

# Capítulo VI

## Desenvolvimento Experimental

### 1. Equipamento e Material

#### 1.1. Equipamento

- Cromatógrafo líquido de alta resolução, modelo Waters 2795 Separations Module, Waters, equipado com:
  - *Software* Masslynx versão 4.0 2002, Micromass Ltd
  - Coluna cromatográfica, dC18 150 mm de comprimento x 2,1 mm de diâmetro interno x 5 µm tamanho de partícula, Atlantis
  - Desgaseificador
  - Bomba quaternária
  - Injector automático
  - Compartimento termostaticado para coluna
- Espectrómetro de massa (MS/MS), modelo Waters – Micromass Quattro Micro API, Waters, equipado com:
  - Sonda de ionização por electrospray (ESI)
  - Analisador de triplo quadrupolo
  - Fotomultiplicador
- Balança analítica, modelo AE240, Mettler
- Vortex, modelo Gienie 2, Scientific Industries
- Sistema de obtenção de água ultra pura, modelo Mili-Q Academic A-10, Millipore
- Sistema de osmose inversa, modelo Rios 16, Millipore
- Sistema SPE, modelo Aspec XL, Gilson
- Sistema SPE, modelo Autotrace, Caliper Life Sciences, equipado com *software* versão 2.11.2 cartridge model
- Sistema de evaporação (fluxo de azoto), modelo Turbovap II Concentration Workstation, Zymark

## 1.2. Material

Nesta secção descreve-se o material específico utilizado na aplicação desta metodologia. Não se apresenta o material de uso corrente de laboratório.

- Membrana filtrante de celulose, 2  $\mu\text{m}$ , Millipore
- Tubos de evaporação 200 mL, graduados 0,5 e 1 mL, Zymark
- Cartuchos para SPE:
  - Waters Oasis HLB, 6 mL, 200 mg, 60  $\mu\text{m}$  – fase estacionária poli(divinilbenzeno-co-N-vinilpirrolidona)
  - Isolute C18 (EC), 6 mL, 1000 mg, 50  $\mu\text{m}$  – fase estacionária octadecilsilica ligada (*endcapped*)
- Vials 9 mm âmbar, 19x32, Waters
- Tubos de redução de volume (*inserts*) para vial, com capacidade para 250  $\mu\text{L}$ , Agilent
- Seringa de 50  $\mu\text{L}$ , 100  $\mu\text{L}$  e 250  $\mu\text{L}$ , Agilent

## 1.3. Reagentes

### 1.3.1. Gerais

- Água desmineralizada
- Água ultra pura (Millipore)
- Acetato de amónio, ( $\text{CH}_3\text{COONH}_4$ ), 98% *p.a.*, Merck
- Acetona, ( $\text{CH}_3\text{COCH}_3$ ), 99,5% (GC), Merck
- Acetona, ( $\text{CH}_3\text{COCH}_3$ ), AR, Merck
- Acetona, ( $\text{CH}_3\text{COCH}_3$ ), *p.a.*, Merck
- Ácido clorídrico fumante 37%, (HCl), *p.a.*, Merck
- Ácido sulfúrico, ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ ), 95-97% *p.a.*, Merck
- Diclorometano, ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ),  $\geq 99,8\%$  (HPLC), Sigma-Aldrich
- Dicromato de potássio, ( $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ ), *p.a.*, Merck
- n-Hexano, [ $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_4\text{CH}_3$ ], (GC), Merck
- Éter metil tert-butílico, [ $(\text{CH}_3)_3\text{COCH}_3$ ], (GC), Merck

- Metanol, (CH<sub>3</sub>OH), 99,9% (LC), Merck
- Tiosulfato de sódio pentahidratado, (Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub>·5H<sub>2</sub>O), 99,5% *p.a.*, Merck

### 1.3.2. Padrões Primários

Todos os padrões utilizados são de qualidade analítica adequada à análise por cromatografia.

- Bisfenol A, (C<sub>15</sub>H<sub>16</sub>O<sub>2</sub>), >99% (GC), TCI
- Dietilestilbestrol, (C<sub>18</sub>H<sub>20</sub>O<sub>2</sub>), >98% (W), TCI
- β-estradiol, (C<sub>18</sub>H<sub>24</sub>O<sub>2</sub>), >97% (GC), TCI
- Estriol, (C<sub>18</sub>H<sub>24</sub>O<sub>3</sub>), >99% (GC), TCI
- Estrona, (C<sub>18</sub>H<sub>22</sub>O<sub>2</sub>), >98% (GC), TCI
- α-Etinilestradiol, (C<sub>20</sub>H<sub>24</sub>O<sub>2</sub>), >98% (LC), Sigma-Aldrich
- Mestranol, (C<sub>21</sub>H<sub>26</sub>O<sub>2</sub>), >98% (LC), TCI
- Nonilfenol, (C<sub>15</sub>H<sub>24</sub>O), mistura de isómeros, TCI
- Octilfenol, (C<sub>14</sub>H<sub>22</sub>O), >93% (GC), TCI
- Progesterona, (C<sub>21</sub>H<sub>30</sub>O<sub>2</sub>), >98% (LC), TCI

## 2. Preparação de soluções

Todas as soluções são preparadas e armazenadas recorrendo a material de vidro. As soluções são armazenadas ao abrigo da luz e a uma temperatura entre 5 ± 3 °C.

### 2.1. Soluções Gerais

- Mistura cromossulfúrica

Num balão de vidro de 5 L dissolver aproximadamente 150 g de dicromato de potássio em 2,5 L de água ultra pura. Adicionar, lentamente e com precaução, 2,5 L de ácido sulfúrico concentrado.

- Metanol:água (1:1) (solução de lavagem da seringa)

Misturar 500 mL de água ultra pura com 500 mL de metanol. Filtrar esta solução em sistema de vácuo, recorrendo a uma membrana filtrante de celulose com 2  $\mu\text{m}$  de porosidade.

- Mistura metanol:água (8:2) + 5 mM de acetato de amónio (ST1)

Pesar 0,3845 g de acetato de amónio e dissolver em 200 mL de água ultra pura. Adicionar 800 mL de metanol. Filtrar em sistema de vácuo, recorrendo a uma membrana filtrante de celulose com 2  $\mu\text{m}$  de porosidade.

- Mistura metanol:água (4:6) + 5 mM de acetato de amónio (ST2)

Pesar 0,3845 g de acetato de amónio e dissolver em 600 mL de água ultra pura. Adicionar 400 mL de metanol. Filtrar em sistema de vácuo, recorrendo a uma membrana filtrante de celulose com 2  $\mu\text{m}$  de porosidade.

## 2.2. Fase Móvel para Cromatografia Líquida

- Solvente A [metanol:água (1:9) + 5 mM de acetato amónio]

Pesar 0,3845 g de acetato de amónio e dissolver em 900 mL de água ultra pura. Adicionar 100 mL de metanol. Filtrar em sistema de vácuo, recorrendo a uma membrana filtrante de celulose com 2  $\mu\text{m}$  de porosidade.

- Solvente B [metanol:água (9:1) + 5 mM acetato amónio]

Pesar 0,3845 g de acetato de amónio e dissolver em 100 mL de água ultra pura. Adicionar 900 mL de metanol. Filtrar em sistema de vácuo, recorrendo a uma membrana filtrante de celulose com 2  $\mu\text{m}$  de porosidade.

O acetato de amónio foi adicionado à fase móvel (solvente A e solvente B) e às misturas (ST1) e (ST2) para facilitar a ionização dos compostos no espectrómetro de massa.

## 2.3. Sistemas de Eluentes para SPE

Devido à natureza dos compostos em análise, todos os frascos de PVC do equipamento foram substituídos por frascos de vidro.

- Metanol:acetona (3:2)

Misturar 300 mL de metanol com 200 mL de acetona e juntar em frasco de vidro.

- Solução de metanol em éter metil tert-butílico (MTBE), 10%  
Pipetar 10 mL de metanol para um balão volumétrico de 100 mL e diluir com MTBE.
- Hexano:diclorometano (9:1)  
Misturar 90 mL de hexano com 10 mL de diclorometano.
- Metanol:diclorometano (9:1)  
Misturar 90 mL de metanol com 10 mL de diclorometano.
- Metanol:diclorometano (1:1)  
Misturar 50 mL de metanol com 50 mL de diclorometano.

## 2.4. Soluções Padrão

### 2.4.1. Soluções Mãe Individuais

As soluções mãe individuais (SMI) de cada composto são preparadas de modo a obter uma concentração de aproximadamente 200 mg/L. Pesar 0,0100 g  $\pm$  0,0005 de cada padrão primário para um balão volumétrico de 50 mL, dissolver com um pouco da mistura metanol:água (8:2) + 5 mM de acetato de amónio (ST1) e perfazer o volume.

A preparação das soluções mãe dos padrões de mestranol e de etinilestradiol seguiram uma metodologia diferente, devido à fraca dissolução destes compostos em água. Pesar 0,0100 g  $\pm$  0,0005 do padrão para um balão volumétrico de 50 mL e dissolver com cerca de 25 mL de metanol. Mergulhar o balão num copo com água quente ( $\cong$  60 °C). Deixar arrefecer até à temperatura ambiente e completar o volume com metanol.

### 2.4.2. Soluções para a Optimização das Condições de Operação do Espectrómetro de Massa

- Solução padrão conjunta intermédia (SPCI)  
Pipetar 1 mL de cada uma das soluções mãe individuais (SMI) para um balão volumétrico de 50 mL e diluir com a mistura ST2 ( $\pm$  4 mg/L).
- Solução padrão conjunta (SPC)  
Pipetar 5 mL da solução padrão conjunta intermédia (SPCI), para um balão volumétrico de 50 mL e diluir com a mistura ST2 ( $\pm$  400  $\mu$ g/L).

- Soluções padrão individuais para infusão (SMI)

As soluções padrão individuais dos compostos para infusão correspondem às soluções mãe individuais (SMI).

- Soluções padrão individuais para injeção na válvula rheodyne (SPI)

Para cada composto, pipetar 1 mL da solução mãe individual (SMI) para um balão volumétrico de 50 mL e diluir com a mistura ST2 ( $\pm 4$  mg/L).

### 2.4.3. Soluções para a Validação do Método LC-ESI-MS/MS

- Soluções padrão para o estudo de linearidade (SPLIN)

A partir da solução padrão conjunta (SPC) foram preparadas vinte soluções padrão de concentrações entre 1  $\mu\text{g/L}$  e 400  $\mu\text{g/L}$  por diluição com a mistura ST2.

### 2.4.4. Solução Padrão de Calibração

#### a) Gama Alta (PCGA)

A partir das soluções mãe individuais (SMI), pipetar 200  $\mu\text{L}$  (bisfenol A,  $\beta$ -estradiol, octilfenol, etinilestradiol e mestranol), 60  $\mu\text{L}$  (progesterona), 50  $\mu\text{L}$  (estriol e nonilfenol) e 20  $\mu\text{L}$  (dietilestilbestrol e estrona) para um balão volumétrico de 100 mL e perfazer com a mistura metanol:água (4:6) + 5 mM de acetato de amónio (ST2). A tabela VI.1 descreve a respectiva concentração para cada composto.

#### b) Gama Baixa (PCGB)

##### Solução 1

A partir das soluções mãe individuais pipetar, para um balão volumétrico de 10 mL, 1 mL de dietilestilbestrol e 1 mL de estrona e perfazer com a mistura ST2. Pipetar 50  $\mu\text{L}$  desta solução para um balão volumétrico de 100 mL. Para o mesmo balão volumétrico pipetar, a partir das soluções mãe individuais, 400  $\mu\text{L}$  de etinilestradiol, 300  $\mu\text{L}$  de mestranol, 200  $\mu\text{L}$  de  $\beta$ -estradiol, 150  $\mu\text{L}$  de progesterona e 100  $\mu\text{L}$  de bisfenol A, octilfenol, estriol e nonilfenol e perfazer o volume com a solução mistura ST2. A tabela VI.1 descreve a respectiva concentração para cada composto.

## Solução 2

Pipetar 10 mL de solução 1 para um balão volumétrico de 100 mL e perfazer o volume com a mistura ST2.

**Tabela VI.1:** Concentração de cada composto na gama alta e na gama baixa.

Composto	PCGA	PCGB
	Conc. ( $\mu\text{g/L}$ )	Conc. ( $\mu\text{g/L}$ )
Estriol	100	20
Bisfenol A	400	20
Dietilestilbestrol	40	1
Estrona	40	1
Estradiol	400	40
Etinilestradiol	400	80
Progesterona	120	30
Octifenol	400	20
Mestranol	400	60
Nonilfenol	100	20

### 2.4.5. Solução Padrão de Controlo

#### a) Gama Alta (PCTGA)

Para um balão volumétrico de 10 mL pipetar 5 mL da solução padrão de calibração (PCGA) e perfazer o volume com a mistura ST2.

#### b) Gama Baixa (PCTGB)

Pipetar 4 mL de solução 1 (gama baixa) para um balão volumétrico de 20 mL e perfazer o volume com a mistura ST2.

## 3. Técnica

### 3.1. Lavagem do Material

A lavagem do material de vidro é realizada de acordo com o seguinte procedimento:

1. Passar o material por acetona *p.a.*;
2. Lavar com água quente e detergente isento de fosfatos;
3. Enxaguar muito bem com água corrente;
4. Mergulhar o material lavado em mistura cromossulfúrica durante pelo menos 12 horas (ideal, 24 horas);
5. Enxaguar o material com água desmineralizada;
6. Passar o material por acetona para análise de resíduos (AR);
7. Secar o material em estufa a uma temperatura de  $45 \pm 5$  °C.

### **3.2. Optimização do Método Analítico LC-ESI-MS/MS**

As condições de operação são optimizadas em duas etapas principais, MS/MS e LC-ESI-MS/MS.

A primeira fase tem por objectivo a obtenção do ião precursor, resultante da ionização do analito, e a obtenção dos iões produto. É realizada no espectrómetro de massa através da análise de soluções padrão individuais dos compostos alvo. Para optimizar as condições de obtenção do ião precursor, as soluções padrão individuais (SMI) são injectadas manualmente, por infusão. Para obtenção dos iões produto são injectadas as soluções padrão individual (SPI), através da válvula de injeção, válvula rheodyne.

Numa segunda fase, e uma vez definidas as condições de operação para o espectrómetro de massa, é avaliado o comportamento dos compostos no sistema completo LC-ESI-MS/MS e são definidos os parâmetros cromatográficos.

A tabela VI.2 apresenta os parâmetros previamente definidos e mantidos durante a fase de optimização.

**Tabela VI.2:** Condições previamente definidas para o espectrómetro de massa.

Gás de nebulização, dessolvatação e de cone	Azoto
Gás de colisão	Árgon
Ionização	Electrospray
Extractor (V)	2
Radiofrequência (V)	0,5
Temperatura da fonte (°C)	150
Temperatura de dessolvatação (°C)	50
Fluxo do gás de dessolvatação (L/h)	350
Fluxo do gás no cone (L/h)	50

### 3.2.1. Condições da Fonte de Ionização - Ião Precursor

O ião pseudo-molecular, ou ião precursor, é obtido através da ionização do composto, por *electrospray*, sendo utilizado o azoto como gás de nebulização, dessolvatação e de cone e por aplicação de voltagem na fonte de ionização (energia de ionização) e no cone de extracção (voltagem de cone).

Para otimizar as condições operacionais de obtenção do ião precursor, são analisados isoladamente cada um dos compostos em estudo, injectando as soluções padrão individuais para infusão (SMI), com a concentração de 200 mg/L.

A optimização baseia-se essencialmente na selecção do modo de ionização (negativo ou positivo), da energia de ionização e da voltagem de cone.

Antes de iniciar a infusão, a seringa é lavada com metanol. Seguidamente, é injectado metanol através da seringa para a lavagem do capilar. Após esta operação liga-se o capilar ao MS e lava-se o sistema de infusão com metanol, a um fluxo de 30  $\mu$ L/min durante cerca de 2 minutos. As operações de lavagem da seringa, do capilar e do sistema de infusão são repetidas entre infusões de diferentes compostos.

A injeção é realizada por infusão directa no espectrómetro de massa em modo de aquisição *full scan* para o primeiro quadrupolo. Nesta fase o segundo quadrupolo e a energia de colisão não são utilizados.

As condições da fonte de ionização são seleccionadas de modo a obter o maior sinal para o ião precursor de cada composto em estudo, com o menor ruído da linha de base. Compararam-se as intensidades de sinal aplicando diferentes voltagens de cone,

em modo de ionização positivo e negativo, de forma a seleccionar o modo de ionização para cada um dos compostos em análise.

A voltagem de cone foi testada, em modo de ionização negativo, entre 10 e 90 V, mantendo constante a energia de ionização (3 kV).

Em modo de ionização positivo fez-se variar a voltagem de cone entre 5 e 80 V, mantendo constante a energia de ionização (3 kV).

Para os compostos que não apresentavam sinal num dos modos de ionização, estudaram-se outros valores de energia de ionização, entre 2 e 4 kV, fazendo variar a voltagem de cone entre 10 e 90 V.

Para a selecção da energia de ionização deve tomar-se em consideração qual o valor que apresenta melhores resultados para a maioria dos compostos, uma vez que não é possível alterar este parâmetro durante a análise em LC-MS/MS.

A intensidade de sinal obtido para cada um dos compostos em estudo, para a respectiva gama de voltagem de cone aplicada em modo de ionização negativo e positivo e para as diferentes energias de ionização, foi registado para posterior avaliação.

### **3.2.2. Condições do Triplo Quadrupolo - Iões Produto**

A obtenção dos iões produto de cada composto foi optimizada pela injeção no espectrómetro de massa (válvula de rheodyne) das soluções padrão individuais (SPI).

Esta fase é realizada em modo de aquisição *Daughter Scan*, ou seja modo SIM (Selected Ion Monitoring) para o primeiro quadrupolo e modo *full scan* para o segundo quadrupolo. Desta forma é garantida a passagem apenas do ião precursor no primeiro quadrupolo e a obtenção do espectro completo de iões produto resultante da fragmentação do ião precursor. Uma vez definidas as condições para o primeiro quadrupolo, são aplicados vários níveis de energia de colisão com o objectivo de analisar o comportamento do ião precursor. Dos espectros resultantes são avaliados os vários fragmentos e seleccionados os iões produto com melhor resultado em termos de intensidade de sinal.

Deste modo há a passagem apenas do ião precursor no primeiro quadrupolo, que é fragmentado por colisão com o argon na célula de colisão, sendo os fragmentos direccionados para o segundo quadrupolo. Esta metodologia permite obter a

informação espectral completa para cada composto. Por análise do espectro obtido, são seleccionados os dois iões produto com melhor intensidade de sinal, ou seja as duas transições que resultam nos dois iões produtos de maior intensidade de sinal. Os iões produto seleccionados possuem massa inferior ao seu ião precursor e este também deve ser visível no espectro de massa. Esta fragmentação quase total do ião precursor é importante, quando se pretende efectuar a identificação de um composto em modo *Daughter Scan*.

Optimizados os parâmetros operacionais para obtenção dos iões precursores e seleccionados os respectivos iões produto e respectivas energias de colisão, estão reunidas as condições para definir as duas transições para cada composto alvo. A primeira transição (MRM1) é usada na quantificação e a segunda transição (MRM2) é usada na qualificação de cada composto.

### 3.2.3. Condições Cromatográficas

Esta etapa tem como objectivo avaliar a ordem de eluição dos compostos e definir no *software* do equipamento as janelas de retenção para cada composto e o método que vai ser utilizado em futuros ensaios. Com este objectivo, foi injectado um volume de 50 µL da solução padrão conjunta (SPC), com a concentração de 400 µg/L, em modo MRM (Multiple Reaction Monitoring), ou seja modo SIM no primeiro e segundo quadropolos. As condições cromatográficas pré-definidas para a realização desta etapa encontram-se descritas nas tabelas VI.3 e VI.4.

**Tabela VI.3:** Condições cromatográficas definidas para análise dos compostos em estudo.

Coluna cromatográfica	Atlantis dC18 (150 mm x 2,1 mm, 5 µm)
Desgaseificador	Ligado
Fase móvel	A: metanol:água (1:9) B: metanol:água (9:1)
Fluxo do eluente	0,3 mL/min
Temperatura da coluna	30 °C
Volume de injeção	50 µL

**Tabela VI.4:** Gradiente da fase móvel.

Tempo (min)	Solvente A (%)	Solvente B (%)
0.0	100	0
15.0	0	100
20.0	0	100
20.1	100	0
25.0	100	0

Mediante a análise dos resultados é definida a ordem de eluição dos compostos e respectivos tempos de retenção ( $t_R$ ).

Nesta altura, temos os dados necessários para definir, no *software* do equipamento, o método para a análise dos desreguladores endócrinos (estriol, bisfenol A, dietilestilbestrol, estrona,  $\beta$ -estradiol, etinilestradiol, progesterona, octilfenol, mestranol e nonilfenol). O método tem de definir para cada composto o modo de ionização, a janela correspondente ao intervalo dos tempos de retenção, o ião precursor e respectivos iões produto, a voltagem de cone e a energia de colisão (para as duas transições seleccionadas). Os parâmetros analíticos estabelecidos para analisar os compostos em estudo são apresentados na tabela VI.5.

**Tabela VI.5:** Método criado no *software* do equipamento para análise dos compostos alvo por LC-ESI-MS/MS.

Composto	Modo de ionização	Janela de retenção (min)	Ião precursor	Iões produto	Voltagem de cone (V)	Energia de colisão (eV)
Estríol	-	3:00 – 13:50	287,40	145,40	60	40
				171,30	60	40
Bisfenol A	-	13:20 – 15:60	227,40	133,20	40	20
				212,30	40	20
Dietilestilbestrol	-	14:60 – 16:80	267,30	237,40	40	25
				251,40	40	25
Estrona	-	14:60 – 16:90	269,30	143,00	60	55
				145,20	60	40
β-estradiol	-	14:65 – 17:00	271,40	143,00	65	65
				145,30	65	40
Ethinilestradiol	-	14:85 – 16:50	295,41	144,95	50	39
				159,03	50	34
Progesterona	+	16:50 – 18:50	315,40	96,90	35	20
				108,90	35	25
Octilfenol	-	17:60 – 19:20	205,20	133,00	45	30
				134,00	45	20
Mestranol	+	17:80 – 19:40	311,40	121,20	30	20
				159,20	30	15
Nonilfenol	-	18:25 – 20:50	219,40	119,00	40	22
				133,30	40	30

A energia de ionização aplicada para o método foi de 3 kV.

(-): Modo de ionização negativo. (+): Modo de ionização positivo

### 3.3. Validação do Método LC-ESI-MS/MS

Para a validação do método LC-ESI-MS/MS foram realizados vários testes com o objectivo de avaliar o intervalo de linearidade e gama de trabalho, os limiares analíticos, a precisão e a exactidão do método.

#### 3.3.1. Estudo da Linearidade

Para a determinação do intervalo de linearidade, foram analisadas 21 soluções padrão (SPLIN), numa gama de concentrações entre 1 a 400 µg/L.

Os resultados obtidos foram tratados de modo a obter a recta de calibração através do método dos mínimos quadrados (área vs concentração). A estes resultados foram

aplicados vários testes, nomeadamente, o das áreas normalizadas, a análise de resíduos, o teste de RIKILT e o teste de Mandel.

Os critérios internos estabelecidos para de aceitação dos resultados foram:

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

Ao longo da gama de concentrações do intervalo de linearidade foi ainda estudada a variabilidade da razão MRM1/MRM2, usada como critério de qualificação.

### 3.3.2. Limiares Analíticos

Os limites de detecção e de quantificação do método LC-ESI-MS/MS foram calculados em condições de repetibilidade e considerando os dados da equação da recta obtida após o estudo do intervalo de linearidade, (Anexo 11).

### 3.3.3. Precisão

A precisão foi estudada em condições de repetibilidade e de precisão intermédia. Para a avaliação da repetibilidade foram analisadas na mesma série de trabalho 10 soluções de dois níveis de concentração diferentes para cada composto. As concentrações correspondem ao nível mais baixo e mais elevado do intervalo de linearidade. Para a avaliação da precisão intermédia foram analisadas, em séries de trabalho independentes, 13 soluções de um nível de concentração para cada composto. Para o estudo da precisão intermédia foram analisadas soluções padrão controlo correspondentes à gama baixa (PCTGB).

### 3.4. Optimização da Técnica SPE

Com o objectivo de optimização da técnica SPE são avaliadas e optimizadas várias condições operacionais, nomeadamente o tipo de cartucho, o tipo de eluente, a secagem do cartucho, o fluxo de passagem da amostra e as condições de concentração do eluído. A concentração do eluído no sistema de evaporação por fluxo de azoto (Turbovap) foi efectuada até um volume de 0,25 mL. De seguida foi efectuado o acerto de volume a 0,5 mL utilizando a mistura ST2.

As condições previamente estabelecidas em SPE que foram utilizadas nos estudos subsequentes são apresentadas na tabela VI.6.

**Tabela VI.6:** Condições de SPE previamente definidas.

Fluxo de condicionamento do cartucho	10 mL/min
Volume da amostra (água ultra pura)	500 mL
Volume de lavagem (água ultra pura)	3 mL
Fluxo de lavagem	10 mL/min
Fluxo de eluição	2 mL/min
Gás de secagem do cartucho	Azoto
Turbovap	0,2 bar/35 °C

Os parâmetros optimizados para a análise por LC-MS/MS (tabela VI.2 e tabela VI.3) mantiveram-se constantes. A calibração instrumental foi efectuada por análise do padrão de calibração e através do método do factor de resposta.

Em cada série de trabalho, foi determinado o Factor de Resposta (FR) para cada composto, através da injeção da solução padrão de calibração (PCGA), preparada no próprio dia.

A análise do padrão de controlo (PCTGA) no início, no meio e no fim da sequência analítica permitiu garantir a estabilidade da calibração ao longo do tempo de análise.

#### 3.4.1. Selecção do Cartucho de SPE e do Eluente

Neste estudo foram testados os cartuchos Isolute C18 (EC) e Oasis HLB devido às características dos tipos de enchimento serem favoráveis à extracção de compostos de polaridade média a alta. Foi igualmente tido em consideração o facto de estes

cartuchos serem os mais referenciados na literatura para análise de compostos desreguladores endócrinos (hormonas naturais, hormonas de síntese, bisfenol A e alquilfenóis etoxilatos) em águas.

Para a selecção do cartucho de SPE foram testadas soluções de 500 mL de água ultra pura fortificadas com 0,5 mL da solução padrão de calibração (PCGA).

A tabela VI.7 apresenta os cartuchos de SPE e os solventes usados nas várias fases da técnica de SPE. Para cada cartucho estudado e para cada conjunto de solventes estudado foram analisadas 3 réplicas. Após concentração no Turbovap, as amostras foram analisadas por LC-ESI-MS/MS.

Os primeiros eluentes a serem testados foram seleccionados de acordo com os seguintes critérios:

- O metanol:acetona (3:2) foi o primeiro eluente a ser testado porque é um solvente adequado à extracção de compostos polares
- O eluente metanol:éter metil tert-butílico 10% foi testado adaptando uma metodologia recomendada para os estrogénios em águas superficiais <sup>[168]</sup>. Neste caso, e de acordo com o procedimento, a amostra foi acidificada a pH 3 por adição de ácido clorídrico e foi usado o cartucho Oasis HLB
- A mistura de eluentes hexano:diclorometano (9:1) e metanol:diclorometano (9:1) foi utilizada num trabalho de investigação desenvolvido no intuito de definir um método de análise para surfactantes não iónicos polietoxilatos (onde se inclui o nonilfenol e o octilfenol) <sup>[71]</sup>

Com o objectivo de testar diferentes polaridades testaram-se posteriormente os seguintes eluentes:

- Metanol:diclorometano (9:1) e metanol:diclorometano (9:1)
- Metanol:diclorometano (9:1) e metanol:acetona (3:2)
- Metanol:diclorometano (1:1) e metanol:acetona (3:2)

**Tabela VI.7:** Cartuchos e solventes estudados na otimização da técnica de SPE.

Cartucho	Ativação/Condicionamento	Eluente	Eluição
Waters Oasis HLB	6 mL metanol:acetona (3:2)	<b>A</b>	4+2+2 mL metanol:acetona (3:2)
	6 mL metanol		
	6 mL água ultra pura		
	3 mL metanol:éter metil tert-butílico 10%	<b>B</b>	4+2+2 mL metanol:éter metil tert-butílico 10%
3 mL éter metil tert-butílico			
3 mL metanol			
Isolute C18 (EC)	3 mL água ultra pura		
	6 mL metanol:acetona (3:2)	<b>A</b>	4+2+2 mL metanol:acetona (3:2)
	6 mL metanol		
	6 mL água ultra pura		
	6 mL diclorometano	<b>C</b>	5+5 mL hexano:diclorometano (9:1) 5+5 mL metanol:diclorometano (9:1)
	6 mL metanol		
	6 mL água ultra pura		
	6 mL metanol	<b>D</b>	5+5 mL metanol:diclorometano (1:1) 5+5 mL metanol:diclorometano (9:1)
	6 mL diclorometano		
	6 mL água ultra pura		
	6 mL metanol:acetona (3:2)	<b>E</b>	2+3 mL metanol:diclorometano (9:1) 2+3 mL metanol:acetona (3:2)
	6 mL metanol		
6 mL água ultra pura			
6 mL metanol:acetona (3:2)	<b>F</b>	2+3 mL metanol:diclorometano (1:1) 2+3 mL metanol:acetona (3:2)	
6 mL metanol			
6 mL água ultra pura			

As amostras analisadas utilizando o éter metil tert-butílico como solvente de eluição foram acidificadas a pH 3. Para tal, adicionar 2 gotas de ácido clorídrico num volume de amostra de 2000 mL.

### 3.4.2. Efeito do Fluxo de Passagem da Amostra

Para avaliar o melhor fluxo de passagem da amostra analisaram-se duas amostras de 500 mL de água ultra pura fortificada com 0,5 mL da solução padrão de calibração (PCGA) a dois fluxos, 10 mL/min e 30 mL/min. O ensaio foi realizado com o cartucho Oasis HLB, utilizando o solvente metanol:acetona (3:2) com a respectiva activação do cartucho (tabela VI.6).

### **3.4.3. Efeito do Tempo de Secagem do Cartucho**

Com o objectivo de avaliar qual o tempo de secagem de cartucho que permite obter melhores recuperações foram analisadas duas amostras de 500 mL de água ultra pura fortificadas com 0,5 mL da solução padrão de calibração (PCGA), sob três condições: sem secagem de cartucho e secagem durante 5 e 10 minutos.

Para o ensaio foram utilizados os cartuchos Isolute C18 (EC) e Oasis HLB e o solvente metanol:acetona (3:2) com a respectiva activação do cartucho (tabela VI.6), a um fluxo de passagem da amostra de 30 mL/min.

### **3.4.4. Efeito da temperatura de evaporação**

A etapa de concentração conjuga a passagem de fluxo de azoto a uma determinada pressão e temperatura. Pode determinar-se qual o melhor binómio pressão de azoto/temperatura variando as condições isoladamente e mantendo as restantes condições do método constantes.

Para avaliar qual temperatura ideal de concentração, que reduza o tempo da operação sem perda dos compostos, foi preparada uma solução idêntica à solução padrão de calibração (PCGA) mas diluída em metanol. Transferiu-se directamente 5 mL para o tubo de concentração e levou-se ao Turbovap a concentrar até um volume de 0,25 mL. O volume foi completado a 0,5 mL com a mistura metanol:água (ST2). Foram ensaiadas as temperaturas de 35, 40, 45 e 50 °C. Os extractos concentrados foram analisados por LC-ESI-MS/MS.

## **3.5. Estudos de Recuperação**

Para efeitos de validação da técnica de SPE foram realizados ensaios de recuperação em água ultra pura e em diferentes matrizes, nomeadamente água superficial (captação Tejo, captação Castelo de Bode), água subterrânea (poço Alenquer) e água da rede de distribuição da EPAL (torneira do consumidor).

A água da rede de distribuição foi analisada após tratamento com tiosulfato de sódio (0,2 g/L), o qual tem por finalidade eliminar a interferência do cloro residual livre (oxidante).

Os ensaios em água ultra pura tiveram como objectivo otimizar o nível de fortificação adequado aos ensaios de recuperação nas matrizes reais. Os ensaios foram realizados

com 500 mL de água ultra pura fortificada com 1 mL e 1,5 mL da solução padrão de calibração (PCGB).

Para as matrizes reais foi analisado um volume de amostra de 500 mL, fortificado com 1 mL da solução padrão de calibração (PCGB). Por cada matriz estudada foram analisadas no mínimo seis réplicas. Foram aplicadas as condições descritas na tabela VI.8. Em cada série de trabalho foi efectuada a calibração instrumental com o padrão de calibração (PCGB). A confirmação da estabilidade da calibração foi efectuada com o padrão de controlo (PCTGB).

**Tabela VI.8:** Condições de SPE usadas nos estudos de recuperação.

<b>Condições para a técnica de SPE</b>	
Cartucho	Oasis HLB
Activação do cartucho de SPE	6 mL metanol:acetona (3:2)
	6 mL metanol
	6 mL água ultra pura
Fluxo de passagem amostra	30 mL/min
Tempo de secagem do cartucho	5 min
Eluição	4+2+2 mL
	metanol:acetona (3:2)
<b>Condições do Turbovap</b>	
Temperatura	40 °C
Pressão	0,2 bar

A percentagem de recuperação,  $Rec(\%)$ , foi determinada de acordo com a seguinte equação:

$$Rec(\%) = \frac{C_a}{C_T} \times 100$$

Em que:

$C_a$  Concentração do composto na amostra fortificada, determinada experimentalmente ( $\mu\text{g/L}$ )

$C_T$  Concentração teórica do composto na amostra fortificada ( $\mu\text{g/L}$ )

### 3.6. Limites de Determinação do Método Global

Após os estudos de recuperação, estamos em condições de calcular o limite de determinação ( *LD* ) do método SPE-LC-ESI-MS/MS. A determinação do *LD* é calculada de acordo com a seguinte equação:

$$LD = \frac{C_p}{F_c} \times \frac{100}{Rec}$$

Em que:

*C<sub>p</sub>* Concentração do composto no padrão de calibração (µg/L), correspondente ao padrão de menor concentração

*F<sub>c</sub>* Factor de concentração

*Rec* Percentagem de recuperação (%)

## 4. Estimativa da Incerteza Expandida do Método

Qualquer medição tem um erro associado, que irá variar consoante o tipo de medição, e que poderá ser conhecido ou desconhecido. A descrição deste erro desconhecido é a medição da incerteza. Descrever a incerteza associada a um resultado de uma medição constitui uma boa prática e permite ao técnico avaliar de forma mais adequada o resultado obtido.

A norma NP EN ISO IEC 17025 <sup>[181]</sup>, pela qual o Laboratório Central da EPAL se encontra acreditado, refere a necessidade da aplicação do cálculo da estimativa das incertezas aos métodos analíticos executados. Os cálculos são efectuados, tendo como base, os requisitos do Guia Eurachem CITAC CG 4 <sup>[182]</sup>.

De acordo com o Anexo 12, a estimativa da incerteza expandida, para cada um dos compostos em estudo, foi efectuada após determinação das componentes de incerteza individuais. A partir destas calcula-se a incerteza combinada, *u<sub>c</sub>(C)* e, a partir desta, a incerteza expandida, *U(C)*, para um nível de significância de 95%.

## 5. Análise de Amostras

Foram analisadas 43 amostras entre Maio e Junho de 2008, colhidas nas captações de água e no sistema de abastecimento da EPAL. As diversas amostras foram agrupadas

de acordo com a sua origem. Na tabela VI.9 apresentam-se os grupos de amostras. O anexo 5 apresenta a listagem das amostras analisadas.

**Tabela VI.9:** Amostras agrupadas de acordo com a sua origem.

<b>Grupo</b>	<b>Descrição</b>
Sistema de adução/transporte	Adutores, aquedutos, condutas, reservatórios e estações elevatórias de água tratada, parte do sistema de transporte ou adução
Rede de distribuição	Tubagens de água tratada, parte da rede de distribuição
Torneiras de consumidores	Vários pontos de colheita, à saída da torneira do consumidor (abrange rede predial)
Captações subterrâneas	Poços/nascentes de águas subterrâneas (água bruta)
Captações superficiais	Captação de água superficial (água bruta)

## 5.1. Colheita

As amostras foram colhidas em frascos de vidro âmbar e armazenados a  $5 \pm 3$  °C. O volume de amostra colhida foi de 1000 mL para cada ensaio. A extracção em SPE e análise por LC-ESI-MS/MS seguiu as condições experimentais já definidas (tabelas VI.1, VI.2, VI.3 e VI.4, VI.5. e VI.7).

Às amostras de água para consumo humano (água tratada) adicionou-se tiosulfato de sódio pentahidratado na proporção de 0,1 g/500 mL.

## 5.2. Análise

Cada amostra é analisada por SPE-ESI-LC-MS/MS de acordo com as condições optimizadas (tabela VI.4 e tabela VI.7). Em cada série de trabalho é injectada uma solução de calibração (PCGB) e uma solução padrão de controlo (PCTGB). A primeira tem por objectivo a calibração instrumental do LC-MS/MS através do método do factor de resposta e permite determinar o intervalo de aceitação da razão MRM1/MRM2 para cada um dos compostos. Este intervalo é tido em consideração para a identificação do

composto. A segunda permite monitorizar a estabilidade da resposta, em termos de sinal, do equipamento ao longo da sequência de análise, pelo que é analisada várias vezes, geralmente início, meio e fim, dependendo da extensão da sequência de análise. É uma medida de exactidão da análise no LC-ESI-MS/MS.

### 5.2.1. Quantificação

A calibração instrumental foi efectuada através da injeção directa da solução padrão de calibração (PCGA), de concentração conhecida para cada um dos compostos. Com base nos sinais cromatográficos obtidos é possível determinar o factor de resposta ( $F_R$ ) individual do seguinte modo:

$$F_R = \frac{C_p}{A_p}$$

Em que:

- $C_p$  Concentração do composto no padrão de calibração ( $\mu\text{g/L}$ )
- $A_p$  Área do pico cromatográfico referente à transição MRM1 de quantificação do composto no padrão de calibração

A concentração de cada composto na amostra,  $C_a$  ( $\mu\text{g/L}$ ), é calculada de acordo com a equação:

$$C_a = \frac{A_a \times F_R \times V_{ext}}{V_a \times \text{Rec}}$$

Em que:

- $A_a$  Área do pico cromatográfico, referente à transição de quantificação (MRM1), do composto na amostra
- $F_R$  Factor de resposta do composto
- $V_{ext}$  Volume do extracto (mL)
- $V_a$  Volume da amostra (mL)
- $\text{Rec}$  Percentagem de recuperação (%)