

"Being prepared for all circumstances is what ensures certain victory,
for it means you are fighting an enemy who is already beaten."

Sun Tzu, Art of War

Agradecimentos

Com a finalização de uma etapa de cinco anos, seria injusto não dar o devido crédito a todos aqueles que me ajudaram de alguma forma no meu percurso.

Ao laboratório CESAB - Centro de Serviços do Ambiente, em especial ao orientador Dr. João Pereira e colega de laboratório Dra. Sandra Pinheiro, por me terem dado a oportunidade, não só de realizar este projeto como de me terem mostrado o dia-a-dia de um laboratório de química.

Ao meu pai, Carlos, por todos os esforços e sacrifícios que fez por mim. À minha irmã, Berta, pelas palavras de carinho e apoio que me deu. À minha mãe, Maria Clara, que me inspirou e motivou para alcançar todos os meus sonhos.

Aos meus padrinhos, que sempre me apoiaram desde o meu nascimento até aos dias de hoje.

Aos amigos sertaginenses que me acompanharam desde a escola, os quais eu levo para a vida

Aos amigos que tive a honra de conhecer quando ingressei no curso de química, nomeadamente, Bárbara Lima, Cátia Esteves, Filipe Estrada, Filipa Silva, João Gregório, José Roque, José Miguel e Tiago Marques.

Ao meu orientador da Faculdade, Professor Doutor Jorge Costa Pereira, por todo o suporte e apoio que me deu para a realização deste projeto.

O meu muito obrigado a todos vós.

Objetivos

Este projecto tem como objetivo definir e validar uma metodologia analítica para a determinação de microcistinas LR, YR e RR pela técnica SPE-UPLC-MS/MS em águas doces naturais e água de consumo humano, assim como implementar a análise dos pesticidas mecoprope e desetilsimazina seguindo uma metodologia analítica pré-existente para outros pesticidas no laboratório, também por SPE-UPLC-MS/MS. Em ambos os métodos pretende-se fazer cumprir o decreto-lei número 152/2017 de 7 de Dezembro, que especifica o limite de quantificação dos compostos referidos.

Resumo

Este projeto foi desenvolvido com o objetivo de estabelecer dois métodos analíticos pela técnica SPE-UPLC-MS/MS, na área do controlo de qualidade de águas, capazes de quantificar a desetilsimazina e o mecoprope da família de pesticidas e três tipos de microcistinas, nomeadamente microcistina-LR, microcistina-RR e microcistina-YR. O método foi estudado, para os pesticidas, em matrizes água subterrânea e água de consumo humano. Relativamente às microcistinas, as matrizes que foram alvo de estudos foram água superficial e água de consumo humano.

Deste modo, este trabalho teve como base o estudo de validação dos métodos referidos, onde foram avaliados em vários parâmetros como precisão, exatidão, seletividade, linearidade, limiares analíticos (instrumentais), limites de quantificação e taxas de recuperação.

Foi possível obter várias curvas de calibração de forma a avaliar a resposta do equipamento, seguidos dos ensaios em regime de repetibilidade com leituras de padrões para os pesticidas e microcistinas. Foi validado o uso da extração em fase sólida tanto para as microcistinas como para os pesticidas. Elaborou-se um procedimento de tratamento de amostra para a análise de microcistinas, sendo este procedimento utilizado para extrair as microcistinas presentes na fase particulada. Por último, foram efetuadas leituras em regime de repetibilidade de amostras fortificadas tanto para as microcistinas como para os pesticidas.

Com utilização de procedimentos estatísticos, foi possível validar os métodos em estudo, com a finalidade de os sujeitar ao processo de acreditação.

Palavras-chave:

controlo da qualidade, água, pesticidas, microcistinas, SPE-UPLC-MS/MS, acreditação.

Abstract

This project was developed with the goal of establishing two analytical methods based on the methodology SPE-UPLC-MS/MS, related to quality control of waters, able to quantify the compounds deethylsimazine and mecoprop, from the family of pesticides, and three types of microcystins, namely microcystin-LR, microcystin-RR and microcystin-YR. The methodology was studied, for the pesticides, in drinking water and groundwater as matrices. About the microcystins, the matrices studied were drinking water and surface water.

At this way, this work was made using validation study by methodology based on SPE-UPLC-MS/MS, where precision, accuracy, selectivity, linearity, analytical thresholds, limit of quantification and spike recovery were evaluated.

It was possible to do several calibration curves in order to evaluate the instrumental response, followed by elaboration of assays with the goal of study the repetibility with standards os pesticides and microcystins. It was validated the use of solid phase extraction for both compounds. It was elaborated an analytical procedure of sample treatment in order to analyse microcystins, which procedure was necessary to extract the particulated microcystins. Finally, it was evaluated several assays to study repetibility with spiked samples for microcystins and pesticides.

With statistical procedures, it was possible the validation of all methods, with the main reason to apply them to accreditation process.

Keywords:

quality control, pesticides, microcystins, SPE-UPLC-MS/MS, accreditation.

Preâmbulo

Este trabalho foi realizado no âmbito da disciplina de Projeto Científico/Industrial, para a conclusão do Mestrado em Química, na vertente de Controlo de Qualidade e Ambiente do Departamento de Química da Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade de Coimbra.

Este projeto encontra-se organizado sob a forma de cinco capítulos. No primeiro capítulo são abordados alguns aspetos sobre a qualidade de água e sobre os analitos que serão abordados neste projeto. Também serão referidos, de forma breve, o laboratório onde este projeto foi realizado e a metodologia na qual será realizado este projeto

No segundo capítulo são referidas as características químicas dos analitos em estudo, e da metodologia referida. As abordagens estatísticas também são abordadas, em especial relevo com aplicação à validação de métodos analíticos.

Sobre o terceiro capítulo, neste são referidos os procedimentos gerais como a preparação das soluções usadas no projeto e a otimização das condições experimentais. É de referir também que são explicados os cálculos usados na estatística da validação.

Acerca do quarto capítulo, nele são explicados o processo de otimização das condições experimentais e a obtenção dos diversos parâmetros que constituem o processo de validação. É de salientar que foram também executados ensaios interlaboratoriais.

Por último, no quinto capítulo são retiradas as conclusões dos resultados obtidos e uma breve abordagem acerca das perspetivas futuras que visem melhorar o método estudado.

Nomenclatura

- $\%CV$ - coeficiente de variação (dispersão relativa sob forma percentual)
- $\%RE$ - desvio relativo (erro sistemático sob a forma percentual)
- $\%Rec$ - taxa de recuperação (em percentagem)
- $\%Res_i$ - Resposta relativa
- $\%Rkt_i$ - Teste de Rikilt
- $\%RSE$ - erro padrão relativo (incerteza relativa sob forma percentual)
- $\%RSE_0$ - erro padrão relativo do método
(valor percentual da incerteza média de quantificação)
- α - nível de significância ou de diferença significativa (corresponde à probabilidade mínima para aceitação da hipótese nula)
- \bar{x} - estimativa cantral - média aritmética
- ν - graus de liberdade
- $\sigma(b_i)$ - estimativa de incerteza associada ao parâmetro b_i (erro padrão)
- σ_{fit} - desvio padrão do ajuste
- $\sigma_{p.e.}$ - estimativa de incerteza relacionada com variabilidade puramente aleatória
- τ - valor de referência (valor correto)
- b_0 - parâmetro polinomial de ordem zero (ordenada na origem)
- b_1 - parâmetro polinomial de primeira ordem (declive)
- b_2 - parâmetro polinomial de segunda ordem (termo quadrático)
- C_a - concentração de analito adicionada (incremento)
- C_f - concentração total de analito encontrada na amostra incrementada
- C_i - concentração inicial de analito presente na amostra

- $F_{\alpha(\nu_1, \nu_2)}^s$ - valor crítico referente à distribuição de Fischer com simetria s ($s = u$ para unilateral ou $s = b$ no caso bilateral), calculado ao nível de confiança de $100(1 - \alpha)$ para ν_1 e ν_2 graus de liberdade no numerador e no denominador, respetivamente
- H_0 - hipótese nula
- H_1 - hipótese alternativa
- LD_{50} - dose letal para 50 da população
- $p[x]$ - probabilidade de ocorrência do evento "x"
- $P_{(.1)}$ - modelo linear incompleto (polinómio de primeiro grau sem ordenada na origem); expressão: $y_i = b_1 \cdot x_i$
- $P_{(01)}$ - modelo linear (polinómio de primeiro grau completo); expressão: $y_i = b_0 + b_1 \cdot x_i$
- $P_{(012)}$ - modelo curvilíneo (polinómio de segundo grau completo); expressão: $y_i = b_0 + b_1 \cdot x_i + b_2 \cdot x_i^2$
- R^2 - coeficiente de determinação (correlação de Pearson ao quadrado)
- RC_i - razão de confirmação
- s - estimativa de dispersão (desvio padrão)
- S_0 - erro padrão do método (estimativa de erro médio na quantificação)
- s_r - estimativa da incerteza relacionada com a repetibilidade
- S_{x^p} - soma de termos elevados ao grau p
- $Sens$ - sensibilidade do método analítico
- SS - soma de desvios quadráticos
- $t_{\alpha(\nu)}^s$ - valor crítico da distribuição $t - student$ com simetria s ($s = u$ para o caso unilateral e $s = b$ no caso bilateral), estimado ao nível de confiança de $100(1 - \alpha)$ com ν graus de liberdade
- t_r - tempo de retenção (tempo de eluição de um analito numa coluna de separação cromatográfica)
- TV - valor de teste (do Inglês, Test Value)
- x_1 - primeiro padrão da curva de calibração (padrão de menor concentração)
- x_i - concentração do item de ensaio (i)
- x_N - último padrão da curva de calibração (padrão de maior concentração)
- x_{LD} - limite de deteção (menor concentração a partir da qual o analito pode ser detetado)
- x_{LQ} - limite de quantificação (menor concentração a partir da qual o analito pode ser quantificado com rigor estatístico)

y_i	- resposta do método analítico ao item de ensaio de concentração x_i
y_{LD}	- sinal correspondente ao limite de deteção (menor sinal a partir do qual se pode afirmar que o analito é detetado)
y_{LQ}	- sinal correspondente ao limite de quantificação (menor sinal a partir da qual o analito pode ser quantificado com rigor estatístico)
z	- fator de desempenho (do Inglês, z-score)
Adda	- ácido 3-amino-9-metoxi-2,6,8-trimetil-10-fenildeca-4E,6E-dienóico
CESAB	- Centro de Serviços do Ambiente
DIA	- herbicida desisopropilatrizona
ELISA	- do Inglês, Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ensaio bioquímico baseado na atividade de enzimas e anticorpos imobilizados)
EN	- norma Europeia (European Norm)
ERSAR	- Entidade Reguladora dos Serviços de Águas e Resíduos
HPLC	- cromatografia líquida de elevado desempenho (do Inglês, High Performance Liquid Chromatography)
IEC	- Comissão Eletrotécnica Internacional (International Electrotechnical Commission)
IPAC	- Instituto Português de Acreditação
ISO	- Organização Internacional para a Padronização (International Organization for Standardization)
MC	- microcistina
MC-LR	- microcistina LR
MC-RR	- microcistina RR
MC-YR	- microcistina YR
MCPP	- herbicida mecoprope (ácido (RS)-2-(4-cloro-2-metifenoxi) propanóico)
MRC	- material de referência certificado
MRM	- monitorização simultânea de reações (do Inglês, Multiple Reaction Monitoring)
MS	- espetrometria de massa (do Inglês, Mass Spectrometry)
MS/MS	- espetrometria de massa acoplada em série (do Inglês, tandem MS)
Mw	- massa molar (g mol^{-1}), do Inglês Molecular Weight
NP	- norma Portuguesa
RELACRE	- Associação de Laboratórios Acreditados de Portugal
SIM	- monitorização de um único ião (do Inglês, Single Ion Monitoring)
SPE	- Extração em fase sólida (do Inglês, Solid Phase Extraction)
UPLC	- cromatografia líquida de desempenho ultra-elevado (do Inglês, Ultra-Performance Liquid Chromatography)

Conteúdo

1	Introdução	1
1.1	Qualidade	1
1.2	Qualidade da Água	2
1.2.1	Microcistinas	3
1.2.2	Pesticidas	4
1.3	CESAB - Centro de Serviços do Ambiente	4
2	Fundamentação	6
2.1	Métodos analíticos implementados	6
2.2	Microcistinas	7
2.2.1	Estrutura química	7
2.2.2	Toxicidade	8
2.2.3	Estabilidade	9
2.3	Pesticidas	9
2.3.1	Mecoprope	9
2.3.2	Desisopropilatrazina	10
2.4	Metodologia Analítica	10
2.4.1	Extração em fase sólida	10
2.4.2	Cromatografia líquida de ultra eficiência	11
2.4.3	Espetrometria de massa	12
2.5	Estatística no Tratamento de Dados	15
2.6	Validação de um Método Analítico	17
2.6.1	Identificação do analito	17
2.6.2	Especificidade e Seletividade	17
2.6.3	Gama de Trabalho	17
2.6.4	Linearidade	18
2.6.5	Sensibilidade	18
2.6.6	Limiares Analíticos	18
2.6.7	Precisão	19
2.6.8	Exatidão	19
2.6.9	Coerência	20
3	Procedimentos	21
3.1	Materiais	21
3.2	Reagentes	21
3.2.1	Padrões primários	22
3.3	Soluções	22

3.3.1	Pesticidas	22
3.3.2	Preparação de Soluções	23
3.3.2.1	Solução tampão de Acetato de Amónio (5 mM)	23
3.3.2.2	Fase móvel A - Acetato de Amónio/Metanol [90/10 (v/v)]	23
3.3.2.3	Fase móvel B - Acetato de Amónio/Metanol [10/90 (v/v)]	23
3.3.2.4	Padrão individual de pesticidas de stock	23
3.3.2.5	Soluções padrão individuais dos pesticidas - calibração (200 mg/L)	23
3.3.2.6	Soluções padrão individuais dos pesticidas - controlo (200 mg/L)	23
3.3.2.7	Soluções padrão intermédias de pesticidas - calibração (2 mg/L)	23
3.3.2.8	Soluções padrão intermédias de pesticidas - controlo (2 mg/L)	23
3.3.2.9	Soluções padrão para calibração (14 – 74 µg/L)	24
3.3.2.10	Solução padrão para fortificação - pesticidas (50 µg/L)	24
3.3.2.11	Amostras/Matrizes fortificadas	24
3.3.2.12	Preparação das amostras/matrizes fortificadas	24
3.3.3	Microcistinas	24
3.3.4	Preparação de Soluções	24
3.3.4.1	Fase móvel A - 0,1% de ácido fórmico em água	24
3.3.4.2	Fase móvel B - 0,1% de ácido fórmico em metanol	25
3.3.4.3	Soluções padrão de microcistinas de stock (10 mg/L)	25
3.3.4.4	Solução padrão de microcistinas intermédia - calibração (500 µg/L)	25
3.3.4.5	Solução padrão de microcistinas intermédia - controlo/fortificação	25
3.3.4.6	Soluções padrão de microcistinas para a calibração (40 – 160 µg/L)	25
3.3.4.7	Amostras/matrizes fortificadas	25
3.3.4.8	Preparação das amostras/matrizes fortificadas	25
3.4	Equipamentos	26
3.5	Métodos	26
3.5.1	Otimização de Condições - UPLC-MS/MS	26
3.5.1.1	Condições cromatográficas	27
3.5.1.2	Condições do detetor de massas - triplo quadrupolo	27
3.5.2	Otimização de Condições - Extração em fase sólida	27
3.6	Tratamento Estatístico de Resultados	28
3.6.1	Estimativa central	28
3.6.2	Estimativa de dispersão	28
3.6.3	Análise de valores discrepantes	28
3.6.4	Análise de Variabilidade	29
3.6.5	Teste de linearidade	29
3.6.6	Verificação de valores discrepantes no modelo de ajuste	30
3.7	Validação	30
3.7.1	Identificação do Analito	31
3.7.2	Especificidade e Seletividade	31
3.7.3	Gama de trabalho	32
3.7.4	Linearidade	32
3.7.4.1	Teste de linearidade	32
3.7.4.2	Coeficiente de determinação	33
3.7.4.3	Teste de Rikilt	34
3.7.4.4	Resposta Relativa	34
3.7.5	Sensibilidade	34

3.7.6	Gama analítica	35
3.7.6.1	Limite de detecção	35
3.7.6.2	Limite de quantificação	35
3.7.7	Precisão	36
3.7.8	Exatidão	37
4	Resultados e Discussão	38
4.1	Otimização de Condições	38
4.1.1	Condições cromatográficas	38
4.1.2	Otimização das condições do detetor de massas	40
4.1.2.1	Otimização da voltagem do cone	40
4.1.2.2	Otimização da energia de colisão	41
4.1.2.3	Resumo das condições otimizadas de MRM	43
4.2	Curvas de calibração	45
4.2.1	Homogeneidade de Variâncias	45
4.2.2	Testes de linearidade	46
4.2.2.1	Escolha do modelo	48
4.2.2.2	Deteção de valores discrepantes na curva de calibração	49
4.2.2.3	Significado estatístico dos parâmetros	53
4.2.2.4	Limites analíticos da calibração	57
4.2.2.5	Sensibilidade	57
4.2.3	Precisão	60
4.2.3.1	Ensaio de repetibilidade em matrizes/amostras fortificadas	60
4.2.3.2	Incerteza na quantificação	61
4.2.4	Exatidão	62
4.2.4.1	Ensaio de recuperação	62
4.2.5	Limite de Quantificação do Método	66
4.2.6	Ensaio Interlaboratorial	67
5	Conclusões	68
A	Tabelas estatísticas	76

Capítulo 1

Introdução

Neste capítulo serão referenciados alguns temas de forma a enquadrar o projeto realizado. Inicialmente será abordado de forma sucinta alguns assuntos mais relevantes relacionados com a qualidade, seguida de algumas generalidades sobre a água e a sua regulamentação. Posteriormente serão caracterizadas de forma geral as microcistinas e os pesticidas. Por último, será referida um breve apresentação da instituição onde este projeto foi realizado.

1.1 Qualidade

A qualidade pode ser entendida como um conjunto de características de um determinado produto ou serviço fornecido aos clientes que conduza à plena satisfação desses mesmos clientes. A razão pela qual se deseja que um determinado serviço tenha uma boa qualidade intrínseca está associado ao objetivo de servir os clientes de forma positiva, e dessa forma, aumentar a chance de se obter mais clientes. No entanto, de forma a melhorar e/ou manter a qualidade de um serviço ou produto, requer na maior parte dos casos um investimento, que pode resultar no aumento de custos. A qualidade também pode ser vista como característica de um produto ou serviço em que não existem deficiências provenientes de quaisquer naturezas [1].

De uma forma genérica e universalmente reconhecida, existem três processos associados à gestão da qualidade, nomeadamente planeamento da qualidade, controlo da qualidade e melhoria da qualidade. O planeamento da qualidade, como o nome indica, traduz-se na esquematização de todo o processo da qualidade de forma estabelecer alguns conceitos base como identificar os clientes e suas necessidades, estabelecer as metas envolvidas para o processo de qualidade em questão, desenvolver produtos que possam dar resposta às necessidades dos clientes, entre outros. Relativamente ao passo do controlo da qualidade, este tem como objetivo avaliar o respetivo desempenho dos processos/métodos implementados e, mediante as metas anteriormente estabelecidas, aplicar alterações no processo de forma a que estas sejam cumpridas na totalidade. Por último, a melhoria da qualidade é estabelecida de forma a desenvolver projetos e estratégias adequadas que possam ser usadas no controlo de qualidade de forma a incrementar a qualidade de um produto e/ou serviço desejado [1]. Na figura 1.1 pode ser visualizada de forma esquemática os três processos anteriormente referidos.

Uma garantia internacionalmente reconhecida que demonstra que uma determinada instituição oferece produtos e/ou serviços de qualidade baseia-se na acreditação. A acreditação, segundo o Instituto Português da Acreditação (IPAC), “consiste na avaliação e reconhecimento da competência técnica de entidades para efetuar atividades específicas de avaliação de conformidade”. Desta forma, a acreditação tem como consequência natural a transmissão de confiança aos clientes que usufruem dessas mesmas atividades. No entanto, para que uma entidade consiga acreditar os seus métodos, essa mesma entidade precisa de implementar um sistema de gestão da qualidade. Este sistema de gestão obriga à entidade a recrutar recursos humanos qualificados,

Planeamento da Qualidade	Controlo da Qualidade	Melhoria da Qualidade
Estabelecer metas para a qualidade	Avaliar desempenho atual	Demonstrar a necessidade de uma melhoria
Identificar os clientes	Comparar desempenho atual com as metas da qualidade estabelecidas	Estabelecer um novo projeto que visa contribuir com a melhoria em questão
Determinar as necessidades dos clientes		
Desenvolver produtos e/ou serviços adequados às necessidades dos clientes	Atuar nas diferenças achadas	Implementar novo método desenvolvido no controlo de qualidade
Estabelecer controlos que averiguem o cumprimento das metas da qualidade sobre condições de funcionamento		

Figura 1.1: Os três processos universais de gestão da qualidade, adaptado de [1].

a possuir equipamentos verificados e/ou calibrados, a realizar auditorias e a criar um plano de formação e qualificação contínuos, tratando-se de um conjunto de pré-requisitos que exigem esforços das mais variadas naturezas. A norma de referência para a acreditação de laboratórios de ensaios é a NP EN ISO/IEC 17025, estando nesta definidos os requisitos a cumprir pela entidade de forma a que possa ser acreditada com sucesso [2].

1.2 Qualidade da Água

A água é um dos compostos chave para a vida, em que a partir desta surgiram as condições necessárias para o nascimento e respetiva evolução dos primeiros organismos vivos [3]. Este composto representa cerca de 70% do peso da maioria dos seres vivos conhecidos e ocupa no planeta Terra um volume de aproximadamente 1386 milhões de quilómetros cúbicos (no estado líquido). Sendo um dos recursos cada vez mais escasso e valioso, a água destinada para consumo humano é um dos fatores que mais influencia o desenvolvimento económico e social de vários países e comunidades. Por diversos motivos a sua disponibilidade encontra-se em decadência e, portanto, surge a necessidade de um uso racional e sustentável de forma a garantir um melhor aproveitamento deste recurso [4].

Podendo ser usada em inúmeras aplicações, tanto as características como a composição da água devem ser controladas de modo a torná-la viável para o fim a que se destina. Desta forma, a água adquire diferentes denominações devido à matriz pela qual é constituída e/ou pela sua futura aplicação. Exemplos disso são águas doces naturais, que se podem dividir em águas subterrâneas, superficiais, entre outras. Outro subtipo, sendo este dos mais importantes a nível global, trata-se da água de consumo humano, que é fortemente legislada e controlada devido aos riscos associados que podem resultar do consumo de água imprópria na dieta

normal de uma pessoa [5].

Para que uma água seja considerada potável, esta tem de cumprir critérios rigorosos estabelecidos pela legislação portuguesa. Esses critérios encontram-se retratados nos decretos lei nº 306/2007 de 27 de Agosto e, posteriormente, nº 152/2017 de 7 de Dezembro. A entidade responsável nomeada pela legislação para coordenar e fiscalizar a aplicação dos decretos-lei é a (ERSAR). Esta última elaborou também um documento de forma a consolidar os decretos lei anteriormente citados, nomeado “Regime legal do controlo da qualidade da água para consumo humano”. O controlo da qualidade da água é efetuado pela análise de parâmetros de natureza química, microbiológica e radiológica, existindo algumas normas ISO (normas provenientes da *International Organization of Standardization*) como suporte a todo o processo de controlo de qualidade da mesma [6]

1.2.1 Microcistinas

As microcistinas (MC's) pertencem a um grupo de cianotoxinas resultantes do metabolismo de algumas espécies de cianobactérias, cuja produção e libertação dos respetivos metabolitos para o ambiente ocorre principalmente durante a fase de afloramento de culturas. Em ambientes aquáticos eutrofizados¹, ambientes onde ocorre um crescimento excessivo de planas aquáticas devido a vários fatores, como águas doces naturais, a proliferação das culturas é amplificada, induzindo tanto um crescimento de cianobactérias como uma produção de MC's máximos [7–9].

A produção de MC's depende de diversos fatores, sendo assegurada por algumas espécies de cianobactérias, tais como *Anabaena* e *Microcystis* [10]. Uma das formas conhecidas para estimar aproximadamente a quantidade de MC's no meio baseia-se na quantificação de clorofila presente nesse mesmo meio. Cerca de 80% das MC's produzidas armazena-se no meio intracelular, enquanto que a libertação dos restantes 20% ocorre maioritariamente entre o início da fase estacionária² do ciclo celular até à morte da célula [11]. A concentração de MC's no meio exterior depende de diversos fatores tais como a degradação (associadas à temperatura e pH, por interação com a luz e de origem biológica) e adsorção das mesmas em partículas presentes no meio [12–16]. Existindo mais de 100 congéneres moleculares, as variantes mais conhecidas são as MC-LR, MC-YR e MC-RR, sendo a MC-LR a que apresenta uma maior toxicidade e foi a mais comum em Portugal no ano de 1996 [17–19].

Tendo já sido retratados diversos casos, quer de intoxicações tanto em pessoas como em animais, quer da presença de MC's em diversos reservatórios de água, surgiu a necessidade de estabelecer valor limite para a quantidade de MC's presentes nas águas para consumo humano [20–27]. A MC-LR trata-se da única variante que se encontra ao abrigo da legislação, cujo valor máximo permitido é de 1 µg/L nas águas de consumo humano, segundo a legislação portuguesa e a Organização Mundial de Saúde (OMS) [6, 28, 29].

A toxicidade das MC's varia entre os diversos congéneres, tendo como principais consequências problemas hepáticos e risco de desenvolvimento de tumores [8, 9, 30]. Acredita-se que a produção de MC's, tratando-se de metabolitos secundários e tendo sido mantida ao longo da evolução genética das culturas, traga benefícios às cianobactérias produtoras, cujas razões especuladas se baseiam: na defesa das cianobactérias de servirem de alimento a predadores naturais; nas propriedades das MC's como agentes surfactantes e herbicidas; na capacidade de promoção de relações simbióticas; numa possível resposta a processos de diferenciação intra

¹eutrofização consiste na proliferação excessiva de algas devido a um aumento irregular de quantidade de nutrientes no ecossistema

²considerada como uma das fases de crescimento de algas, a fase estacionária é caracterizada por ausência de crescimento. Esta fase antecede a fase de morte.

e extracelular; na possibilidade de substituir outros compostos para desempenhar funções; na aquisição e acumulação de metais, entre outras [8, 31].

1.2.2 Pesticidas

Nos dias de hoje, a fome ainda é uma realidade para algumas populações. Com a agravante de que a população mundial está em crescimento constante, é necessário otimizar e reformular os meios com os quais é possível obter alimentos para fazer face a este problema. A agricultura é uma das formas bem conhecida de produzir alimentos. Associados a problema naturezas diversas, o rendimento da prática desta atividade pode diminuir cerca de 35% [32].

De forma a contrariar a perda de rendimento, foram criados compostos denominados de pesticidas, que se encontram em desenvolvimento contínuo. Pesticidas são substâncias que tem como objetivo destruir, repelir ou mitigar pragas indesejadas. Mediante o fim prático a que se destinam, estes compostos adquirem diferentes denominações, nomeadamente inseticida para combater pragas de insetos, herbicidas para combater o crescimento de plantas indesejadas, entre outros [32].

Segundo os decretos-lei 306/2007 de 27 de Agosto e 152/2017 de 7 de Dezembro, existem várias tipos de pesticidas, nomeadamente inseticidas, herbicidas, fungicidas, nematocidas, acaricidas, algicidas, rodenticidas, controladores de secreções viscosas e produtos afins (nomeadamente reguladores de crescimento), seus metabolitos, produtos de degradação e reações importantes.

De forma a garantir a qualidade da água potável, os decretos-lei anteriormente citados estipulam que a concentração máxima de um pesticida presente em água de consumo humano seja 0,10 µg/l e, no caso de haver mais que um pesticida detetável e quantificável, a concentração total máxima admitida de todos os pesticidas é 0,50 µg/L. Assim como acontece com outros contaminantes, se o teor de pesticidas ultrapassar a quantidade limite estabelecida pela legislação, será necessário implementar procedimentos de forma a corrigir esta irregularidade. Hoje em dia, existem várias técnicas usadas na remoção de pesticidas nas águas, em que a mais eficaz baseia-se na utilização de carvão ativado acoplado com ozonólise [33].

Devido ao risco de uma possível contaminação de pesticidas nos solos e águas de qualquer natureza, por exemplo, devido à utilização indevida de pesticidas, existe a necessidade de vigiar e controlar a presença de pesticidas nesses mesmos territórios. Desta forma surgiu por necessidade a implementação de uma lista de pesticidas a analisar pelas diferentes zonas de Portugal, lista essa elaborada pela Direção-Geral de Alimentação e Veterinária. Esta lista é atualizada de três em três anos e tem como propósito indicar os pesticidas a pesquisar, consoante a localização da origem da água e culturas regionais. Com isto, pretende-se que o controlo da qualidade da água seja cumprido segundo os decretos-lei proferidos e que o risco de consumo de água imprópria seja minimizado [34].

Mediante a lista referida, pretende-se elaborar uma metodologia analítica que permita a deteção e quantificação de dois pesticidas presentes nessa mesma lista. Os pesticidas referidos serão o mecoprope e a desisopropilatrizona.

1.3 CESAB - Centro de Serviços do Ambiente

Criado no ano de 1992, o CESAB – Centro de Serviços do Ambiente é uma entidade que visa promover ações de proteção ambiental, apoiando a exploração de sistemas de saneamento básico, o controlo de qualidade

de vários tipos de água e a investigação científica e tecnológica na área dos tratamentos de águas.

Tratando-se de uma associação sem fins lucrativos de direito privado, o CESAB tem como objetivos principais fiscalizar obras de saneamento básico, apoiar atividades de investigação aplicadas no controlo de águas de forma a responder às necessidades dos clientes, apoiar as Entidades Gestoras no controlo e análise de águas dos sistemas de abastecimento público, entre outros.

Desde Outubro de 2002, o CESAB encontra-se acreditado pelo IPAC segundo a norma NP EN ISO 17025 com o certificado de acreditação número L0297, tendo cerca de 200 ensaios acreditados em vários tipos de água, solos, lamas, sedimentos e resíduos sólidos. O CESAB, pelo histórico de bons desempenhos em ensaios interlaboratoriais (como forma de avaliação externa de exatidão dos resultados obtidos pelo laboratório), tem sido convidado a pertencer à Comissão Consultiva da RELACRE (Associação de Laboratórios Acreditados de Portugal), constituída para dar apoio técnico na realização destes exercícios.

Capítulo 2

Fundamentação

Neste capítulo, inicialmente, serão referidos os métodos analíticos que se encontram retratados na literatura. Depois é explicada, com mais pormenor, alguns aspetos sobre o desenvolvimento do método analítico no CESAB. Seguidamente serão abordados os aspetos químicos das microcistinas e dos pesticidas em estudo. Serão também referidas as características da instrumentação usada e dos procedimentos usados no tratamento de amostras. Por último, serão abordadas as bases estatísticas e os procedimentos para a validação de métodos analíticos, que serão ambos usados no tratamento e interpretação dos dados experimentais deste projeto.

2.1 Métodos analíticos implementados

Relativamente aos pesticidas, são várias as matrizes analisadas na literatura. Exemplos delas são as frutas, vegetais, águas subterrâneas, águas de consumo humano, entre outras [35–37]. Sobre as microcistinas, existem várias metodologias retratadas na literatura para a sua deteção e quantificação em algumas matrizes, nomeadamente águas para consumo humano, águas naturais doces superficiais, águas naturais salinas, entre outros [38–45].

As metodologias implementadas para a análise de pesticidas são realizadas em grande parte dos casos com recurso a técnicas cromatográficas, líquida e/ou gasosa, podendo estar acompanhada com um passo de pré-concentração tais como extração líquido-líquido ou em fase sólida [35, 36, 46].

Parte das metodologias publicadas para as microcistinas dividem-se na preferência das técnicas analíticas a usar, surgindo maioritariamente duas vias alternativas. Uma das escolhas baseia-se na utilização de ensaios de imunoabsorção analítica, denominada por ELISA (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*), técnica analítica que, através de interações antigénio-anticorpo, permite identificar o analito de forma seletiva [38, 47, 48]. A outra opção caracteriza-se pelo uso de técnicas de separação analítica por cromatografia, nomeadamente cromatografia líquida, na qual, através da afinidade química entre o analito presente numa matriz e as fases móvel (líquida) e estacionária, permite uma separação qualitativa e posterior quantificação do analito em causa [39–44, 49]. Tanto a técnica ELISA como a cromatografia líquida fazem-se acompanhar de vantagens e desvantagens paralelas ao seu uso. A técnica que recorre aos ensaios de imunoabsorção tem como vantagens apresentar uma boa seletividade, pois permite a escolha de um anticorpo que apresente seletividade para um composto específico. Acerca das desvantagens, esta técnica apresenta dificuldades na discriminação e identificação de variantes moleculares distintas [41].

Relativamente ao recurso de separação analítica por cromatografia líquida, trata-se de uma técnica dispendiosa e cuja capacidade de identificar distintos congêneros moleculares depende dos padrões analíticos

disponíveis no mercado [41]. Mediante os vários modelos dos aparelhos utilizados na cromatografia líquida, tanto aquele que recorre à alta e ultra pressão (HPLC e UPLC), respetivamente, encontram-se na literatura [39–43, 50–53]. De forma genérica, o segundo modelo possui uma maior velocidade de análise e melhor resolução e sensibilidade comparativamente com o primeiro modelo, devido a vários fatores como diferentes valores de pressão a que as colunas em cada modelo são submetidas, dimensões das partículas presentes no interior das colunas cromatográficas, entre outros [54].

2.2 Microcistinas

Como já foi referido anteriormente, as microcistinas são compostos perigosos para a saúde pública caso consigam entrar nos organismos. Desta forma, torna-se relevante conhecermos a sua natureza química e suas características, encontrando-se abaixo referenciadas algumas delas.

2.2.1 Estrutura química

As microcistinas são heptapéptidos inseridas na família de compostos considerados como hepatotóxicos. Na figura 2.1 pode ser visualizada a estrutura genérica cíclica mais comum das MC's, sendo possível identificar cada fragmento molecular a partir das delimitações feitas com retas a tracejado. As variantes moleculares distinguem-se principalmente, no caso das MC's, através dos aminoácidos presentes nas posições 2 e 4 juntamente com o número de metilações ocorridas nos aminoácidos situados nas posições 3 e/ou 7. Genericamente, a estrutura de uma MC possui uma D-Alanina na posição 1, uma D-Metil asparagina (ácido D-eritro- β -metilaspártico) na posição 3; uma Adda na posição 5, um D-Glutamato (ácido D-isoglutâmico) na posição 6 e uma Mdha na posição 7 [29]. O fragmento Adda presente trata-se de um aminoácido natural incomum cuja presença é característica nas microcistinas, denominado de ácido 3-amino-9-metoxi-2,6,8-trimetil-10-fenildeca-4E, 6E-dienóico, enquanto que o aminoácido Mdha baseia-se na N-metil-desidroalanina. Na tabela 2.1 é feita a referência aos substituintes nas posições 2 e 4 da estrutura da microcistina e respetiva denominação da variante molecular.

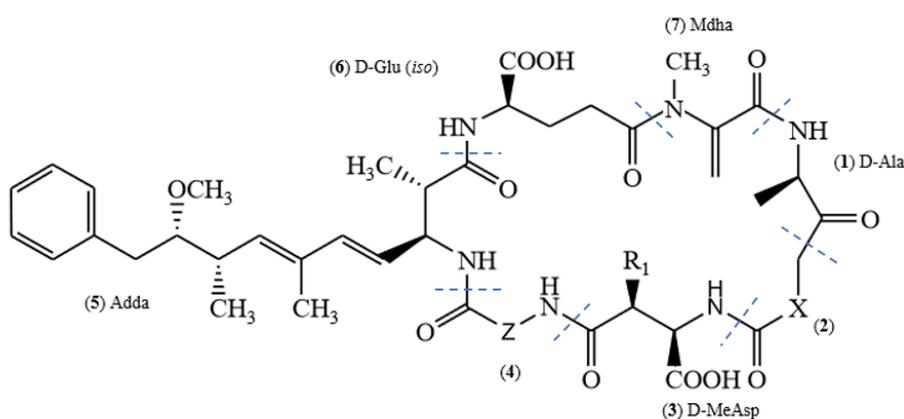


Figura 2.1: Esquema genérico da estrutura molecular de uma microcistina cíclica. Cada fragmento molecular, numerado de 1 a 7, encontra-se delimitado com retas a tracejado. Todos os fragmentos são aminoácidos ou seus derivados, nomeadamente: **(1)** D-Alanina; **(3)** ácido D-eritro--metilaspártico (D-Metil asparagina); **(5)** ácido 3-amino-9-metoxi-2,6,8-trimetil-10-fenildeca-4E,6E-dienóico (Adda); **(6)** ácido D-isoglutâmico (D-Glutamato); **(7)** N-metil-desidroalanina (Mdha). Os aminoácidos a ocupar as posições **(2)** e **(4)** determinam o congénere molecular. Adaptado de [29].

Tabela 2.1: Classificação das microcistinas de acordo com os aminoácidos inseridos nas posições X (2) e Z (4) da figura (2.1).

	X	Z	Codificação
Microcistina - LR	Leucina	Arginina	MC-LR
Microcistina - RR	Arginina	Arginina	MC-RR
Microcistina - YR	Tirosina	Arginina	MC-YR

2.2.2 Toxicidade

A toxicidade das MC's varia dentro dos diversos congêneres moleculares, cujas doses letais (LD_{50})¹ das variantes MC-LR, MC-RR e MC-YR são 43.0, 235.4 e 110.6 $\mu g/kg$, respetivamente [9, 18, 30]. Após vários estudos efetuados, determinou-se que a toxicidade das microcistinas depende de alguns fatores tais como: possuir uma estrutura cíclica; desimpedimento estérico do ácido carboxílico presente no ácido glutâmico; existência de um aminoácido apolar ligado ao grupo γ -carboxílico do ácido glutâmico e a molécula Adda existente na estrutura possua isomeria *trans*² [55].

A absorção dos compostos hepatotóxicos pelo organismos e posterior intoxicação pode ocorrer por inalação, ingestão e de forma intravenosa, entre outras formas. Apesar de serem compostos considerados como promotores de tumores/carcinogénicos, o seu efeito nefasto nos seres vivos ocorre primeiramente a nível hepático [30]. As MC's, através do mecanismo de transporte dos sais biliares, são mobilizadas até ao fígado, onde ocorre a inibição das fosfatases do tipo 1 e 2A nas células hepáticas. Essa inibição pode levar, como consequência final, à perda cromossómica, podendo dela resultar entre apoptoses indevidas, necroses e, por último, à carcinogénese [9, 28]. Na figura 2.2 pode ser visualizada um esquema simplificado dos possíveis mecanismos da genotoxicidade induzida pela microcistina-LR.

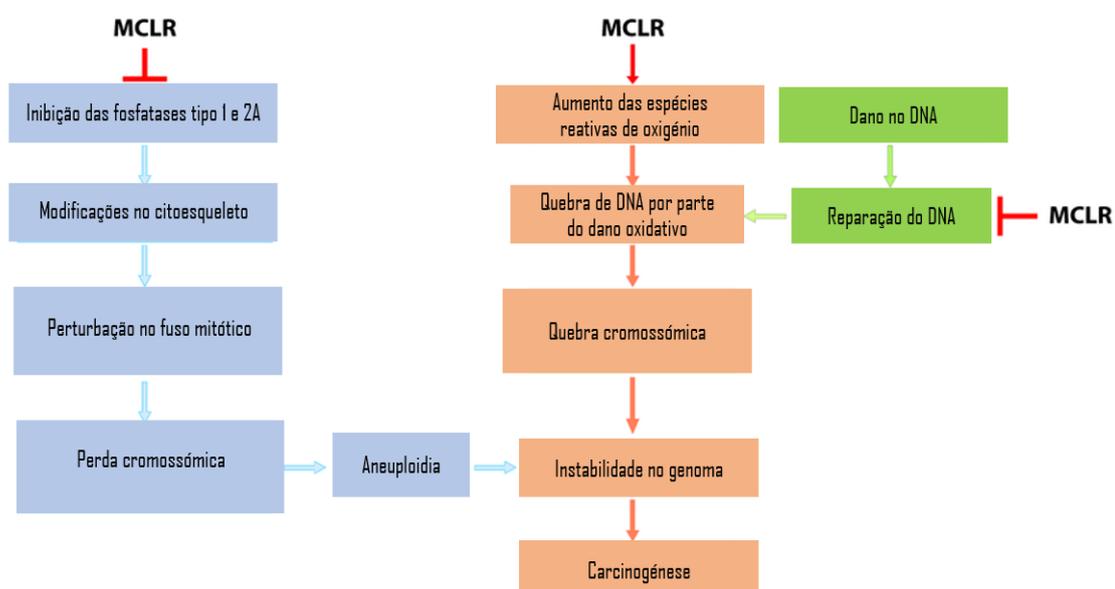


Figura 2.2: Proposta mecanística da genotoxicidade induzida pela microcistina-LR. A microcistina tem a capacidade de inibir as fosfatases do tipo 1 e 2A, assim como interferir com a reparação do DNA. Desta forma, resultam interferências nos cromossomas, comprometendo a informação genética do indivíduo. As alterações no genoma induzidas desta forma podem resultar, no pior dos cenários, no processo de carcinogénese. Adaptado de [56].

¹ LD_{50} corresponde à concentração necessária para matar 50% dos indivíduos de uma determinada população

²Este tipo de isomeria caracteriza-se pelo posicionamento transversal de grupos substituintes em relação à ligação dupla situada nos carbonos adjacentes.

2.2.3 Estabilidade

A estabilidade das MC's, como a de qualquer composto, depende das condições do meio onde estão inseridas. Vários estudos retrataram a estabilidade das MC's, nomeadamente da MC-LR, mediante vários fatores tais como pH, temperatura, irradiação de luz, presença de bactérias e cloro [12, 13, 57–59].

Relativamente ao pH e à temperatura, alguns estudos encontram-se na literatura. Foi verificado que, a um pH de 1 e 9 respetivamente associado a uma temperatura de 40 e 21-30 °C, as microcistinas podem degradar-se. A degradação, neste caso, é desencadeada pela hidrólise do Mdha, resultando na formação de vários péptidos lineares [12].

Quando as MC's são irradiadas por radiação eletromagnética de alta energia, como radiação ultra-violeta proveniente do Sol, ocorre degradação com a possibilidade de formação de isómeros, em que alguns desses isómeros são provenientes do fragmento Adda. Para que a degradação ocorra de uma maneira mais eficaz com apenas com recurso ao uso da luz solar, a presença de pigmentos contidos nas cianobactérias no meio é um requisito [13, 57].

A degradação bacteriológica das MC's também é possível, verificando-se alterações tanto no fragmento Adda como na estrutura cíclica da microcistina [60]. Os produtos resultantes da decomposição apresentam uma toxicidade inferior que a estrutura original da microcistina [16].

O processo de cloração das MC's via hipoclorito de sódio também pode ser uma alternativa, visto que nenhum dos diversos produtos formados resultantes do processo apresenta efeitos prejudiciais nos organismos [58].

2.3 Pesticidas

Como foi dito anteriormente, os pesticidas em estudo são o mecoprope e a desetilsimazina. Desta forma, abaixo estão descritos esses mesmos pesticidas e algumas das suas características.

2.3.1 Mecoprope

O ácido (RS)-2-(4-cloro-2-metifenoxi) propanóico, também designado por mecoprope (MCP), pode ser visualizado na figura 2.3. Trata-se de um herbicida usado no Inverno e na Primavera, de forma a controlar o crescimento de ervas daninhas no cultivo de cereais. Trata-se de um composto quiral em que apenas o enantiómero R, denominado de mecoprope-p, tem sido alvo de estudos de toxicidade aguda enquanto que a mistura racémica é usada para estudos toxicológicos a longo prazo. Ambos enantiómeros apresentam toxicidade, no entanto, os efeitos nefastos da mistura racémica foram demonstrados equivalentes aos do enantiómero R em estudos de doses repetitivas [61]. Tanto o enantiómero R como o S podem ser observados na figura acima mencionada.

No caso de ingestão, este composto tem tendência a passar para a via sistémica (sangue), indo progressivamente depositar-se na tiroide e nos rins. Já foram registadas mortes em pessoas adultas que tenham ingerido uma quantidade superior ou igual a 6,5 gramas. Em condições aeróbias, ambos enantiómeros podem ser degradados por algumas espécies de microorganismos [63, 64]. Existem várias metodologias descritas para a sua quantificação, nomeadamente por cromatografia líquida e gasosa [65–67].

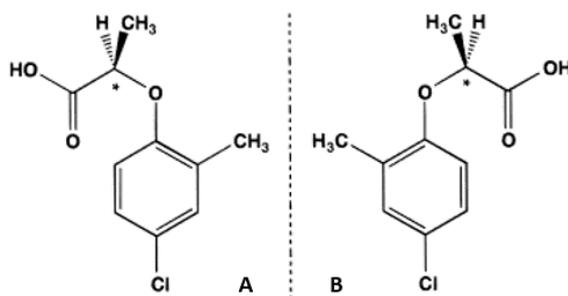


Figura 2.3: Estrutura química dos enantiômeros do mecoprope, onde o composto identificado com a letra A representa o enantiômero R e com a letra B o enantiômero S. O carbono quiral encontra-se sinalizado com o asterisco (*), adaptado de [62].

2.3.2 Desisopropilatrazina

A desisopropilatrazina ou desetilsimazina (DIA) pode ser visualizada na figura 2.4. Este composto é um derivado da triazina, usado no controle de ervas indesejadas em plantações de trigo. A formação deste composto resulta de processos de decomposição da simazina e da atrazina, sendo o metabolito produzido em maior quantidade aquando da degradação da simazina [68, 69]. A DIA pode ser encontrada em água subterrâneas em que, simultaneamente, a presença de simazina e/ou a atrazina não se verifique [69].

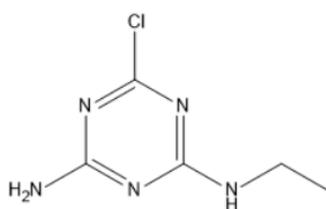


Figura 2.4: Estrutura molecular da desisopropilatrazina.

Quando ingerido por ratos, tem a capacidade de aumentar o crescimento da próstata e de inibir a produção de testosterona, causando interferências a nível hormonal [70, 71]. A DIA apresenta uma toxicidade semelhante à atrazina [69, 72]. Na literatura encontram-se descritos métodos que recorrem a cromatografia, tanto líquida como gasosa, para a sua quantificação [73–75].

2.4 Metodologia Analítica

Neste projeto foram utilizadas como técnicas analíticas a extração em fase sólida e a cromatografia, portanto ambos métodos e seus princípios de funcionamento serão referidos de forma sucinta.

2.4.1 Extração em fase sólida

Quando se pretende analisar uma amostra, por vezes, é preciso sujeitá-la a diversos tipos de tratamento de forma a analisá-la da forma mais correta possível e, se possível, sem interferências. Uma forma de preparação é a extração em fase sólida, que tem como objetivo isolar e concentrar o analito de interesse de uma amostra e, desta forma, minimizar eventuais interferências. Os analitos são isolados com o auxílio de um polímero específico ou por um pequeno volume de fase estacionária cromatográfica. Tratando-se de uma técnica de

separação líquido-sólido, o princípio da técnica reside nas interações químicas entre o enchimento sólido e o analito de interesse, sendo semelhante à técnica de cromatografia. A forma mais usual de efetuar uma extração de fase sólida consiste na utilização de cartuchos, onde se pode verificar esquematicamente na figura (2.5) a sucessão de passos que engloba todo o processo.

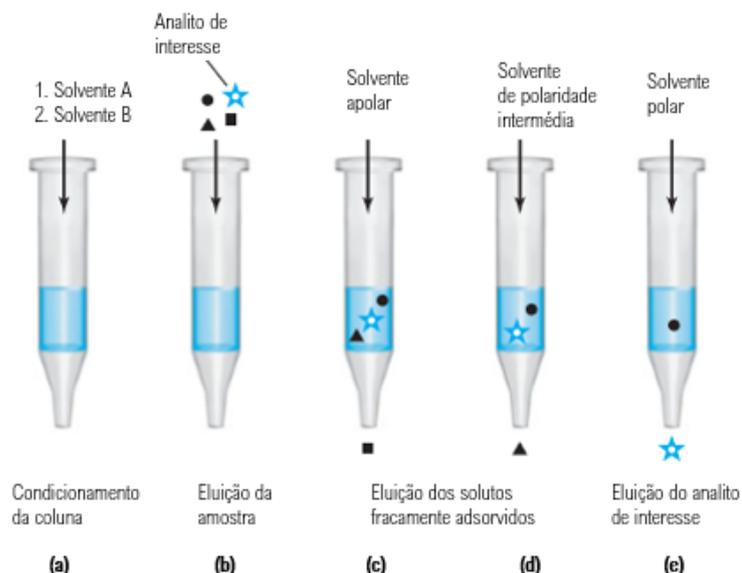


Figura 2.5: Diagrama esquemático do processamento padrão na separação de frações por extração em fase sólida: (a) acondicionamento inicial da coluna, (b) aplicação da amostra, (c) remoção de alguns contaminantes por lavagem com solvente, (d) remoção de alguns contaminantes mais fortemente retidos com solventes de polaridade intermédia e (e) eluição do analito de interesse, adaptado de [49].

Inicialmente, passa-se um solvente pelo cartucho de forma a remover impurezas e solvatar a fase estacionária, para que este último possa interagir com a amostra. Seguidamente faz-se passar a amostra pelo cartucho de forma a que o analito de interesse fique retido no enchimento sólido. Após a adsorção do analito de interesse juntamente com outros compostos, utilizam-se vários solventes com diferentes polaridades, aplicados no cartucho por crescente ou decrescente de polaridade, de forma a remover os compostos interferentes da amostra e conseguir o analito de interesse isolado destes [49, 76].

2.4.2 Cromatografia líquida de ultra eficiência

A cromatografia é uma técnica reconhecida que permite a separação de diversos analitos presentes numa matriz complexa, sendo bastante usada não só para a purificação como também para a análise quantitativa dos mesmos.

Neste tipo de cromatografia são necessárias uma fase móvel líquida (eluente) e uma fase estacionária fixa, geralmente uma fase líquida imobilizada numa coluna, denominada coluna cromatográfica.

A separação de compostos é efetuada através da interação entre o(s) analito(s) de interesse e as fases móvel e estacionária. Após a otimização prévia de condições, o funcionamento da técnica passa pela injeção da amostra, sendo esta arrastada juntamente com um fluxo estabelecido de fase móvel, por um percurso que atravesse a fase estacionária (coluna cromatográfica) e que alcance o detetor. Devido às propriedades químicas dos vários analitos, estes apresentam naturalmente diferentes afinidades para com as fases móvel e estacionária. Desta forma, quanto maior for a afinidade dos analitos para com a fase estacionária, maior será

a sua retenção na fase estacionária. Assim, a sua eluição será mais demorada e, conseqüentemente, maior será o tempo necessário para que o analito alcance o detetor.

Para que a separação ocorra, é necessário que as polaridades entre a fase móvel e estacionária sejam diferentes. Desta forma, denomina-se por cromatografia de fase normal quando a fase estacionária apresenta uma maior polaridade relativamente à fase móvel. Quando a fase estacionária apresenta uma polaridade menor em comparação com a fase móvel, designa-se por cromatografia de fase reversa. Um outro aspeto que pode auxiliar a separação cromatográfica baseia-se na composição da fase móvel ao longo do tempo de análise. Quando a composição da fase móvel mantém-se constante ao longo do tempo de análise, designa-se por eluição isocrática. No entanto, quando é necessário a alteração da composição da fase móvel no decurso da análise, a eluição é denominada de eluição gradiente. Esta última pode auxiliar a separação de analitos com polaridades semelhantes ou diferentes.

Um dos parâmetros que tem utilidade na identificação de um analito é o seu tempo de retenção, tempo esse compreendido entre o momento aquando da injeção do analito até este alcançar o detetor. Os tempos de retenção, por norma, são maiores na técnica HPLC relativamente ao UPLC (*Ultra pressure liquid chromatography*, UPLC). Em ambas as técnicas, a sua composição é constituída geralmente por um sistema binário de solventes, bomba, um sistema de injeção de amostra, coluna cromatográfica e detetor.

O sistema binário de solventes é responsável pela variação de composição da fase móvel. O sistema de injeção permite injetar a amostra num curto intervalo de tempo, aplicando um fluxo constante de fase móvel durante todo o tempo de análise. Tanto a temperatura do injetor automático como o volume de amostra a injetar são variáveis, no entanto, é desejável que o volume de amostra injetado seja reduzido. A utilização de um volume reduzido, na ordem dos microlitros, permite uma correta resolução de analitos. Sobre as colunas cromatográficas, estas por norma, têm um diâmetro interno compreendido entre 1 mm e 2,1 mm, associadas a partículas com dimensão inferior ou igual a 2 µm. Estas dimensões permitem, entre outros, minimizar o efeito do aquecimento da coluna aquando da corrida cromatográfica, devido à pressão a que a coluna é sujeita devido à passagem da fase móvel.

Relativamente ao detetor, existem vários que podem ser usados na cromatografia líquida, como o detetor por fluorescência, de índice de refração, por espectrometria de massa, entre outros [49]. Por opção de disponibilidade, o detetor por MS/MS, ou *tandem* MS, foi o escolhido. Sendo a cromatografia líquida de ultra pressão uma técnica que recorre a altas pressões, enquanto que a espectrometria de massa trabalha com pressões bastante reduzidas, o uso da técnica de electrospray como interface torna-se necessária. Esta técnica permite a vaporização da fase líquida que contém o analito, após o tempo de eluição dos compostos com o auxílio de um fluxo de azoto. O campo elétrico criado entre o capilar metálico que contém a fase líquida e a entrada para o espetrometro de massa são também um requisito. Na figura 2.6 pode ser visualizado esquematicamente a técnica de electrospray e o modo como esta vaporiza a amostra e permite a ionização simultânea do analito.

Com esta técnica é possível formar um aerossol de partículas carregadas, aerossol esse que confere ao analito as características necessárias para ser analisado pela técnica de espectrometria de massa.

2.4.3 Espetrometria de massa

A espectrometria de massa é considerada umas das melhores técnicas de deteção aquando acoplada à cromatografia, devido à sensibilidade oferecida, informação de cariz qualitativo e quantitativo e capacidade de distinguir diferentes compostos com semelhantes tempos de retenção. Esta técnica permite separar os

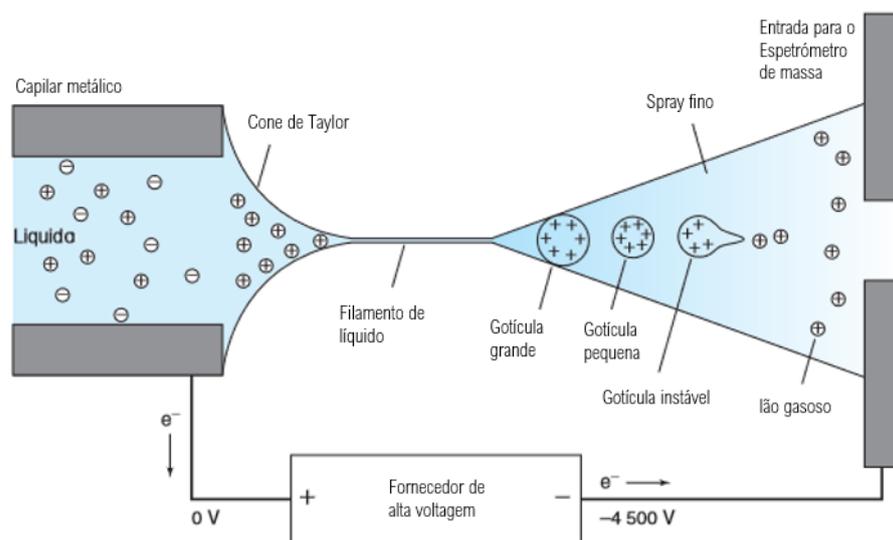


Figura 2.6: Representação esquemática da interface LC-MS dando ênfase à ionização do analito no eletrospray. No final da eluição da fase líquida que contém analitos, com o auxílio de um campo elétrico juntamente com um fluxo gasoso de azoto, ocorre a ionização seguida da vaporização das moléculas presentes. Com a ionização das moléculas, estas formam gotículas de íons carregadas. A acumulação de cargas gera instabilidade dentro da gotícula, pelo que, a gotícula desagrega-se. A desagregação é responsável pela vaporização dos íons, estando estes aptos a serem analisados pelo espectrometro de massas. Este modo de ionização designa-se de ESI⁺ (gera íons "+"). Adaptado de [49].

compostos ionizados mediante a razão massa e a sua respetiva carga (m/z). Desta forma, é possível estudar a massa de átomos, moléculas e fragmentos moleculares provenientes do(s) analito(s) presente(s) numa amostra [49].

Pode também haver a possibilidade de associar dois ou mais espectrómetros de massa em série de forma a melhorar significativamente a seletividade e a relação sinal/ruído. Neste caso, estamos perante a técnica MS/MS. Nesta técnica, é usual recorrer a um espectrómetro de massa de triplo quadrupolo, podendo ser visto na figura 2.7 um exemplar esquemático em funcionamento.

É possível trabalhar de dois modos distintos num quadrupolo, nomeadamente, modos varrimento completo (ou *full scan*) e *SIM* (ou *Single Ion Monitoring*). O modo *full scan* corresponde à procura dos íons precursor ou fragmentos existentes numa gama de razões m/z enquanto que a escolha de íons precursor ou fragmentos de razão m/z específica caracteriza o modo *SIM*. Mediante o compromisso na escolha dos dois modos associados ao primeiro e terceiro quadrupolos, podemos ser realizados diferentes modos de trabalho.

Uma das funcionalidades que usufrui na totalidade deste tipo de técnica é a monitorização de reações seletivas (*Multiple Reaction Monitoring, MRM*). Neste modo, com a utilização de três quadrupolos onde o segundo é denominado por célula de colisão, é possível escolher entre uma gama de massas ou razões m/z específicas no primeiro e no terceiro quadrupolos, de forma a que apenas os compostos com os requisitos pré-definidos alcancem o detetor. Através da aplicação de uma tensão constante e de uma rádio-frequência oscilante, é possível gerar campos elétricos responsáveis por estabelecer trajetórias complexas aos íons, desde a câmara de ionização até ao detetor. Desta forma, é possível adaptar todo o processo de forma a privilegiar a deteção do analito de interesse assim como de fragmentos provenientes desse mesmo analito, através da escolha de determinadas razões m/z . É de salientar que, no primeiro quadrupolo, existe a necessidade de escolher a voltagem de cone associada ao cone extrator de forma a que o composto a analisar apresente um sinal de maior intensidade. No entanto, a deteção de massas no terceiro quadrupolo requer a utilização da

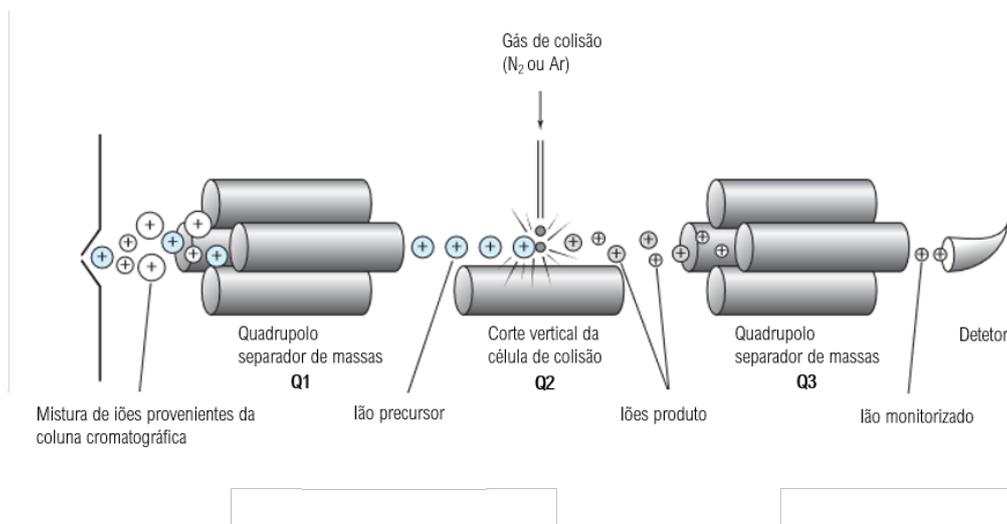


Figura 2.7: Representação esquemática de um espectrômetro de massa acoplado (*tandem MS/MS*). Com a entrada de íons com diferentes razões massa/carga, é possível escolher uma razão específica ou uma gama de razões no primeiro quadrupolo. Com a passagem dos íons pelo primeiro quadrupolo, só alcançam o segundo quadrupolo os que tiverem a razão massa/carga dentro das especificações definidas. No segundo quadrupolo ou célula de colisão, com o auxílio de uma energia de colisão e gás de colisão, é possível fragmentar os íons. Com os vários fragmentos formados no segundo quadrupolo, estes seguem para o terceiro quadrupolo, onde podem ser pré-definidas as razões m/z de interesse. Após o terceiro quadrupolo, os íons e/ou fragmentos de interesse alcançam o detetor. Adaptado de [49].

célula de colisão, célula essa que através de uma voltagem definida e de um fluxo de gás, permite fragmentar os compostos provenientes do primeiro quadrupolo.

Na figura (2.8) é possível visualizar os diferentes modos de funcionamento em MS/MS. Como se pode verificar nesta figura, existem várias formas de extrair informação a partir da fonte de íons, informação essa captada através do compromisso das massas a selecionar tanto no primeiro como no terceiro quadrupolos.

No modo de funcionamento A, denominado por varrimento de íons produto, permite-nos averiguar o conjunto de fragmentos moleculares, dentro de uma gama de razões m/z , provenientes de um único íon precursor (*Daughter scan*). Para que isso ocorra, no primeiro quadrupolo, elege-se uma razão m/z de forma a detetar o íon precursor de interesse. Seguidamente, no segundo quadrupolo ou célula de colisão define-se uma energia de colisão de forma a fragmentar o íon precursor em estudo. Por último, escolhe-se uma gama de razões m/z para o terceiro quadrupolo e, desta forma, conseguimos obter um completo varrimento de fragmentos moleculares inseridos no intervalo de massas/carga anteriormente referido. Este modo pode ser repetido para diferentes íons precursor.

Relativamente ao modo de funcionamento B, este tem como objetivo identificar os íons precursor que são capazes de gerar um fragmento molecular específico. Desta forma, faz-se um varrimento dos íons precursor no primeiro quadrupolo, escolhe-se uma voltagem para a célula de colisão e, no terceiro quadrupolo, escolhe-se uma determinada razão massa/carga que caracteriza o fragmento em estudo.

Sobre o modo de funcionamento C, este caracteriza-se pela análise sincronizada de massas dos analitos relativamente ao primeiro e terceiros quadrupolos, em que a diferença de razões m/z entre os quadrupolos permanece constante. O varrimento de perdas neutras é eficaz quando se pretende avaliar a presença de um analito que tem inserido na sua estrutura moléculas neutras. Com a entrada do analito em estudo para a célula de colisão, este é fragmentado de forma a libertar moléculas da sua estrutura, nomeadamente moléculas neutras. Dessa forma, os fragmentos a procurar no terceiro quadrupolo poderão ser as razões massa/carga

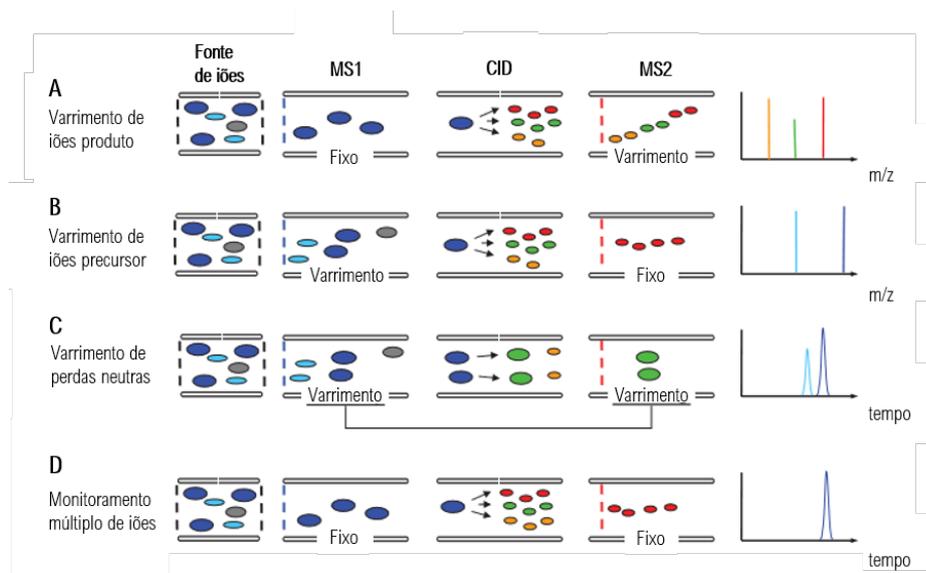


Figura 2.8: Representação esquemática de alguns dos modos de funcionamento mais comuns de um espectrômetro de massa acoplado (*tandem MS/MS*) em aplicações analíticas: (A) Varrimento de íons produto, (B) Varrimento de íons precursor, (C) Varrimento de perdas neutras, (D) Monitoramento múltiplo de íons, adaptado de [77].

da(s) molécula(s) neutra(s) que foram retiradas da estrutura do analito inicial juntamente com o analito cuja razão massa/carga difere da inicial de valor igual ao da razão m/z da(s) molécula(s) libertada(s).

Por último, o modo de funcionamento D, denominado de monitoramento de íons múltiplo ou monitorização de reações múltiplas (*MRM*), baseia-se num modo de trabalho que permite detetar íons precursor e íons produto com o conhecimento prévio das suas razões massa/carga. É, no entanto, necessário a aplicar uma voltagem correta na célula de colisão de forma a adquirir os fragmentos desejados na proporção desejada, voltagem essa alcançada de forma empírica aquando da otimização de condições do detetor [77].

2.5 Estatística no Tratamento de Dados

Quando dados experimentais são obtidos, torna-se imprescindível o seu tratamento estatístico de forma a extrair relações e resultados que possam ser interpretados e correlacionados da melhor forma possível. Desta forma, recorre-se à ciência que se dedica à recolha, tratamento e interpretação de dados provenientes da ocorrência de eventos, a estatística. A partir dos dados obtidos de uma determinada população, permite através dela estimar parâmetros através de teorias probabilísticas que caracterizam essa mesma população.

A estatística confere ao analista ferramentas poderosas que auxiliam no controlo de qualidade de forma a avaliar os resultados obtidos, recorrendo a testes estatísticos de hipóteses. Desta forma, consegue-se averiguar eventuais falhas no procedimento e tomar decisões sobre a aceitação/rejeição dos métodos implementados [78].

Existe um procedimento genérico para se efetuar um teste estatístico de hipóteses, sendo constituído por vários passos sequenciais, nomeadamente:

- Formulação do problema;
- Expressão do teste que irá resultar no valor teste (TV);
- Definição das hipóteses de trabalho;
- Determinação da simetria do teste;

- Estipulação do nível de confiança;
- Cálculo do TV;
- Comparação com o valor crítico e respetiva conclusão [78].

Como passo inicial, a formulação do problema baseia-se no que se pretende demonstrar. Por exemplo, averiguar se duas estimativas de dispersão não são significativamente diferentes. Seguidamente, a expressão do teste estatístico surge da natureza do que se pretende demonstrar. Os testes estatísticos podem ser sistematizados em testes de caracterização e classificação de distribuições, avaliação de valores discrepantes, comparação de estimativas, entre outros grupos. Genericamente, os testes estatísticos incidem sobre uma estimativa central (posição), estimativa de dispersão ou frequência (forma de distribuição). Cada qual tem como referência uma distribuição estatística associada, respetivamente, distribuição *t-student*, *Fischer* e χ^2 (chi-quadrado) [78]. Usando o exemplo descrito anteriormente, a expressão de teste (TV) seria indicar a razão entre as variâncias respetivas, de forma a que o rácio fosse superior ou igual a 1.

As hipóteses de trabalho são ferramentas que servem de base para a tomada de decisões. Estas são usadas, por exemplo, para apoiar ou refutar modelos hipotéticos criados que pretendem explicar observações. A hipótese nula, H_0 , é aquela que afirma uma situação de conformidade e contempla uma condição de igualdade. A hipótese alternativa, H_1 , indica um complemento da condição binomial não satisfeita pela hipótese nula [78]. No exemplo acima, a H_1 seria assumir que ambas as estimativa eram significativamente diferentes, enquanto que a H_0 estabeleceria o contrário.

No que diz respeito à simetria dos testes, esta depende exclusivamente na forma em como as hipóteses foram definidas anteriormente. Quando a hipótese nula constata apenas a igualdade entre um valor a comprovar e um dado valor conhecido, a hipótese alternativa por complementaridade, afirma que os valores são diferentes. Sendo os valores diferentes, o valor a comprovar poderá ser maior ou menor que o conhecido, originando uma simetria bilateral ou testes bilaterais. Por oposição, quando a hipótese nula afirma que o valor a comprovar é igual ou menor/menor (\leq ou \geq) que o valor conhecido, então a hipótese alternativa refere que o valor a comprovar será maior/menor ($>$ ou $<$), respetivamente. Neste caso, a simetria será unilateral. No exemplo anteriormente citado, entende-se que a simetria do teste será bilateral, visto que a hipótese nula constata uma igualdade.

Enquanto que o nível de confiança ($p[H_0] = (1 - \alpha)$) está relacionado com a probabilidade associada à H_0 (probabilidade de aceitação da H_0), o nível de significância (α) está associado à probabilidade da hipótese alternativa ($p[H_1]$) (probabilidade de aceitação da H_1) sendo que ambos conduzem à probabilidade do evento certo ($p[H_0] + p[H_1] = 1$). Quando a probabilidade de aceitação da hipótese nula (valor de prova) é maior que o nível de significância, $p[H_0] > \alpha$, a hipótese nula é aceite.

As normas da qualidade estipulam frequentemente graus de confiança de 95% e 99% o que corresponde a impor níveis de significância de $\alpha = 0,05$ e $\alpha = 0,01$, respetivamente.

Segundo o exemplo anteriormente descrito, sem outra informação ou condição expressa, o teste iria ser inicialmente efetuado com $\alpha = 0,05$. Para o cálculo do valor teste resolve-se a expressão obtida que, pelo exemplo referido, corresponde a calcular a razão entre as variâncias.

Além do nível de significância, na escolha do valor crítico tem-se que atender ao tipo de distribuição estatística em causa, à simetria do teste e aos respetivos graus de liberdade.

Usando o exemplo anterior como referência, o valor crítico respetivo provém da distribuição de *Fischer*, com simetria bilateral, associado ao número de graus respetivos de cada variância e ao nível de confiança. Caso o valor TV não exceda este valor crítico encontrado então a H_0 estaria correta e, por consequência, as estimativas de dispersão não seriam significativamente diferentes. Caso o valor teste seja inferior ao valor crítico, e se o nível de significância associado for de $\alpha = 0,05$, tem-se que verificar o valor crítico associado

ao nível de significância de $\alpha = 0,01$ para que se possa rejeitar a hipótese nula com segurança. Se o valor crítico com $\alpha = 0,01$ for inferior ao valor teste, então a hipótese nula é rejeitada sendo a hipótese alternativa considerada válida. Outra situação possível conduz a uma indeterminação na conclusão estatística. Os valores críticos das distribuições estatísticas de *Fischer*, *t-student* e χ^2 (chi-quadrado) podem ser obtidas por consulta em [79].

2.6 Validação de um Método Analítico

A validação de um método analítico trata-se de um processo algo complexo que tem como finalidade demonstrar que uma determinada metodologia analítica é adequada para identificar, separar e quantificar um analito, a uma dada concentração, numa determinada gama de trabalho para uma determinada matriz. Através da validação, é possível demonstrar que os resultados obtidos são credíveis e de qualidade, indicando que o método interno executado é adequado [80]. Para um laboratório poder reportar resultados de qualidade, este tem a necessidade de concretizar alguns procedimentos, nomeadamente, efetuar o controlo de qualidade interno respetivo a cada metodologia analítica usada; participar em ensaios interlaboratoriais; usar métodos analíticos validados e encontrar-se acreditado pela norma ISO 17025.

Como podemos constatar, a validação de métodos faz parte de um conjunto de procedimentos que, como um todo, constituem um conjunto de evidências em como os resultados reportados têm todo o rigor analítico necessário. Existindo distintas metodologias para quantificar um determinado analito, surge a necessidade de escolher o método analítico mais viável para o laboratório e que assegure a validade dos resultados obtidos. Para que um método seja validado, existem vários parâmetros que precisam ser estudados e avaliados, nomeadamente: identificação do analito; especificidade e seletividade; gama de trabalho e linearidade; sensibilidade; limiares analíticos; exatidão; precisão e coerência.

2.6.1 Identificação do analito

Após a escolha da metodologia analítica, tem que se garantir que o sinal obtido por parte da instrumentação corresponde apenas à presença do analito em estudo. Por norma, recorre-se à informação disponível das condições experimentais na literatura como ponto de partida, tendo em consideração de que, experimentalmente, elas podem variar devido a vários fatores, como por exemplo, os modelos dos aparelhos na literatura serem diferentes dos modelos dos aparelhos disponíveis.

2.6.2 Especificidade e Seletividade

Um método específico é aquele que consegue discriminar o analito em estudo relativamente à matriz que o envolve. Já a seletividade traduz-se na capacidade de identificar e distinguir o analito de interesse dos restantes compostos presentes na amostra. De forma a verificar a presença de interferentes, é comum estudar-se o efeito matriz através de, por exemplo, ensaios de recuperação onde amostras com uma determinada matriz são dopadas a um certo nível de concentração. Desta forma, consegue-se verificar se existem perdas durante o tratamento de amostra, ou quaisquer outros efeitos associados à matriz [49].

2.6.3 Gama de Trabalho

Considera-se como gama de trabalho o intervalo de concentrações onde é possível determinar com exatidão e precisão o teor de analito presente numa amostra. A gama de trabalho é definida aquando da escolha da gama de concentrações escolhida para os padrões que irão definir as curvas de calibração. Por norma, recorre-

se, no mínimo, a um branco e cinco padrões cuja concentração deve variar entre 0,5 e 1,5 vezes a concentração esperada do analito presente nas amostras a analisar.

Uma das formas de avaliar uma gama de trabalho definida é através do estudo de homogeneidade de variâncias. As normas ISO 8466-1 e ISO 8466-2 auxiliam no estudo de estratégias de calibração para métodos que apresentam uma resposta linear (modelo linear) ou uma resposta não linear (modelo polinomial), respetivamente.

2.6.4 Linearidade

A linearidade de um método pode ser verificada quando o sinal do analito é proporcional à sua concentração, através de um determinado método analítico. Esta pode ser avaliada por várias abordagens, tendo todas por base o estudo das retas de calibração obtidas para os analitos de interesse.

A forma mais rigorosa de se avaliar a linearidade é através do teste de Mandel. Este, de forma sucinta, permite achar qual a função matemática, modelo linear ou quadrático, que melhor se ajusta à distribuição dos sinais obtidos. No entanto, para que os modelos possam ser comparados, é necessário obter os parâmetros que definem essas mesmas funções, como a ordenada na origem e o declive. Estes parâmetros podem ser obtidos através do método dos mínimos quadrados.

Outra forma de se avaliar a linearidade baseia-se na determinação do coeficiente de determinação, R^2 , em que, se o valor correspondente for superior a 0,995, então admite-se a linearidade da resposta. Este parâmetro mostra a proporção da variância de uma das variáveis que pode ser explicada a partir do valor da outra. Por exemplo, quando o referido parâmetro assume o valor de 0,999, isto indica que 99,9% da variação de uma variável pode ser justificada pela variação da outra variável.

É importante referir que, antes de ser efetuado o teste de Mandel, é necessário averiguar a existência de valores discrepantes nas curvas de calibração. Os valores discrepantes podem ser sugeridos por regressão robusta e/ou cálculo de diferenças entre valores experimentais e respetivos valor teóricos previstos pelo modelo de ajuste linear. A segunda alternativa remete a utilização dos parâmetros obtidos pelo método dos mínimos quadrados, ou seja, análise de resíduos.

2.6.5 Sensibilidade

Este parâmetro resume-se na capacidade que o método tem em distinguir diferentes concentrações do analito. Quanto menor forem as diferenças entre concentrações que o método consiga distinguir, maior a sua sensibilidade.

Se o método analítico apresentar uma boa resposta linear, a sensibilidade é aproximadamente igual ao declive ou derivada de primeira ordem da função de ajuste obtida da curva de calibração. Este parâmetro pode ser usado como um dos critérios na escolha da metodologia usada, pois quanto maior for a sensibilidade necessária para a deteção de um analito, mais sofisticado terá de ser o método a implementar.

2.6.6 Limiares Analíticos

Quando se pretende implementar um método analítico, existe a necessidade de determinar os limiares analíticos, ou seja, intervalo de concentrações que, a partir destes, é possível obter com todo o rigor o teor do analito em estudo. O limite superior corresponde ao padrão de maior concentração usado para estabelecer a curva de calibração. Relativamente aos limites inferiores, estes denominam-se de limite de deteção e limite de quantificação.

O limite de deteção (x_{LD}) corresponde à menor concentração de analito que é significativamente diferente de um branco. No entanto, não é possível determinar a sua concentração de forma rigorosa devido a erros significativos. A realização de um ensaio de uma amostra que apresente o sinal do analito inferior ao limite de

deteção não significa, necessariamente, a total ausência do mesmo na amostra. Neste caso é de salientar que, devido à elevada incerteza estatística inerente à sua deteção, mesmo que uma amostra apresente um sinal de analito inferior ao limite de deteção, o analito não deve ser considerado como efetivamente detetado.

O limite de quantificação (x_{LQ}) corresponde à menor concentração que, a partir da qual, é possível quantificar com todo o rigor analítico o analito presente nas amostras. Após a validação da curva de calibração, o limite de quantificação corresponde ao padrão de menor concentração pertencente à mesma. Uma forma de verificar a exatidão e precisão do padrão correspondente ao limite de quantificação é realizar testes tais como a precisão intermédia. Estes últimos são estudados com a leitura de vários padrões preparados com a concentração correspondente ao limite de quantificação.

Existem três formas reconhecidas de se calcularem os limites de deteção e quantificação. Uma delas baseia-se na relação sinal/ruído que pode ser usado em algumas técnicas, como na cromatografia a partir dos cromatogramas obtidos provenientes das leituras das amostras. Outra forma de estimar os limiares analíticos resulta da leitura de amostras sem analito (brancos) que possuam sinal e cujo desvio padrão dos ensaios das respetivas leituras sejam diferentes de zero. Por último, é possível também estimar os limites recorrendo à função de ajuste de uma curva de calibração. A escolha da maneira a ser usada para a obtenção dos limiares analíticos depende se esses mesmos limites resultam em valores com significado físico e reprodutíveis [81].

2.6.7 Precisão

A precisão de um método analítico é avaliada pelo grau de proximidade relativa aos resultados obtidos na repetição de ensaios. A repetibilidade e a reprodutibilidade são situações extremas de se avaliar a precisão num método. A repetibilidade baseia-se na leitura da mesma amostra feitas nas mesmas condições no menor intervalo de tempo possível. Já a reprodutibilidade permite avaliar a dispersão de resultados a nível global para determinada metodologia analítica sob amostras representativas. Um exemplo de reprodutibilidade baseia-se nos ensaios interlaboratoriais, conseguindo-se avaliar a concordância de resultados entre ensaios dependentes/independentes de uma mesma amostra/padrão [49].

É também, de igual forma importante, avaliar a precisão dos ensaios em regime de precisão intermédia, sendo este regime uma medida de dispersão que se situa entre a repetibilidade e a reprodutibilidade.

2.6.8 Exatidão

Com o estudo da exatidão, consegue-se verificar se os resultados provenientes são próximos do valor de referência admitido como verdadeiro. A exatidão é tanto maior quanto menor for a diferença entre os valores acima referidos.

Existem várias formas de avaliar a exatidão, entre elas estão os ensaios de recuperação, a análise de materiais de referência certificados (MRC's) e ensaios interlaboratoriais. Com os brancos de amostra, adiciona-se uma quantidade conhecida de analito e, desta forma, é possível verificar se a taxa de recuperação está dentro da gama de aceitação relativamente ao efeito matriz inerente. Sobre a análise de MRC's que contenha uma matriz semelhante às das amostras reais, é esperado que o teor de analito obtido pelo método esteja dentro do intervalo compreendido no certificado que acompanha o MRC. Os ensaios interlaboratoriais são ensaios relacionados pelos laboratórios através de uma entidade organizadora. Esta distribui uma amostra pelos vários laboratórios participantes no ensaio, ficando a cargo destes a análise e o respetivo reporte do valor à entidade organizadora sobre o teor do analito em causa.

Mediante um valor de referência estabelecido pela entidade organizadora, os valores reportados pelos vários laboratórios serão comparados com a dita referência. Com essa comparação, é possível estabelecer um nível de desempenho dentro de uma gama de concordância, denominado de "z-score", do método analítico implementado no laboratório.

O cálculo do desvio absoluto, que corresponde à diferença absoluta entre o valores obtido e definido como verdadeiro, ou desvio relativo que indica a diferença a nível percentual são formas de se avaliar a exatidão [49].

Os ensaios interlaboratoriais são ensaios relacionados pelos laboratórios através de uma entidade organizadora relacionada com a metrologia e qualidade analítica. Esta distribui uma amostra pelos vários laboratórios participantes no ensaio, ficando a cargo destes a análise e o respetivo reporte do valor à entidade organizadora sobre o teor do analito em causa.

Mediante um valor de referência estabelecido pela entidade organizadora, os valores reportados pelos vários laboratórios serão comparados com a dita referência. Com essa comparação, é possível estabelecer um nível de desempenho dentro de uma gama de concordância, denominado de *z-score*, do método analítico implementado no laboratório.

2.6.9 Coerência

A coerência corresponde à capacidade do método conduzir ao mesmo resultado quando ocorrem alterações não deliberadas de algumas condições tais como analista, reagentes, períodos de trabalho, entre outros. Para avaliar este parâmetro de desempenho repetem-se as determinações num certo conjunto de amostras, seguindo as condições de análise impostas e em diferentes instantes, por períodos de tempo variável e procura-se avaliar a concordância dos resultados obtidos.

Capítulo 3

Procedimentos

Para a realização da parte experimental relativa aos pesticidas e microcistinas, além dos materiais usuais num laboratório analítico de controlo da qualidade, apenas iremos discriminar alguns que são mais específicos e foram utilizados neste trabalho. Seguidamente, serão apresentados os métodos usados, referindo as condições da amostragem, da extração em fase sólida e da cromatografia líquida com detetor de massas. Por último, serão descritas as formas de se avaliarem os parâmetros intrínsecos à validação do método analítico a ser implementado.

3.1 Materiais

Os materiais usados para os procedimentos experimentais foram os seguintes:

- Cartuchos (SPE) OASIS HLB 500 mg – Waters ®;
- Sistema de extração de amostras Auto Trace SPE Workstation – Caliper LifeSciences ®;
- Sistema de secagem de cartuchos - Turbo Vap LC Concentration Workstation – Caliper LifeSciences ®;
- Frascos de polietileno;
- Tubos de vidro 15 e 40 mL;
- Frascos Schott ® 500 e 1000 mL;
- Banho de ultrassons - Silver Crest ®;
- Vials 12*32mm com septo PTFE/silicone - VWR;
- Sistema de aquisição de dados;
- Material corrente de laboratório e material volumétrico;
- Balança - Tokyo Japan, A&D Company, Limited ®;
- Micro seringas de volumes variados - Agilent ®;
- Software MassLynx Version 4.1 SCN919;
- Bomba de vácuo;
- Sistema de vácuo multiposto – Waters ®;
- Agitador Vortex;
- Filtros de membrana compatível com solventes aquosos e orgânicos de polipropileno hidrofílico 0,22 µm de porosidade e 47 mm diâmetro Filtros de fibra de vidro, PALL, A/E, 1 µm, 47 mm de diâmetro;
- Tubos/Vasos de centrifuga;

3.2 Reagentes

Relativamente aos reagentes, podem ser visualizados na tabela 3.1 juntamente com as suas características:

Tabela 3.1: Reagentes usados para a realização do projeto.

Reagentes	Fórmula química	Densidade (g/cm^3)	Fornecedor	Número CAS	Massa molar (g/mol)
Metanol	CH_4O	0,79	VWR	67-56-1	32,04
Éter dietílico	$C_4H_{10}O$	0,71	VWR	60-29-7	74,12
Acetato de amónio	$C_2H_7NO_2$	1,17	VWR	631-61-8	77,08
Tiosulfato de sódio pentahidratado	$Na_2O_3S_2 \cdot 5H_2O$	1,74	Merck	10102-17-7	248,21
Ácido Fórmico	CH_2O_2	1,22	VWR	64-18-6	46,03

Quando não for dito em contrário, as soluções preparadas foram aferidas com água desmineralizada obtida pelo aparelho Purity PU 20 VWR (®), com condutividade específica de 0,055 ($\pm 0,005$) siemens (S) medida à temperatura 18-22 °C. Todos os solventes e compostos têm a pureza necessária para processos cromatográficos associados ao detetor de massas. As densidades apresentadas estão associadas a uma temperatura de 20 °C.

3.2.1 Padrões primários

Sobre os padrões, estes encontram-se abaixo discriminados na tabela 3.2 juntamente com as suas características.

Tabela 3.2: Padrões usados para a realização do projeto.

Padrões	Fórmula química	Fornecedor	Número CAS	Massa molar(g/mol)	Pureza (%) ou Concentração (mg/L em metanol)
DIA	$C_5H_8ClN_5$	Dr. Ehrenstorfer	1007-28-9	173,6	98,9%
MCPP	$C_{10}H_{11}ClO_3$	Dr. Ehrenstorfer	93-65-2	214,6	99,3%
MC-LR	$C_{49}H_{74}N_{10}O_{12}$	LGC	101043-37-2	995,2	
MC-RR	$C_{49}H_{75}N_{13}O_{12}$	LGC	111755-37-4	1038,2	10 mg/L
MC-YR	$C_{52}H_{72}N_{10}O_{13}$	LGC	101064-48-6	1045,2	

3.3 Soluções

Relativamente à validação dos métodos, encontra-se abaixo indicadas as soluções usadas tanto para os pesticidas como para as microcistinas. É de referir que as fases móveis precisam de ser desgasificadas antes de serem utilizadas.

3.3.1 Pesticidas

Para os pesticidas, as soluções foram as seguintes:

- Solução tampão de Acetato de Amónio (5 mM);
- Fase móvel A, constituída por 5 mM Acetato de Amónio/Metanol [90/10 (v/v)];
- Fase móvel B, constituída por 5 mM Acetato de Amónio/Metanol [10/90 (v/v)];
- Padrão individual de pesticidas;
- Soluções padrão individuais - calibração (200 mg/L);
- Soluções padrão individuais - controlo (200 mg/L);
- Solução padrão intermédia - calibração (2 mg/L);

- Solução padrão intermédia - controlo (2 mg/L);
- Soluções padrão para calibração (14 – 74 µg/L);
- Solução padrão para fortificação (2 mg/L).

3.3.2 Preparação de Soluções

3.3.2.1 Solução tampão de Acetato de Amónio (5 mM)

Pesar 0,385 de acetato de amónio e dissolver num balão de 1000 mL com água desmineralizada.

3.3.2.2 Fase móvel A - Acetato de Amónio/Metanol [90/10 (v/v)]

Retirar 100 mL do tampão de acetato de amónio (solução 3.3.2.1) com uma proveta. Juntar aos restantes 900 mL, 100 mL de metanol. Solução estável durante 48h à temperatura ambiente.

3.3.2.3 Fase móvel B - Acetato de Amónio/Metanol [10/90 (v/v)]

Colocar os 100 mL retirados no tampão de acetato de amónio em 900 mL de metanol. Solução estável durante 2 semanas à temperatura ambiente.

3.3.2.4 Padrão individual de pesticidas de stock

Pesticida adquirido em estado sólido, com qualidade analítica reconhecida para técnicas cromatográficas.

3.3.2.5 Soluções padrão individuais dos pesticidas - calibração (200 mg/L)

Pesar 5,0 mg do padrão de pesticida 3.3.2.4 e dissolver num balão de diluição de 25 mL com metanol. Transferir esta solução para um frasco de vidro fosco.

As soluções individuais devem ser armazenadas numa temperatura compreendida entre 2 e 8 °C, ao abrigo da luz. Para futuras aplicações estas soluções devem ser preparadas anualmente, no caso de apresentarem sinais de degradação, evaporação de solvente ou expiração do prazo de validade dos padrões dos pesticidas em estudo. A concentração da solução padrão individual de pesticidas foi corrigida pela percentagem de pureza dos compostos.

3.3.2.6 Soluções padrão individuais dos pesticidas - controlo (200 mg/L)

Procedimento de preparação igual a 3.3.2.5.

3.3.2.7 Soluções padrão intermédias de pesticidas - calibração (2 mg/L)

Transferir 100 µL, com auxílio de uma micro seringa, de cada uma das soluções padrão individuais de pesticidas preparadas na solução 3.3.2.5 para um balão de diluição de 10 mL e aferir com metanol. Corrigir o volume a transferir mediante a concentração real das soluções, se necessário.

3.3.2.8 Soluções padrão intermédias de pesticidas - controlo (2 mg/L)

Procedimento de preparação igual a 3.3.2.7, no entanto, o volume de 100 µL deverá ser retirado das soluções individuais preparadas em 3.3.2.6.

3.3.2.9 Soluções padrão para calibração (14 – 74 $\mu\text{g/L}$)

A partir da solução intermédia de pesticidas 3.3.2.7, prepararam-se padrões de concentrações compreendidas entre 14 e 74 $\mu\text{g/L}$ em fase móvel A (solução 3.3.2.2), em balões de diluição de 20 mL. Na tabela 3.3 encontra-se descrita as concentrações dos padrões usados juntamente com o volume transferido da solução 3.3.2.7 para cada padrão.

Tabela 3.3: Preparação de soluções padrão para calibração dos pesticidas.

Solução padrão	Volume transferido de solução/ μL	Concentração aproximada/ $(\mu\text{g/L})$
x_1	140	14
x_2	240	24
x_3	340	34
x_4	440	44
x_5	540	54
x_6	640	64
x_7	740	74

3.3.2.10 Solução padrão para fortificação - pesticidas (50 $\mu\text{g/L}$)

Transferir 250 μL da solução 3.3.2.8 para um balão de 10 mL e aferir com metanol.

3.3.2.11 Amostras/Matrizes fortificadas

Transferir 140 μL da solução 3.3.2.10 para 500 mL de amostra/matriz a analisar.

3.3.2.12 Preparação das amostras/matriz fortificadas

Aferir um balão de diluição de 500 mL com matriz/amostra. Seguidamente, acrescentar 140 μL da solução 3.3.2.10 para a matriz/amostra. Submeter a amostra/matriz fortificada ao processo da extração em fase sólida.

3.3.3 Microcistinas

Para a validação do método das microcistinas, foi necessário utilizar as seguintes soluções:

- Fase móvel A, 0,1% de ácido fórmico em água;
- Fase móvel B, 0,1% de ácido fórmico em metanol;
- Soluções padrão de microcistinas de stock (10 mg/L);
- Solução padrão intermédia - calibração (500 $\mu\text{g/L}$);
- Solução padrão intermédia - controlo;
- Soluções padrão para a calibração (50 – 150 $\mu\text{g/L}$);
- Solução padrão para fortificação.

3.3.4 Preparação de Soluções

3.3.4.1 Fase móvel A - 0,1% de ácido fórmico em água

Transferir, para um balão de diluição de 1000 mL, 800 mL de água. Adicionar 1 mL de ácido fórmico e aferir com água. Solução estável durante 48h à temperatura ambiente.

3.3.4.2 Fase móvel B - 0,1% de ácido fórmico em metanol

Transferir, para um balão de diluição de 1000 mL, 800 mL de metanol. Adicionar 1 mL de ácido fórmico e aferir com metanol. Solução estável durante 2 semanas à temperatura ambiente.

3.3.4.3 Soluções padrão de microcistinas de stock (10 mg/L)

Solução de microcistinas adquiridas individualmente, com qualidade analítica reconhecida para técnicas cromatográficas.

3.3.4.4 Solução padrão de microcistinas intermédia - calibração (500 µg/L)

Transferir 0,5 mL da solução 3.3.4.3 para um balão de 10 mL e aferir com metanol

3.3.4.5 Solução padrão de microcistinas intermédia - controlo/fortificação

Transferir 0,5 mL da solução 3.3.4.3 da microcistina-YR e 0,25 mL da solução 3.3.4.3 das microcistinas-LR e microcistina-RR para um balão de diluição de 5 mL.

3.3.4.6 Soluções padrão de microcistinas para a calibração (40 – 160 µg/L)

A partir da solução intermédia de microcistinas, 3.3.4.4, prepararam-se padrões de concentrações compreendidas entre 50 e 150 µg/L e 40 e 160 µg/L em balões de 5 mL, mediante a(s) microcistina(s) a calibrar, aferidos na solução que compõe a primeira linha de gradiente do método cromatográfico, nomeadamente 45% de fase móvel A (solução 3.3.4.1) e 55% de fase móvel B (solução 3.3.4.2). Na tabela 3.4 encontram-se descritas as concentrações dos padrões usados juntamente com o volume transferido da solução 3.3.4.4 para cada padrão.

Tabela 3.4: Preparação de soluções padrão para a calibração das microcistinas.

Volume transferido/ mL	Concentração aproximada/(µg/L)
0,40	40
0,50	50
0,60	60
0,75	75
0,80	80
1,00	100
1,20	120
1,40	140
1,50	150
1,60	160

3.3.4.7 Amostras/matrizes fortificadas

Transferir 100 µ/L da solução 3.3.4.5 e adicionar a 250 mL de matriz/amostra a analisar.

3.3.4.8 Preparação das amostras/matrizes fortificadas

Aferir um balão de diluição de 250 mL com matriz/amostra. Transferir 100 µL da solução 3.3.4.5 para a matriz/amostra respetiva. Filtrar os 250 mL de matriz/amostra. Seguidamente, lavar com 5 mL de uma

solução de metanol (90%) e o funil com 2,5 mL com da mesma solução de metanol, adicionando-os ao filtrado. Colocar o filtro utilizado dentro de um tubo de vidro e adicionar 2 mL de uma solução de metanol (80%) de forma a que a solução cubra todo o filtro. Submeter o filtro a uma temperatura de -20 °C por algum tempo, entre 1h-16h e o filtrado deve ser armazenado a uma temperatura $\leq 6^{\circ}\text{C}$. Após o tempo de espera, transferir os 2 mL adicionados ao tubo de vidro que continha o filtro para o filtrado, podendo em seguida descartar o filtro. Lavar o tubo de vidro com 2 mL de uma solução de metanol (80%), repetindo a lavagem do tubo com 1 mL da mesma solução de metanol. Por último, submeter o filtrado ao processo da extração em fase sólida.

Relativamente às microcistinas, estas têm características que exigem um cuidado especial no processamento de amostras. A característica baseia-se no facto de, no caso de uma amostra possuir microcistinas na sua composição, terá à partida cianobactérias. Estas, como foi anteriormente referido, retêm no seu interior 80% das microcistinas produzidas, ou seja 20% das microcistinas libertadas denominam-se de microcistinas dissolvidas enquanto que os restantes 80% fazem parte das microcistinas particuladas. Devido a esta característica o processamento de amostra, antes de ser submetido à extração em fase sólida, tem de garantir a quebra da membrana celular das cianobactérias de forma a que ocorra a libertação das microcistinas particuladas para a água. Desta forma, poderá ser possível detetar o teor total de microcistinas na amostra e, assim, garantir a sua análise e posterior quantificação. Relativamente ao tempo inerente ao passo de secagem, este poderá prolongar-se sempre que, por inspeção visual, se detetar a presença de água nos cartuchos. Aquando da preparação das amostras para os ensaios de recuperação das microcistinas, a adição do padrão à matriz a avaliar deverá ser o primeiro passo de forma a que as taxas de recuperação possam englobar todo o processo. O procedimento de tratamento de amostras/matrizes a testar terá como referência o documento americano proveniente da agência de proteção ambiental existente para a quantificação de microcistinas, denominado de “*Single Laboratory Validated Method for Determination of Microcystins and Nodularin in Ambient Freshwaters by Solid Phase Extraction and Liquid Chromatographic/Tandem Mass Spectroscopy*” [82].

3.4 Equipamentos

O equipamento analítico usado para a realização do projeto encontra-se abaixo discriminado:

ACQUITY Ultra Performance – Binary Solvent Manager Waters®;

ACQUITY Ultra Performance – Sample Manager Waters®;

ACQUITY Ultra Performance – TQ Detector Waters®;

Coluna ACQUITY UPLC HSS T3 2,1*150 mm 1,8 μm ®.

3.5 Métodos

Neste capítulo irei detalhar a otimização das condições relativas à extração em fase sólida e à cromatografia líquida de ultra eficiência com detetor de massas/detetor de massas. Posteriormente, será referido o tratamento estatístico efetuado de forma a verificar cada etapa do processo de validação da metodologia analítica.

3.5.1 Otimização de Condições - UPLC-MS/MS

Para que a análise dos novos compostos em estudo seja feita, é primeiramente necessário otimizar as condições experimentais, nomeadamente as condições cromatográficas e seguidamente as do detetor de massas.

3.5.1.1 Condições cromatográficas

Relativamente à parte cromatográfica, a sua otimização tem como objetivo encontrar os tempos de retenção característicos de cada analito associados a uma gama de condições inerentes ao processo (como temperatura da coluna cromatográfica, volume de injeção, entre outros) definidos para uma determinada coluna cromatográfica associada às fases móveis escolhidas. As condições otimizadas têm como objetivo melhorar o processo de separação dos diferentes componentes da amostra, caso os analitos de interesse estejam presentes.

3.5.1.2 Condições do detetor de massas - triplo quadrupolo

A otimização das condições do detetor de massas é fundamental para que a presença de um determinado analito possa ser verificada. Neste passo, pretende-se obter o íão precursor de cada analito de interesse e seus respectivos fragmentos moleculares com o estudo da correta voltagem de cone a aplicar, energia de colisão, entre outros parâmetros específicos do sistema de deteção. Para que esta otimização seja feita serão realizados vários modos de trabalho, nomeadamente modos que resultam do compromisso entre *full scan* e *SIM* nos primeiro e terceiro quadrupolos. Após a otimização das condições, condições essas que otimizam a deteção de um íão precursor e de dois fragmentos, é possível implementar o modo de trabalho *MRM*.

Neste modo de trabalho, é possível monitorizar íões com razões massa/carga específicas tanto no primeiro como no terceiro quadrupolos. Com a prévia otimização da voltagem do cone e das energias de colisão para a obtenção do íão precursor e dos fragmentos característicos do analito, é possível atingir a sensibilidade necessárias para que seja possível monitorizar a presença de analitos com reduzidas interferências. Cada *MRM* mede uma transição do íão precursor para um fragmento característico, sendo cada transição característica do analito. Com a procura de dois fragmentos específicos, é possível monitorizar duas transições, *MRM₁* e *MRM₂*, em que a transição mais intensa é denominada genericamente como transição de quantificação e a menos intensa de transição de confirmação.

3.5.2 Otimização de Condições - Extração em fase sólida

Após o passo de processamento da amostra, segue-se a extração em fase sólida, cujo procedimento encontra-se especificado na tabela 3.5. Para a extração em fase sólida, existem várias condições a estudar, o fluxo de passagem da amostra e do posterior eluente, composição do(s) eluente(s), tempo de secagem dos cartuchos, entre outros aspetos. A extração em fase sólida foi realizada com auxílio de cartuchos (SPE) OASIS HLB 500 mg, da Waters® para todos os analitos, cuja fase sólida é definida como adsorvente hidrofílico-lipofílico equilibrado. As matrizes a testar para os pesticidas foram água de consumo humano e água subterrânea. Nas MC's, usaram-se água de consumo humano e água superficial. A escolha das matrizes para alvo do estudo foi feita em conformidade com a decisão do laboratório. É de referir que, aquando da análise da matriz água de consumo humano, existe a necessidade de adicionar 5 mg tiosulfato de sódio de forma a neutralizar o cloro existente, segundo as recomendações do livro de métodos padrão para análise de águas e efluentes (Standard methods for the examination of water and wastewater).

Tabela 3.5: Condições da extração em fase sólida dos pesticidas e microcistinas.

	Pesticidas	Microcistinas
Condicionamento do cartucho	3 mL éter dietílico + 3 mL MeOH + 3 mL água	15 mL MeOH + 15 mL água
Fluxo de condicionamento	lento e controlado	
Volume de amostra/padrão	500 mL	250 mL
Secagem do cartucho	15 minutos	15 minutos
Eluição das amostras	5 + 3 mL MeOH	5 mL de MeOH + 5 mL MeOH (90%)
Evaporação do(s) solvente(s)	15 minutos em azoto com banho em 35 °C	20 minutos em azoto com banho em 60 °C

3.6 Tratamento Estatístico de Resultados

De forma a avaliar os resultados obtidos experimentalmente no capítulo 4, foram utilizadas diversas metodologias e cálculos estatísticos. Nesta parte encontram-se descritas as expressões e cálculos estatísticos utilizados.

3.6.1 Estimativa central

Sendo a média a estimativa central mais utilizada, este cálculo crucial permite identificar o valor central de um determinado conjunto de dados, sendo um valor à partida mais confiável do que quaisquer resultados individuais. A expressão matemática para o cálculo da média encontra-se representada na equação (3.1), onde \bar{x} representa a média e x_i um resultado individual proveniente de n valores.

$$\bar{x} = \frac{\sum_{i=1}^n x_i}{n} \quad (3.1)$$

3.6.2 Estimativa de dispersão

Com o objetivo de avaliar a precisão de um conjunto de dados, um dos cálculos muito usados é o desvio-padrão. Encontra-se escrita na equação (3.2) a expressão matemática para o seu cálculo, onde s representa o desvio-padrão. No sentido de efetuar testes estatísticos com dispersões, é conveniente estimar a respetiva variância, que corresponde à potência (em segundo grau) da estimativa obtida em (3.2).

$$s = \sqrt{\sum_{i=1}^n \frac{(x_i - \bar{x})^2}{n - 1}} \quad (3.2)$$

3.6.3 Análise de valores discrepantes

Durante o trabalho de rotina, podem surgir alguns valores experimentais que diferem dos valores esperados de forma significativa, denominados de valores discrepantes ou *outliers*. No sentido de evitar erros de estimativa, estes têm de ser identificados e processados de acordo com instruções inerentes à qualidade em metrologia. Para este efeito existem vários testes estatísticos para a deteção de valores discrepantes. O teste de Grubbs é recomendado pela normas ISO 17025, pelo que será utilizado. A sua expressão matemática encontra-se descrita na equação (3.3), onde $TV(G)$ representa o valor do teste e $x_?$ o valor suspeito. Existem

alguns pressupostos que se admitem como verdadeiros para o conjunto de dados em causa, nomeadamente a sua distribuição ser normal.

$$TV(G) = \frac{|x? - \bar{x}|}{s} \quad (3.3)$$

O valor suspeito apenas deve ser excluído quando o resultado do teste for superior ao valor crítico com um nível de significância de 0,05, para n valores experimentais. Os valores críticos podem ser visualizados na tabela A.1 presente no Apêndice A.

3.6.4 Análise de Variabilidade

De forma a comparar as variâncias de duas populações diferentes, assumindo que estas possuem uma distribuição normal e portanto, associadas à distribuição de Fischer, recorre-se ao teste estatístico F, que se encontra descrito na equação (3.4). Nesta expressão, a variância maior deve situar-se no numerador. Neste tipo de teste, a hipótese nula indica o sentido de igualdade e, portanto, as diferenças achadas resultam em variações de natureza puramente aleatória. Já a hipótese alternativa afirma que as variâncias são estatisticamente diferentes. A hipótese nula é rejeitada se as variâncias comparadas forem estatisticamente diferentes entre si [78].

$$TV = \left(\frac{s_1^2}{s_2^2} \right) \quad (3.4)$$

3.6.5 Teste de linearidade

No processamento do ajuste dos resultados obtidos na calibração através do método de mínimos quadrados, importa verificar se a resposta instrumental obtida é linearmente dependente da concentração. Para isso, ajusta-se os resultados experimentais a uma função de primeiro grau ($P_{(01)}(x) = b_0 + b_1x$) e de segundo grau ou polinomial ($P_{(012)}(x) = b_0 + b_1x + b_2x^2$). Posto isso, estimam-se a soma dos resíduos ao quadrado e, posteriormente, compara-se o aumento da variância do ajuste com a diminuição do grau do polinómio.

Ao compararmos o incremento de variância de modelo de ajuste com uma estimativa de erro de natureza puramente aleatória através da exclusão de um parâmetro (coeficiente do termo de segundo grau), conseguimos tirar conclusões sobre o modelo que melhor descreve os dados experimentais.

Essa comparação baseia-se num teste estatístico de Mandel, eq. (3.5),

$$TV = \frac{\Delta SS / \Delta \nu}{\sigma_{p.e.}^2} = \frac{(SS_1 - SS_2) / (\nu_1 - \nu_2)}{\sigma_{fit(2)}^2} \quad (3.5)$$

onde SS_1 e SS_2 correspondem à soma de quadrados dos resíduos obtidos no ajuste da função polinomial de primeiro ($P_{(01)}$) e de segundo grau ($P_{(012)}$) e ν_1 e ν_2 aos respetivos graus de liberdade relacionados com esses dois ajustes. Neste caso a referência de dispersão é uma estimativa puramente aleatória ($\sigma_{p.e.}^2$) que coincide com a variância do ajuste ($\sigma_{fit(2)}^2$) obtida com polinómio de segundo grau,

$$\sigma_{fit(2)}^2 = \frac{SS_2}{\nu_2} \quad (3.6)$$

Após a obtenção do TV , eq. (3.5), é necessário compará-lo com o valor crítico da distribuição estatística de *Fischer* unilateral ($F_{0,01(1;\nu_2)}^u$). Caso o valor de TV seja inferior a este valor crítico, aceita-se o modelo linear como válido.

3.6.6 Verificação de valores discrepantes no modelo de ajuste

De uma forma geral, a presença de valores discrepantes nos dados a processar pelo método dos mínimos quadrados pode alterar significativamente o valor das estimativas de posição e de dispersão. Desta forma, é necessário verificar a existência de valores anômalos nas curvas de calibração. O teste estatístico a usar é também o teste de Mandel, sendo este responsável por avaliar a variação da qualidade do ajuste, σ_{fit}^2 do ajuste de n e do ajuste $n - 1$ valores experimentais, após se ter removido o eventual valor discrepante.

Existem essencialmente duas formas similares para localizar os valores mais discrepantes, ambas através da análise dos desvios de cada valor em relação ao modelo obtido, por via paramétrica (estimativa por mínimos quadrados) e por via não paramétrica (regressão robusta). Dado que a regressão robusta é muito insensível a valores anômalos, esta é a mais recomendada na análise de dados fortemente contaminados com valores discrepantes.

A regressão robusta (estimativa não paramétrica) baseia-se na determinação dos valores dos parâmetros que caracterizam o modelo de ajuste. Usando como exemplo o modelo linear, os parâmetros robustos obtidos seriam o declive e ordenada na origem, respetivamente \tilde{b}_1 e \tilde{b}_0 . O declive (\tilde{b}_1) obtém-se calculando a mediana de todas as derivadas numéricas pontuais obtidas por combinação de valores, dois a dois. Conhecendo o declive robusto, consegue-se para cada valor experimental (x_i, y_i), o valor respetivo $b_{0(i)}$ através da equação

$$b_{0(i)} = y_i - \tilde{b}_1 \times x_i \quad (3.7)$$

A estimativa robusta para a ordenada na origem (\tilde{b}_0) corresponde à mediana dos n valores obtidos ($b_{0(i)}$).

Em ambos casos (estimativas paramétrica e não paramétrica) o modelo desenvolvido serve de referência aos valores obtidos - estimam-se essas diferenças e obtêm-se uma listagem de eventuais valores discrepantes, ordenando os respetivos desvios absolutos por ordem decrescente.

Na equação (3.8) é possível visualizar a expressão matemática para o cálculo do TV , onde corresponde n ao número de pontos que constitui a curva de calibração, p ao número de parâmetros associados ao modelo de calibração.

$$TV = \frac{(SS_{(n)} - SS_{(n-1)}) / ((n - p) - (n - p - 1))}{\sigma_{p.e.}^2} = \frac{\Delta\sigma_{fit}^2}{\sigma_{fit}^2} \leq F_{\alpha(1;n-p-1)}^u \quad (3.8)$$

Sendo esta também uma fase crítica da calibração, no sentido de evitar desvios sistemáticos na posição e dispersão das estimativas, o teste deve ser efetuado ao nível de significância de 0,01.

3.7 Validação

De forma a validar um método analítico, existem etapas demonstrativas necessários que foram descritos anteriormente. No entanto, para cada parâmetro estudado da validação, existe um tratamento estatístico inerente associado aos dados experimentais, que será posteriormente detalhado.

3.7.1 Identificação do Analito

Para se garantir que o sinal obtido de cada amostra provém apenas da presença do analito em estudo, recorrem-se a alguns pré-requisitos obtidos aquando da otimização das condições do equipamento. Essas condições usadas para confirmar o analito em estudo baseiam-se:

- tempos de retenção, cujo critério de confirmação baseia-se no valor médio de cada analito de interesse associado a uma incerteza de $\pm 0,2$ minutos;
- presença de duas transições obtidas pelo modo de trabalho *MRM*, isto é, a partir de um mesmo ião precursor obter dois fragmentos, cujas transições denominam-se por transição de quantificação *MRM₁* e transição de confirmação *MRM₂*;
- razão entre as transições de quantificação e confirmação, *MRM₁/MRM₂*, visto que este rácio é característica de cada analito. Como critério de confirmação, usa-se o valor médio dessa razão associado a uma incerteza de $\pm 25\%$.

É de salientar que os critérios usados aquando da verificação da presença do analito nas amostras encontram-se retratados em documentos emitidos pela comissão europeia e pelo jornal oficial das comunidades europeias. Alguns dos documentos usados como referência são o jornal oficial das comunidades europeias - decisão da comissão datado a 12 de Agosto de 2002 juntamente com o documento "Guidance document on analytical quality control and method validation procedures for pesticide residues and analysis in food and feed" da comissão europeia.

3.7.2 Especificidade e Seletividade

Para análise deste parâmetro, é usual calcular-se a taxa de recuperação para avaliação de erros sistemáticos que possam influenciar o sinal do analito em estudo como o efeito matriz inerente da amostra. Para o seu cálculo recorre-se à expressão matemática descrita na equação (3.9), onde C_f corresponde à concentração total de analito na amostra, C_i corresponde à concentração de analito na amostra antes da sua fortificação, C_a corresponde à concentração de analito da solução usada na fortificação da amostra e $\%Rec$ indica a taxa de recuperação percentual.

$$\%Rec = 100 \times \left(\frac{C_f - C_i}{C_a} \right) \quad (3.9)$$

Após a obtenção das taxas de recuperação de cada analito associado a cada matriz, estas são válidas se forem reprodutíveis. Caso sejam reprodutíveis, as futuras taxas de recuperação, para serem aceites, devem ser comparadas com a taxa de recuperação média obtida em condições de precisão intermédia de cada composto associada à matriz respetiva com uma margem de aceitação de $\pm 25\%$. As taxas de recuperação podem diferir do valor ideal de 100% devido a vários fatores, tais como características inerentes da matriz e/ou do analito, perdas de analito durante o pré-tratamento de amostra, nomeadamente no passo de extração em fase sólida, entre outros.

É de referir que, para métodos que recorram à espetrometria de massa "tandem", estes podem usar outro parâmetro que avalia a especificidade. Esse parâmetro denomina-se por razão de confirmação, (*RC*), que se baseia no rácio entre a transição de quantificação e a transição de confirmação, como foi referido anteriormente. A expressão para o cálculo da razão de confirmação pode ser visualizada na equação 3.10. Esta razão é característica de cada analito e, portanto, deverá ser verificada aquando do estudo da linearidade de forma a obter-se o valor médio.

$$RC_i = \frac{MRM_{1(i)}}{MRM_{2(i)}} \quad (3.10)$$

3.7.3 Gama de trabalho

Relativamente a este parâmetro, deve-se optar por estudar uma gama de concentrações que vá ao encontro dos objetivos analíticos do laboratório. Para isso, deve-se ter em conta o limite de quantificação do método analítico implementado, com o objetivo final de cumprir com os decretos-lei em vigor.

Após a escolha da gama de concentrações a ser estudada, recomenda-se a preparação de 10 padrões (no mínimo 5) de concentrações diferentes distribuídos de forma igual pela gama de trabalho estipulada. Tem que ser feita de igual forma a leitura de 10 réplicas independentes do primeiro e último padrão de forma a avaliar a homogeneidade de variâncias nos extremos da curva de calibração.

Após as 10 leituras do primeiro e último padrão, calcula-se a variâncias de ambos mediante a equação (3.2) com base nos valores das leituras obtidas. Com a obtenção das variâncias, recorre-se à expressão 3.4 e compara-se com o valor crítico de F. Caso o valor de TV seja inferior ou igual ao valor crítico, as variabilidades entre o primeiro e último padrão são semelhantes, pelo que temos homogeneidade de variâncias. Caso o TV apresente um valor maior que o valor crítico, associado a um nível de significância de 0,01, então estamos perante um caso de heterogeneidade de variâncias, havendo a necessidade de escolher uma outra gama de trabalho de forma a repetir este parâmetro até se alcançar a homogeneidade. Uma outra alternativa seria a aplicação de diferentes contribuições (pesos) nos diferentes níveis de concentração.

3.7.4 Linearidade

A linearidade da resposta do método analítico pode ser avaliada de diferentes formas como por exemplo, através do teste de Rikilt (representação gráfica da sensibilidade relativa estimada em cada ponto da curva de calibração), através do coeficiente de determinação (R^2) (valor relativo que expressa a quantidade de informação reproduzida pela função ajustada), Resposta relativa (avaliação gráfica da aleatoriedade dos desvios em relação ao modelo ajustado). De acordo com as normas ISO para a calibração (ISO 8466-1 e 8466-2), a linearidade da resposta analítica deve ser testada segundo critérios estatísticos bem definidos - através da comparação do ajuste com polinómios de primeiro grau (modelo linear, $P_{(01)}$) ou de segundo grau (modelo quadrático, $P_{(012)}$) estimados através do método dos mínimos quadrados.

3.7.4.1 Teste de linearidade

A equação (3.11) representa a expressão genérica de uma função polinomial linear ($P_{(01)}$), onde b_0 representa a ordenada na origem e b_1 representa o declive da função.

$$P_{(01)} : \hat{y} = b_0 + b_1 \cdot x_i \quad (3.11)$$

Na expressão (3.12), é possível visualizar a função genérica de uma função quadrática, onde b_2 representa o coeficiente do termo quadrático da função polinomial, responsável pela perda de linearidade da resposta instrumental ao analito.

$$P_{(012)} : \hat{y} = b_0 + b_1 \cdot x_i + b_2 \cdot x_i^2 \quad (3.12)$$

Em cada caso ($P_{(01)}$ e $P_{(012)}$) o desvio padrão residual é estimado com recurso à equação (3.13),

$$\sigma_{fit} = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (y_i - \hat{y}_i)^2}{(n - p)}} \quad (3.13)$$

onde y_i representa o sinal obtido da leitura do padrão x_i e \hat{y}_i representa o sinal estimado pela função.

Segundo as normas ISO 8466-1 e 8466-2, após a obtenção dos parâmetros e estimativas relacionadas com o modelo linear ($P_{(01)}$) e quadrático ($P_{(012)}$), recorre-se à expressão (3.5), que se baseia na comparação da avaliação da diferença de variâncias do ajuste ($\sigma_{fit(2)}^2$) pelo desvio padrão residual obtido pelo modelo polinomial elevado ao quadrado. É de referir que a escolha do modelo (teste de linearidade) é uma fase crítica da calibração. Assim sendo o valor crítico associado a este teste corresponde ao nível de significância de $\alpha = 0.01$. No caso de exceder este valor crítico deve-se concluir que a calibração não é linear (a função $P_{(012)}$ ajusta melhor os valores obtidos). Neste caso, para evitar complicar o processo de calibração e quantificação procura-se encurtar na gama de trabalho de forma a obter uma região com dependência linear.

Apesar de a norma ISO 8466-1 ser omissa acerca deste assunto, é sempre importante avaliar o significado estatístico da ordenada na origem (b_0) no caso do modelo linear ($P_{(01)}$) para verificar se a curva de calibração está “sobre parametrizada” e se ele deve ou não ser excluído do modelo de ajuste. Este teste consiste em comparar o módulo de cada parâmetro (b_0 e b_1) com a respetiva incerteza padrão ($\sigma(b_0)$ e $\sigma(b_1)$), de uma forma genérica através do teste

$$TV = \frac{|b_i|}{\sigma(b_i)} \leq t_{0.01(n-2)}^b \quad (3.14)$$

em que as estimativas de erro são dadas por

$$\sigma^2(b_0) = \left(\frac{S_{x^2}}{(n \cdot S_x^2 - S_x \cdot S_x)} \right) \cdot \sigma_{fit}^2 \quad (3.15)$$

$$\sigma^2(b_1) = \left(\frac{n}{(n \cdot S_x^2 - S_x \cdot S_x)} \right) \cdot \sigma_{fit}^2 \quad (3.16)$$

sendo n o número de padrões da curva de calibração, S_x e S_{x^2} somas relativas a,

$$S_x = \sum_{i=1}^n x_i \quad (3.17)$$

$$S_{x^2} = \sum_{i=1}^n x_i^2 \quad (3.18)$$

3.7.4.2 Coeficiente de determinação

Relativamente ao cálculo do coeficiente de determinação, a obtenção deste acrescida de uma inspeção visual da representação dos dados experimentais podem servir como passo introdutório no estudo da linearidade, de

forma a avaliar a correlação entre as variáveis sinal instrumental e concentração do analito. O cálculo do coeficiente de determinação pode ser visualizado na expressão (3.19), onde x_i representa cada valor individual de concentração, \bar{x} o valor média das várias concentrações, y_i indica o sinal instrumental individual de uma determinada concentração respetiva e \bar{y} o média dos sinais instrumentais.

$$R^2 = \left(\frac{\sum_{i=1}^N [(x_i - \bar{x})(y_i - \bar{y})]}{\sqrt{\sum_{i=1}^N (x_i - \bar{x})^2 \sum_{i=1}^N (y_i - \bar{y})^2}} \right)^2 \quad (3.19)$$

3.7.4.3 Teste de Rikilt

Sobre o teste de Rikilt, este tem como objetivo verificar a dispersão de cada ponto experimental relativamente à curva de calibração obtida. Assim, é possível avaliar a consistência da sensibilidade da resposta ao analito. Para o seu cálculo pode ser visualizada a expressão (3.20) onde y_i e x_i representam, respetivamente, o sinal instrumental e a concentração de um determinado padrão e \bar{y}/\bar{x} representa a médias das razões sinal/concentração de todos os padrões. Idealmente, os valores obtidos seriam 100% para uma linearidade perfeita, no entanto, existe um desvio aceitável estipulado nos 20%, indicando que para toda a gama de trabalho, os valores obtidos deverão estar compreendidos entre os 80 e 120%.

$$\%Rkt_i = 100 \times \left(\frac{y_i/x_i}{\bar{y}/\bar{x}} \right) \quad (3.20)$$

3.7.4.4 Resposta Relativa

A resposta relativa é um teste que se realiza de forma a avaliar a distância entre o sinal obtido experimentalmente comparativamente ao sinal previsto pela reta de calibração. Na expressão (3.21) pode ser visualizada o cálculo a ser realizado, onde y_i e \hat{y}_i representam, respetivamente, o sinal instrumental e o sinal teórico previsto pela curva de calibração. Com este teste, obtêm-se um valor percentual cuja margem de aceitação não pode exceder os 15%. Este teste é particularmente útil para avaliar o quociente das diferenças individuais entre o sinal experimental e o teórico de cada padrão. Desta forma, mesmo que se obtenha um coeficiente de correlação perto de 1, é feita uma análise individual da contribuição dos valores obtidos de cada padrão.

$$\%Res_i = 100 \times \left(\frac{y_i}{\hat{y}_i} \right) \quad (3.21)$$

3.7.5 Sensibilidade

Para o cálculo da sensibilidade, recorre-se à expressão (3.22) onde Δy representa a variação do sinal experimental entre o primeiro e último padrão e Δx as respetivas concentrações.

$$Sens = \frac{\Delta y}{\Delta x} \quad (3.22)$$

Importa referir que, no caso de a função de calibração ser um polinómio de primeiro grau, a sensibilidade coincide com o parâmetro b_1 (declive).

3.7.6 Gama analítica

A gama analítica do método fica definida com base nos limiares analíticos (limite de deteção e limite de quantificação), no extremo inferior do intervalo de concentração, e o último padrão utilizado da curva de calibração.

3.7.6.1 Limite de deteção

O sinal correspondente ao limite de deteção, y_{LD} , pode ser estimado de três formas distintas, através da relação sinal ruído, $y(S/R)$, da estimativa de erro obtida na repetibilidade (S_r) ou através da estimativa de erro do ajuste da curva de calibração (σ_{fit}).

O cálculo com base na relação sinal/ruído pode ser visualizado na expressão (3.23), onde S representa o sinal instrumental e R o ruído, em que o nível de ruído pode ser obtido através da comparação da leitura de amostras com um baixo teor de analito conhecido com brancos.

$$y_{LD} = 3,30 \times y(S/R) \quad (3.23)$$

Através do ensaio de repetibilidade, quer de brancos ou de um padrão no limite inferior da gama de trabalho, o limite de deteção pode ser determinado pela equação (3.24),

$$y_{LD} = 3,30 \times S_r \quad (3.24)$$

onde S_r indica o desvio-padrão das leituras efetuadas.

Na expressão (3.25) encontra-se descrita a forma de estimar o sinal correspondente ao limite de deteção com base no desvio padrão residual da reta de calibração (σ_{fit}),

$$y_{LD} = 3,30 \times \sigma_{fit} \quad (3.25)$$

Sendo o limite de deteção geralmente expresso sob a forma de um limiar de concentração, estas expressões relativas a sinal ($y(LD)$) têm de ser convertidas em concentrações com base na função de quantificação¹.

3.7.6.2 Limite de quantificação

De modo similar, o valor da resposta correspondente ao limite de quantificação (y_{LQ}) pode ser estimado de três formas diferentes, através da relação sinal ruído (S/R), da estimativa de erro obtida na repetibilidade (S_r) ou através da estimativa de erro do ajuste da curva de calibração (σ_{fit}). Na expressão (3.26), o limite é calculado segundo a razão sinal/ruído, onde S e R representam, respetivamente, o sinal do padrão de baixa concentração e o ruído (proveniente de leitura de brancos).

¹A função de quantificação corresponde à função inversa da calibração. Por exemplo, sendo a calibração dada por $\hat{y}_i = b_0 + b_1 \cdot x_i$, a função de quantificação será dada por $\hat{x}_i = (y_i - b_0)/b_1$.

$$y_{LQ} = 10 \times y(S/R) \quad (3.26)$$

As outras duas formas baseiam-se igualmente num ensaio por repetibilidade de branco ou do primeiro padrão da curva de calibração e através do desvio-padrão residual da reta, definidas pelas expressões (3.27) e (3.28), respetivamente. Na equação (3.27), S_r representa o desvio-padrão das leituras efetuadas e, na expressão (3.28), σ_{fit} representa o desvio-padrão residual da reta e b_1 o declive.

$$y_{LQ} = 10 \times S_r \quad (3.27)$$

$$y_{LQ} = 10 \times \sigma_{fit} \quad (3.28)$$

No final todas estas expressões (y_{LQ}) terão de ser de igual modo convertidas nas respetivas concentrações a fim de servirem de estimativa de limite de quantificação em termos de concentração.

3.7.7 Precisão

Para o cálculo da precisão, existem várias formas tais como o cálculo de desvios padrão e coeficientes de variação. Estes parâmetros podem estar interligados a diferentes regimes, tais como de repetibilidade e de reprodutibilidade. Relativamente à análise da precisão em regime de precisão intermédia, trata-se de um regime intermédio entre os estudos por repetibilidade e reprodutibilidade.

A incerteza média associada à quantificação é designada de erro padrão médio (S_0)

$$S_0 = \frac{\sigma_{fit}}{b_1} \quad (3.29)$$

sendo a incerteza padrão relativa ($\%RSE_0$) dada por

$$\%RSE_0 = 100 \times \frac{S_0}{\bar{x}} \quad (3.30)$$

onde \bar{x} representa a média das concentrações dos padrões utilizados na curva de calibração.

O cálculo do desvio-padrão pode ser visualizado na expressão (3.2) enquanto que o coeficiente de variação encontra-se representado pela expressão (3.31). O coeficiente de variação é dado pelo quociente percentual da incerteza obtida em relação à respetiva estimativa central.

É de salientar que, no caso do método analítico contemplar modos de trabalho como o *MRM*, o cálculo do coeficiente de variação deverá abordar o rácio entre as transições de quantificação e de confirmação.

$$\%CV = 100 \times \frac{S}{\bar{x}} \quad (3.31)$$

3.7.8 Exatidão

Para se avaliar a exatidão do método analítico, pode-se recorrer a várias formas tais como os ensaios de recuperação, desvio relativo e z-score proveniente dos ensaios interlaboratoriais. Conhecendo-se o valor de referência (τ), o erro relativo percentual ($\%RE$) é estimado com base em

$$\%RE = 100 \times \left(\frac{x - \tau}{\tau} \right) \quad (3.32)$$

sendo x o valor obtido em laboratório.

A função de desempenho “z-score” é avaliada com base em estimativas inerentes ao ensaio interlaboratorial,

$$z = \frac{x - \mu}{\sigma} \quad (3.33)$$

onde x corresponde ao valor reportado do laboratório, μ indica a média e σ a incerteza provenientes do ensaio interlaboratorial.

Capítulo 4

Resultados e Discussão

Este capítulo encontra-se dedicado à apresentação e discussão dos resultados mais relevantes, obtidos na sequência do trabalho desenvolvido neste projeto. Primeiramente será mencionada a otimização de condições do equipamento, nomeadamente, o procedimento para a obtenção das condições ótimas cromatográficas e, relativamente ao detetor, os parâmetros ótimos para o modo de trabalho *MRM*. Após a otimização das condições, serão apresentados os resultados obtidos e seu tratamento para os parâmetros relativos à validação dos métodos.

4.1 Otimização de Condições

Para a otimização de condições, foram utilizadas soluções individuais de cada composto de concentração na ordem das microgramas por litro com o objetivo puramente qualitativo de se obterem os parâmetros ótimos relativamente à deteção dos analitos.

4.1.1 Condições cromatográficas

A otimização das condições cromatográficas foi conseguida de forma separada e independente, tanto para os pesticidas como para as microcistinas.

Relativamente aos pesticidas, como foi referido anteriormente, o objetivo deste trabalho baseia-se na extensão de um método existente a dois novos pesticidas. Deste modo, as condições do método cromatográfico a testar primeiramente serão as mesmas que as do método interno já estabelecido. A coluna cromatográfica usada foi a ACQUITY UPLC HSS T3 2,1*150 mm 1,8 μm (®) com as fases móveis descritas em 3.3.2.2 e 3.3.2.3, cujas condições testadas de todo o processo cromatográfico encontram-se referidas na tabela 4.1.

É de referir que o tempo de análise tem uma duração total de 15 minutos, um fluxo constante de 0,350 mL/min, o volume de injeção é de 10 μL e as temperaturas da coluna e do injetor automático são de $48,0 \pm 5,0$ e $8,0 \pm 5,0$ °C respetivamente. Após cada análise, o sistema é purgado com dois tipos de solvente de lavagem, contituídos por [90/10 (v/v)] água/metanol e [50/50 (v/v)] água/metanol, em que cada solvente de lavagem utiliza um volume correspondente a 1 mL.

Sobre as microcistinas, com a necessidade de estipular um método cromatográfico, recorreu-se à literatura existente sobre os analitos em questão. A partir da informação disponível, com a utilização da coluna ACQUITY UPLC HSS T3 2,1*150 mm 1,8 μm (®), definiram-se as condições cromatográficas a testar, estando estas discriminadas na tabela 4.2. O tempo de análise tem uma duração total de 15 minutos, com um fluxo

Tabela 4.1: Condições cromatográficas associadas à eluição dos pesticidas em estudo numa coluna de fase reversa (ACQUITY UPLC HSS T3 2,1*150 mm 1,8 μ m $\text{\textcircled{R}}$).

Tempo (minutos)	Fase móvel A (%)	Fase móvel B (%)
0	90	10
13	0	100
13,10	90	10

constante de 0,200 mL/min. O volume de injeção é de 10 μ L e as temperaturas respetivas da coluna e do injetor são $30,0 \pm 5,0$ e $8,0 \pm 5,0$ $^{\circ}\text{C}$.

Tabela 4.2: Condições cromatográficas associadas à eluição das microcistinas em estudo numa coluna de fase reversa (ACQUITY UPLC HSS T3 2,1*150 mm 1,8 μ m $\text{\textcircled{R}}$).

Tempo (minutos)	Fase móvel A (%)	Fase móvel B (%)
0	45	55
12	10	90
12,50	45	55
15	45	55

Após ter as condições cromatográficas definidas, avaliou-se de seguida as condições analíticas para o detetor (triplo quadrupolo) de forma a otimizar as condições de deteção de cada analito em estudo. Nas figuras 4.1 a 4.5 podem ser observados os cromatogramas de cada composto, evidenciando que, nas condições de eluição estabelecidas, os analitos podem efetivamente ser detetados separadamente dado as excelentes características dos sinais cromatográficos e a grande diferença nos seus tempos de retenção (t_r).

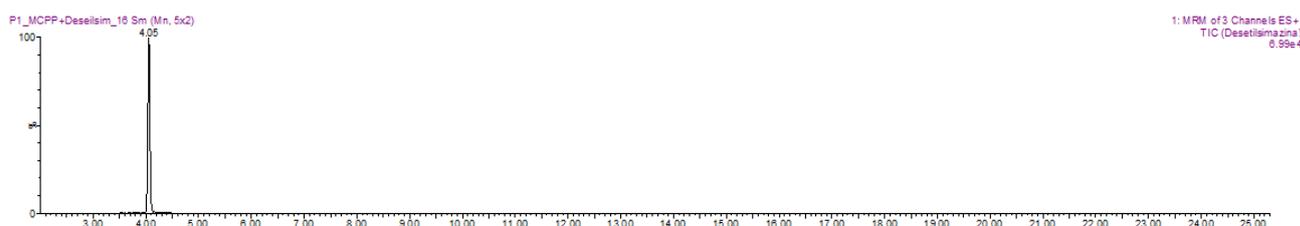


Figura 4.1: Cromatograma caraterístico da desetilsimazina ($t_r = 4.05$ min.; 0,200 mL/min)

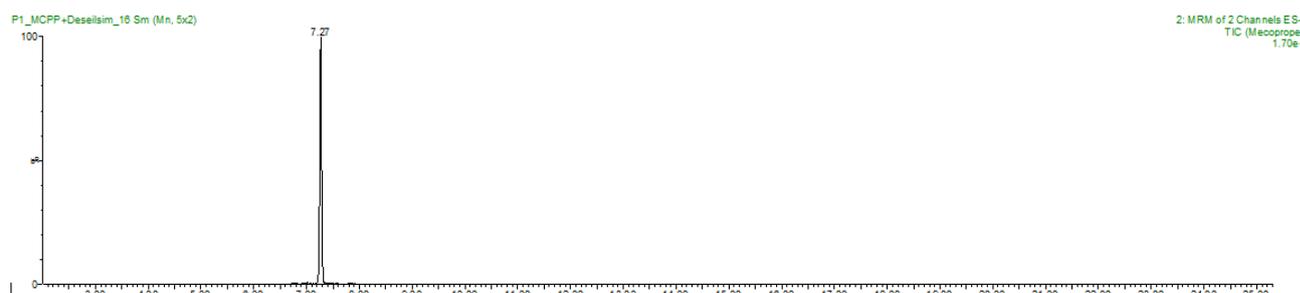


Figura 4.2: Cromatograma caraterístico do mecoprope ($t_r = 7.27$ min.; 0,200 mL/min).

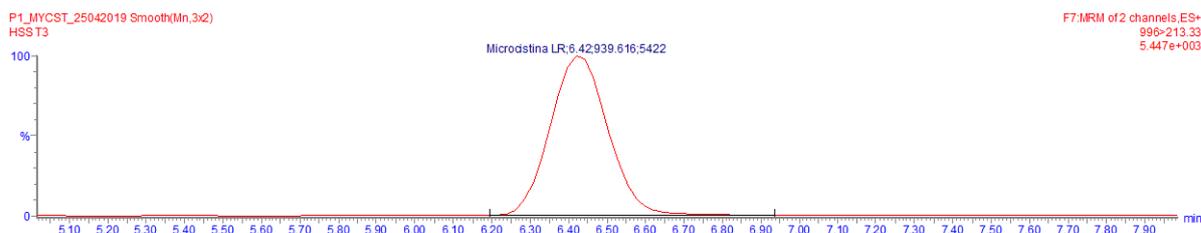


Figura 4.3: Cromatograma caraterístico da microcistina-LR ($t_r = 6,40$ min; 0,200 mL/min).

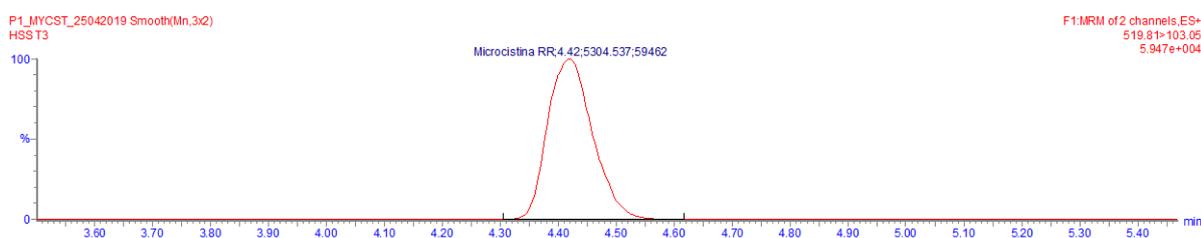


Figura 4.4: Cromatograma caraterístico da microcistina-RR ($t_r = 4,40$ min; 0,200 mL/min).

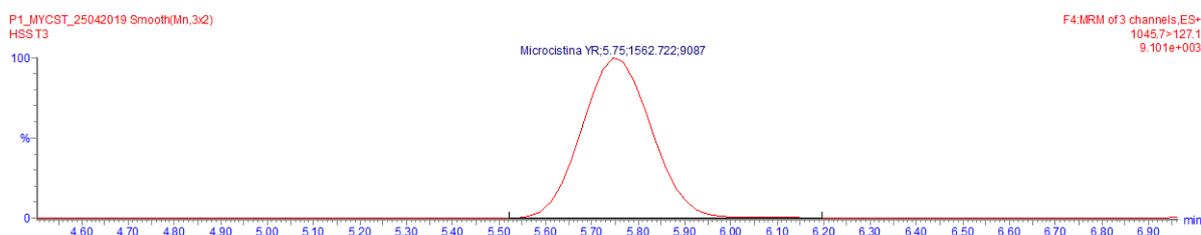


Figura 4.5: Cromatograma caraterístico da microcistina-YR ($t_r = 5,70$ min; 0,200 mL/min).

4.1.2 Otimização das condições do detetor de massas

Inicialmente, para cada analito, elaborou-se uma pesquisa bibliográfica com o objetivo de encontrar as razões massa/carga do ião precursor e dos seus fragmentos resultantes caraterísticos. Seguidamente, pretendeu-se otimizar as condições de forma a obter uma maior intensidade de sinal do ião precursor, condições essas que se resumem na escolha do modo de ionização (positivo ou negativo) e na voltagem do cone. A tensão capilar estabeleceu-se sempre nos 3,5 kV. Após a obtenção da voltagem de cone ótima, procurou-se achar a energia de colisão mais apropriada para se obter os dois fragmentos com uma intensidade de sinal maior e, concomitantemente, verificar a existência do ião precursor que originou os fragmentos.

4.1.2.1 Otimização da voltagem do cone

Para a obtenção da energia de cone ótima, efetuaram-se vários varrimentos no primeiro quadrupolo (modo *full scan*) dentro de uma gama de razões massa/carga, incluída na gama pré-definida a razão m/z específica do ião precursor caraterístico do analito em estudo. Cada varrimento foi efetuado com uma energia de cone diferente, com o objetivo de encontrar a energia ótima que resulte na formação do ião precursor. Na figura 4.6 podemos visualizar um gráfico onde mostra a intensidade do sinal do ião precursor em função da voltagem de cone, para a desetilsimazina, cujo procedimento foi efetuado para todos os compostos em estudo. Pela

análise do gráfico, podemos verificar que a voltagem correspondente à maior intensidade de sinal para o ião precursor do analito DIA é de 20 Volts.

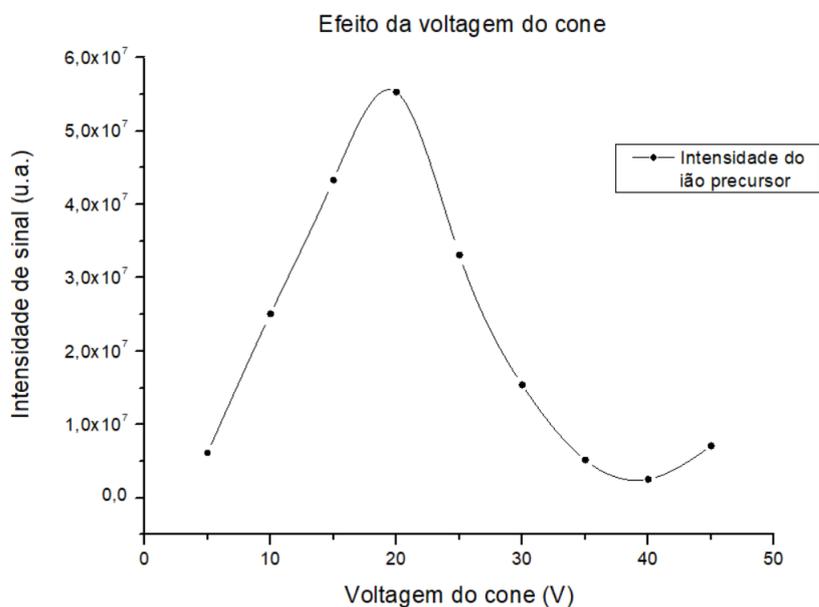


Figura 4.6: Efeito da voltagem do cone relativamente à intensidade do ião precursor do analito DIA.

4.1.2.2 Otimização da energia de colisão

Após a otimização da voltagem do cone, pretendeu-se otimizar a energia de colisão de forma a ser possível a obtenção de dois fragmentos provenientes do mesmo ião precursor. Para a otimização da energia de colisão, o modo de trabalho escolhido para o detetor de massas foi o varrimento de iões produto (*Product Ion Scan*). Na figura 4.7 podemos visualizar um espectro de massa obtido da DIA que demonstra os vários fragmentos provenientes do mesmo ião precursor, com a energia de colisão de 20 eV. Esta energia de colisão foi a que demonstrou uma maior intensidade de sinal de um dos fragmentos e, no sentido de maximizar a sensibilidade do método, foi esta a energia de colisão escolhida para a uma das transições. Por análise da figura, podemos verificar que os fragmentos que demonstram uma maior intensidade de sinal têm uma razão m/z de 96,31 e de 104,26.

Na figura 4.8 podemos visualizar a variação das intensidades de sinal do ião precursor e dos dois fragmentos resultantes em função da energia de colisão. A partir da análise da figura podemos observar que a energia de colisão correspondente a 20 eV é a que leva à maximização da intensidade de sinal do fragmento de razão 96 m/z e, para uma energia de colisão de 25 eV, a intensidade de sinal é máxima para o fragmento de razão 104 m/z . Desta forma, todas as condições inerentes à espectrometria de massa *tandem* para a deteção da DIA foram otimizadas.

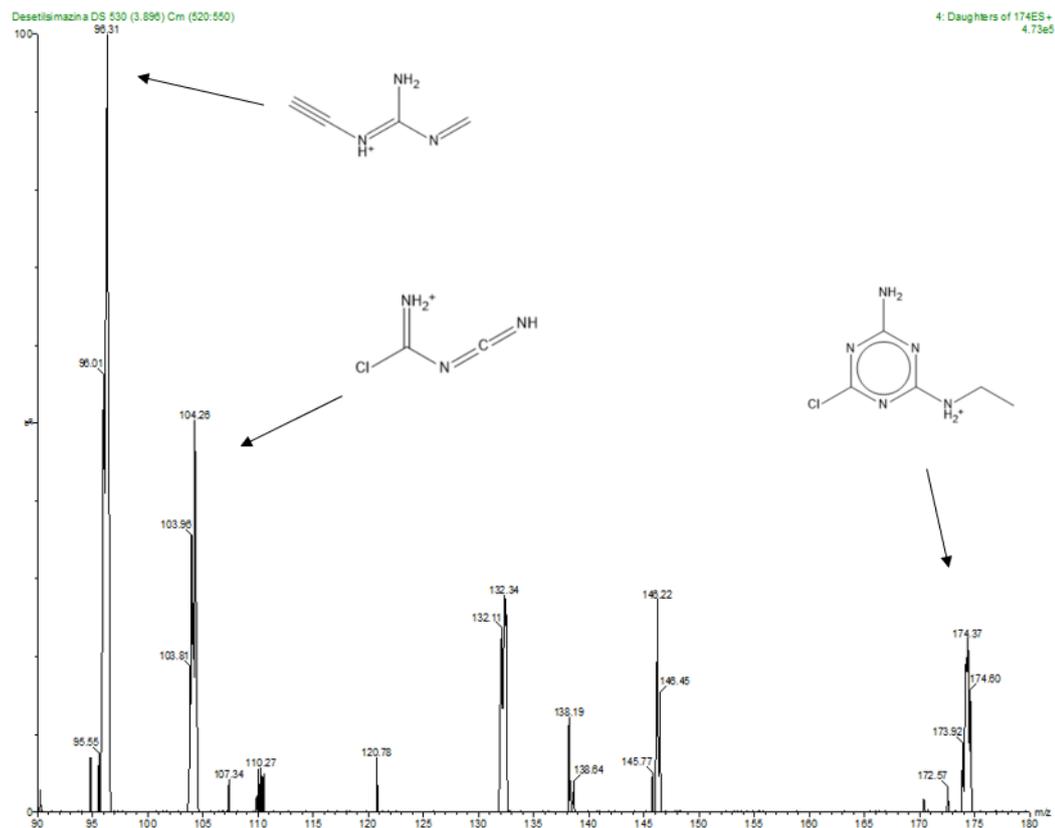


Figura 4.7: Espectro de massa do analito DIA com energia de colisão de 20 eV. É possível visualizar as estruturas químicas dos fragmentos ($m/z = 96, 31$; $104, 26$) e íon precursor ($m/z = 174, 37$) associadas ao espectro de massa.

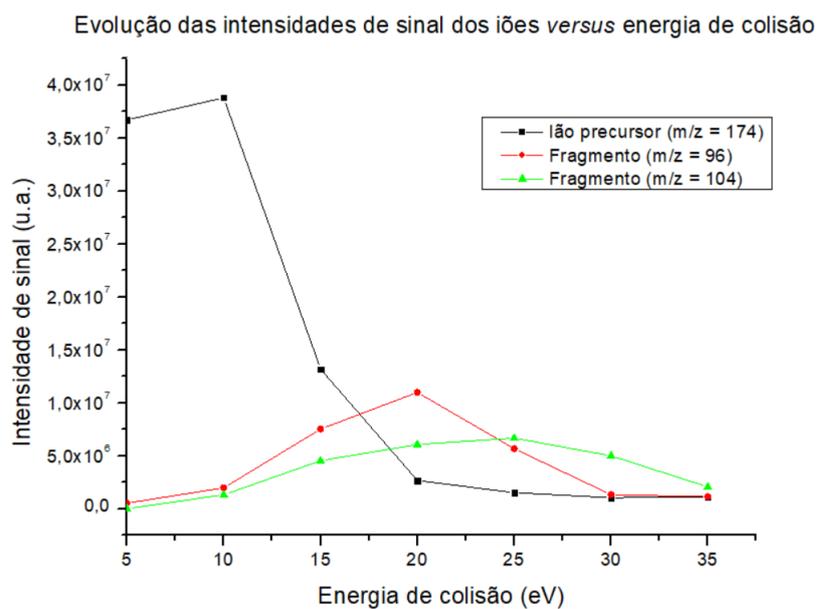


Figura 4.8: Intensidade de sinal dos íons em função da energia de colisão para o analito DIA.

4.1.2.3 Resumo das condições otimizadas de MRM

Com a otimização das condições do detetor de massas, foi possível determinar todos os parâmetros a utilizar de forma a tornar possível a execução do modo de trabalho MRM para cada analito. Na tabela 4.3 encontra-se um resumo das condições otimizadas para a detecção dos analitos em causa juntamente com os tempos de retenção característicos, onde t_r representa tempo de retenção, V_{cone} representa a voltagem de cone e $E_{colisão}$ indica a energia de colisão. É de salientar que no caso do MCP, existe não um mas dois iões precursores devido à existência de dois isótopos de cloro estáveis, nomeadamente ^{35}Cl e ^{37}Cl . A diferença entre razões m/z dos iões precursores é igual à diferença de massa dos isótopos de cloro referidos, sendo por isso, a justificação da diferença nas razões m/z dos iões precursores.

Tabela 4.3: Resumo das condições otimizadas dos analitos em estudo.

Analitos	Mw ($g\ mol^{-1}$)	Ionização	t_r (min)	lão Precursor(m/z)	V_{cone} (V)	lão Quantificação	$E_{colisão}$	lão Confirmação	$E_{colisão}$
DIA	173,6	ESI+	3,9	174,37	20	96,31	25	104,26	20
				212,69	26	141,04	10	-	-
MCP	214,6	ESI-	7,1	214,78	26	-	-	143,13	10
				995,6	80	135,3	60	213,3	60
MC-LR	995,2	ESI+	6,4	519,8	41	135,1	36	103,1	42
MC-RR	1038,2	ESI+	4,4	1045,7	62	135,1	70	127,1	85

Com base nos vários valores de razão m/z dos diferentes compostos, foi possível encontrar não só na literatura como também com o auxílio do software *Competitive Fragmentation Modeling for Metabolite Identification*, as estruturas dos iões correpondentes. Na figura 4.9, 4.10, 4.11 e 4.12 é possível visualizar as estruturas dos iões precursores e respetivos fragmentos dos analitos MCP, MC-LR, MC-RR e MC-YR.

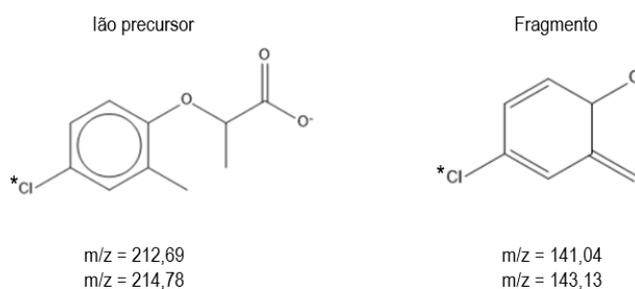


Figura 4.9: Estruturas dos iões resultantes das condições MRM otimizadas para o mecoprope. Existem duas razões m/z para cada estrutura devido à existência de isótopos de cloro ^{35}Cl e ^{37}Cl , assinalados com um asterisco (*)

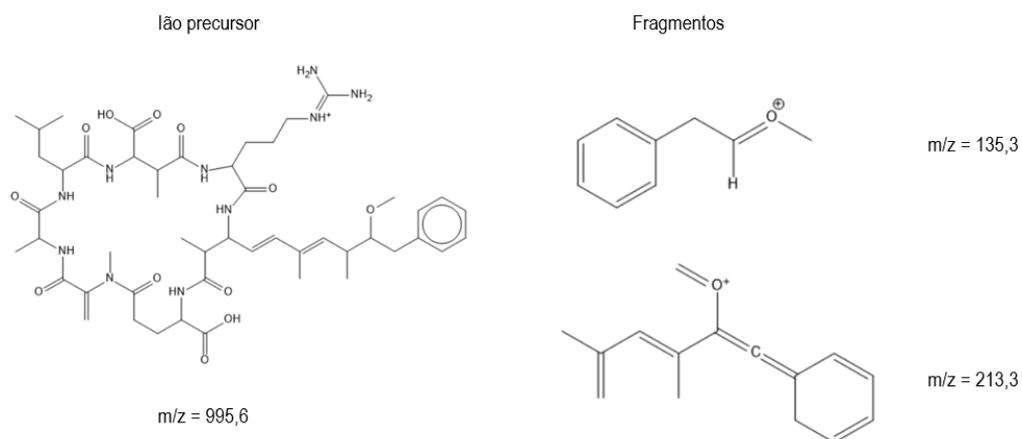


Figura 4.10: Estruturas dos íões resultantes das condições MRM otimizadas para a MC-LR.

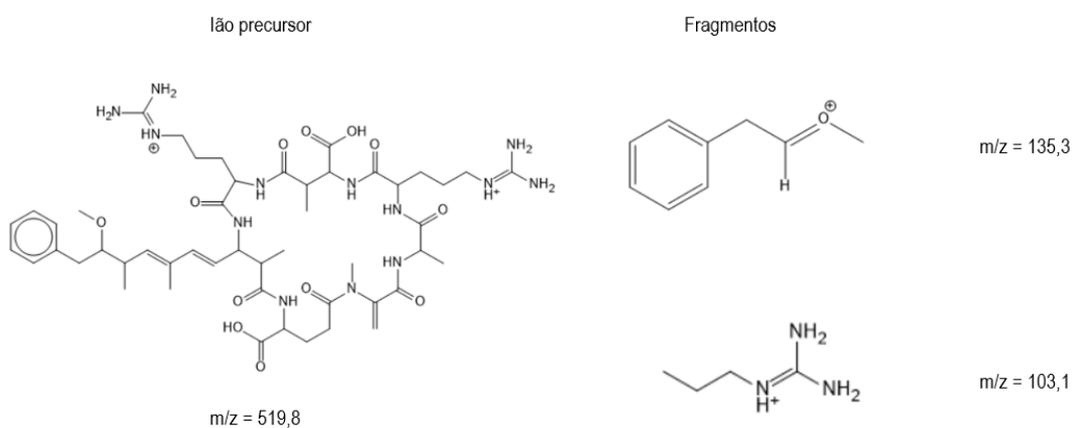


Figura 4.11: Estruturas dos íões resultantes das condições MRM otimizadas para a MC-RR.

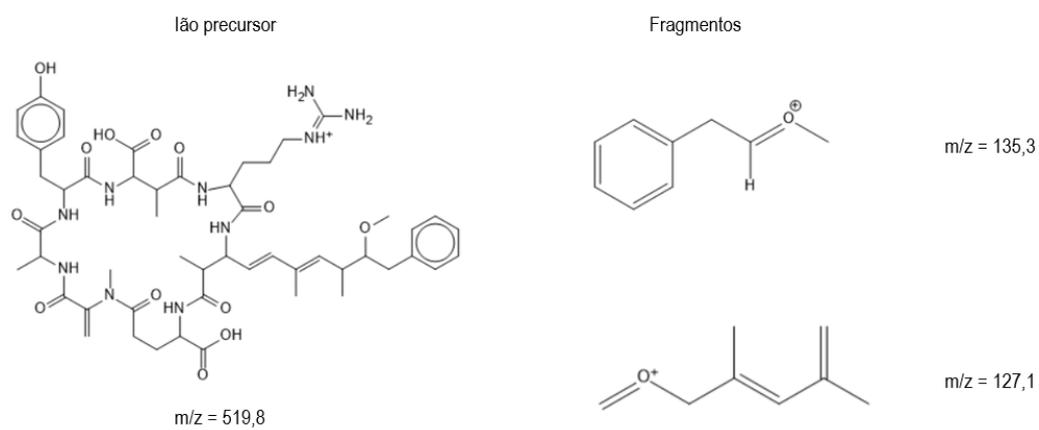


Figura 4.12: Estruturas dos íões resultantes das condições MRM otimizadas para a MC-YR.

4.2 Curvas de calibração

Com base nos valores paramétricos publicados na legislação para estes cinco analitos para águas de consumo humano (decreto-lei nº 152/2017 de 7 de Dezembro) e nos cálculos efetuados para a concentração dos analitos nas amostras (ver secção 3.3.2.9 e 3.3.4.6) estabeleceu-se como gama analítica de interesse para os pesticidas (DIA e MCPP) e para as microcistinas (MC-LR, MC-RR e MC-YR) os intervalos de concentrações 14 a 74 $\mu\text{g/L}$ e de 50 a 150 $\mu\text{g/L}$, respetivamente (ver secção 1.2.1 e 1.2.2). Para cada analito foram preparadas várias retas de calibração independentes. Para evitar ser fastidioso na apresentação dos respetivos resultados iremos descrever em detalhe o processo de validação de uma dessas curvas de calibração.

4.2.1 Homogeneidade de Variâncias

Antes de iniciar o ajuste das curvas de calibração importa estimar a variabilidade do sinal instrumental ao longo da curva de calibração. De acordo com as recomendações para a curva de calibração (ISO 8466-1 e 8466-2), o teste de homogeneidade da variância foi efetuado com dez réplicas no primeiro (x_1) e último padrão (x_N), correspondendo aos padrões de menor e maior concentração. Na tabela 4.5 encontram-se retratados os diferentes valores obtidos para o cálculo do teste estatístico referido provenientes dos limites da gama de linearidade estudada.

Tabela 4.4: Valores obtidos para a avaliação da variabilidade da resposta aos diferentes analitos obtida em condições de repetibilidade.

Analitos	Padrões	Rep01	Rep02	Rep03	Rep04	Rep05	Rep06	Rep07	Rep08	Rep09	Rep10
MCPP	x_1	445	464	447	436	417	367	495	478	472	439
	x_N	2248	2290	2250	2400	2471	2253	2376	2334	2250	2287
DIA	x_1	1399	1423	1342	1583	1310	1479	1366	1278	1222	1238
	x_N	6202	6810	6179	6263	6541	6479	6710	6941	6479	6186
MC-LR	x_1	28331	28234	27797	27846	27215	26730	27312	27506	28186	27992
	x_N	78656	76452	78606	77504	78456	77755	76853	80009	77203	78256
MC-RR	x_1	290702	285545	290057	287479	280389	268142	272009	272654	283612	276521
	x_N	1304379	1272358	1326982	1350527	1341109	1284602	1322273	1317564	1293078	1318506
MC-YR	x_1	16862	18636	17975	18392	17593	17662	19018	17106	16619	16897
	x_N	73648	70615	69214	75235	69681	69588	70755	68701	70428	70195

Rep?? - réplicas efetuadas; x_1 e x_N - primeiro e último padrão da curva de calibração.

Com base nos valores da tabela 4.4, foi efetuado um rastreio inicial para eventuais valores discrepantes da média segundo o teste de Grubbs (ver secção 3.6.3). Como estimativas central e de dispersão para o mecoprope, obteve-se respetivamente 16.1 (1.3) e 88.2 (2.9) em ambos casos com $n = 10$. O maior valor teste obtido (eq. 3.3) foi $TV(G) = 2.11$ relativo ao mínimo no nível de concentração mais baixo. Como este valor não excede o valor crítico de Grubbs ($\alpha = 0.05$, $n = 10$) que é de 2.29, ver tabela A.1, permite-nos concluir que não existem valores discrepantes e por isso considera-se ambas leituras validadas. As restantes leituras dos padrões da tabela 4.4 foram de igual modo processadas para verificar a presença de valores anómalos e não foram também encontrados eventuais valores discrepantes o que nos permitiu também validar esses resultados.

Dado que se trata de uma das fases relevantes na curva de calibração a aceitação da hipótese nula (homogeneidade da variância) é efetuado ao nível de confiança de 99% ($\alpha = 0.01$). No sentido de melhor compactar toda a informação, na tabela 4.5 encontra-se um resumo dos resultados obtidos com os cinco analitos estudados referentes ao teste de homogeneidade da variância.

Tabela 4.5: Cálculo da homogeneidade de variâncias para os cinco analitos de interesse.

Analitos	x_1 ($\mu\text{g/L}$)	x_N ($\mu\text{g/L}$)	TV	$p[H_0]$
MCPP	14	74	4.61	0.033
DIA	14	74	6.02	0.013
MC-LR	50	150	4.07	0.048
MC-RR	40	140	6.40	0.011
MC-YR	50	150	6.28	0.012

x_1 e x_N - primeiro e último padrão da curva de calibração;

TV - valor de teste (homogeneidade); $p[H_0]$ - valor de prova.

Por análise dos valores da tabela 4.5, verifica-se que em dois casos (calibração da resposta ao MCPP e de ao MC-LR) existem fortes evidências para haver homogeneidade da variância ($p[H_0] \geq 0.03$). Já nos restantes casos (calibração ao DIA, MC-RR e MC-YR) o valor de prova aproxima-se muito do limite de aceitação ($p[H_0] > 0.01$) nunca ficando abaixo desse valor. Assim sendo, para todos os analitos em estudo, o processo de ajuste das respetivas curvas de calibração foi efetuado segundo o método de mínimos quadrados não ponderados.

4.2.2 Testes de linearidade

Para avaliar a linearidade da resposta aos diferentes analitos, realizaram-se os procedimentos descritos na secção 3.7.4, nomeadamente, o teste estatístico de Mandel, coeficiente de correlação, estabilidade da razão de confirmação (RC) relativas às transições MRM_1 e MRM_2 , o teste de Rikilt e Resposta relativa. Os procedimentos referidos serão executados para um exemplar de uma das curvas de calibração obtida para os vários compostos em estudo, cujos valores experimentais obtidos encontram-se descritos nas tabelas 4.6 e 4.7. As curvas de calibração foram preparadas de forma a respeitar as condições da norma ISO 8466-1, nomeadamente a utilização de pelo menos cinco padrões de concentrações diferentes para estabelecer uma curva de calibração.

Tabela 4.6: Concentração dos padrões e respetivos sinais instrumentais relativos à DIA e MCPP.

Padrões	Concentração / ($\mu\text{g/L}$)	Sinal instrumental / (u.a.)	
		DIA	MCPP
x_1	14	1364	446
x_2	24	2063	788
x_3	34	3234	1115
x_4	44	–	1391
x_5	54	4871	1696
x_6	64	5748	1905
x_7	74	6479	2316

Tabela 4.7: Concentração dos padrões e respectivos sinais instrumentais relativos às microcistina LR, RR e YR.

Padrões	Concentração/($\mu\text{g/L}$)	Sinal instrumental/(u.a.)		
		MC-LR	MC-RR	MC-YR
x_1	40	–	280711	–
x_2	50	27715	–	17676
x_3	60	–	494419	24277
x_3	75	41429	–	–
x_4	80	–	592395	31738
x_5	100	55002	797118	–
x_6	120	–	–	51595
x_7	125	67992	–	–
x_8	140	–	–	65104
x_9	150	77975	1269614	70806
x_{10}	160	–	1313138	–

Nas figuras seguintes representa-se a resposta analítica ao DIA e MCPP (fig. 4.13), ao MC-LR e MC-YR (fig. 4.14) e à MC-RR (fig. 4.15).

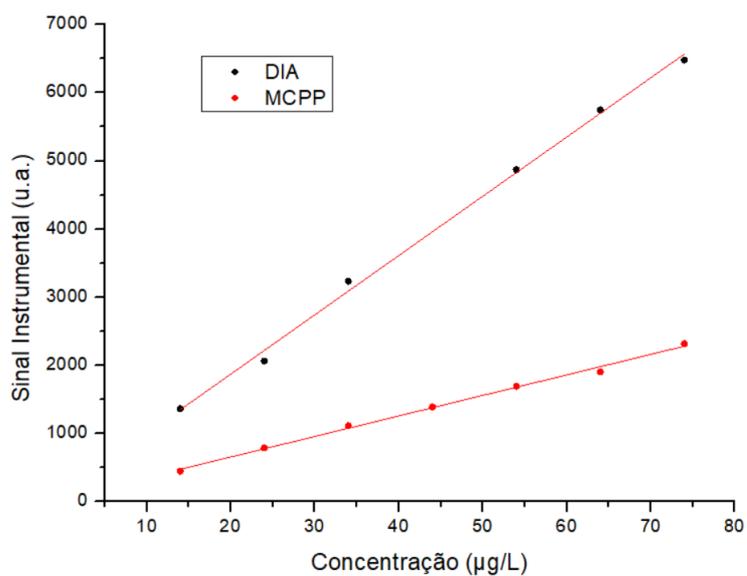


Figura 4.13: Curvas de calibração dos analitos DIA e MCPP. É possível visualizar os ajustes lineares para cada analito, representados pelas retas. Os dados característicos das retas encontram-se retratados na tabela 4.8.

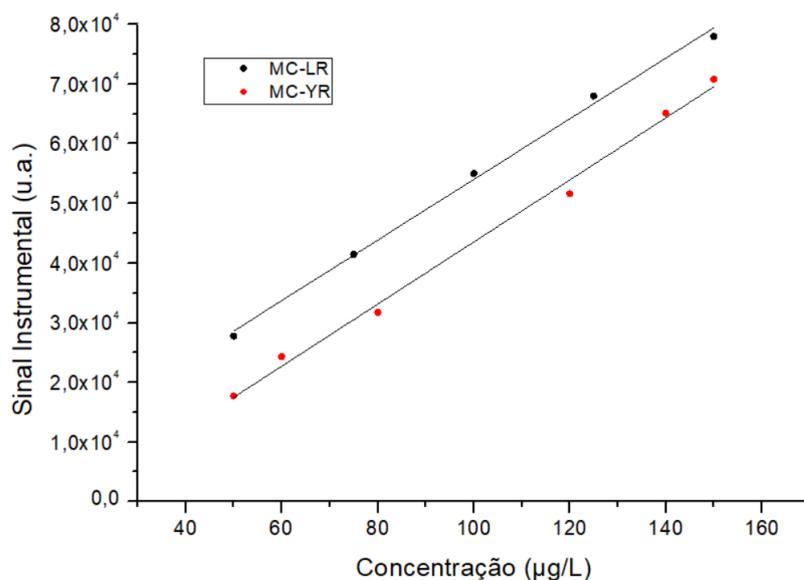


Figura 4.14: Curvas de calibração dos analitos MC-LR e MC-YR. É possível visualizar os ajustes lineares para cada analito, representados pelas retas. Os dados característicos das retas encontram-se retratados na tabela 4.8.

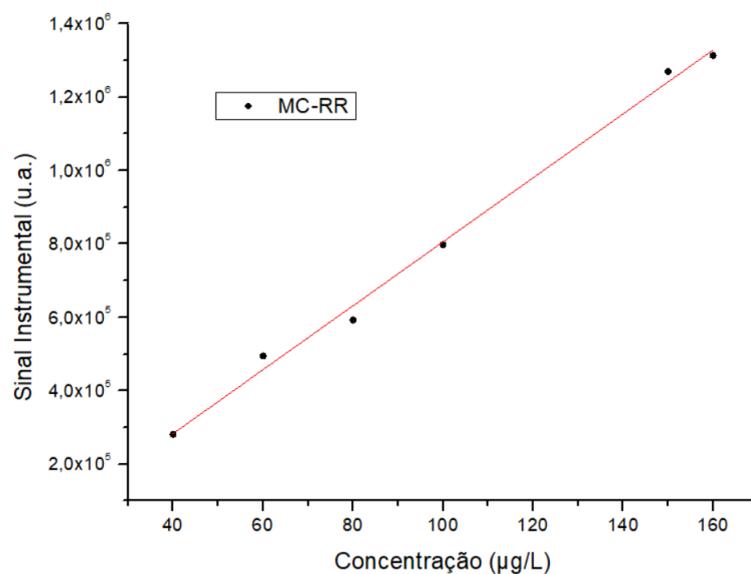


Figura 4.15: Curva de calibração da MC-RR. É possível visualizar o ajuste linear respetivo, representado pela reta. Os dados característicos da reta encontra-se retratados na tabela 4.8.

4.2.2.1 Escolha do modelo

Após a obtenção dos resultados instrumentais aos padrões da curva de calibração, tabelas 4.6 e 4.7, verificou-se a linearidade da resposta a cada um dos analitos com base no teste de Mandel, anteriormente descrito na secção 3.7.4. Na tabela 4.8 podemos visualizar os valores obtidos para os parâmetros calculados que escrevem as curvas de calibração de cada um dos analitos.

Tabela 4.8: Diagnóstico da linearidade da resposta instrumental aos diferentes analitos, diagnóstico de valores discrepantes e avaliação do significado estatístico das estimativa paramétricas do modelo de calibração ajustado aos valores previamente indicados em 4.6 e 4.7.

Analitos	n	Gama	R^2	TV	$p[H_0]$	b_i	$b_i(\sigma(b_i))$	$\%RSE(b_i)$	$TV[b_i = 0]$	$p[b_i = 0]$
DIA	6	14-74	0,9973	0,91	0,410	b_0	$1,3 (1,1) \times 10^2$	84,6	1,19	0,299
						b_1	$8,7 (0,23) \times 10^1$	2,6	38,19	0,000
MCPP	7	14-74	0,9962	0,02	0,894	b_0	$5,6 (4,0) \times 10^1$	71,4	1,39	0,224
						b_1	$3,0 (0,08) \times 10^1$	2,7	36,19	0,000
	6*	14-74	0,9993	1,07	0,896	b_0	$3,7 (1,8) \times 10^1$	48,7	2,06	0,109
						b_1	$3,1 (0,04) \times 10^1$	1,3	76,61	0,000
MC-LR	5	50-150	0,9976	10,54	0,083	b_0	$3,2 (1,8) \times 10^3$	56,3	1,76	0,177
						b_1	$5,1 (0,17) \times 10^2$	3,3	29,68	0,000
MC-RR	6	40-160	0,9955	0,18	0,700	b_0	$-6,4 (3,1) \times 10^4$	48,4	2,05	0,110
						b_1	$8,9 (0,41) \times 10^3$	4,6	21,64	0,000
MC-YR	6	50-150	0,9951	4,89	0,114	b_0	$-8,5 (2,0) \times 10^3$	23,5	3,51	0,025
						b_1	$5,2 (0,18) \times 10^2$	3,4	28,49	0,000

n - número de padrões na curva de calibração; (*) estimativas obtidas após a remoção de um valor discrepante;

Gama - valores limite da concentração dos padrões ($\mu g/L$); R^2 - coeficiente de determinação;

TV - valores de teste relativos ao teste de Mandel (teste de linearidade); $p[H_0]$ - valor de prova (teste de linearidade);

$TV[b_i = 0]$ - valores de teste relativos à avaliação do significado estatístico dos parâmetros do modelo (b_0 e b_1);

$p[b_i = 0]$ - valores de prova relativos à avaliação do significado estatístico dos parâmetros do modelo (b_0 e b_1).

Como se pode verificar da tabela 4.8 a resposta linear descrita com $P_{(01)}$ é satisfatória em todos os casos ($R^2 > 0.995$). No teste de linearidade (teste de Mandel) a hipótese que prevalece é nitidamente a hipótese nula ($p[H_0] \gg 0.01$) o que demonstra a preferência para o ajuste com polinómio de primeiro grau ($P_{(01)}$) em vez de polinómio de segundo grau ($P_{(012)}$) ou seja, todas as curvas de calibração apresentam comportamento linear.

Em termos de significado estatístico dos parâmetros estimados, em todos os casos apenas o declive (b_1) possui significado estatístico ($p[b_1 = 0] < 0.01$) (o valor de prova é inferior a um nível de significância de 0,01) enquanto que a ordenada na origem (b_0) não tem significado estatístico ($p[b_0 = 0] > 0.05$) (o valor de prova é superior ao nível de significância de 0,05).

4.2.2.2 Deteção de valores discrepantes na curva de calibração

Após a escolha do modelo que corresponde ao melhor ajuste para as curvas de calibração experimentais, é relevante verificar a existência de eventuais valores discrepantes. A título exemplificativo vamos apresentar o processo de verificação de valores discrepantes numa das curvas de calibração obtida para o composto DIA, não coincidente com os resultados da tabela 4.6, cujos pontos experimentais encontram-se apresentados na tabela 4.9, e a representação gráfica na figura 4.16.

Tabela 4.9: Resultados obtidos numa das várias curvas de calibração da resposta analítica ao pesticida DIA onde foi detetado um valor discrepante.

Padrões	Concentração/ $(\mu\text{g/L})$	Sinal instrumental/ (u.a.)
x_1	14	1621
x_2	24	2507
x_3	34	3168
x_4	44	3771
x_5	54	5053
x_6	64	5283
x_7	74	5977

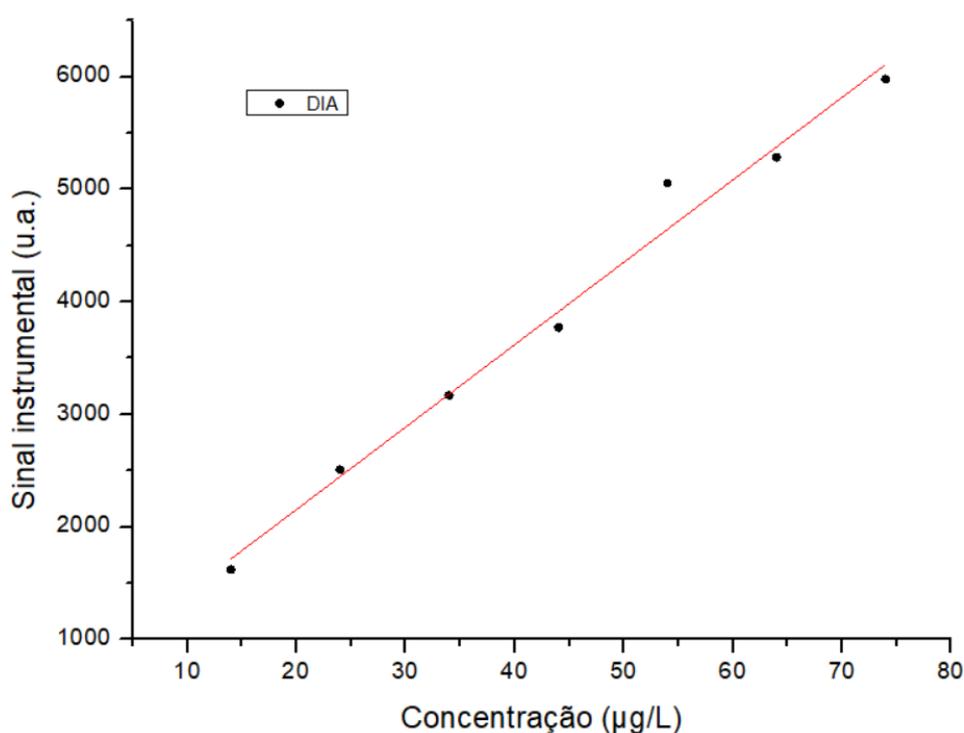


Figura 4.16: Representação dos valores da tabela 4.9 e respetiva curva de calibração para o pesticida DIA.

Como se pode verificar por inspeção visual da figura 4.16, o padrão x_5 é aquele que se encontra mais afastado da reta de ajuste comparativamente aos respetivos padrões. A obtenção de um valor de 0,985 para o coeficiente de determinação, demonstrando falta de linearidade, suporta a suspeita do padrão x_5 . Trata-se do ponto experimental mais discrepante e, portanto, deve-se verificar a exclusão ou não deste ponto.

Para determinarmos, através da estatística, qual o ponto a testar, podemos fazê-lo através do cálculo de diferenças entre o sinal experimental e teórico. Com base nos valores dos sinais teórico e experimental de cada solução padrão, realizamos uma subtração de forma a saber qual a solução padrão apresenta uma maior diferença entre os valores. Após a obtenção das sete diferenças (visto que se tratam de sete pontos experimentais), é importante dividir cada diferença calculada pelo desvio padrão de todas as diferenças de forma a que estas possam ser comparáveis entre si. Na figura 4.17 é possível visualizar os desvios entre o sinal previsto (\hat{y}_i) e o respetivo valor experimental (y_i) de cada padrão. Ambas as diferenças foram verificadas de igual forma por regressão robusta, podendo ser visualizada na figura 4.18 os desvios existentes. Em ambos

os processos de verificação de pontos discrepantes na calibração, obtêve-se o mesmo padrão a testar.

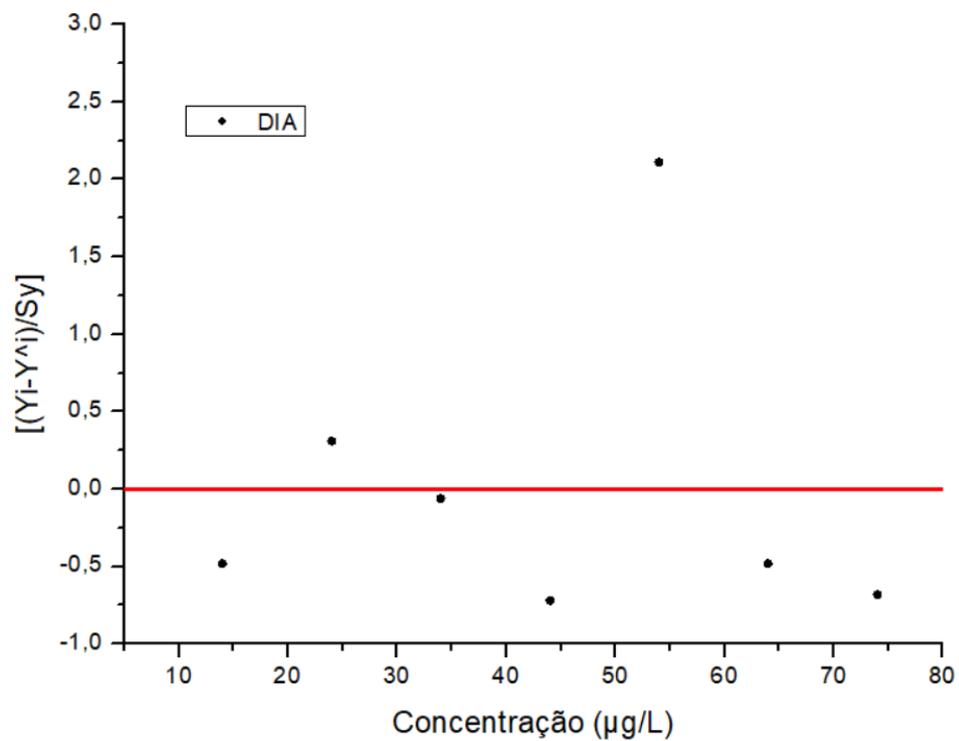


Figura 4.17: Representação gráfica dos desvios entre os sinais teóricos e experimentais das soluções padrão do analito DIA. A linha a vermelho representa o desvio nulo.

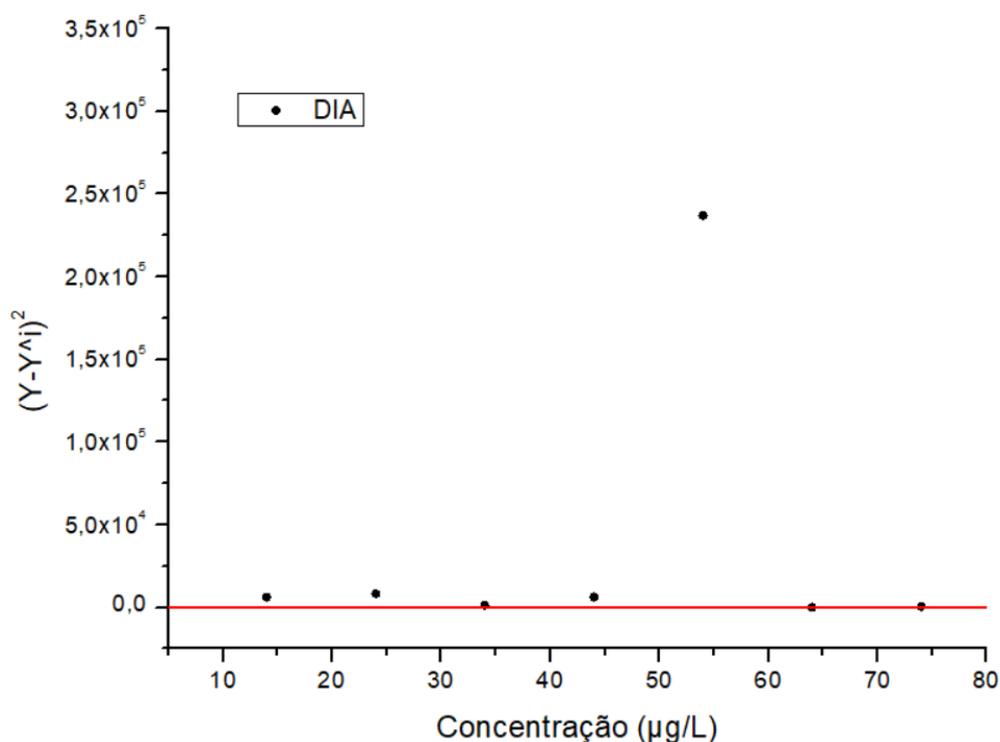


Figura 4.18: Representação gráfica dos desvios entre os sinais teóricos e experimentais das soluções padrão do analito DIA por regressão robusta.

Como pode ser visualizado, tanto por inspeção visual na figura 4.16, o padrão x_5 é aquele que apresenta uma maior discrepância relativamente aos restantes padrões. Com a utilização da expressão (3.8), obteve-se um $TV = 37,43$ relativamente ao padrão P_5 da curva de calibração. Dado o valor crítico de F, $F_{0,01(1;4)}^u = 21,20$, este padrão deverá ser removido da calibração. O teste foi de novo efetuado para o padrão P_4 , padrão esse que obteve um maior resíduo comparativamente aos restantes padrões, obtendo-se um $TV = 4,42$. Sendo o valor crítico de $F_{0,01(1;3)}^u = 34,12$, este padrão deverá ser mantido na curva de calibração. Assim, a remoção de outliers considera-se concluída, resultando numa curva de calibração com 6 pontos experimentais.

O passo de deteção de *outliers* foi verificado para as seis retas de calibração anteriormente descritas, ficando discriminadas na tabela 4.8, com alterações apenas para o analito MCPP. Os valores modificados encontram-se realçados com um asterisco (*).

Como se pode verificar na tabela, com a eliminação dos *outliers* nas retas de calibração relativas ao composto MCPP, o valor de R^2 aumentou ligeiramente, nomeadamente de 0,996 para 0,999. Desta forma, podemos verificar que a presença de *outliers* nas retas de calibração podem provocar uma diminuição no valor do coeficiente de determinação devido ao aumento de variabilidade residual. É de salientar que os restantes testes a efetuar nas retas de calibração serão feitos apenas nas mesmas sem a presença de valor discrepantes.

Na figura 4.19 encontra-se representada a reta de calibração da DIA sem *outliers*.

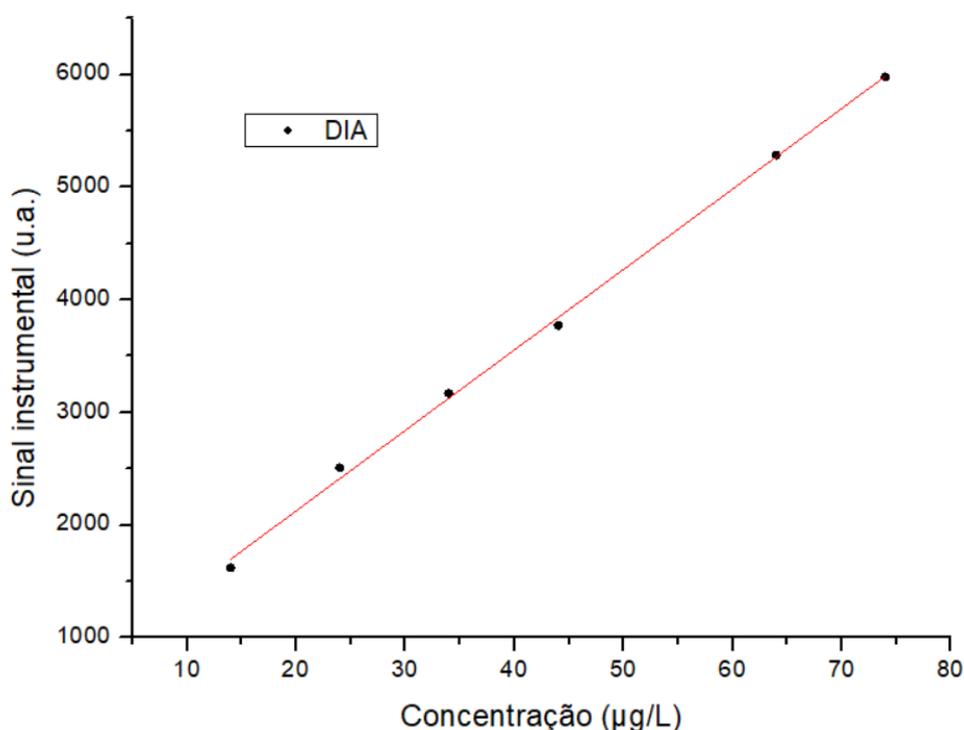


Figura 4.19: Reta de calibração da DIA com base na tabela 4.6 sem *outliers*.

4.2.2.3 Significado estatístico dos parâmetros

Após o ajuste com o modelo linear em todas as curvas de calibração anteriormente descritas, observou-se que a incerteza relativa da ordenada na origem, $\%RSE(b_0)$, era elevada (os valores variavam entre 23,5 a 84,6%) enquanto que no caso do declive (b_1), esta era significativamente menor (valores situados entre 1,3 e 4,6%). Assim sendo, efetuou-se um teste estatístico para verificar se estas estimativas paramétricas possuíam significado estatístico. Como se pode verificar da tabela 4.8, todos os declives estimados (b_1) possuem significado estatístico mas as respetivas ordenadas na origem (b_0) não possui significado estatístico em nenhuma das calibrações apresentadas. Assim sendo, o modelo que irá permitir efetuar melhor quantificação deve ser aquele que apenas depende do declive. Na tabela 4.10 encontra-se um resumo de alguns parâmetros de desempenho mais relevantes das novas calibrações efetuadas com $P_{(.1)}$.

Tabela 4.10: Caracterização das curvas de calibração obtidas através do ajuste polinomial com $P_{(.1)}$ (apenas um parâmetro de ajuste, o declive b_1).

Analitos	n	Gama	R^2	σ_{fit}	$b_1 (\sigma(b_1))$
DIA	6	14-74	0,9993	13	89,4 (1,0)
MCP	6	14-74	0,9997	25	31,6 (0,2)
MC-LR	5	50-150	0,9993	$1,7 \times 10^2$	$53,7 (0,7) \times 10^1$
MC-RR	6	40-160	0,9972	$4,5 \times 10^3$	$81,6 (1,5) \times 10^2$
MC-YR	6	50-150	0,9946	$3,4 \times 10^2$	$44,7 (1,4) \times 10^1$

n - número de padrões; Gama - valores limite da concentração dos padrões ($\mu g/L$);

R^2 - coeficiente de determinação; σ_{fit} - desvio padrão do ajuste;

$b_1 (\sigma(b_1))$ - estimativa do declive e respetiva incerteza padrão;

Relativamente à razão de confirmação, descrito em 3.10, esta define-se pela razão entre as intensidades de transição MRM_1 e MRM_2 . Esta razão é característica do analito e, portanto, deverá ser constante ao longo da gama de linearidade estudada. Na figura 4.20 é possível visualizar a representação gráfica dos valores da razão de confirmação descritos na tabela 4.11 referentes a todos os compostos.

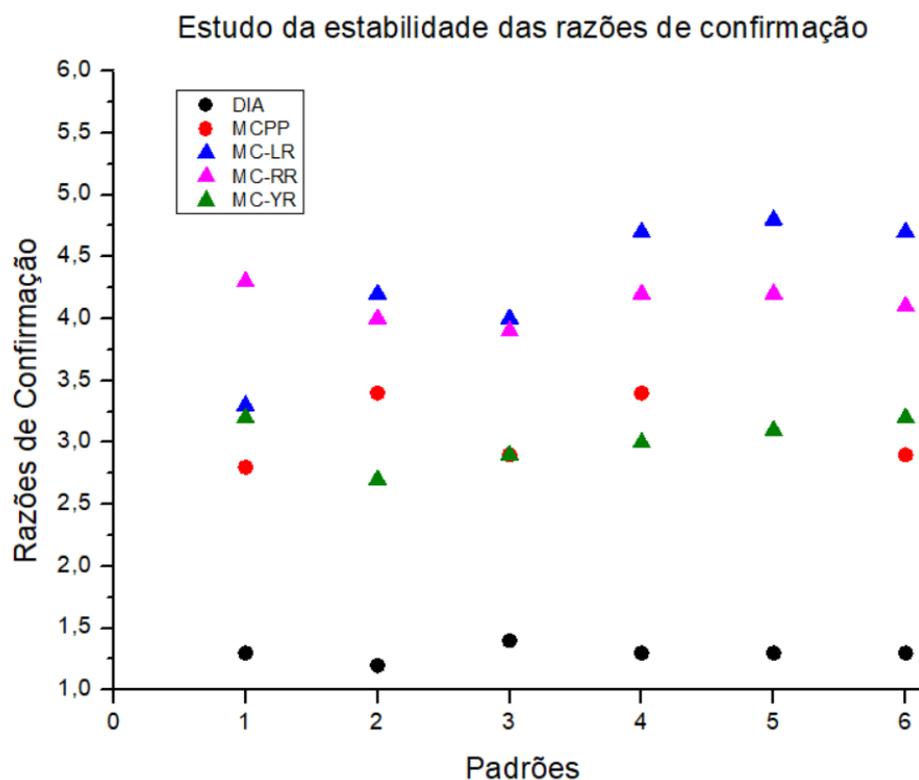


Figura 4.20: Representação gráfica da razão de confirmação dos vários analitos (DIA, MCPP, MC-LR, MC-YR e MC-RR) segundo os valores da tabela 4.11.

Tabela 4.11: Razões de confirmação (MRM_1/MRM_2) ao longo da gama de linearidade dos analitos em estudo.

Padrões	DIA	MCPP	MC-LR	MC-RR	MC-YR
x_1	1,3	2,8	3,3	4,3	3,2
x_2	1,2	3,4	4,2	4,0	2,7
x_3	1,4	2,9	4,0	3,9	2,9
x_4	1,3	3,4	4,7	4,2	3,0
x_5	1,3	-	4,8	4,2	3,1
x_6	1,3	2,9	4,7	4,1	3,2
\overline{RC}	1,2	3,1	4,3	4,1	3,0
$s(RC)$	0,1	0,3	0,6	0,1	0,2
$\%CV$	4,7	9,6	12,8	3,6	7,1
$TV(G)$	1,58	1,08	1,70	1,47	1,63

\overline{RC} - valor médio (relação de confirmação); $s(RC)$ - desvio padrão
- coeficiente de variação (percentual); $TV(G)$ - valor teste (teste de Grubbs).

Como se pode verificar na tabela 4.11, através do cálculo do $TV(G)$ e comparando com os respetivos valores

críticos (1,89 e 1,71 para $n = 6$ e $n = 5$, respectivamente) verifica-se que nenhum dos valores experimentais é considerado como discrepante. Desta forma, as estimativas calculadas como a média e o desvio-padrão encontram-se validadas. O cálculo dos coeficientes de variação dos cinco compostos resultou em valores inferiores a 15%. Admitindo que, como critério interno do laboratório, o coeficiente de variação relativo às transições não deverá exceder os 15%, assume-se que existe estabilidade relativamente à razão de confirmação de todos os compostos.

Com o objetivo de avaliar a dispersão de cada ponto experimental relativamente à curva de calibração onde este se encontra inserido, este teste estatístico foi efetuado sobre todos os analitos utilizando a expressão (3.20). Na figura 4.21 é possível visualizar a representação gráfica do teste de Rikilt efetuado com recurso aos valores indicados nas tabelas 4.6 e 4.7. Os gráficos foram feitos com base no sinal instrumental descrito nas retas de calibração anteriormente mencionadas, após a eliminação de valores discrepantes.

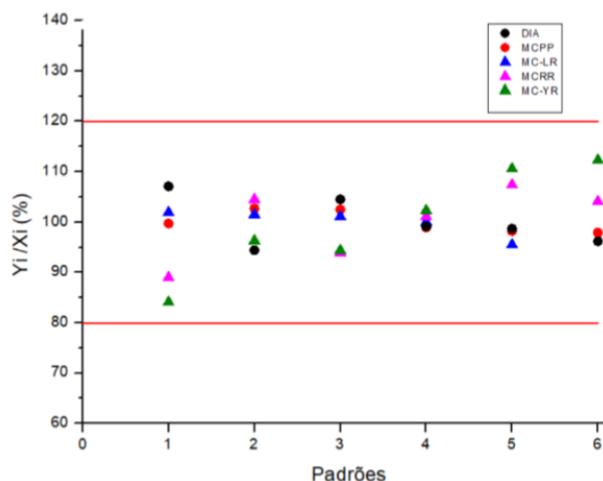


Figura 4.21: Teste de Rikilt relativo a todos os analitos (DIA, MCPP, MC-LR, MC-RR e MC-YR).

Relativamente à resposta relativa, estes foram calculados mediante a expressão (3.21), estando representado na figura 4.22 o gráfico dos resíduos calculados em função das soluções padrão dos vários analitos. Na tabela 4.12 encontram-se os valores obtidos para a representação dos resíduos dos vários analitos.

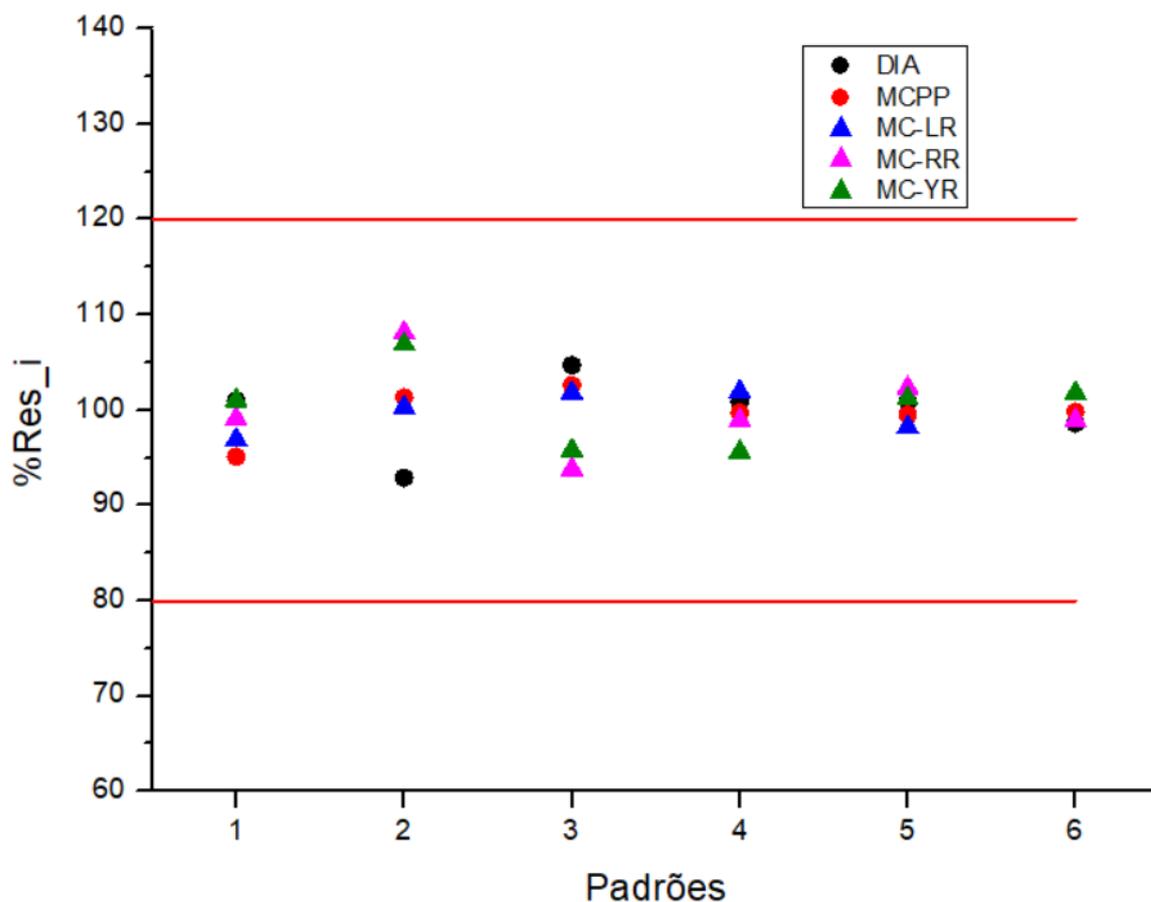


Figura 4.22: Resposta relativa referente aos vários analitos (DIA, MCP, MC-LR, MC-RR e MC-YR).

Tabela 4.12: Dados relativos à resposta relativa ($\%Res_i$) dos vários analitos.

Padrões	<i>Resíduos(%)</i>				
	DIA	MCP	MC-LR	MC-RR	MC-YR
x_1	101,0	95,1	96,9	99,1	101,0
x_2	92,9	101,3	100,3	108,1	106,9
x_3	104,7	102,6	101,8	93,8	95,8
x_4	100,9	99,7	101,9	98,9	95,6
x_6	100,9	99,5	98,2	102,3	101,2
x_7	98,6	99,8	-	98,9	101,8

Sobre os testes de Rikilt e resposta relativa, na tabela 4.13 encontra-se evidenciado o intervalo de valores obtidos. Relativamente a cada teste, encontram-se os intervalos de valores obtidos para cada analito.

Tabela 4.13: Resumo dos valores do teste de Rikilt e resposta relativa dos analitos em estudo.

Analitos	Gama ($\mu\text{g/L}$)	Teste de Rikilt (%)	Resposta relativa (%)
DIA	14-74	[94,4 - 107,1]	[92,9 - 104,7]
MCPP	14-74	[97,9 - 102,7]	[95,1 - 102,6]
MC-LR	50-150	[95,5 - 101,9]	[96,9 - 101,9]
MC-RR	40-160	[89,0 - 107,4]	[93,8 - 108,1]
MC-YR	50-150	[84,1 - 112,3]	[95,6 - 106,9]

Como podemos verificar, todos os compostos apresentam valores obtidos para os diversos testes estatísticos dentro do intervalo da gama de aceitação dos mesmos, cuja gama de aceitação em ambos testes é definida entre 80 e 120%. Desta forma, podemos concluir que todos os pontos apresentam uma dispersão aceitável relativamente ao ajuste linear e que as diferenças residuais entre o modelo linear e os pontos experimentais encontram-se distribuídas de forma homogénea ao longo dos vários padrões.

4.2.2.4 Limiares analíticos da calibração

Com o objetivo de se obterem os limiares analíticos, usaram-se as expressões (3.25) e (3.28) de forma a se obterem o limite de deteção e de quantificação experimentais respetivamente. Para isso recorreram-se aos parâmetros obtidos das retas de calibração relativas a cada composto, estando indicados na tabela 4.14 os valores associados ao desvio-padrão residual das retas de calibração juntamente com o seu declive associado para cada composto, representados por σ_{fit} e b_1 .

Tabela 4.14: Limiares analíticos calculados para os analitos em estudo.

Analitos	σ_{fit}	b_1	x_{LD} ($\mu\text{g/L}$)	x_{LQ} ($\mu\text{g/L}$)	x_1 ($\mu\text{g/L}$)	x_N ($\mu\text{g/L}$)
DIA	13	89,4	0,5	1,5	14	74
MCPP	25	31,6	2,6	7,9	14	74
MC-LR	$1,7 \times 10^2$	$5,37 \times 10^2$	1,0	3,2	50	150
MC-RR	$4,5 \times 10^3$	$8,16 \times 10^3$	1,8	5,5	40	160
MC-YR	$3,4 \times 10^2$	$4,47 \times 10^2$	2,5	7,6	50	150

Como se pode verificar, em todos os casos o limite de quantificação (x_{LQ}) são inferiores relativamente à concentração do primeiro padrão usado na reta de calibração (x_1) de cada composto respetivo, sendo esta a prova de que os limiares analíticos encontram-se bem estimados. A escolha do modo de cálculo dos limiares analíticos deve-se aos procedimentos internos pré-definidos pelo laboratório.

4.2.2.5 Sensibilidade

De forma a avaliar a sensibilidade do equipamento ao longo do tempo, analisaram-se os vários declives obtidos resultantes das várias curvas de calibração obtidas para os analitos. Como todas as curvas de calibração obtidas foram ajustadas segundo o modelo linear $P_{(1)}$, a sensibilidade coincide com o declive das retas. Na tabela 4.15 encontram-se os valores obtidos dos declives das várias curvas de calibração obtidas, associado à sua incerteza, b_1 ($\sigma(b_1)$). Nas figuras 4.23, 4.24 e 4.25 é possível visualizar as representações gráficas dos diversos declives obtidos para cada analito respetivo.

Tabela 4.15: Valores de declives obtidos das várias retas de calibração obtidas para cada analito.

Analitos	Calibrações			
	$b_1(\sigma(b_1))_1$	$b_1(\sigma(b_1))_2$	$b_1(\sigma(b_1))_3$	$b_1(\sigma(b_1))_4$
DIA	86,7 (3,8)	84,6 (3,0)	73,0 (3,4)	89,4 (1,0)
MCP	43,4 (0,5)	40,7 (0,4)	29,2 (0,5)	31,7 (0,2)
MC-LR	$39,4 (2,2) \times 10^1$	$53,7 (0,7) \times 10^1$	$57,0 (0,9) \times 10^1$	$70,4 (1,7) \times 10^1$
MC-RR	$81,8 (1,71) \times 10^2$	$81,3 (2,12) \times 10^2$	$81,6 (1,54) \times 10^2$	—
MC-YR	$44,6 (1,4) \times 10^1$	$37,3 (5,0) \times 10^1$	$36,9 (4,4) \times 10^1$	$44,5 (1,4) \times 10^1$

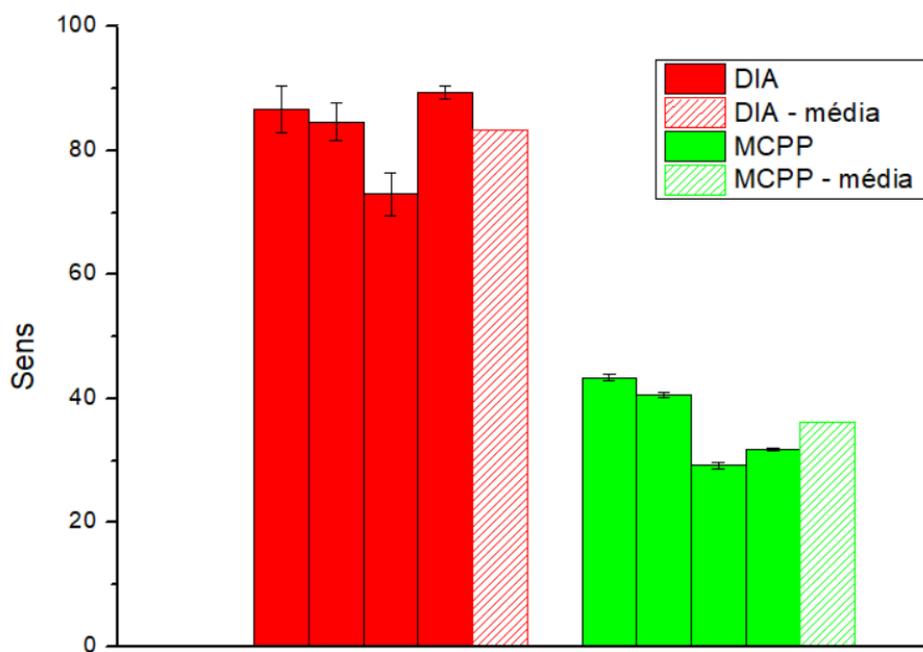


Figura 4.23: Variação da sensibilidade dos analitos DIA e MCP ao longo das várias curvas de calibração. As barras a tracejado correspondem à média dos declives do analito respetivo.

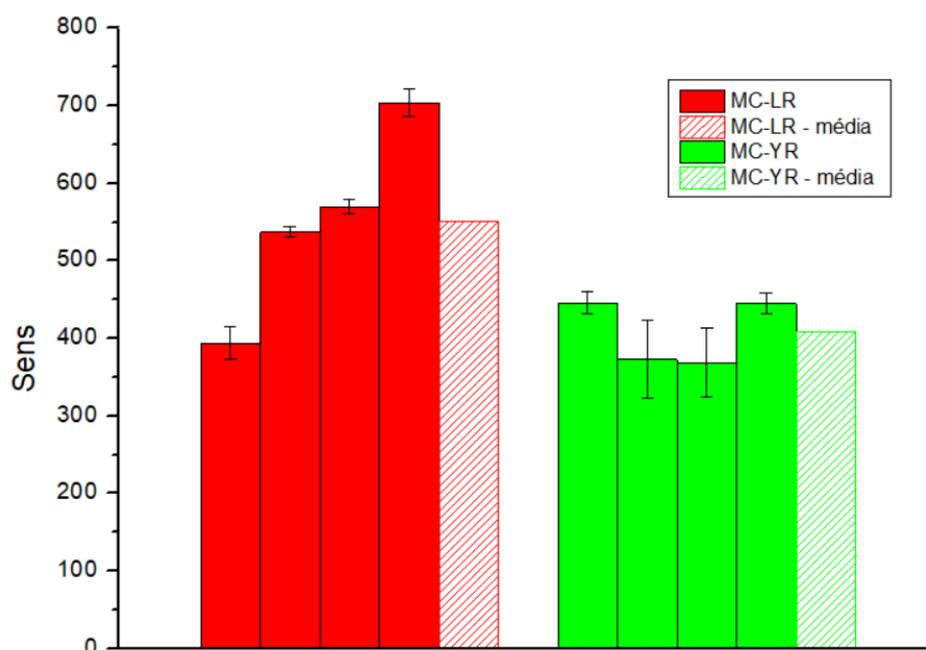


Figura 4.24: Variação da sensibilidade dos analitos MC-LR e MC-YR ao longo das várias curvas de calibração. As barras a tracejado correspondem à média dos declives do analito respectivo.

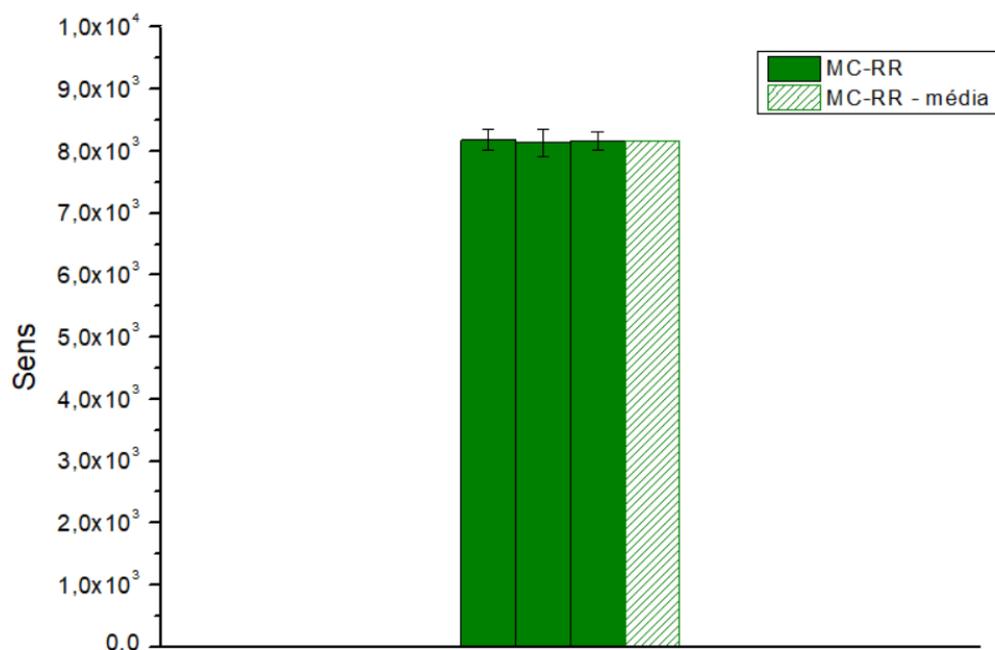


Figura 4.25: Variação da sensibilidade dos analitos MC-RR ao longo das várias curvas de calibração. As barras a tracejado correspondem à média dos declives do analito respectivo.

Por análise dos gráficos, verifica-se que existe alguma variabilidade para todos os compostos estudados. Contudo, efetuando o teste de Grubbs para avaliação de valores anómalos não foram detetados valores discrepantes. Como tal apenas se pode inferir que esta dispersão tem proveniência puramente aleatória.

4.2.3 Precisão

De forma a avaliar a precisão do método em amostras reais, foram realizados ensaios de repetibilidade em matrizes/amostras de interesse. Por último, foi calculada a incerteza na quantificação com base na análise de padrões de concentração ao nível dos extremos da gama de linearidade estudada, também em regime de repetibilidade.

4.2.3.1 Ensaios de repetibilidade em matrizes/amostras fortificadas

Para a análise da precisão em matrizes, prepararam-se soluções de concentração igual ao limite de quantificação previsto para o método (ver secção 3.3.2.12 e 3.3.4.8) e efetuaram-se leituras em regime de repetibilidade. Ao contrário das restantes microcistinas, a microcistina-YR foi testada a uma concentração de 0,4 µg/L. Nas tabelas 4.16, 4.17 e 4.18 é possível visualizar os resultados obtidos nos ensaios relativamente às várias matrizes em estudo.

Tabela 4.16: Leituras em regime de repetibilidade para amostras dopadas em água de consumo humano.

Concentração/(µg/L)	Compostos				
	DIA	MCP	MC-LR	MC-RR	MC-YR
	0,040	0,040	0,2	0,2	0,4
	Ensaio				
1	53,1	42,1	61,7	30,5	94,2
2	51,9	49,9	59,7	29,8	110,9
3	53,1	42,5	61,1	27,8	97,3
4	51,2	42,3	55,4	26,5	91,0
5	48,6	41,2	67,9	29,7	104,8
6	51,5	48,3	66,4	28,6	102,8
7	50,3	45,1	60,1	27,5	99,4
8	–	40,4	–	42,7	99,6
\bar{x}	51,4	44,0	61,7	30,4	100,5
s_r	1,6	3,5	4,2	5,2	5,7
$\%CV$	3,1	7,9	6,8	17,0	5,6

Tabela 4.17: Leituras em regime de repetibilidade para amostras dopadas em água subterrânea (SUB) e água superficial (SUP).

Concentração/($\mu\text{g/L}$)	SUB		SUP		
	DIA	MCP	MC-LR	MC-RR	MC-YR
	0,040	0,040	0,2	0,2	0,4
	Ensaio				
1	42,8	44,8	84,0	29,1	92,5
2	47,0	54,4	85,6	29,7	102,2
3	55,3	50,7	86,0	32,6	94,5
4	44,2	53,6	83,7	26,4	95,9
5	43,6	43,2	83,2	29,0	102,2
6	32,3	47,0	80,8	28,8	96,9
7	33,2	47,5	81,7	28,6	102,4
8	–	52,2	–	–	113,3
\bar{x}	42,6	49,2	83,6	29,2	100,0
s_r	7,9	4,2	1,9	1,8	6,6
$\%CV$	18,6	8,4	2,3	6,3	6,6

Tabela 4.18: Leituras em regime de repetibilidade para amostras dopadas em água desmineralizada.

Concentração/($\mu\text{g/L}$)	Compostos				
	DIA	MCP	MC-LR	MC-RR	MC-YR
	0,040	0,040	0,2	0,2	0,4
	Ensaio				
1	37,8	38,1	49,9	48,4	89,0
2	37,8	30,3	44,9	46,4	80,3
3	37,3	37,4	73,8	46,3	77,8
4	27,8	41,5	56,5	49,1	53,5
5	33,6	28,1	52,0	48,0	86,3
6	29,1	43,0	61,5	52,5	61,8
7	–	40,5	–	49,6	88,3
8	–	–	–	47,9	82,3
\bar{x}	33,9	37,0	56,4	48,5	77,4
s_r	4,5	5,7	10,2	2,0	13,0
$\%CV$	13,3	15,4	18,1	4,0	16,8

Como se pode analisar pelos valores do coeficiente de variação mediante as diferentes matrizes, todas alcançam valores inferiores a 20%, pelo que a precisão do método de ensaio em condições idênticas é garantida.

4.2.3.2 Incerteza na quantificação

A precisão relativa do sinal instrumental foi avaliada através da análise de dez réplicas dos padrões extremos (y_1 e y_N), em condições de repetibilidade. Já a precisão média do método analítico foi estimada com base no erro padrão médio (SE_0), equação 3.30. Os valores estimados encontram-se sistematizados na tabela 4.19.

Da tabela 4.19 verifica-se que, no que diz respeito à resposta instrumental, todas as estimativas apresentam valores inferiores a 20%, limite desejável para a incerteza nesta componente. De modo similar, à exceção da

Tabela 4.19: Análise de precisão sob a forma de coeficiente de variação percentual ($\%CV$) ao nível dos extremos para os cinco analitos em estudo.

Analitos	$\%CV(y_1)$	$\%CV(y_N)$	SE_0	$\%RSE_0$
DIA	8,1	3,3	0.15	0.3
MCPP	8,2	4,2	0.79	1.8
MC-LR	1,9	1,3	0.32	0.3
MC-RR	2,9	1,9	0.55	0.6
MC-YR	4,6	2,9	0.76	0.8

$\%CV(y_1)$ e $\%CV(y_N)$ - coeficiente de variação percentual da resposta instrumental;
 SE_0 - erro padrão do método; $\%RSE_0$ - erro padrão relativo (percentual) do método.

determinação de MCPP, a estimativa média de erro padrão da concentração situa-se abaixo de 1% o que é muito bom para um método analítico ao nível dos “ppb” ($\mu\text{g L}^{-1}$).

4.2.4 Exatidão

Para avaliar a exatidão do método, foram realizados ensaios de recuperação de forma a verificar as respetivas taxas de recuperação para cada matriz de interesse. Este passo é considerado fundamental, pois permite estipular o limite de quantificação do método em amostras reais.

4.2.4.1 Ensaios de recuperação

De forma a avaliar os ensaios de recuperação, foram preparadas as amostras mediante os procedimentos descritos em 3.3.2.12 relativamente aos pesticidas. Sobre as microcistinas, as amostras foram preparadas pelos procedimentos descritos em 3.3.4.8. Após a preparação das amostras, estas foram sujeitas à extração em fase sólida em que, mediante o analito presente na amostra, executa-se o procedimento descrito na tabela 3.5. Após o passo da extração em fase sólida, as amostras foram sujeitas aos ensaios analíticos de cromatografia, mediante as condições descritas em 4.1 e 4.2, respetivamente para os pesticidas e microcistinas em estudo. Após os ensaios, é possível avaliar as taxas de recuperação das amostras.

Na tabela 4.20 encontram-se apresentadas as percentagens de recuperação obtidas em regime de precisão intermédia da DIA em água de consumo humano e água subterrânea. Nas tabelas 4.21, 4.22, 4.23 e 4.24 foi possível visualizar a recuperação dos restantes analitos para as diferentes matrizes.

Com o objetivo de definir o limite de quantificação do método para os pesticidas, efetuaram-se os ensaios de recuperação em amostras reais (brancos de amostra) tendo o cuidado de adicionar analito com vista a obter o valor final próximo de $40 \mu\text{g/L}$. Desta forma, sabendo que o volume de amostra inicial é de 500 mL e que, após o tratamento de amostra, o volume final do extrato será de 500 μL , então, o pesticida em estudo é concentrado 1000 vezes. Assim, as amostras de pesticidas a testar foram dopadas a uma concentração de $0,040 \mu\text{g/L}$.

Relativamente às microcistinas, a concentração estabelecida pelo laboratório a testar como limite de quantificação foi de $50 \mu\text{g/L}$. Assim, com a conversão do volume de amostra de 250 mL para um volume final de extrato de 1 mL, o analito é concentrado 250 vezes. Com isto, as amostras de microcistinas foram dopadas a uma concentração de $0,2 \mu\text{g/L}$.

No gráfico de barras 4.26 e na tabela 4.25 foi possível visualizar as diferentes recuperações para as diferentes matrizes de todos os analitos em estudo, onde “ACH” representa água de consumo humano, “SUB” representa água subterrânea e “SUP” representa água superficial.

Tabela 4.20: Ensaios de recuperação da DIA para água de consumo humano e água superficial. As denominações de C_i , C_a e C_f encontram-se descritos na expressão (3.9), onde as denominações “ACH” e “SUB” representam valores respetivos a água de consumo humano e água subterrânea.

Amostras	Concentração ($\mu\text{g/L}$)				Recuperações (%)	
	C_i	C_a	C_{f-ACH}	C_{f-SUB}	Rec_{ACH}	Rec_{SUB}
1	0,00	40	42,60	42,80	106,5	107,0
2	0,00	40	40,90	47,00	102,3	117,5
3	0,00	40	38,77	55,30	96,9	138,3
4	0,00	40	41,50	44,20	103,8	110,5
5	0,00	40	48,80	43,60	122,0	109,0
6	0,00	40	39,92	32,30	99,8	80,8
7	0,00	40	46,19	33,20	115,5	83,0
8	0,00	40	35,71	33,20	89,3	83,0
9	0,00	40	32,01	44,40	80,0	111,0
10	0,00	40	34,09	44,80	85,2	112,0
11	0,00	40	38,64	35,10	96,6	87,8
12	0,00	40	44,12	–	110,3	–
13	0,00	40	37,55	–	93,9	–
14	0,00	40	38,78	–	96,9	–
15	0,00	40	42,75	–	106,9	–
16	0,00	40	32,79	–	92,0	–
$\%Rec$	–	–	–	–	99,2	103,6
$s(\%Rec)$	–	–	–	–	11,7	17,8
$\%CV$	–	–	–	–	11,8	17,3

Tabela 4.21: Ensaios de recuperação do MCPP para água de consumo humano e água subterrânea. As denominações de C_i , C_a e C_f encontram-se descritos na expressão (3.9), onde as denominações “ACH” e “SUB” representam valores respetivos a água de consumo humano e água subterrânea.

Amostras	Concentração				Recuperações (%)	
	C_i ($\mu\text{g/L}$)	C_a ($\mu\text{g/L}$)	C_{f-ACH} ($\mu\text{g/L}$)	C_{f-SUB} ($\mu\text{g/L}$)	$\%Rec_{ACH}$	$\%Rec_{SUB}$
1	0,00	40	34,70	47,30	86,8	118,3
2	0,00	40	43,10	44,80	107,8	112,0
3	0,00	40	40,70	44,80	101,8	112,0
4	0,00	40	39,80	43,40	99,5	108,5
5	0,00	40	48,50	45,10	121,3	112,8
6	0,00	40	43,70	47,10	109,3	117,8
7	0,00	40	37,40	43,90	93,5	109,8
8	0,00	40	42,70	41,90	106,8	104,8
9	0,00	40	43,72	42,70	109,3	106,8
10	0,00	40	44,30	43,50	110,8	108,7
11	0,00	40	44,90	–	112,3	–
12	0,00	40	37,45	–	93,6	–
13	0,00	40	37,70	–	94,3	–
14	0,00	40	38,44	–	96,1	–
15	0,00	40	39,30	–	98,3	–
16	0,00	40	36,99	–	92,5	–
$\%Rec$	–	–	–	–	102,1	112,9
$s(\%Rec)$	–	–	–	–	9,3	7,3
$\%CV$	–	–	–	–	9,1	6,5

Tabela 4.22: Ensaios de recuperação da MC-LR para água de consumo humano e água superficial. As denominações de C_i , C_a e C_f encontram-se descritos na expressão (3.9), onde as denominações “ACH” e “SUP” representam valores respetivos a água de consumo humano e água superficial.

Amostras	Concentração ($\mu\text{g/L}$)				Recuperações (%)	
	C_i	C_a	C_{f-ACH}	C_{f-SUP}	$\%Rec_{ACH}$	$\%Rec_{SUP}$
1	0,00	0,2	0,247	0,336	123,4	168,0
2	0,00	0,2	0,239	0,342	119,4	171,2
3	0,00	0,2	0,244	0,344	122,2	172,0
4	0,00	0,2	0,222	0,335	110,8	167,4
5	0,00	0,2	0,272	0,333	135,8	166,4
6	0,00	0,2	0,266	0,323	132,8	161,6
7	0,00	0,2	0,240	0,327	120,2	163,4
8	0,00	0,2	0,193	0,303	96,5	131,5
9	0,00	0,2	0,195	0,338	97,5	149,0
10	0,00	0,2	0,203	0,311	101,5	135,5
11	0,00	0,2	0,192	0,303	96,0	131,5
12	0,00	0,2	0,187	0,320	93,5	140,0
13	0,00	0,2	–	0,324	–	142,0
14	0,00	0,2	–	0,331	–	145,5
15	0,00	0,2	–	0,332	–	146,0
$\%Rec$	–	–	–	–	112,5	152,3
$s(\%Rec)$	–	–	–	–	15,1	15,0
$\%CV$	–	–	–	–	13,4	9,8

Tabela 4.23: Ensaios de recuperação da MC-RR para água de consumo humano e água superficial. As denominações de C_i , C_a e C_f encontram-se descritos na expressão (3.9), onde as denominações “ACH” e “SUP” representam valores respetivos a água de consumo humano e água superficial.

Amostras	Concentração ($\mu\text{g/L}$)				Recuperações (%)	
	C_i	C_a	C_{f-ACH}	C_{f-SUP}	Rec_{ACH}	$\%Rec_{SUP}$
1	0,00	0,2	0,171	0,130	85,4	65,2
2	0,00	0,2	0,150	0,159	75,0	79,4
3	0,00	0,2	0,170	0,180	85,0	90,0
4	0,00	0,2	0,179	0,165	89,5	82,5
$\%Rec$	–	–	–	–	83,7	79,3
$s(\%Rec)$	–	–	–	–	6,2	10,4
$\%CV$	–	–	–	–	7,4	13,1

Tabela 4.24: Ensaios de recuperação da MC-YR para água de consumo humano e água superficial. As denominações de C_i , C_a e C_f encontram-se descritos na expressão (3.9), onde as denominações “ACH” e “SUP” representam valores respetivos a água de consumo humano e água superficial.

Amostras	Concentração ($\mu\text{g/L}$)				Recuperações (%)	
	C_i	C_a	C_{f-ACH}	C_{f-SUB}	$\%Rec_{ACH}$	$\%Rec_{SUB}$
1	0,00	0,4	0,326	0,552	81,5	138,0
2	0,00	0,4	0,384	0,610	96,0	152,5
3	0,00	0,4	0,337	0,564	84,3	141,0
4	0,00	0,4	0,315	0,572	78,8	143,0
5	0,00	0,4	0,363	0,610	90,8	152,5
6	0,00	0,4	0,356	0,578	89,0	144,5
7	0,00	0,4	0,344	0,611	86,0	152,8
8	0,00	0,4	0,345	0,676	86,3	169,0
$\%Rec$	–	–	–	–	86,6	149,1
$s(\%Rec)$	–	–	–	–	5,4	9,9
$\%CV$	–	–	–	–	6,3	6,6

Tabela 4.25: Taxas de recuperação de todos os compostos mediante as diferentes matrizes analisadas. ACH, SUB e SUP representam, respetivamente, água de consumo humano, água subterrânea e água superficial. Os valores foram validados com recurso ao teste de Grubbs, com recurso à expressão 3.3. Os valores encontram-se representados com intervalo de confiança associado a um nível de confiança de 95%.

Analitos	Matriz		
	ACH	SUB	SUP
DIA	99,2 ± 6,2%	103,6 ± 12,1%	–
MCP	102,1 ± 4,9%	111,1 ± 3,1%	–
MC-LR	104,6 ± 15,5%	--	152,7 ± 8,3%
MC-RR	83,7 ± 9,8%	–	79,3 ± 16,5%
MC-YR	86,6 ± 4,5%	–	149,2 ± 8,2%

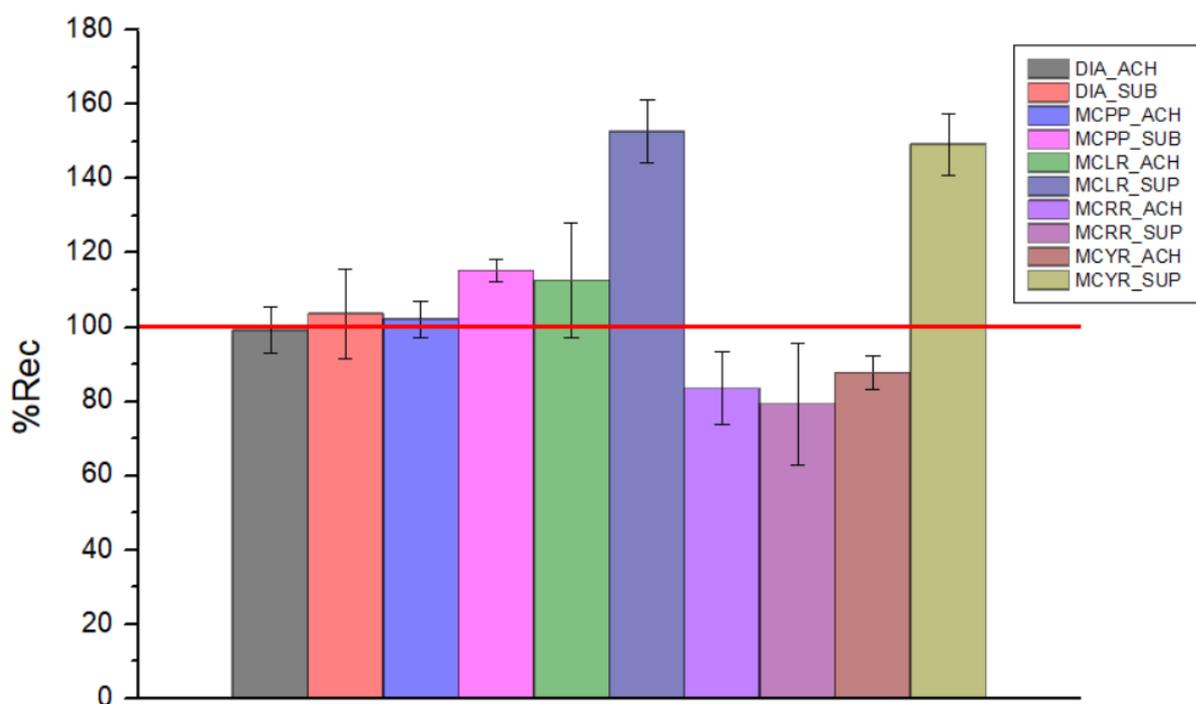


Figura 4.26: Taxas de recuperação para todos os compostos mediante as diferentes matrizes. É possível visualizar segmentos de reta no topo de cada coluna, representando os intervalos e confiança com nível de significância de 5%. A linha a vermelho que atravessa todas as barras simboliza uma taxa de recuperação de 100%.

Como se pode verificar nos valores obtidos para os ensaios de recuperação, todos os coeficientes de variação calculados são inferiores ao critério de aceitação, isto é, são todos inferiores a 20%. Desta forma, a variação do valor das taxas de recuperação não é significativo. Assim, os valores das taxas de recuperação são consideradas como reprodutíveis e, portanto, o valor médio das taxas referidas podem ser considerados como valores característicos dos analitos associados à respetiva matriz. Assim, as taxas obtidas podem ser utilizadas futuramente como ajuste ao sinal de analito proveniente de amostra reais, permitindo quantificar uma amostra sem a influência inerente da respetiva matriz.

Por análise da figura 4.26, verificamos que alguns compostos apresentam uma taxa de recuperação superior a 100%, como é o caso da MC-LR e MC-YR em matrizes de água superficial. Também se revelam casos em que as taxas são inferiores a 100%, tais como MC-RR na matriz de água subterrânea e água de consumo humano e MC-YR em água de consumo humano. Nestes casos o efeito matriz é acentuado, cuja proveniência pode resultar do ambiente químico inerente à matriz em causa e/ou características inerentes do analito.

4.2.5 Limite de Quantificação do Método

O limite de quantificação do método corresponde à concentração mínima que, a partir da qual, é possível quantificar amostras reais pela aplicação do método previamente referido. Para o cálculo do limite há que ter em conta a taxa de recuperação média de cada analito para cada matriz e os fatores de concentração a que as amostras são submetidas. Nas tabelas 4.26 e 4.27 é possível visualizar os diferentes limites de quantificação do método para as diferentes matriz, para cada analito. É de referir que, inicialmente, os ensaios de recuperação para a MC-YR foi testada em amostras de concentração de 0,2 µg/L, no entanto, as taxas de recuperação apresentavam um coeficiente de variação superior ao critério dos 20%. Desta forma, a dispersão dos valores

das taxas de recuperação era excessiva, pelo que os ensaios de recuperação deveriam ter como alvo amostras de maior concentração. Posto isto, a concentração associada à MC-YR testada foi de 0,4 µg/L tanto para os ensaios de recuperação como para os ensaios de repetibilidade em amostras/matrizes.

Tabela 4.26: Limite de quantificação para os compostos para a matriz água de consumo humano.

Analitos	$x_1/(\mu\text{g/L})$	Fator de concentração	Rec. média (%)	LQ	CV (%)
DIA	14	1000x	99,2	0,040	11,8
MCPP	14		102,1	0,040	9,1
MC-LR	50	250x	112,5	0,2	13,4
MC-RR	40		83,7	0,2	7,4
MC-YR	50		86,6	0,4	6,3

Tabela 4.27: Limite de quantificação para os compostos para as matrizes água superficial e água subterrânea.

Matrizes	Analitos	$x_1/(\mu\text{g/L})$	Fator de concentração	Rec. média (%)	LQ	CV (%)
SUP	MC-LR	50	250x	152,7 %	0,2	9,8
	MC-RR	40		79,3 %	0,2	13,1
	MC-YR	50		149,2 %	0,4	6,6
SUB	DIA	14	1000x	103,6 %	0,040	17,3
	MCPP	14		112,9 %	0,040	6,5

4.2.6 Ensaio Interlaboratorial

Na parte final do passo de validação do método relativamente à otimização de condições experimentais e da elaboração das curvas de calibração, decorreu a participação no ensaio interlaboratorial LGC AQUACHECK relativamente às microcistinas MC-LR, MC-RR e MC-YR. Os resultados provenientes do ensaio em questão encontram-se representados na tabela 4.28, onde o valor obtido representa a concentração obtida através do sinal instrumental proveniente da amostra por interpolação a uma curva de calibração, o valor verdadeiro representa o teor de analito presente na amostra fornecida pela entidade organizadora e $|z\text{-score}|$ o módulo do nível de desempenho.

Tabela 4.28: Resultados do ensaio interlaboratorial para as microcistinas.

Analitos	Valor obtido/ $(\mu\text{g/L})$	Valor verdadeiro/ $(\mu\text{g/L})$	$ z\text{-score} $
MC-LR	0,39	0,51	1,5
MC-RR	0,66	0,93	1,5
MC-YR	0,36	0,49	1,3

Como se pode visualizar, os valores obtidos para o desempenho analítico ($z\text{-score}$) são inferiores a dois, concluindo que o método demonstra ter elevado grau de exatidão. Posto isto, garantimos que a parte da validação relativamente à capacidade de deteção de espectro de massas *tandem* otimizado para as microcistinas e a gama de trabalho estudada para as mesmas encontra-se apta.

Capítulo 5

Conclusões

Numa perspetiva final, a validação dos dois métodos foi conseguida. Após a otimização das condições experimentais tais como obtenção de tempos de retenção constantes para cada analito, a gama de linearidade foi testada (e validada) com o resultado do teste de homogeneidade de variâncias, a linearidade foi demonstrada para todos os compostos a partir do teste estatístico de Mandel acompanhado com o coeficiente de correlação, com valores acima de 0,995. As razões de confirmação, como uma das características inerentes a cada analito, apresentaram coeficientes de variação inferiores ao máximo admitido. Tanto a Resposta relativa como o teste de Rikilt demonstraram uma dispersão aleatória entre os pontos experimentais.

A precisão do método foi verificada por ensaios em regime de repetibilidade, em amostras sem processamento e em amostras fortificadas sujeitas à extração em fase sólida. Essa verificação foi efetuada em concentrações equivalentes ao primeiro padrão das gamas de linearidade estudadas para os vários analitos. Em ambas as amostras, estas apresentaram um coeficiente de variação inferior ao valor máximo admitido, estando demonstrada uma boa precisão.

A exatidão foi avaliada através de ensaios de recuperação, em regime de precisão intermédia em todos os analitos e, relativamente às microcistinas, foram realizados ensaios interlaboratoriais. Os valores obtidos em prol das taxas de recuperação apresentaram coeficientes de variação aceitáveis, pelo que as taxas de recuperação foram consideradas como reprodutíveis para as matrizes respetivas. Os ensaios interlaboratoriais obtiveram valores inferiores a dois ($|z| \leq 2$), pelo que o método demonstrou um bom desempenho e, portanto, boa exatidão.

Os limites de quantificação dos diferentes analitos satisfazem o decreto-lei 306/2007 de 7 de Agosto, que se encontra neste momento em vigor. Os analitos MC-LR e MC-RR conseguiram obter um limite de quantificação que se enquadra de acordo com o decreto lei 152/2017 de 7 de Dezembro. Para os restantes analitos, o limite de quantificação alcançado é adequado deverá ser minorado a 30% do valor paramétrico até 31 de Dezembro, de forma a que os ensaios possam ser/se mantenham acreditados.

Sobre perspetivas futuras, existem alguns detalhes a serem modificados no método das microcistinas, com especial relevo no processamento das amostras. Segundo a norma ISO 20179, existe um procedimento alternativo com o objetivo de quebrar a membrana celular das cianobactérias, baseado na utilização de ultrasons (recurso a um “Polytron Homogenizer”), pelo que seria interessante integrá-lo no método desenvolvido.

Nesta mesma norma também são referidos dois tipos de processamentos de amostras, baseados em amostras de baixa ou elevada densidade celular. O método que foi estudado abordava amostras com baixa/inexistente densidade celular, pelo que seria importante implementar um processamento que aborde amostras com elevada densidade celular. Uma outra sugestão como trabalho futuro seria elaborar uma calibração simultânea de pesticidas e microcistinas referidos, com utilização de calibração multivariada

Infelizmente, as amostras/matrizes utilizadas para verificar os ensaios de recuperação foram retiradas de excessos de amostras de outros clientes, que estavam isentas de cianobactérias. Com isto, torna-se difícil de avaliar se o processamento de amostra é eficaz para quebrar as membranas celulares. Uma forma de se avaliar futuramente a eficácia do processamento de amostra seria recolher amostras com elevado índice de suspeita de existência de cianobactérias, subcontratando a análise dessas mesmas amostras a um laboratório acreditado para a quantificação de microcistinas. Desta forma, poderíamos avaliar se o teor de microcistinas obtido pelo método definido seria fidedigno, comparando-o com o reportado pelo laboratório acreditado. É de salientar que as amostras fortificadas poderão, futuramente, ter aplicação em cartas de controlo de forma a validar não só, padrões de controlo usados em rotinas de trabalho, como criar um historial de taxas de recuperação por matriz.

Bibliografia

- [1] Joseph Juran and A. Blanton Godfrey. Quality handbook. *Republished McGraw-Hill*, 1999.
- [2] Susana Paula Soares Branco. Acreditação de métodos de ensaios e/ou calibração de um laboratório. Master's thesis, Universidade de Aveiro, 2010.
- [3] David L. Nelson, Albert L. Lehninger, and Michael M. Cox. *Lehninger principles of biochemistry*. Macmillan, 2008.
- [4] Unesco. *World water resources: a new appraisal and assessment for the 21st century: a summary of the monograph world water resources*. United Nations Educational, Scientific and Cultural Organization, 1998.
- [5] IPAC acreditação. *Laboratórios de águas, efluentes líquidos e amostras sólidas ambientais - âmbito de acreditação*, June 2017.
- [6] Fourth Edition. Guidelines for drinking-water quality. *WHO chronicle*, 38(4), 2011.
- [7] Mariyo F. Watanabe and Shinshi Oishi. Effects of environmental factors on toxicity of a cyanobacterium (*microcystis aeruginosa*) under culture conditions. *Applied and Environmental Microbiology*, 49(5):1342–1344, 1985.
- [8] Kaarina Sivonen and Gary Jones. Cyanobacterial toxins. *Toxic cyanobacteria in water: a guide to their public health consequences, monitoring and management*, 1:43–112, 1999.
- [9] Kaarina Sivonen. Cyanobacterial toxins and toxin production. *Phycologia*, 35(sup6):12–24, 1996.
- [10] Brett A. Neilan, Leanne A. Pearson, Michelle C. Moffitt, K. T. Mihali, M. Kaebernick, Ralf Kellmann, and Francesco Pomati. The genetics and genomics of cyanobacterial toxicity. In *Cyanobacterial harmful algal blooms: state of the science and research needs*, pages 417–452. Springer, 2008.
- [11] Jussi Meriluoto, Geoffrey Codd, Marianne Reilly, James S. Metcalf, Lisa Spooft, Olli Sjövall, Tom Hall, Katarzyna Lzydorczyk, Tore Lindholm, Tomas Kull, et al. Toxic: cyanobacterial monitoring and cyanotoxin analysis. *Acta Academiae Aboensis, Ser. B*, 2005.
- [12] Ken-ichi Harada, Kiyomi Tsuji, Mariyo F. Watanabe, and Fumio Kondo. Stability of microcystins from cyanobacteria—iii. effect of ph and temperature. *Phycologia*, 35(sup6):83–88, 1996.
- [13] Kiyomi Tsuji, Tomohiko Watanuki, Fumio Kondo, Mariyo F. Watanabe, Sumiko Suzuki, Hiroyuki Nakazawa, Makoto Suzuki, Hideaki Uchida, and Ken-Ichi Harada. Stability of microcystins from cyanobacteria—ii. effect of uv light on decomposition and isomerization. *Toxicon - An Interdisciplinary Journal on the Toxins Derived from Animals, Plants and Microorganisms*, 33(12):1619–1631, 1995.

- [14] Claudia Wiedner, Petra M. Visser, Jutta Fastner, James S. Metcalf, Geoffrey A. Codd, and Luuc R. Mur. Effects of light on the microcystin content of microcystis strain pcc 7806. *Applied and Environmental Microbiology*, 69(3):1475–1481, 2003.
- [15] J. Rapala, K. Lahti, K. Sivonen, and S. I. Niemelä. Biodegradability and adsorption on lake sediments of cyanobacterial hepatotoxins and anatoxin-a. *Letters in applied microbiology*, 19(6):423–428, 1994.
- [16] David G. Bourne, Gary J. Jones, Robert L. Blakeley, Alun Jones, Andrew P. Negri, and Peter Riddles. Enzymatic pathway for the bacterial degradation of the cyanobacterial cyclic peptide toxin microcystin lr. *Applied and Environmental Microbiology*, 62(11):4086–4094, 1996.
- [17] V. M. Vasconcelos, K. Sivonen, W. R. Evans, W. W. Carmichael, and M. Namikoshi. Hepatotoxic microcystin diversity in cyanobacterial blooms collected in portuguese freshwaters. *Water Research*, 30(10):2377–2384, 1996.
- [18] Nidhi Gupta, S. C. Pant, R. Vijayaraghavan, and P. V. Lakshmana Rao. Comparative toxicity evaluation of cyanobacterial cyclic peptide toxin microcystin variants (lr, rr, yr) in mice. *Toxicology*, 188(2-3):285–296, 2003.
- [19] Pia Vesterkvist, Julia Misiorek, Lisa Spoof, Diana Toivola, and Jussi Meriluoto. Comparative cellular toxicity of hydrophilic and hydrophobic microcystins on caco-2 cells. *Toxins*, 4(11):1008–1023, 2012.
- [20] Marina Aboal and Maria-Ángeles Puig. Intracellular and dissolved microcystin in reservoirs of the river segura basin, murcia, se spain. *Toxicon - An Interdisciplinary Journal on the Toxins Derived from Animals, Plants and Microorganisms*, 45(4):509–518, 2005.
- [21] Jennifer L. Graham, John R. Jones, Susan B. Jones, John A. Downing, and Thomas E. Clevenger. Environmental factors influencing microcystin distribution and concentration in the midwestern united states. *Water research*, 38(20):4395–4404, 2004.
- [22] B. Oudra, M. Loudiki, B. Sbiyyaa, R. Martins, V. Vasconcelos, and N. Namikoshi. Isolation, characterization and quantification of microcystins (heptapeptides hepatotoxins) in microcystis aeruginosa dominated bloom of lalla takerkoust lake-reservoir (morocco). *Toxicon - An Interdisciplinary Journal on the Toxins Derived from Animals, Plants and Microorganisms*, 39(9):1375–1381, 2001.
- [23] Ruihua Dai, Huijuan Liu, Jiuhui Qu, Jia Ru, and Yining Hou. Cyanobacteria and their toxins in guanting reservoir of beijing, china. *Journal of hazardous materials*, 153(1-2):470–477, 2008.
- [24] Imed Maatouk, Noureddine Bouaicha, Didier Fontan, and Yves Levi. Seasonal variation of microcystin concentrations in the saint-caprais reservoir (france) and their removal in a small full-scale treatment plant. *Water Research*, 36(11):2891–2897, 2002.
- [25] Fatma Gurbuz, James S. Metcalf, Aynur Gul Karahan, and Geoffrey A. Codd. Analysis of dissolved microcystins in surface water samples from kovada lake, turkey. *Science of the total environment*, 407(13):4038–4046, 2009.
- [26] Valentina Messineo, Sara Bogialli, Serena Melchiorre, Nicola Sechi, Antonella Lugliè, Paola Casiddu, Maria Antonietta Mariani, Bachisio Mario Padedda, Antonio Di Corcia, Roberto Mazza, et al. Cyanobacterial toxins in italian freshwaters. *Limnologica*, 39(2):95–106, 2009.
- [27] Zorica Svirčev, Damjana Drobac, Nada Tokodi, Biljana Mijović, Geoffrey A. Codd, and Jussi Meriluoto. Toxicology of microcystins with reference to cases of human intoxications and epidemiological investigations of exposures to cyanobacteria and cyanotoxins. *Archives of toxicology*, 91(2):621–650, 2017.

- [28] R. M. Dawson. The toxicology of microcystins. *Toxicon*, 36(7):953–962, 1998.
- [29] Alexandre Campos and Vitor Vasconcelos. Molecular mechanisms of microcystin toxicity in animal cells. *International journal of molecular sciences*, 11(1):268–287, 2010.
- [30] Jussi Meriluoto. B toxins of freshwater cyanobacteria (blue-green algae). In *Handbook of analytical separations*, volume 2, pages 359–390. Elsevier, 2000.
- [31] G. A. Codd. Cyanobacterial toxins: occurrence, properties and biological significance. *Water Science and Technology*, 32(4):149–156, 1995.
- [32] György Matolcsy, Miklós Nádasy, and Viktor Andriska. *Pesticide chemistry*, volume 32. Elsevier, 1989.
- [33] M. P. Ormad, N. Miguel, A. Claver, J. M. Matesanz, and J. L. Ovelleiro. Pesticides removal in the process of drinking water production. *Chemosphere*, 71(1):97–106, 2008.
- [34] ERSAR. *Lista de pesticidas a pesquisar em água destinada ao consumo humano. Triênio 2019-2021*.
- [35] N. R. Poppi J. L. R. Júnior. Determination of organochlorine pesticides in ground water samples using solid-phase microextraction by gas chromatography-electron capture detection. *Journal of Chromatographic Science*, 72:1833–1841, 2007.
- [36] C. M. Torres, Y. Picó, and J. Mafies. Determination of pesticide residues in fruit and vegetables. *Journal of Chromatography A*, 754:301–333, 1996.
- [37] Guilherme P. Sabin, Osmar D. Prestes, Martha B. Adaime, and Renato Zanella. Multiresidue determination of pesticides in drinking water by gas chromatography-mass spectrometry after solid-phase extraction. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 20(5):918–925, 2009.
- [38] Ellen P. Preece, Barry C. Moore, Mark E. Swanson, and F. Joan Hardy. Identifying best methods for routine elisa detection of microcystin in seafood. *Environmental monitoring and assessment*, 187(2):12, 2015.
- [39] Andrew D. Turner, Julia Waack, Adam Lewis, Christine Edwards, and Linda Lawton. Development and single-laboratory validation of a uhplc-ms/ms method for quantitation of microcystins and nodularin in natural water, cyanobacteria, shellfish and algal supplement tablet powders. *Journal of Chromatography B*, 1074:111–123, 2018.
- [40] Ines Rodriguez, Maria Fraga, Amparo Alfonso, Delphine Guillebault, Linda Medlin, Julia Baudart, Pauline Jacob, Karim Helmi, Thomas Meyer, Ulrich Breitenbach, et al. Monitoring of freshwater toxins in european environmental waters by using novel multi-detection methods. *Environmental toxicology and chemistry*, 36(3):645–654, 2017.
- [41] Brett Greer, Sara E. McNamee, Bas Boots, Lucia Cimarelli, Delphine Guillebault, Karim Helmi, Stefania Marcheggiani, Stefan Panaiotov, Ulrich Breitenbach, Reyhan Akcaalan, et al. A validated uplc–ms/ms method for the surveillance of ten aquatic biotoxins in european brackish and freshwater systems. *Harmful Algae*, 55:31–40, 2016.
- [42] J. V. Sancho E. Beltran, M. Ibanez and F. Hernandez. Determination of six microcystins and nodularin in surface and drinking waters by on-line solid phase extraction–ultra high pressure liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1266:61–68, 2012.

- [43] Jing Wang, Xiaolu Pang, Fei Ge, and Zhanyu Ma. An ultra-performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry method for determination of microcystins occurrence in surface water in zhejiang province, china. *Toxicon - An Interdisciplinary Journal on the Toxins Derived from Animals, Plants and Microorganisms*, 49(8):1120–1128, 2007.
- [44] Wei Xu, Qi Chen, Ting Zhang, Zengxuan Cai, Xiaofei Jia, Qing Xie, and Yiping Ren. Development and application of ultra performance liquid chromatography–electrospray ionization tandem triple quadrupole mass spectrometry for determination of seven microcystins in water samples. *analytica chimica acta*, 626(1):28–36, 2008.
- [45] Eclética Química, editor. *Estudo da presença da toxina microcistina-LR em água utilizada em clínica de hemodiálise e validação de um método analítico*, volume 32, 2007.
- [46] A. Laplanchea G. Gervais, S. Brosillona and C. Helen. Ultra-pressure liquid chromatography–electrospray tandem mass spectrometry for multiresidue determination of pesticides in water. *Journal of Chromatography A*, 1202:163–172, 2008.
- [47] D. O. Mountforta, P. Hollanda, and J. Sprosenb. Method for detecting classes of microcystins by combination of protein phosphatase inhibition assay and elisa: comparison with lc-ms. *Toxicon - An Interdisciplinary Journal on the Toxins Derived from Animals, Plants and Microorganisms*, pages 199–206, 2005.
- [48] Y. Wua N. Gana L. Songa L. Leia, b. An elisa-like time-resolved fluorescence immunoassay for microcystin detection. *Elsevier*, 2004.
- [49] Daniel C. Harris. *Quantitative Chemical Analysis*. Clancy Marshall, 2012.
- [50] C. Niu N. Qiang W. Li, J. Duan and D. Mulcahy. Determination of microcystin-lr in drinking water using uplc tandem mass spectrometry – matrix effects and measurement. *Journal of Chromatographic Science*, 49, October 2011.
- [51] P. M. Fedorak A. K.-Y. Lam and E. E. Prepas. Biotransformation of the cyanobacterial hepatotoxin microcystin - lr, as determined by hplc and protein phosphatase bioassay. *Environmental Science & Technology*, 1995.
- [52] S. Puiseux-Dao C. Robillot, J. Vinh and M. Hennion. Hepatotoxin production kinetics of the cyanobacterium microcystis aeruginosa pcc 7820, as determined by hplc-mass spectrometry and protein phosphatase bioassay. *Environmental Science & Technology*, 2000.
- [53] E. C. Aguate, A. Gago-Martínez, J. M. Leão, J. A. Rodríguez-Vázquez, C. Menard, and J. F. Lawrence. Hplc and hpce analysis of microcystins rr, lr and yr present in cyanobacteria and water by using immunoaffinity extraction. *The International Journal of Pure and Applied Analytical Chemistry*, 2003.
- [54] M. E. Swartz. Uplc tm: An introduction and review. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*, 2005.
- [55] M. Namikoshi & B. W. Choi K. L. Rinehart. Structure and biosynthesis of toxins from blue-green algae (cyanobacteria). *Journal of Applied Phycology*, 1994.
- [56] Carina Menezes, Elisabete Valério, and Elsa Dias. *The kidney Vero-E6 cell line: a suitable model to study the toxicity of microcystins*. InTech (Sivakumar Gowder), 2013.

- [57] F. Kondo N. Ishikawa M. F. Watanabe M. Suzuki K. Tsuji, S. Naito and K. Haradall. Stability of microcystins from cyanobacteria: Effect of light on decomposition and isomerization. *Environmental Science & Technology*, 1994.
- [58] F. Kondo M. F. Watanabe H. Nakazawa M. Suzuki H. Uchida K. Tsuji, T. Watanuki and K.-I. Harada. Stability of microcystins from cyanobacteria - iv. effect of chlorination on decomposition. *Toxicon - An Interdisciplinary Journal on the Toxins Derived from Animals, Plants and Microorganisms*, 1997.
- [59] R. L. Blakeley G. J. Jones, D. G. Bourne and H. Doelle. Degradation of the hepatotoxin microcystin cyanobacteria by aquatic bacteria. *Natural Toxins*, 1994.
- [60] P. M. Fedorak A. K.-Y. Lam and E. E. Prepas. Biotransformation of the cyanobacterial hepatotoxin microcystin-u1, as determined by hplc and protein phosphatase bioassay. *Environmental Science & Technology*, 1995.
- [61] European Food Safety Authority (EFSA). Peer review of the pesticide risk assessment of the active substance mecoprop-p. *EFSA Journal*, 2017.
- [62] S. B. Haderlein M. Gruhl C. Zipper, M. J. F. Suter and H. E. Kohler. Changes in the enantiomeric ratio of (r)- to (s)-mecoprop indicate in situ biodegradation of this chiral herbicide in a polluted aquifer. *Environmental Science & Technology*, 1998.
- [63] J. J. W. Higgo I. Harrison, R. U. Leader and G. M. Williams. A study of the degradation of phenoxyacid herbicides at different sites in a limestone aquifer. *Pergamon*, 1997.
- [64] Ian Harrison, Geoffrey M. Williams, and Claire A. Carlick. Enantioselective biodegradation of mecoprop in aerobic and anaerobic microcosms. *Chemosphere*, 53(5):539–549, 2003.
- [65] Bao-hui Jin, Feng Xiao, Bo Chen, Pei-jin Chen, and Li-qi Xie. Simultaneous determination of 42 organic chemicals in bottled water by combining c18 extraction disk with gc-ms and lc/ms/ms technique. *Journal of water and health*, 8(1):116–125, 2010.
- [66] Marina Kuster, Maria José López de Alda, Maria Dolores Hernando, Mira Petrovic, Jordi Martín-Alonso, and Damià Barceló. Analysis and occurrence of pharmaceuticals, estrogens, progestogens and polar pesticides in sewage treatment plant effluents, river water and drinking water in the Llobregat river basin (Barcelona, Spain). *Journal of hydrology*, 358(1-2):112–123, 2008.
- [67] Sjöf Öllers, Heinz P Singer, Philipp Fässler, and Stephan R Müller. Simultaneous quantification of neutral and acidic pharmaceuticals and pesticides at the low-ng/l level in surface and waste water. *Journal of chromatography A*, 911(2):225–234, 2001.
- [68] Imtiaz Ibrahim, Anne Togola, and Catherine Gonzalez. Polar organic chemical integrative sampler (pocis) uptake rates for 17 polar pesticides and degradation products: laboratory calibration. *Environmental Science and Pollution Research*, 20(6):3679–3687, 2013.
- [69] E. Funari, L. Barbieri, P. Bottoni, G. Del Carlo, S. Forti, G. Giuliano, A. Marinelli, C. Santini, and A. Zavatti. Comparison of the leaching properties of alachlor, metolachlor, triazines and some of their metabolites in an experimental field. *Chemosphere*, 36(8):1759–1773, 1998.
- [70] TE Stoker, DL Guidici, SC Laws, and RL Cooper. The effects of atrazine metabolites on puberty and thyroid function in the male wistar rat. *Toxicological Sciences*, 67(2):198–206, 2002.
- [71] Minnesota Department of Health, Division of Environmental Health, Health Risk Assessment Unit. *Human Health Assessment: Atrazine*, December 2009.

- [72] Helena Prosen. Fate and determination of triazine herbicides in soil. In *Herbicides-Properties, Synthesis and Control of Weeds*. IntechOpen, 2012.
- [73] Georgina Fortuny, Laura Pineda, Antoni Rúbies, Francesc Centrich, and Ramon Companyó. Determination of 61 organic pollutants in drinking water by solid phase extraction followed by liquid and gas chromatography coupled to tandem mass spectrometry: an analytical strategy for a routine laboratory. *International journal of environmental analytical chemistry*, 93(7):707–726, 2013.
- [74] G. Gervais, S. Brosillon, A. Laplanche, and C. Helen. Ultra-pressure liquid chromatography–electrospray tandem mass spectrometry for multiresidue determination of pesticides in water. *Journal of Chromatography A*, 1202(2):163–172, 2008.
- [75] Tuija Pihlström, Anna Hellström, and Victoria Axelsson. Gas chromatographic analysis of pesticides in water with off-line solid phase extraction. *Analytica chimica acta*, 356(2-3):155–163, 1997.
- [76] Janusz Pawliszyn and Heather Lynn Lord. *Handbook of sample preparation*. Wiley Online Library, 2010.
- [77] Bruno Domon and Ruedi Aebersold. Mass spectrometry and protein analysis. *science*, 312(5771):212–217, 2006.
- [78] Douglas A. Skoog, Donald M. West, and F. James Holler. *Fundamentos de química analítica*, volume 2. Reverté, 1997.
- [79] Stephen Kokoska. *Statistical tables and formulae*. Springer ScienceBusinessMedia, 2012.
- [80] RELACRE, editor. *guia,elacre13validacaodemethodosinternosdeensaioemanalisequimica*, 2000.
- [81] Alankar Shrivastava, Vipin B. Gupta, et al. methods for the determination of limit of detection and limit of quantitation of the analytical methods. *chronicles of young scientists*, 2(1):21, 2011.
- [82] U. S. Environmental Protection Agency, editor. *single laboratory validated method for determination of microcystins and nodularin in ambient freshwaters by solid phase extraction and liquid chromatography tandem mass spectrometry (lc_{msms}), number EPA document EPA600/R17344*, 2017.

Apêndice A

Tabelas estatísticas

Tabela A.1: Valores críticos para o teste de Grubbs (G_{crit}) em função da dimensão da amostragem associados a um nível de confiança de 95%.

n	G_{crit}	n	G_{crit}	n	G_{crit}
3	1,15	11	2,34	19	2,68
4	1,48	12	2,41	20	2,71
5	1,71	13	2,46	21	2,73
6	1,89	14	2,51	22	2,76
7	2,02	15	2,55	23	2,78
8	2,13	16	2,54	24	2,80
9	2,21	17	2,62	25	2,82
10	2,29	18	2,65	30	2,91