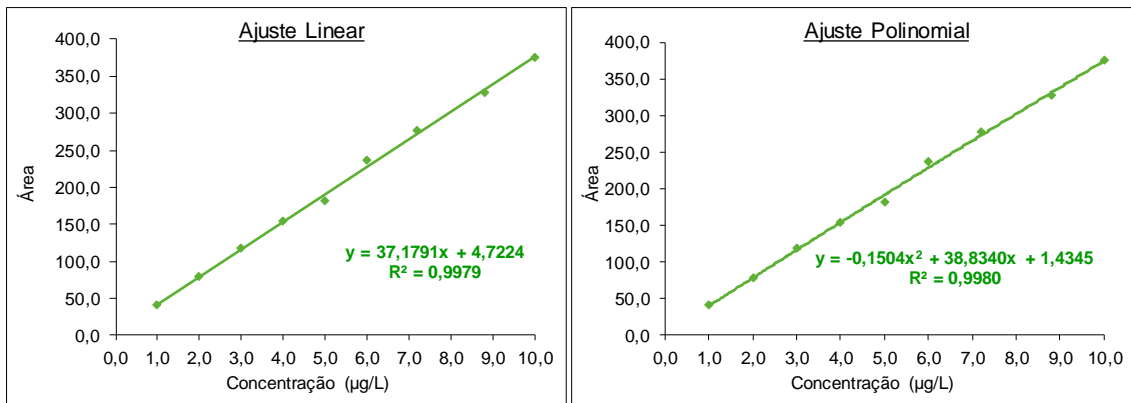


Figura III.3 - Representação gráfica dos ajustes linear e polinomial para PI.

Tabela III.6 - Erros quadráticos obtidos para cada ajuste e respetivo desvio padrão residual para PI.

<u>Ajuste Linear</u>		<u>Ajuste Polinomial</u>	
	<u><math>(y-y_i)^2</math></u>		<u><math>(y-y_i)^2</math></u>
	1,91		0,16
	0,07		0,10
	3,57		2,46
	0,01		0,68
	80,03		103,45
	83,94		62,99
	25,09		17,48
	19,31		16,15
	1,39		0,36
Soma =	215,3	Soma =	203,8
N-2 =	7	N-3 =	6
$S_{y/x}$ =	5,55	$S_{y/x(2^o)}$ =	5,83

$$DS^2 = (N - 2) S^2_{y/x} - (N - 3) S^2_{y/x(2^o)}$$

$$DS^2 = 11,49$$

$$VT = DS^2 / S^2_{y/x(2^o)}$$

$$VT = 0,338$$

$$F_{(1,6)95\%} = 5,99$$



## Anexo IV – Teste de RIKILT

O teste de RIKILT permite analisar a linearidade em cada ponto da reta de calibração. Assim, primeiramente, traça-se um gráfico de linearidade, de modo a avaliar se, de facto, o comportamento é linear. De seguida, calcula-se para cada concentração  $x_i$  e para cada sinal instrumental  $y_i$ , a razão  $y_i/x_i$ .

Calcula-se também a média de todas as razões  $y_i/x_i$ , sendo que este valor se considera como 100%. Assim, determina-se o valor percentual de cada razão  $y_i/x_i$  em função do valor médio, através da equação seguinte:

$$y_i/x_i (\%) = \frac{y_i/x_i}{\bar{y}_i/x_i} \times 100 \quad (\text{IV.1})$$

Para obter a representação gráfica pretendida, coloca-se o valor das concentrações no eixo dos  $x$  e o valor da razão  $y_i/x_i$  (%), no eixo dos  $y$ .

No caso ideal, cada ponto de calibração deveria dar um valor de 100%. Como existem sempre desvios, os valores obtidos devem estar compreendidos entre 90 e 110%. Caso um ponto esteja fora dos limites estabelecidos, este deve ser rejeitado e a gama de concentrações deve ser reduzida, sendo que é necessário aplicar novamente o teste até que os requisitos sejam cumpridos.

### β-estradiol – com PI

Tabela IV.1 - Valores obtidos para as razões para E2 com PI.

Concentração (µg/L) = $x_i$	Área = $y_i$	Razão $y_i / x_i$	% $y_i / x_i$
1,0	0,62	0,62	100
2,0	1,31	0,66	105
3,0	1,87	0,62	100
4,0	2,43	0,61	97
5,0	2,95	0,59	94
6,0	3,88	0,65	104
7,2	4,52	0,63	100
8,8	5,54	0,63	101
10,0	6,21	0,62	99
<b>Média</b>		<b>0,625</b>	

$\beta$ -estradiol – sem PI**Tabela IV.2** - Valores obtidos para as razões para E2 sem PI.

Concentração ( $\mu\text{g/L}$ ) = $x_i$	Área = $y_i$	Razão $y_i / x_i$	% $y_i / x_i$
1,0	161,6	161,6	110
2,0	302,8	151,4	103
3,0	444,1	148,0	101
4,0	552,7	138,2	94
5,0	697,4	139,5	95
6,0	889,7	148,3	101
7,2	1068,6	148,4	101
8,8	1298,8	147,6	100
10,0	1406,6	140,7	96
	<b>Média</b>	<b>147,1</b>	

Padrão interno**Tabela IV.3** - Valores obtidos para as razões para PI.

Concentração ( $\mu\text{g/L}$ ) = $x_i$	Área = $y_i$	Razão $y_i / x_i$	% $y_i / x_i$
1,0	40,5	40,5	105
2,0	78,8	39,4	102
3,0	118,2	39,4	102
4,0	153,5	38,4	100
5,0	181,7	36,3	94
6,0	237,0	39,5	102
7,2	277,4	38,5	100
8,8	327,5	37,2	97
10,0	375,3	37,5	97
	<b>Média</b>	<b>38,5</b>	

## Anexo V – Teste das Áreas Normalizadas

O teste das áreas normalizadas tem como objetivo avaliar a dispersão dos valores obtidos na calibração em relação aos valores ótimos, tendo por base um intervalo previamente estabelecido.

Através da equação da reta obtida pela regressão linear, estimam-se as áreas do pico cromatográfico para cada concentração. De seguida, calcula-se a razão entre o valor do sinal obtido experimentalmente e o valor do sinal estimado pela equação da reta.

A concentração para a qual esta razão mais se aproxima de 1 é chamada de  $C_{100}$ , portanto é o valor de referência utilizado para a normalização. Assim, as áreas normalizadas são calculadas pela equação seguinte:

$$\text{Área normalizada} = \frac{\frac{A_i}{C_i} \times C_{100} \times 100}{A_{100}} \quad (\text{V.1})$$

Em que:

$A_i$  – área do pico cromatográfico correspondente a determinada concentração;

$C_i$  – concentração correspondente à área;

$A_{100}$  – altura do pico cromatográfico correspondente ao ponto experimental com melhor correlação;

$C_{100}$  – concentração correspondente ao ponto experimental com melhor correlação.

Os valores normalizados obtidos devem estar compreendidos entre 85 e 115%. Caso existam valores que tenham um desvio superior, estes deverão ser excluídos e aplica-se novamente o teste até que os requisitos sejam cumpridos.

β-estradiol – com PI

**Tabela V.1** - Cálculo dos valores normalizados para E2 com PI.

Área pico estimada	Área experimental / Área estimada	Concentração (µg/L)	Valores normalizados
0,6	1,006	1,0	100,2
1,2	1,055	2,0	95,1
1,9	1,001	3,0	100,0
2,5	0,974	4,0	102,7
3,1	0,945	5,0	105,8
3,7	1,037	6,0	96,4
4,5	1,005	7,2	99,4
5,5	1,007	8,8	99,1
6,2	0,994	10,0	100,4

β-estradiol – sem PI

**Tabela V.2** - Cálculo dos valores normalizados para E2 sem PI.

Área pico estimada	Área experimental / Área estimada	Concentração (µg/L)	Valores normalizados
154,5	1,046	1,0	91,6
297,4	1,018	2,0	97,8
440,4	1,008	3,0	100,0
583,3	0,948	4,0	107,1
726,3	0,960	5,0	106,1
869,2	1,024	6,0	99,8
1 040,7	1,027	7,2	99,7
1 269,5	1,023	8,8	100,3
1 441,0	0,976	10,0	105,2

Padrão Interno

**Tabela V.3** - Cálculo dos valores normalizados para PI.

Área pico estimada	Área experimental / Área estimada	Concentração (µg/L)	Valores normalizados
41,9	0,967	1,0	94,7
79,1	0,997	2,0	97,4
116,3	1,016	3,0	97,5
153,4	1,001	4,0	100,0
190,6	0,953	5,0	105,6
227,8	1,040	6,0	97,2
272,4	1,018	7,2	99,6
331,9	0,987	8,8	103,1
376,5	0,997	10,0	102,3

## Anexo VI – Teste de Normalidade

De modo a comprovar que um conjunto de dados segue uma distribuição Normal, pode recorrer-se a diversos testes estatísticos. O teste de Kolmogorov-Smirnov é bastante utilizado para testar a normalidade, sendo especializado para amostras pequenas <sup>[113]</sup>.

Primeiramente, calculou-se a média e o desvio padrão do conjunto de dados. De seguida, ordenaram-se os dados por ordem crescente e calculou-se a distribuição cumulativa teórica ( $F_0$ ). Por fim, calcularam-se as distâncias entre  $F_0$  e as distribuições empíricas para cada valor  $i$ , através das seguintes equações:

$$D^+ = \left| F_0 - \frac{i}{n} \right| \quad (\text{VI.1})$$

$$D^- = \left| F_0 - \frac{(i-1)}{n} \right| \quad (\text{VI.2})$$

A estatística de teste obtida é:

$$D = \text{máximo}(D^+, D^-) \quad (\text{VI.3})$$

O valor obtido foi comparado com o valor tabelado ( $D_{\text{crítico}}$ ), para um erro de 1%. Caso  $D$  seja inferior a  $D_{\text{crítico}}$ , então não existe evidência para desprezar a normalidade dos dados.

### β-estradiol – com PI (concentração: 1,0 e 10 µg/L)

**Tabela VI.1** - Resultados para a normalidade das concentrações de 1,0 e 10 µg/L (com PI).

n	Concentração: 1 µg/L				Concentração: 10 µg/L			
	Valores ordenados	$F_0$	$D^+$	$D^-$	Valores ordenados	$F_0$	$D^+$	$D^-$
1	0,639	0,093	0,007	0,093	5,967	0,093	0,007	0,093
2	0,642	0,110	0,090	0,010	5,984	0,105	0,095	0,005
3	0,649	0,155	0,145	0,045	6,055	0,162	0,138	0,038
4	0,666	0,330	0,070	0,030	6,247	0,401	0,001	0,101
5	0,679	0,485	0,015	0,085	6,252	0,408	0,092	0,008
6	0,681	0,515	0,085	0,015	6,300	0,481	0,119	0,019
7	0,696	0,702	0,002	0,102	6,494	0,756	0,056	0,156
8	0,705	0,797	0,003	0,097	6,523	0,789	0,011	0,089
9	0,715	0,878	0,022	0,078	6,594	0,859	0,041	0,059
10	0,725	0,931	0,069	0,031	6,709	0,935	0,065	0,035

D	0,145
---	-------

D	0,156
---	-------

β-estradiol – sem PI (concentração: 1,0 e 10 µg/L)

**Tabela VI.2** - Resultados para a normalidade das concentrações de 1,0 e 10 µg/L (sem PI).

n	Concentração: 1 µg/L				Concentração: 10 µg/L			
	Valores ordenados	F <sub>0</sub>	D <sup>+</sup>	D <sup>-</sup>	Valores ordenados	F <sub>0</sub>	D <sup>+</sup>	D <sup>-</sup>
1	151,7	0,021	0,079	0,021	1 272,3	0,020	0,080	0,020
2	158,0	0,156	0,044	0,056	1 313,8	0,210	0,010	0,110
3	162,0	0,362	0,062	0,162	1 325,9	0,329	0,029	0,129
4	164,1	0,496	0,096	0,196	1 330,6	0,382	0,018	0,082
5	164,3	0,509	0,009	0,109	1 341,4	0,509	0,009	0,109
6	165,1	0,561	0,039	0,061	1 346,2	0,567	0,033	0,067
7	165,9	0,612	0,088	0,012	1 352,9	0,644	0,056	0,044
8	166,2	0,631	0,169	0,069	1 354,5	0,662	0,138	0,038
9	171,2	0,876	0,024	0,076	1 380,0	0,882	0,018	0,082
10	173,1	0,928	0,072	0,028	1 388,5	0,925	0,075	0,025

D	0,196
---	-------

D	0,138
---	-------

PI (concentração: 1,0 e 10 µg/L)

**Tabela VI.3** - Resultados para a normalidade das concentrações de 1,0 e 10 µg/L (PI).

n	Concentração: 1 µg/L				Concentração: 10 µg/L			
	Valores ordenados	F <sub>0</sub>	D <sup>+</sup>	D <sup>-</sup>	Valores ordenados	F <sub>0</sub>	D <sup>+</sup>	D <sup>-</sup>
1	38,9	0,083	0,060	0,083	244,7	0,022	0,121	0,022
2	41,6	0,304	0,018	0,161	310,8	0,340	0,054	0,197
3	41,7	0,321	0,107	0,035	331,1	0,532	0,103	0,246
4	42,5	0,417	0,155	0,012	332,1	0,542	0,030	0,113
5	42,8	0,464	0,251	0,108	351,0	0,712	0,002	0,141
6	47,1	0,905	0,048	0,191	356,1	0,753	0,104	0,039
7	47,2	0,912	0,088	0,055	368,9	0,840	0,160	0,017

D	0,251
---	-------

D	0,246
---	-------

Ensaio de recuperação (concentrações)

Tabela VI.4 - Resultados para a normalidade das concentrações de 1, 2 e 3 ng/L.

n	Concentração: 1 ng/L				Concentração: 2 ng/L				Concentração: 3 ng/L			
	Valores ordenados (µg/L)	F <sub>0</sub>	D <sup>+</sup>	D <sup>-</sup>	Valores ordenados (µg/L)	F <sub>0</sub>	D <sup>+</sup>	D <sup>-</sup>	Valores ordenados (µg/L)	F <sub>0</sub>	D <sup>+</sup>	D <sup>-</sup>
1	0,00085	0,074	0,034	0,074	0,00162	0,005	0,035	0,005	0,00237	0,005	0,035	0,005
2	0,00088	0,111	0,031	0,071	0,00182	0,073	0,007	0,033	0,00273	0,067	0,013	0,027
3	0,00089	0,122	0,002	0,042	0,00183	0,081	0,039	0,001	0,00276	0,078	0,042	0,002
4	0,00092	0,185	0,025	0,065	0,00188	0,141	0,019	0,021	0,00285	0,127	0,033	0,007
5	0,00094	0,217	0,017	0,057	0,00190	0,160	0,040	0,000	0,00300	0,239	0,039	0,079
6	0,00094	0,220	0,020	0,020	0,00198	0,299	0,059	0,099	0,00302	0,258	0,018	0,058
7	0,00095	0,238	0,042	0,002	0,00198	0,299	0,019	0,059	0,00306	0,297	0,017	0,057
8	0,00095	0,250	0,070	0,030	0,00198	0,303	0,017	0,023	0,00308	0,318	0,002	0,038
9	0,00096	0,265	0,095	0,055	0,00199	0,314	0,046	0,006	0,00309	0,324	0,036	0,004
10	0,00099	0,335	0,065	0,025	0,00202	0,372	0,028	0,012	0,00310	0,337	0,063	0,023
11	0,00099	0,346	0,094	0,054	0,00205	0,436	0,004	0,036	0,00314	0,383	0,057	0,017
12	0,00100	0,369	0,111	0,071	0,00206	0,463	0,017	0,023	0,00318	0,424	0,056	0,016
13	0,00101	0,393	0,127	0,087	0,00207	0,481	0,039	0,001	0,00333	0,601	0,081	0,121
14	0,00101	0,417	0,143	0,103	0,00209	0,538	0,022	0,018	0,00336	0,631	0,071	0,111
15	0,00102	0,438	0,162	0,122	0,00216	0,671	0,071	0,111	0,00341	0,692	0,092	0,132
16	0,00106	0,549	0,091	0,051	0,00219	0,729	0,089	0,129	0,00341	0,692	0,052	0,092
17	0,00106	0,555	0,125	0,085	0,00220	0,754	0,074	0,114	0,00345	0,728	0,048	0,088
18	0,00108	0,615	0,105	0,065	0,00222	0,794	0,074	0,114	0,00347	0,748	0,028	0,068
19	0,00111	0,710	0,050	0,010	0,00223	0,801	0,041	0,081	0,00351	0,783	0,023	0,063
20	0,00115	0,806	0,006	0,046	0,00223	0,807	0,007	0,047	0,00351	0,786	0,014	0,026
21	0,00121	0,906	0,066	0,106	0,00224	0,822	0,018	0,022	0,00356	0,824	0,016	0,024
22	0,00122	0,911	0,031	0,071	0,00227	0,857	0,023	0,017	0,00357	0,833	0,047	0,007
23	0,00123	0,924	0,004	0,044	0,00229	0,878	0,042	0,002	0,00362	0,866	0,054	0,014
24	0,00126	0,953	0,007	0,033	0,00230	0,893	0,067	0,027	0,00367	0,894	0,066	0,026
25	0,00134	0,991	0,009	0,031	0,00233	0,919	0,081	0,041	0,00380	0,950	0,050	0,010

D 0,162

D 0,129

D 0,132

Ensaio de recuperação (matriz)**Tabela VI.5** - Resultados para a normalidade de água para consumo humano.

<b>Matriz: Água para consumo humano</b>				
n	Valores ordenados (µg/L)	F <sub>0</sub>	D <sup>+</sup>	D <sup>-</sup>
1	0,00075	0,008	0,025	0,008
2	0,00085	0,078	0,012	0,045
3	0,00088	0,128	0,028	0,062
4	0,00089	0,143	0,010	0,043
5	0,00092	0,220	0,054	0,087
6	0,00092	0,235	0,035	0,068
7	0,00093	0,266	0,033	0,066
8	0,00094	0,286	0,019	0,052
9	0,00095	0,313	0,013	0,046
10	0,00095	0,320	0,013	0,020
11	0,00095	0,330	0,036	0,003
12	0,00095	0,334	0,066	0,033
13	0,00096	0,359	0,074	0,041
14	0,00098	0,419	0,047	0,014
15	0,00099	0,450	0,050	0,017
16	0,00099	0,466	0,068	0,034
17	0,00099	0,469	0,097	0,064
18	0,00100	0,497	0,103	0,070
19	0,00101	0,528	0,105	0,072
20	0,00101	0,540	0,127	0,094
21	0,00102	0,586	0,114	0,081
22	0,00105	0,709	0,025	0,009
23	0,00106	0,722	0,045	0,011
24	0,00109	0,809	0,009	0,042
25	0,00109	0,824	0,009	0,024
26	0,00112	0,876	0,010	0,043
27	0,00114	0,915	0,015	0,048
28	0,00116	0,943	0,009	0,043
29	0,00117	0,957	0,010	0,023
30	0,00123	0,987	0,013	0,021

D	0,127
---	-------

Tabela VI.6 - Resultados para a normalidade de água superficial.

Matriz: Água superficial				
n	Valores ordenados ( $\mu\text{g/L}$ )	$F_0$	$D^+$	$D^-$
1	0,00089	0,064	0,001	0,064
2	0,00094	0,128	0,003	0,066
3	0,00095	0,143	0,044	0,018
4	0,00099	0,224	0,026	0,036
5	0,00101	0,267	0,046	0,017
6	0,00101	0,274	0,101	0,038
7	0,00103	0,306	0,132	0,069
8	0,00105	0,384	0,116	0,053
9	0,00106	0,393	0,169	0,107
10	0,00111	0,562	0,063	0,000
11	0,00115	0,678	0,010	0,053
12	0,00121	0,819	0,069	0,132
13	0,00122	0,827	0,015	0,077
14	0,00124	0,867	0,008	0,054
15	0,00126	0,897	0,041	0,022
16	0,00134	0,973	0,027	0,036

D	0,169
---	-------

Tabela VI.7 - Resultados para a normalidade de água subterrânea.

Matriz: Água subterrânea				
n	Valores ordenados ( $\mu\text{g/L}$ )	$F_0$	$D^+$	$D^-$
1	0,00082	0,019	0,034	0,019
2	0,00082	0,021	0,084	0,031
3	0,00094	0,234	0,076	0,129
4	0,00094	0,241	0,031	0,083
5	0,00094	0,245	0,019	0,034
6	0,00096	0,320	0,004	0,057
7	0,00098	0,420	0,052	0,105
8	0,00098	0,425	0,004	0,056
9	0,00100	0,504	0,031	0,083
10	0,00100	0,509	0,017	0,035
11	0,00102	0,597	0,018	0,071
12	0,00103	0,627	0,005	0,048
13	0,00104	0,672	0,012	0,041
14	0,00105	0,719	0,018	0,035
15	0,00107	0,773	0,017	0,036
16	0,00108	0,802	0,040	0,012
17	0,00108	0,805	0,090	0,037
18	0,00109	0,834	0,113	0,061
19	0,00118	0,979	0,021	0,031

D	0,129
---	-------



## Anexo VII – Teste de Homogeneidade de Variâncias

A avaliação da gama de trabalho pode ser feita pelo teste de homogeneidade de variâncias. De acordo com a norma ISO 8466-1, deve efetuar-se a medição de dez réplicas dos padrões com concentração inferior e superior da gama de trabalho. De seguida, calcula-se a variância para cada uma das soluções padrão, através da equação VII.1:

$$S_i^2 = \frac{\sum_{j=1}^i (y_{ij} - \bar{y}_i)^2}{n_i - 1} \quad (\text{VII.1})$$

Em que  $i$  é o número correspondente ao padrão e  $j$  é o número de repetições efetuadas.

Com os valores das variâncias calcula-se o valor de teste (PG), de modo a avaliar se existem diferenças significativas entre elas. O valor de teste é calculado pela equação VII.2 ou pela VII.3.

$$PG = \frac{S_1^2}{S_2^2} \text{ se } S_1^2 > S_2^2 \quad (\text{VII.2})$$

$$PG = \frac{S_2^2}{S_1^2} \text{ se } S_1^2 < S_2^2 \quad (\text{VII.3})$$

O valor obtido é comparado com o valor tabelado da distribuição F de Fisher-Snedecor, para  $n-1$  graus de liberdade e um grau de confiança de 99%.

Se  $PG < F_{99\%}$ , então pode concluir-se que existe homogeneidade de variâncias ao longo da gama de trabalho, logo esta está bem ajustada e as diferenças não são significativas.

Se  $PG > F_{99\%}$ , então conclui-se que não existe homogeneidade de variâncias, portanto existem diferenças significativas <sup>[101]</sup>.

β-estradiol – com PI

**Tabela VII.1** - Resultados obtidos para as duas concentrações estudadas, para E2 com PI.

**Concentração inferior: 1,0 µg/L**

Área Relativa
0,67
0,70
0,71
0,68
0,64
0,64
0,68
0,65
0,72
0,73

**Concentração superior: 10,0 µg/L**

Área Relativa
5,98
6,05
6,25
6,52
6,30
6,71
6,25
6,59
5,97
6,49

N-1 =	9
Média =	0,68
Desvio Padrão =	0,031
Desvio Relativo (%) =	4,51
Variância =	9,38E-04

N-1 =	9
Média =	6,31
Desvio Padrão =	0,262
Desvio Relativo (%) =	4,14
Variância =	6,84E-02

**F<sub>99%</sub> = 5,35**

**PG = 72,95**

β-estradiol – sem PI

**Tabela VII.2** - Resultados obtidos para as duas concentrações estudadas, para E2 sem PI.

**Concentração inferior: 1,0 µg/L**

Área
165,1
173,1
171,2
158,0
162,0
164,1
165,9
151,7
164,3
166,2

**Concentração superior: 10,0 µg/L**

Área
1 313,8
1 341,4
1 352,9
1 380,0
1 346,2
1 388,5
1 325,9
1 330,6
1 272,3
1 354,5

N-1 =	9
Média =	164,2
Desvio Padrão =	6,11
Desvio Relativo (%) =	3,72
Variância =	3,73E+01

N-1 =	9
Média =	1 340,6
Desvio Padrão =	33,2
Desvio Relativo (%) =	2,48
Variância =	1,10E+03

$$F_{99\%} = 5,35$$

$$PG = 29,58$$

Padrão interno

**Tabela VII.3** - Resultados obtidos para as duas concentrações estudadas, para PI.

**Concentração inferior: 1,0 µg/L**

Área
41,6
47,1
47,2
38,9
41,7
42,8
42,5

N-1 =	6
Média =	43,1
Desvio Padrão =	3,02
Desvio Relativo (%) =	6,99
Variância =	9,09

**Concentração superior: 10,0 µg/L**

Área
356,1
368,9
244,7
331,1
332,1
310,8
351,0

N-1 =	6
Média =	327,8
Desvio Padrão =	41,4
Desvio Relativo (%) =	12,61
Variância =	1,71E+03

$$F_{99\%} = 8,47$$

$$PG = 188,08$$



## Anexo VIII – Limiares Analíticos

A determinação dos limiares analíticos foi efetuada de acordo com o descrito no ponto 3.1.2.2.

### Reta de calibração

**Tabela VIII.1** - Desvio padrão residual, declive da reta e limiares analíticos.

	$S_{y/x}$	b	LOQ ( $\mu\text{g/L}$ )	LOD ( $\mu\text{g/L}$ )
Estradiol - com PI	0,09	0,63	0,45	1,5
Estradiol - sem PI	27	143	0,57	1,9

### Repetibilidade

**Tabela VIII.2** - Áreas e concentrações estimadas para o padrão de menor concentração (com PI).

Área	Concentração estimada ( $\mu\text{g/L}$ )
0,67	1,08
0,70	1,12
0,71	1,14
0,68	1,10
0,64	1,03
0,64	1,04
0,68	1,10
0,65	1,05
0,72	1,15
0,73	1,17
Média das Concentrações ( $\mu\text{g/L}$ ) =	1,10
Desvio Padrão ( $\mu\text{g/L}$ ) =	0,05
CV ( % ) =	4,48

<b>LOD =</b>	0,15 $\mu\text{g/L}$
<b>LOQ =</b>	0,49 $\mu\text{g/L}$

**Tabela VIII.3** - Áreas e concentrações estimadas para o padrão de menor concentração (sem PI).

Área	Concentração estimada (µg/L)
165,1	1,07
173,1	1,13
171,2	1,12
158,0	1,02
162,0	1,05
164,1	1,07
165,9	1,08
151,7	0,98
164,3	1,07
166,2	1,08
Média das Concentrações (µg/L) =	1,07
Desvio Padrão (µg/L) =	0,04
CV ( % ) =	4,00

<b>LOD =</b>	0,13 µg/L
<b>LOQ =</b>	0,43 µg/L

Razão sinal/ruído

**Tabela VIII.4** - Razão sinal/ruído do padrão de menor concentração.

Concentração (µg/L)	Razão sinal/ruído
1,0	581

<b>LOD =</b>	0,005 µg/L
<b>LOQ =</b>	0,017 µg/L

## Anexo IX – Precisão

A precisão foi determinada de acordo com o descrito no ponto 4.7.3.

Os resultados obtidos com base na repetibilidade, encontram-se nas tabelas IX.1 a IX.3.

Tabela IX.1 - Precisão em termos de repetibilidade (estradiol - com PI).

	<b>P1 (1 µg/L)</b>	<b>P2 (2 µg/L)</b>	<b>P5 (5 µg/L)</b>	<b>P9 (10 µg/L)</b>
	Área relativa	Área relativa	Área relativa	Área relativa
	0,67	1,27	3,48	5,98
	0,70	1,30	3,12	6,05
	0,71	1,24	3,17	6,25
	0,68	1,25	3,10	6,52
	0,64	1,35	3,14	6,30
	0,64	1,27	3,57	6,71
	0,68	1,20	3,29	6,25
	0,65	1,30	3,08	6,59
	0,72	1,33	3,49	5,97
	0,73	1,16	3,18	6,49
<b>Média =</b>	0,68	1,27	3,26	6,31
<b>Desvio padrão =</b>	0,03	0,06	0,18	0,26
<b>CV (%) =</b>	4,52	4,51	5,65	4,14

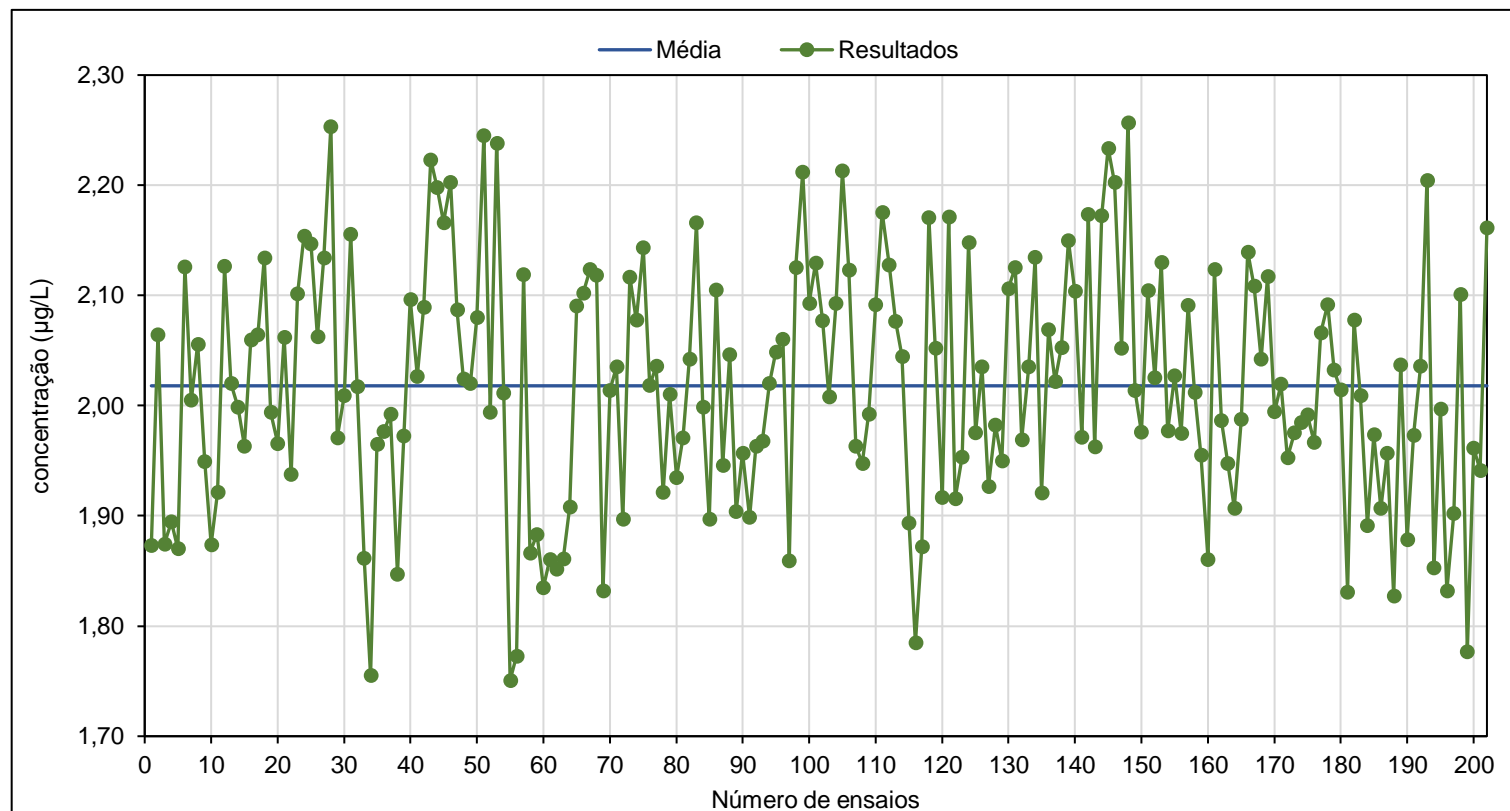
Tabela IX.2 - Precisão em termos de repetibilidade (estradiol - sem PI).

	<b>P1 (1 µg/L)</b>	<b>P2 (2 µg/L)</b>	<b>P5 (5 µg/L)</b>	<b>P9 (10 µg/L)</b>
	Área absoluta	Área absoluta	Área absoluta	Área absoluta
	165,1	315,1	738,0	1 313,8
	173,1	307,2	756,3	1 341,4
	171,2	303,3	740,6	1 352,9
	158,0	316,8	724,4	1 380,0
	162,0	302,4	740,6	1 346,2
	164,1	296,2	743,5	1 388,5
	165,9	291,5	725,9	1 325,9
	151,7	323,4	709,4	1 330,6
	164,3	327,3	737,1	1 272,3
	166,2	291,2	721,6	1 354,5
<b>Média =</b>	164,2	307,4	733,7	1 340,6
<b>Desvio padrão =</b>	6,11	12,83	13,40	33,20
<b>CV (%) =</b>	3,72	4,17	1,83	2,48

**Tabela IX.3** - Precisão em termos de repetibilidade (PI).

	<b>P1 (1 µg/L)</b>	<b>P2 (2 µg/L)</b>	<b>P5 (5 µg/L)</b>	<b>P9 (10 µg/L)</b>
	Área	Área	Área	Área
	41,6	88,5	166,7	356,1
	47,1	73,1	165,7	368,9
	47,2	87,4	201,8	244,7
	38,9	84,2	191,4	331,1
	41,7	85,5	196,2	332,1
	42,8	91,2	181,8	310,1
	42,5	84,2	193,9	351,0
<b>Média =</b>	43,1	84,9	185,4	327,7
<b>Desvio padrão =</b>	3,02	5,76	14,39	41,40
<b>CV (%) =</b>	6,99	6,78	7,76	12,63

Os resultados obtidos, em condições de precisão intermédia, encontram-se nas Figuras IX.1 e IX.2.



**Figura IX.1** - Resultados obtidos para o padrão de calibração P2, em condições de precisão intermédia.

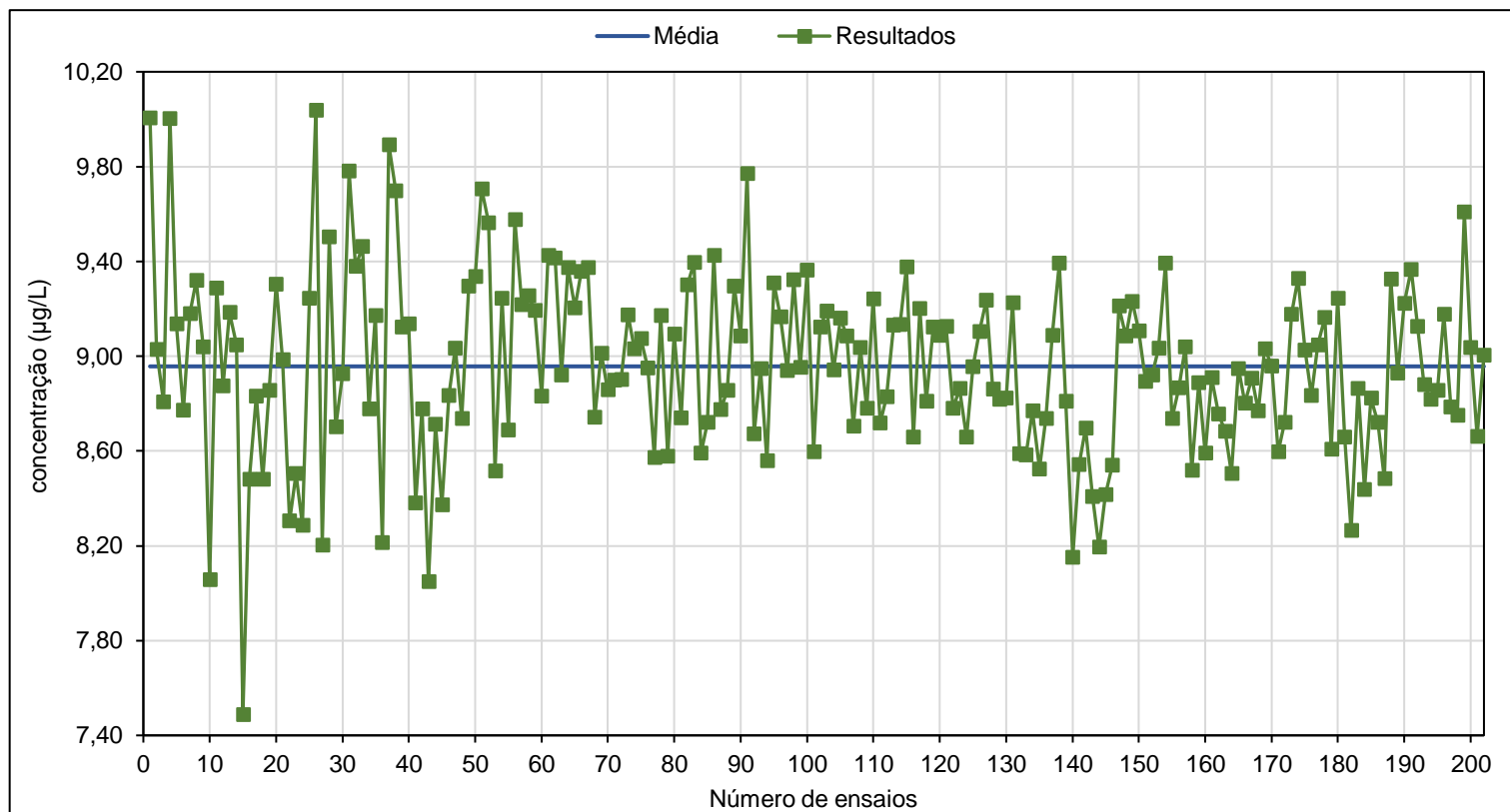


Figura IX.2 - Resultados obtidos para o padrão de calibração P8, em condições de precisão intermédia.

## Anexo X – Incerteza Global do Método

### X.1 Incerteza associada à preparação de padrões

A incerteza associada à preparação de uma solução padrão obtida por pesagem do padrão primário resulta da combinação das seguintes fontes de incerteza <sup>[109,110]</sup>:

- Incerteza associada à pesagem;
- Incerteza associada à pureza do padrão comercial;
- Incerteza associada a uma medição de volume.

#### Incerteza associada à pesagem do padrão comercial

A incerteza associada a uma pesagem unitária pode ser estimada através do erro de indicação da balança, que pode ser dado pelo “Erro Máximo Admissível” (EMA), estabelecido internamente pelo laboratório para cada balança, ou pelo maior erro de indicação dado pelo certificado de calibração da balança. Neste caso, considera-se uma distribuição retangular associada ao EMA.

A equação X.1 considera a incerteza associada a uma pesagem por diferença,  $u_m$ , sendo que  $m$  é a diferença entre a massa bruta e a massa da tara. Assim, a incerteza deverá ser contabilizada duas vezes, uma vez que as duas medições de massa são independentes em termos de repetibilidade da pesagem e, muitas vezes, também o são relativamente à linearidade da resposta da balança.

$$u_m = \sqrt{2(u_{Bal}^{Calib})^2} = \sqrt{2\left(\frac{EMA}{\sqrt{3}}\right)^2} \quad (X.1)$$

Onde  $u_{Bal}^{Calib}$  é a incerteza associada à calibração da balança e EMA é o erro máximo admissível.

#### Incerteza associada à pureza do padrão comercial

De modo a calcular a incerteza associada à pureza do padrão comercial,  $u_{pur}$ , assume-se uma distribuição retangular. Assim, o seu cálculo é feito pela equação X.2.

$$u_{pur} = \frac{u_{cert}}{\sqrt{3}} \quad (X.2)$$

em que  $u_{cert}$  é o valor da incerteza dado pelo certificado de análise.

Incerteza associada à medição de volume

A incerteza associada a uma medição de volume,  $u_V$ , efetuada por um material volumétrico, é calculada tendo em conta a incerteza associada à calibração do material,  $u_V^{calib}$ , e a incerteza associada ao efeito da temperatura na medição do volume,  $u_V^{Temp}$ .

$$u_V = \sqrt{(u_V^{calib})^2 + (u_V^{Temp})^2} \quad (X.3)$$

A incerteza associada à calibração do material volumétrico é calculada através da tolerância do mesmo, que é fornecida pelo fabricante, e considerando uma distribuição retangular, como se observa na equação X.4.

$$u_V^{calib} = \frac{Tolerância}{\sqrt{3}} \quad (X.4)$$

A incerteza associada ao efeito da temperatura diz respeito ao impacto da variação da temperatura do laboratório na medição do volume, sendo que a temperatura de referência é, normalmente, 20 °C. Neste caso, considerou-se uma distribuição retangular, então a incerteza é dada pela equação X.5.

$$u_V^{Temp} = \frac{V \times \Delta T \times \alpha}{\sqrt{3}} \quad (X.5)$$

Em que  $V$  é o volume medido,  $\Delta T$  é a variação da temperatura segundo os critérios definidos e  $\alpha$  é o coeficiente de expansão volúmica da solução à temperatura de referência.

Na prática, quando são utilizadas soluções aquosas diluídas, o valor de  $\alpha$  utilizado pode ser o de soluções aquosas, cujo valor é  $2,07 \times 10^{-4} \text{ } ^\circ\text{C}^{-1}$ .

Com as incertezas padrão anteriores é possível calcular a incerteza padrão combinada associada à preparação da solução padrão primária através da equação X.6.

$$u_C = C \times \sqrt{\left(\frac{u_m}{m}\right)^2 + \left(\frac{u_{pur}}{pur}\right)^2 + \left(\frac{u_V}{V}\right)^2} \quad (X.6)$$

Em que:

- $u_C$  é a incerteza padrão combinada associada à preparação da solução padrão primária (mg/L);
- $C$  é a concentração da solução padrão primária (mg/L);
- $u_m$  é a incerteza padrão associada à pesagem do padrão comercial (g);
- $m$  é a massa pesada do padrão comercial (g);
- $u_{pur}$  é a incerteza padrão associada à pureza do padrão comercial;
- $pur$  é a pureza do padrão comercial;
- $u_V$  é a incerteza associada à medição do volume (L);

- $V$  é o volume do balão volumétrico (L);

### Incerteza combinada associada à preparação de padrões obtidos por diluição

De modo a obter soluções com concentrações mais baixas é necessário realizar diluições sucessivas a partir da solução padrão primária, o que faz com que exista propagação da incerteza. Assim, é necessário calcular a incerteza padrão combinada associada a cada diluição, através da equação X.7.

$$u_{C_{dil}} = C_{dil} \times \sqrt{\left(\frac{u_c}{C}\right)^2 + \left(\frac{u_{V_i}}{V_i}\right)^2 + \left(\frac{u_{V_f}}{V_f}\right)^2} \quad (X.7)$$

Em que:

- $u_{C_{dil}}$  é a incerteza padrão combinada associada à preparação da solução padrão diluída;
- $C_{dil}$  é a concentração da solução padrão diluída;
- $u_c$  é a incerteza combinada da solução padrão anterior;
- $C$  é a concentração da solução padrão anterior;
- $u_{V_i}$  é a incerteza padrão associada à medição do volume inicial (pipeta volumétrica);
- $V_i$  é o volume inicial medido;
- $u_{V_f}$  é a incerteza padrão associada à medição do volume final (balão volumétrico);
- $V_f$  é o volume final (do balão volumétrico).

As incertezas associadas a  $V_i$  e  $V_f$  são calculadas de acordo com a equação X.3, contudo a componente da temperatura,  $u_V^{Temp}$ , não é considerada.

## X.2 Incerteza associada à interpolação da curva de calibração

Quando a função de calibração pode ser descrita pelo Método dos Mínimos Quadrados, de acordo com a ISO 8466-1, a incerteza associada à interpolação do sinal da amostra na função de calibração linear,  $u_{reta}$ , é dada por:

$$u_{reta} = \frac{S_{y/x}}{b} \times \sqrt{\frac{1}{N} + \frac{1}{n} + \frac{(\bar{Y}_a - \bar{y})^2}{b^2 \times \sum(x_i - \bar{x})^2}} \quad (X.8)$$

Onde:

- $S_{y/x}$  é o desvio padrão residual da reta de calibração;
- $b$  é o declive da reta;
- $N$  é o número de padrões de calibração usados no traçado da reta de calibração;
- $n$  é o nº de leituras utilizadas para determinar a concentração da amostra;
- $\bar{y}_a$  é o valor médio das “n” leituras da amostra;
- $\bar{y}$  é o valor médio das “N” leituras dos padrões de calibração;
- $x_i$  é a concentração de cada um dos “N” padrões de calibração;
- $\bar{x}$  é a concentração média dos padrões de calibração.

Para o cálculo desta incerteza, usa-se o sinal obtido pelo padrão de concentração mais baixa da gama de trabalho como referência, de modo a obter uma concentração estimada por interpolação da reta de calibração.

### X.3 Incerteza associada à precisão

Para que a incerteza associada à precisão seja representativa da real variabilidade dos resultados dos ensaios, esta deve ser avaliada em condições de precisão intermédia. Neste caso, o seu cálculo foi efetuado com recurso ao padrão de controlo de gama mais baixa.

A incerteza padrão absoluta associada à precisão,  $u_{precisão}$ , é calculada diretamente pelo desvio padrão absoluto de precisão,  $S_{precisão}$ . Assim,

$$u_{precisão} = S_{precisão} \quad (X.9)$$

A incerteza padrão relativa associada à precisão calcula-se através da equação X.10.

$$u'_{precisão} = \frac{S_{precisão}}{\bar{C} \times \sqrt{n}} \times 100 \quad (X.10)$$

Em que  $\bar{C}$  é a média das concentrações e  $n$  é o número de análises efetuadas.

### X.4 Incerteza associada à exatidão dos ensaios de recuperação (Guia Nordtest)

A incerteza associada à exatidão do método de ensaio pode ser estimada através de ensaios de recuperação, sendo que é necessário ter em conta a incerteza associada à variabilidade e a incerteza associada à concentração da amostra fortificada e usada no ensaio de recuperação [111].

O valor médio das recuperações é determinado através da equação X.11.

$$\bar{R} = \frac{\bar{C}_{obs}}{C_{fortif}} \quad (X.11)$$

Onde:

- $\bar{R}$  é a recuperação média em “n” ensaios efetuados;
- $\bar{C}_{obs}$  é a concentração média estimada de “n” ensaios de amostras fortificadas;
- $C_{fortif}$  é a concentração do analito na amostra fortificada.

A incerteza associada à recuperação média,  $u_{(\bar{R})}$ , é então dada por:

$$u_{(\bar{R})} = \bar{R} \times \sqrt{\left(\frac{s_{obs}^2}{n \times \bar{C}_{obs}^2}\right) + \left(\frac{u_{C_{fortif}}}{C_{fortif}}\right)^2} \quad (X.12)$$

Em que:

- $s_{obs}$  é o desvio padrão da série de “n” resultados obtidos nos ensaios de recuperação a um nível de recuperação;
- $n$  é o número de ensaios de amostras fortificadas;
- $u_{C_{fortif}}$  é a incerteza associada à concentração da amostra fortificada e usada no ensaio de recuperação.

Após a determinação da média das recuperações e da incerteza associada aos ensaios de recuperação,  $u_{(\bar{R})}$ , é possível avaliar se a recuperação média está afastada do valor ideal de 100% ( $\bar{R} = 1$ ), através do teste t de Student.

O valor do t de Student é calculado através da seguinte expressão:

$$t = \frac{|1 - \bar{R}|}{u_{(\bar{R})}} \quad (X.13)$$

O valor obtido é comparado com o valor de  $t_{critico}$  para n-1 graus de liberdade e 95% de nível de confiança. Caso  $t < t_{critico}$ , então  $\bar{R}$  não é significativamente diferente de 1, logo os resultados das amostras não devem ser corrigidos com o valor da recuperação média.

## X.5 Incerteza associada à exatidão dos ensaios de recuperação (ISO 11352)

A incerteza da exatidão do método de ensaio, tendo em conta os erros de medição obtidos pelos ensaios de recuperação, em termos relativos,  $u'_{recup}$ , pode ser calculada pela equação X.14 [112].

$$u'_{recup} = \sqrt{b_{RMS}^2 + u'_{fortif}{}^2} \quad (X.14)$$

Em que:

- $b_{RMS}$  é a incerteza padrão associada à dispersão do erro relativo dos resultados obtidos nos ensaios de recuperação;
- $u'_{fortif}$  é a incerteza padrão relativa da concentração do analito na amostra fortificada.

A incerteza padrão associada à dispersão do erro relativo é calculada pela seguinte equação:

$$b_{RMS} = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (b'_i)^2}{n}} \quad (X.15)$$

Sendo que

$$b' = \frac{C_{Lab} - C_{ref}}{C_{ref}} \times 100 \quad (X.16)$$

Em que:

- $b'_i$  é a diferença relativa entre o valor obtido pelo laboratório no ensaio de recuperação ( $C_{Lab}$ ) e o valor de referência ( $C_{ref}$ );
- $n$  é o número de ensaios de recuperação efetuados.

Nos métodos cromatográficos com preparação de amostra, a percentagem de recuperação média do ensaio de recuperação encontra-se afastada do valor ideal de 100%, por isso o resultado obtido é corrigido pelo valor da percentagem média. Assim, a concentração teórica,  $C_{ref}$ , é calculada através da média dos resultados obtidos nos ensaios de recuperação.

$$C_{ref} = \frac{\sum_{i=1}^n C_{Lab_i}}{n} \quad (X.17)$$

A incerteza padrão relativa da concentração do composto na amostra fortificada é descrita pela equação X.18.

$$u'_{fortif} = \sqrt{\left(\frac{u_{spike}}{C_{spike}}\right)^2 + \left(\frac{u_V}{V}\right)^2 + \left(\frac{u_{V'}}{V'}\right)^2} \quad (X.18)$$

Em que:

- $u_{spike}$  é a incerteza associada à preparação da solução *spike*;
- $C_{spike}$  é a concentração do composto na solução *spike* usada para fortificar a amostra;

- $u_V$  é a incerteza padrão associada à medição do volume da amostra usada no ensaio de recuperação (balão volumétrico);
- $V$  é o volume da amostra utilizado no ensaio de recuperação;
- $u_{V'}$  é a incerteza padrão associada à medição do volume da solução *spike* adicionada à amostra no ensaio de recuperação;
- $V'$  é o volume da solução *spike* adicionado à amostra.

## X.6 Incerteza associada à concentração do padrão interno

Como o método requer a utilização de padrão interno, também é necessário considerar a incerteza inerente à sua preparação. Neste caso, a solução padrão primária é preparada por diluição de um padrão comercial dissolvido num solvente apropriado. As fontes de incerteza contabilizadas são:

- Incerteza associada à pureza da solução padrão comercial;
- Incerteza associada a uma medição de volume;
- Incerteza associada à concentração do composto na solução padrão comercial (indicada pelo fabricante).

A incerteza combinada da concentração da solução padrão preparada por diluição da solução padrão comercial,  $u_C$ , é dada pela equação X.19.

$$u_C = C \times \sqrt{\left(\frac{u_V}{V}\right)^2 + \left(\frac{u_{V'}}{V'}\right)^2 + \left(\frac{u_{pur}}{pur}\right)^2 + \left(\frac{u_{C'}}{C'}\right)^2} \quad (\text{X.19})$$

Em que:

- $C$  é a concentração da solução padrão primária;
- $u_V$  é a incerteza associada à medição do volume;
- $V$  é o volume do solvente adicionado à solução padrão;
- $u_{V'}$  é a incerteza associada à medição do volume da solução padrão comercial adicionado à solução padrão;
- $V'$  é o volume da solução padrão comercial adicionado à solução padrão;
- $u_{pur}$  é a incerteza associada à pureza do padrão;
- $pur$  é a pureza do padrão comercial;
- $u_{C'}$  é a incerteza associada à concentração do composto na solução padrão comercial (indicada pelo fabricante);
- $C'$  é a concentração do composto na solução padrão comercial.



2021

MARIANA ALBANO

IMPLEMENTAÇÃO E VALIDAÇÃO DE UM MÉTODO DE ENSAIO PARA  
ANÁLISE DE 17 $\beta$ -ESTRADIOL EM ÁGUAS POR UPLC-MS/MS