

Capítulo VII

Resultados e Discussão

1. Optimização do Método Analítico LC-ESI-MS/MS

1.1. Condições da Fonte de Ionização - Ião Precursor

A informação obtida durante a fase de optimização é utilizada para seleccionar as condições de operação, nomeadamente, o modo de ionização, a energia de ionização e a voltagem de cone para cada um dos compostos em estudo.

As figuras VII.1 e VII.2 apresentam o resultado obtido para cada um dos compostos aplicando uma ionização negativa e positiva, respectivamente, mantendo a energia de ionização a 3 kV.

Para a maioria dos compostos, as baixas voltagens de cone conduzem a uma baixa intensidade de sinal. O mesmo acontece para as voltagens de cone superiores.

O modo de ionização negativo não permite a análise do mestranol. Por sua vez, o modo de ionização positivo não permite a análise do β -estradiol, etinilestradiol e do octilfenol. Esta conclusão também se aplica ao intervalo de energias de ionização entre 2 e 4 kV, testado nestes compostos, em ambos os modos de ionização.

Alguns compostos, como o estriol e a estrona, não apresentam diferenças significativas na intensidade de sinal em ambos os modos de ionização.

As voltagens de cone e energias de ionização óptimas, para ambos os modos de ionização, são apresentadas na tabela VII.1. Nesta tabela apresenta-se também o intervalo de energias de ionização aplicado aos compostos que não permitem a análise num dos modos de ionização.

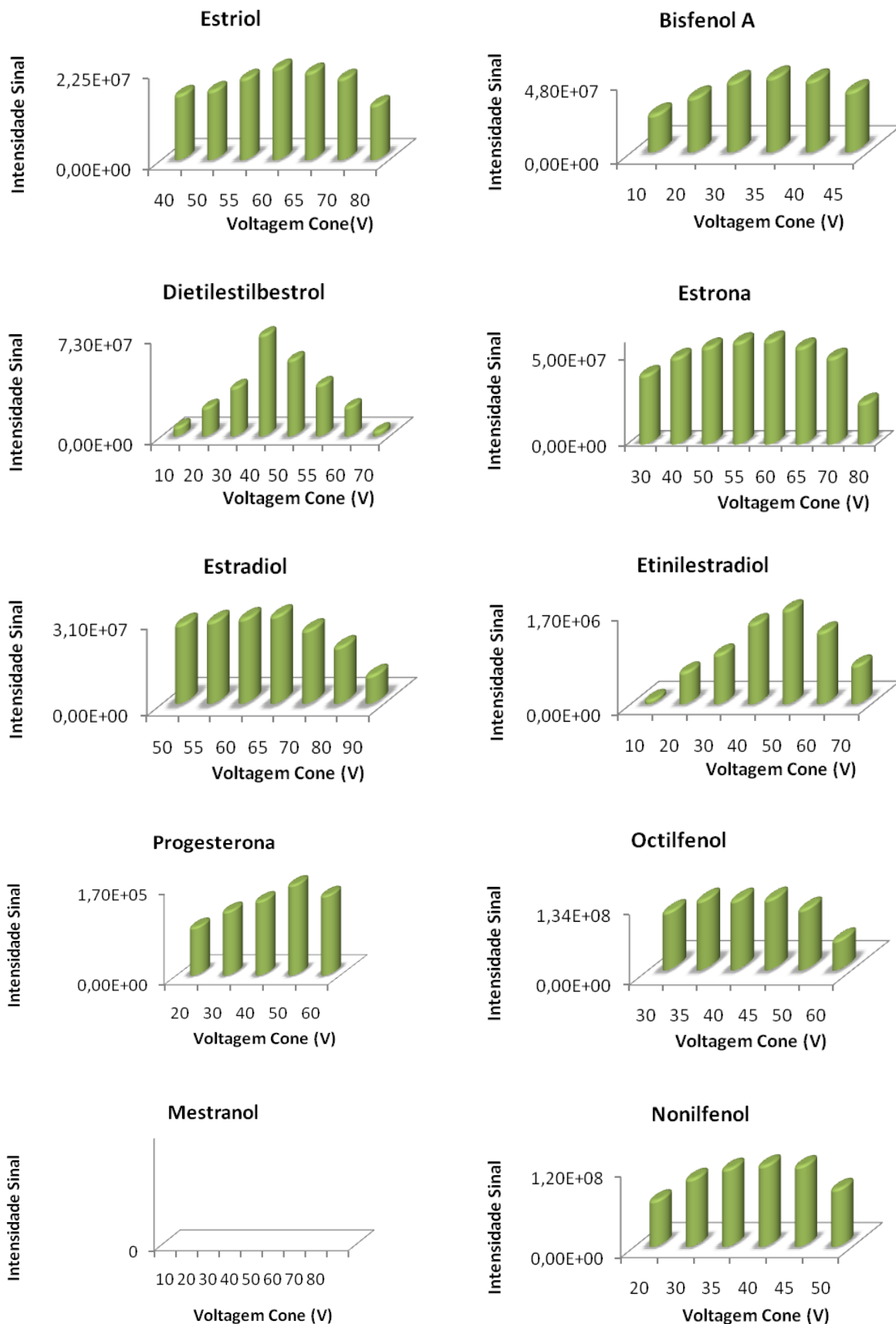


Figura VII.1: Aplicação de ionização negativa por *electrospray*, mantendo constante a energia de ionização a 3 kV.

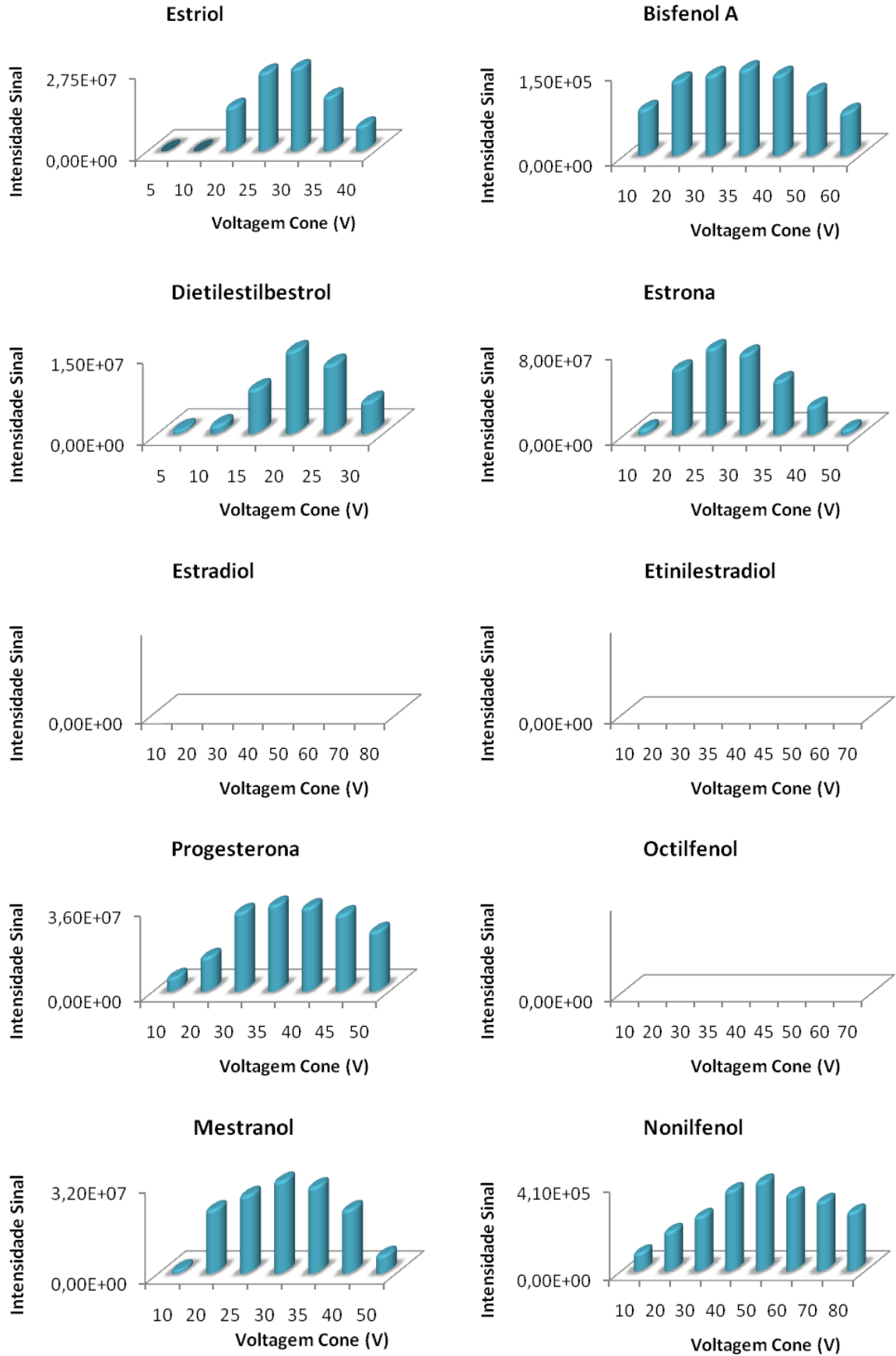


Figura VII.2: Aplicação de ionização positiva por *electrospray*, mantendo constante a energia de ionização a 3 kV.

Tabela VII.1: Condições ótimas em ambos os modos de ionização (negativo e positivo).

Composto	Massa Molecular	ESI	Ião Precursor	Energia de Ionização (kV)	Voltagem de Cone (V)	Intensidade do sinal
Estríol	288,38	-	287,38	3	60	2,25E+07
		+	289,38	3	30	2,75E+07
Bisfenol A	228,29	-	227,29	3	40	4,80E+07
		+	229,29	3	35	1,50E+05
Dietilestilbestrol	268,35	-	267,35	3	40	7,30E+07
		+	269,35	3	20	1,50E+07
Estrona	270,37	-	269,37	3	60	6,00E+07
		+	271,37	3	25	8,00E+07
β-Estradiol	272,38	-	271,38	3	65	3,10E+07
		+	273,38	[2; 4]	[10; 90]	-
Etinilestradiol	296,40	-	295,41	3	50	1,70 E+06
		+	297,41	[2; 4]	[10; 90]	-
Progesterona	314,45	-	313,45	3	50	1,70E+05
		+	315,45	3	35	3,60E+07
Octilfenol	206,32	-	205,32	3	45	1,34E+08
		+	207,32	[2; 4]	[10; 90]	-
Mestranol	310,43	-	309,43	[2; 4]	[10; 90]	-
		+	311,40	3	30	3,20 E+07
Nonilfenol	220,35	-	219,35	3	40	1,20E+08
		+	221,35	3	50	4,10E+05

No caso da estrona e do estríol o modo de ionização positivo, aplicando uma energia de ionização de 3 kV, permitiu obter melhor intensidade de sinal. No entanto, como há um aumento do ruído da linha de base optou-se pelo modo de ionização negativo. A energia de ionização de 3 kV foi a que permitiu obter os melhores resultados para a maioria dos compostos. Fixando este parâmetro e o melhor modo de ionização para cada composto, seleccionou-se a voltagem de cone que permitiu obter o melhor sinal.

A tabela VII.2 resume a informação das condições definidas, após optimização, para obtenção do ião precursor.

Tabela VII.2: Resumo das condições ótimas para obtenção do ião precursor. A energia de ionização foi fixada a 3 kV.

Padrão	Massa Molecular	Ionização (Electrospray)	Ião Precursor	Voltagem de Cone (V)
Estriol	288,38	(-)	287,40	60
Bisfenol A	228,29	(-)	227,40	40
Dietilestilbestrol	268,35	(-)	267,30	40
Estrona	270,37	(-)	269,30	60
β -Estradiol	272,38	(-)	271,40	65
Etinilestradiol	296,40	(-)	295,41	50
Progesterona	314,45	(+)	315,40	50
Octilfenol	206,32	(-)	205,20	45
Mestranol	310,43	(+)	311,40	30
Nonilfenol	220,35	(-)	219,40	40

1.2. Condições do Triplo Quadrupolo - Iões Produto

Definidas as condições ótimas para obtenção do ião precursor, no primeiro quadrupolo, é feita a avaliação do espectro obtido da fragmentação de cada ião precursor nas diversas energias de colisão aplicadas, por análise em modo *Daughter Scan*, ou seja modo SIM no primeiro e modo *full scan* no segundo quadrupolo. A título de exemplo, apresentam-se os espectros de fragmentação do etinilestradiol e da progesterona. A figura VII.3 apresenta o espectro resultante da fragmentação do etinilestradiol, em modo de ionização negativo, por aplicação de energias de colisão de 39 eV e 34 eV para obtenção do ião produto de quantificação e do ião produto de qualificação, respectivamente. A figura VII.4. apresenta o espectro de massas obtido após fragmentação do ião precursor da progesterona, em modo de ionização positivo, por aplicação de energias de colisão de 20 eV e 25 eV para a obtenção do ião produto de quantificação e do ião produto de qualificação, respectivamente.

De um modo geral, os compostos com melhor comportamento em ionização negativa são fragmentados com maiores energias de colisão, enquanto os que são ionizados em modo positivo são fragmentados com energias de colisão mais baixas. Para a maioria dos compostos foi necessário recorrer a diferentes energias de colisão para obter os dois iões produto.

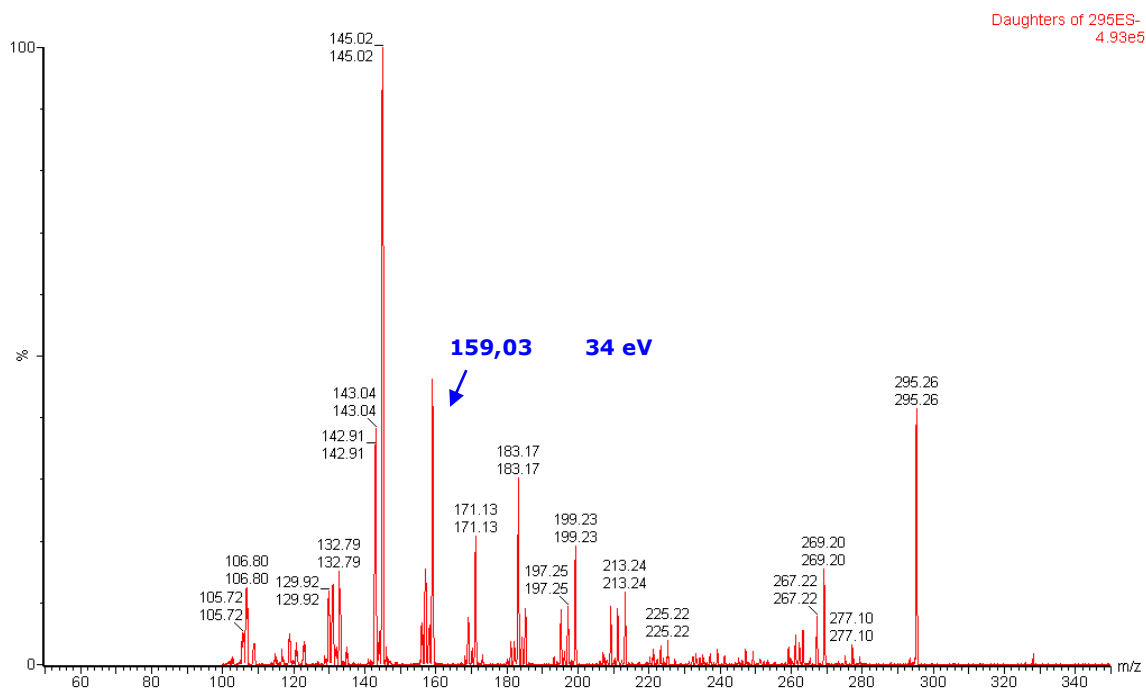
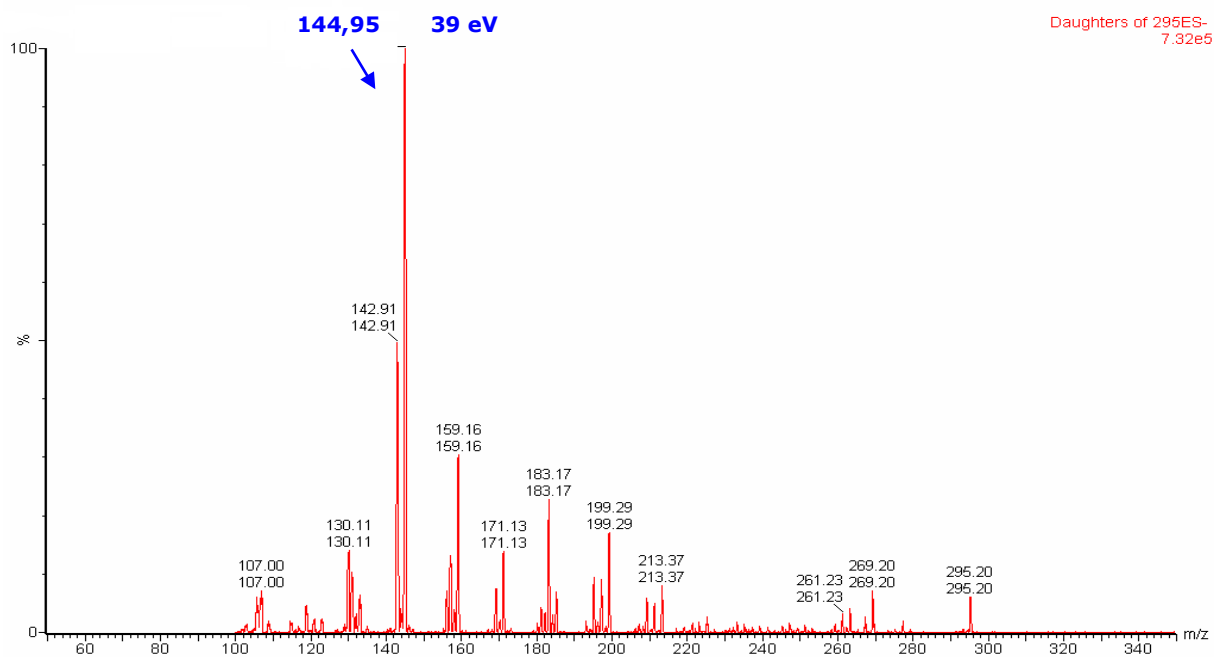


Figura VII.3: Espectro de massas obtido após fragmentação do íon precursor do etinilestradiol, em modo de ionização negativo. Em cima a primeira transição (MRM1), de quantificação, e em baixo a segunda transição (MRM2), de qualificação.

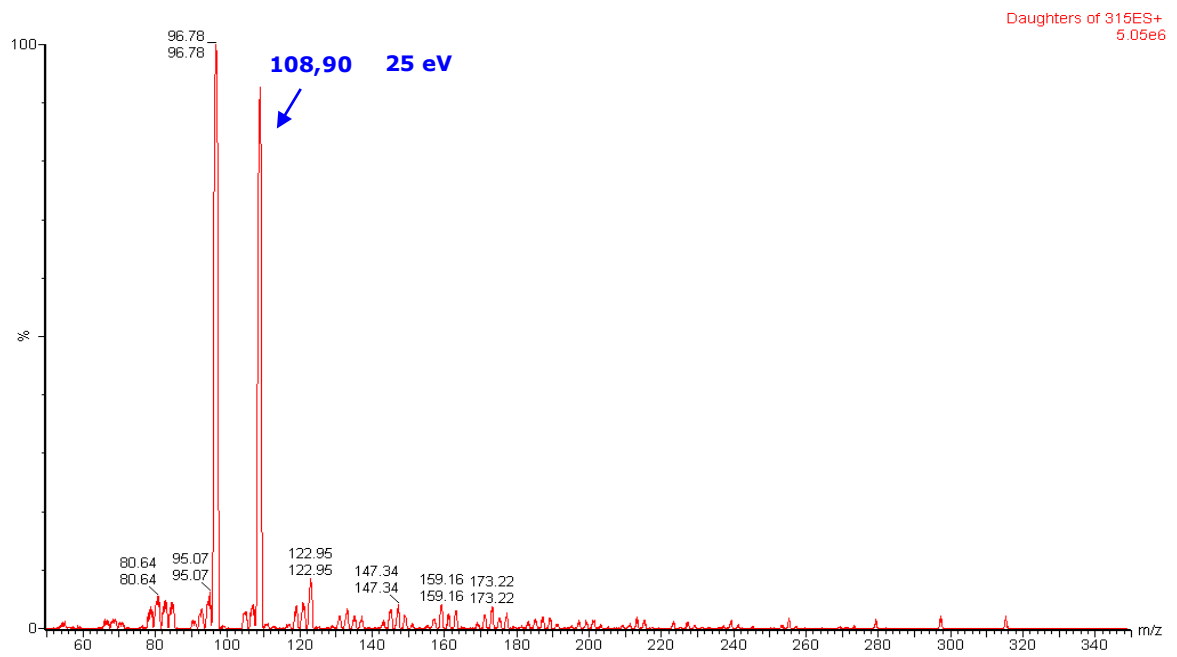
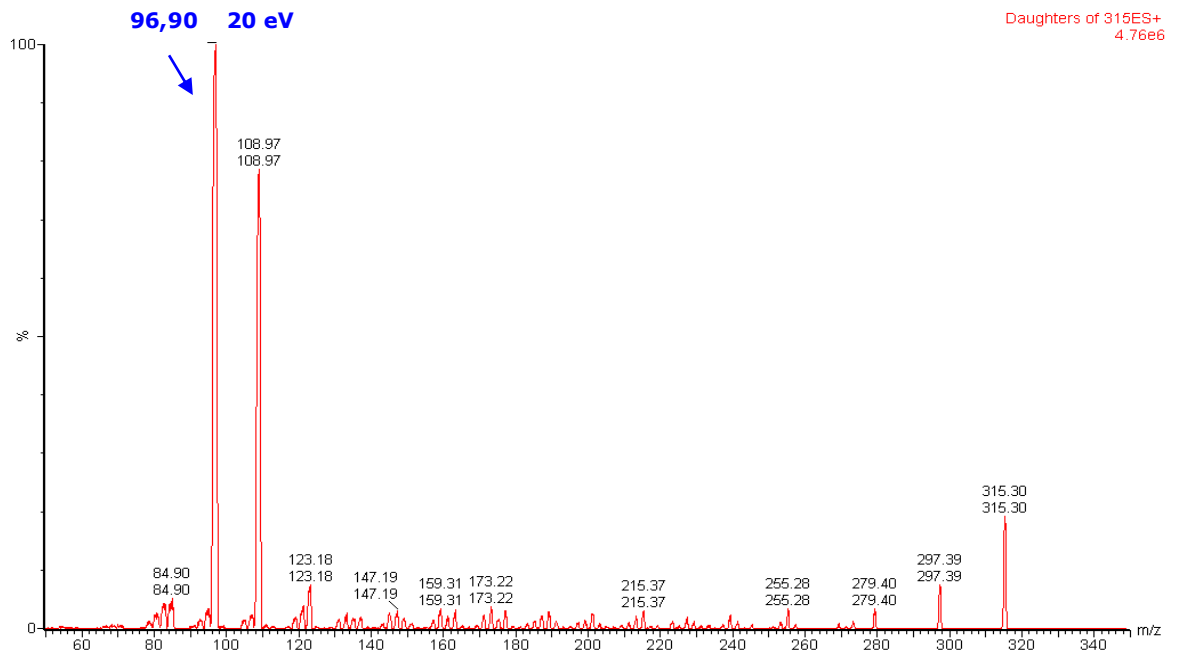


Figura VII.4: Espectro de massas obtido após fragmentação do íon precursor da progesterona, em modo de ionização positivo. Em cima a primeira transição (MRM1), de quantificação, e em baixo a segunda transição (MRM2), de qualificação.

A figura VII.5 apresenta o efeito da energia de colisão na fragmentação do íon precursor da progesterona e do etinilestradiol, em modo de ionização positivo e negativo, respectivamente. A intensidade do sinal do íon precursor e do íon produto são maiores para a progesterona (eixo esquerdo das ordenadas) do que para o etinilestradiol (eixo direito das ordenadas).

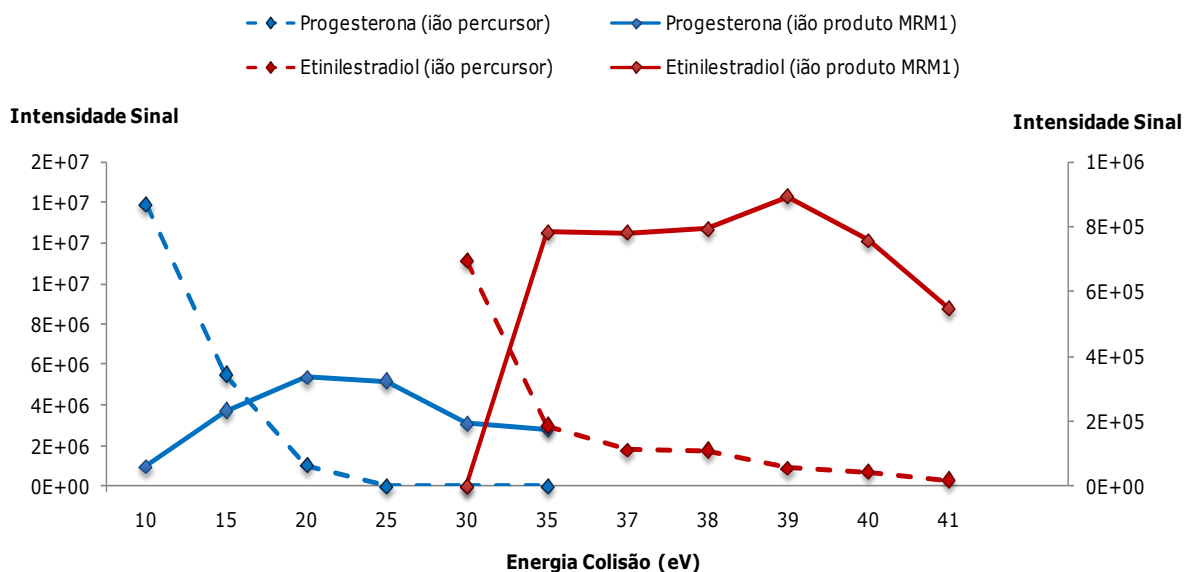


Figura VII.5: Efeito da energia de colisão na fragmentação do íon precursor da progesterona e do etinilestradiol.

Na figura podemos observar que o aumento da energia de colisão aumenta a fragmentação do íon precursor. A sua fragmentação origina a formação do íon produto, que sofre igualmente fragmentação com o aumento da energia de colisão.

As duas transições seleccionadas para cada composto, bem como as condições óptimas de operação, são descritas na tabela VII.3.

Tabela VII.3: Resumo das condições ótimas para obtenção dos íões produto e respectivas transições seleccionadas para cada composto em estudo.

Padrão	Ionização (Electrospray)	Transição MRM (m/z)		Energia de Colisão (eV)
Estriol	(-)	MRM1	287,40 → 145,40	40
		MRM2	287,40 → 171,30	40
Bisfenol A	(-)	MRM1	227,40 → 212,30	20
		MRM2	227,40 → 133,20	20
Dietilestilbestrol	(-)	MRM1	267,30 → 251,40	25
		MRM2	267,30 → 237,40	25
Estrona	(-)	MRM1	269,30 → 145,20	40
		MRM2	269,30 → 143,00	55
β-Estradiol	(-)	MRM1	271,40 → 145,30	40
		MRM2	271,40 → 143,00	65
Etinilestradiol	(-)	MRM1	295,41 → 144,95	39
		MRM2	295,41 → 159,03	34
Progesterona	(+)	MRM1	315,40 → 96,90	20
		MRM2	315,40 → 108,90	25
Octilfenol	(-)	MRM1	205,20 → 134,00	20
		MRM2	205,20 → 133,00	30
Mestranol	(+)	MRM1	311,40 → 121,20	20
		MRM2	311,40 → 159,20	15
Nonilfenol	(-)	MRM1	219,40 → 133,30	30
		MRM2	219,40 → 119,00	22

1.3. Condições Cromatográficas

A análise dos compostos é realizada com o equipamento de LC-ESI-MS/MS, utilizando as condições operacionais aplicadas para o espectrómetro de massa que são referidas nas tabelas VII.2 e VII.3.

Nesta fase é avaliada a ordem de eluição e a resolução cromatográfica através dos respectivos tempos de retenção (t_R) característicos para cada composto. O tempo de retenção varia com a afinidade dos compostos para a coluna cromatográfica. Quanto maior a afinidade para a coluna maior o tempo de retenção. A resolução cromatográfica avalia a existência ou não de coeluição de compostos.

A figura VII.6 apresenta o cromatograma da análise da solução padrão conjunta. Os picos indicam a transição MRM1 para cada um dos compostos.

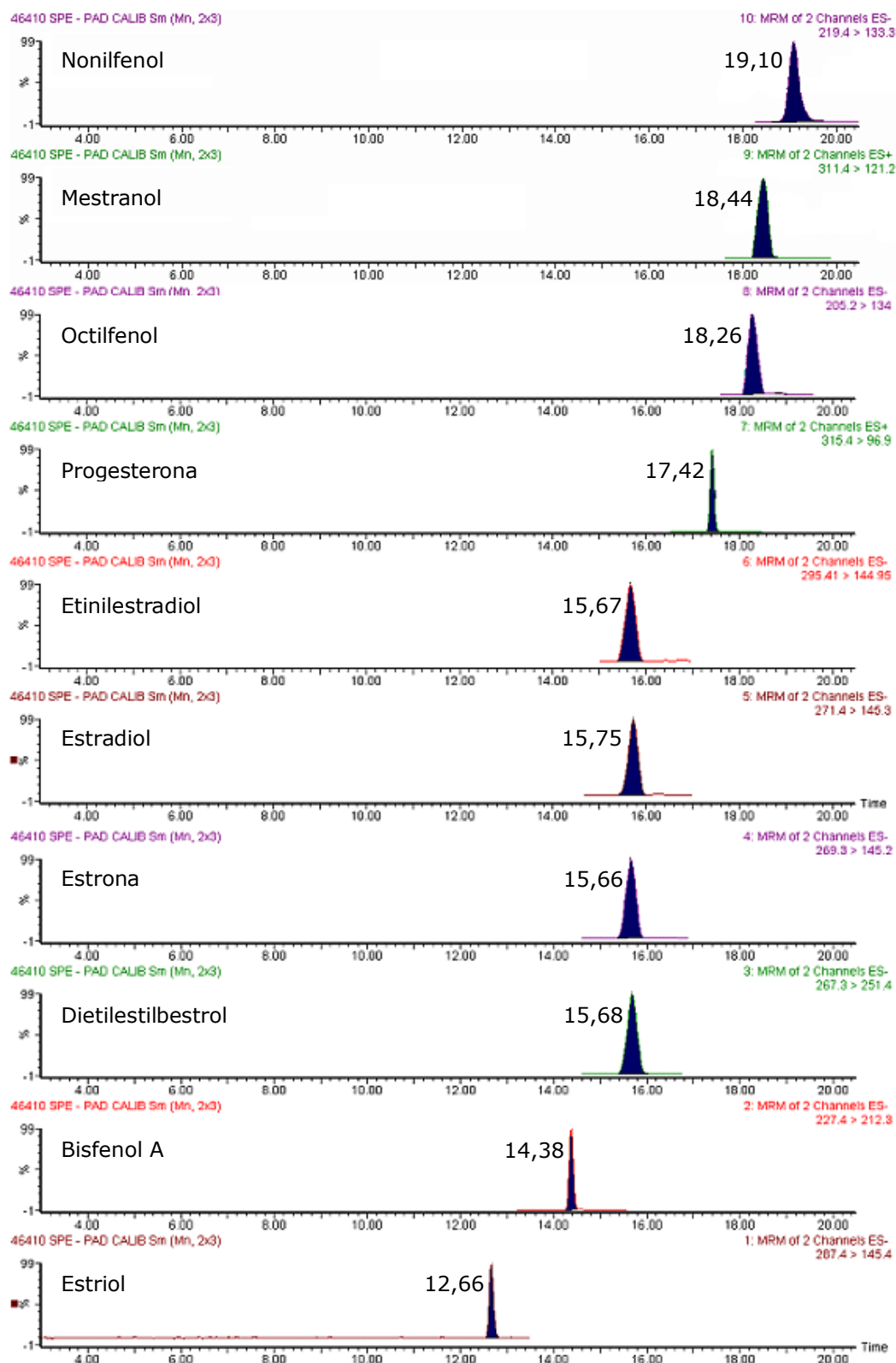


Figura VII.6: Cromatograma obtido por injeção de uma solução padrão conjunta, no que respeita à transição MRM1 de quantificação e respectivos tempos de retenção (t_R).

Apesar do facto de existirem quatro compostos com má resolução cromatográfica (o dietilestilbestrol, a estrona, o estradiol e o etinilestradiol), a elevada selectividade do espectrómetro de massa permitiu um grau de confiança bastante satisfatório na identificação e quantificação dos compostos e ultrapassou eventuais problemas na resolução dos picos cromatográficos.

2. Validação do Método LC-ESI-MS/MS

2.1. Estudos de Linearidade

A tabela VII.4 apresenta os resultados iniciais dos testes aplicados para a avaliação da linearidade do método. Estes valores representam a gama total de concentrações analisada para cada composto. Para alguns compostos a gama não se inicia na concentração inferior ($1 \mu\text{g/L}$) devido à ausência de sinal cromatográfico do ião produto MRM1 de quantificação ou do ião produto MRM2 de qualificação.

Os resultados iniciais foram de seguida tratados de modo a cumprir os critérios de aceitação definidos para cada teste. Os testes para o estudo da linearidade aplicados seguiram uma ordem previamente determinada. Sempre que um destes testes não apresentava resultados de acordo com os limites estabelecidos a gama de concentrações era encurtada e realiza-se uma nova sequência de testes.

Os resultados finais do estudo da linearidade apresentam-se na tabela VII.5.

Tabela VII.4: Resultados iniciais da gama total de concentrações estudada para cada composto.

Composto	N	Gama de Concentrações (µg/L)	R ²	b	a	CV _m (%)	Análise Resíduos (%)	Áreas Normalizadas (%)	RIKILT (%)	Mandel	
										F	VT
Estríol	21	1-400	0,9979	3,99	19,44	1,2	[-71; 8,3]	[80; 161]	[74; 148]	4,41	21
Bisfenol A	21	1-400	0,9972	17,39	8,21	0,33	[-19; 12]	[78; 135]	[78; 131]	4,41	1,4
Dietilestilbestrol	21	1-400	0,9942	67,78	688,92	0,11	[-82; 14]	[76; 105]	[82; 115]	4,41	42
Estrona	21	1-400	0,9921	33,18	225,87	0,28	[-88; 11]	[78; 122]	[78; 122]	4,41	9,9
β-Estradiol	17	10-400	0,9970	1,54	4,01	3,1	[-16; 31]	[85; 158]	[82; 153]	4,60	0,014
Etinilestradiol	11	72-400	0,9961	0,76	-11,83	3,7	[-7,5; 10]	[88; 119]	[81; 110]	6,61	0,041
Progesterona	21	1-400	0,9973	159,36	425,56	0,030	[-69; 7,3]	[80; 111]	[81; 117]	4,41	14
Octilfenol	19	4-400	0,9978	6,49	-6,68	0,72	[-28; 57]	[70; 116]	[70; 116]	4,49	0,16
Mestranol	12	60-400	0,9977	2,18	-6,79	1,0	[-5,7; 5,3]	[95; 109]	[93; 106]	5,12	-0,043
Nonilfenol	16	20-400	0,9907	11,32	-80,51	0,75	[-15; 58]	[78; 113]	[78; 113]	4,67	14

N: número de pontos da recta, R²: coeficiente de determinação, b: declive da recta, a: ordenada na origem, CV_m: coeficiente de variação do método,

F (1,N-3;95%): valor tabelado da distribuição de Fisher/Snedecor, e VT: valor teste.

Tabela VII.5: Resultados após aplicação dos critérios de aceitação definidos nos testes de linearidade para cada um dos compostos em estudo.

Composto	N	Intervalo de Linearidade (µg/L)	R ²	b	a	CV _m (%)	Análise Resíduos (%)	Áreas Normalizadas (%)	RIKILT (%)	Mandel	
										F	VT
Estriol	6	20-100	0,9962	4,10	18,47	0,88	[-8,1; 5,4]	[98; 111]	[94; 105]	10	2,4
Bisfenol A	15	20 - 400	0,9965	17,32	28,73	0,27	[-8,2; 7,6]	[95; 109]	[93; 107]	4,8	1,6
Dietilestilbestrol	8	1 - 40	0,9999	89,89	7,15	0,01	[-7,2; 2,8]	[97; 103]	[97; 103]	6,6	0,87
Estrona	8	1 - 40	0,9993	41,42	11,03	0,07	[-10; 6,2]	[96; 110]	[94; 108]	6,6	0,10
	11	40 - 348	0,9986	31,96	470,50	0,07	[-5,0; 3,7]	[85; 108]	[90; 114]	5,3	0,019
β-Estradiol	12	40 - 400	0,9967	1,55	2,92	2,47	[-6,4; 5,4]	[92; 103]	[94; 106]	5,1	-0,57
Etinilestradiol	9	80-400	0,9977	0,75	-9,21	3,96	[-7,3; 5,7]	[86; 102]	[90; 107]	5,6	1,3
Progesterona	7	30 - 120	0,9972	171,48	-119,65	0,02	[-4,8; 4,2]	[96; 104]	[95; 103]	7,7	2,5
Octilfenol	15	20 - 400	0,9982	6,48	-0,67	0,53	[-5,2; 6,3]	[95; 107]	[95; 106]	4,8	0,14
Mestranol	12	60-400	0,9977	2,18	-6,79	1,04	[-5,7; 5,3]	[95; 109]	[93; 106]	5,1	-0,43
Nonilfenol	8	20-120	0,9965	10,26	27,56	0,32	[-4,0; 4,5]	[96; 109]	[94; 107]	6,6	-4,8
	11	60-348	0,9993	10,65	-20,09	0,16	[-2,8; 3,5]	[98; 103]	[97; 102]	5,3	1,6

N: número de pontos da recta, R²: coeficiente de determinação, b: declive da recta, a: ordenada na origem, CV_m: coeficiente de variação do método,

F (1,N-3;95%): valor tabelado da distribuição de Fisher/Snedecor, e VT: valor teste.

A avaliação comparativa das duas tabelas anteriores, permite, numa primeira análise, observar a redução da gama de concentrações necessária à determinação do intervalo de linearidade. Consoante o composto em estudo, assim a gama de concentrações foi mais ou menos encurtada, chegando, em certos casos, a ser reduzida a mais de 50%. O estriol é o composto que apresenta o menor número de pontos experimentais, sendo no entanto superior ao valor recomendado de $N \geq 5$.

Durante o estudo de linearidade verificou-se que a estrona e o nonilfenol apresentam duas gamas distintas. Estes dois compostos na gama baixa obedecem a todos os requisitos do estudo de linearidade.

O método permite obter bons coeficientes de determinação para todos os compostos (o mínimo de 0,9962 para o estriol e o máximo de 0,9999 para o dietilestilbestrol) e excelentes coeficientes de variação do método, inferiores a 4,0%.

A título de exemplo, apresentam-se na figura VII.7 os resultados iniciais, para a gama total de concentrações, da sequência de testes aplicados à progesterona, nomeadamente do método dos mínimos quadrados, da análise de resíduos, do teste das áreas normalizadas e do teste de RIKILT. A figura VII.8 apresenta a mesma sequência de testes efectuados para a progesterona de modo a cumprirem os vários critérios de aceitação.

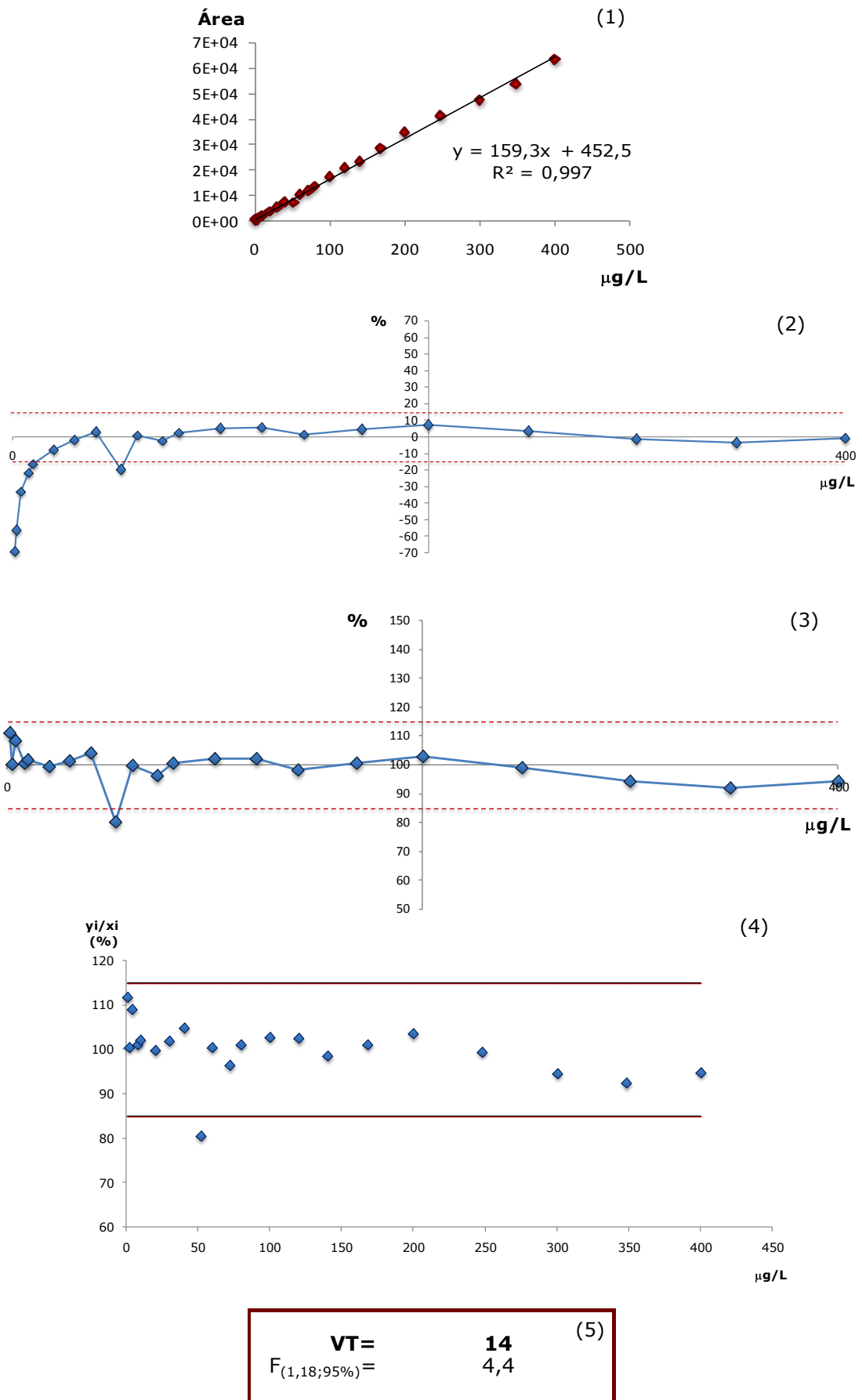


Figura VII.7: Resultados iniciais da gama total de concentrações estudada para a progesterona: aplicação do método dos mínimos quadrados (1), análise de resíduos (2), teste das áreas normalizadas (3), teste de RIKILT (4) e teste de Mandel (5).

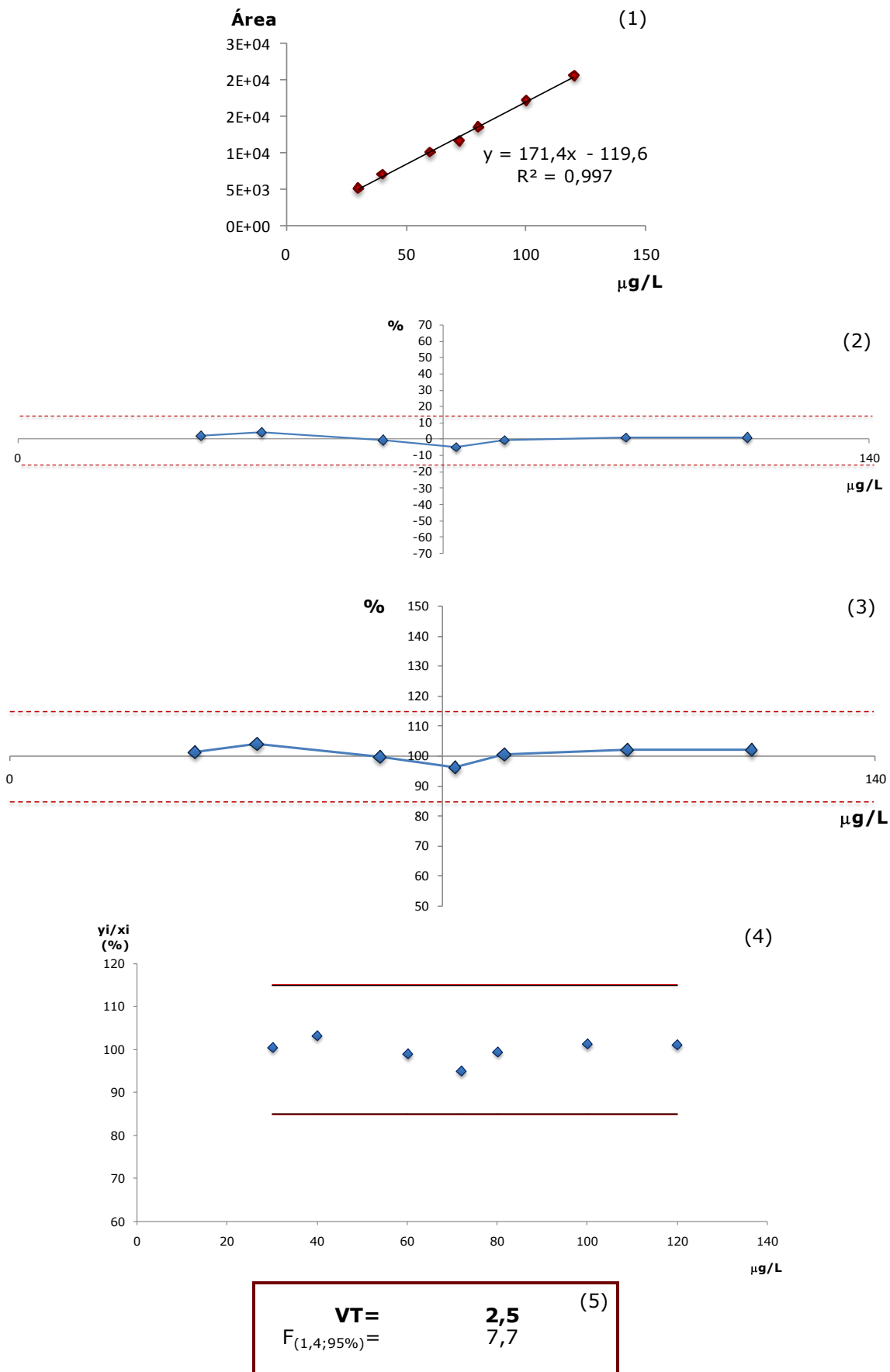


Figura VII.8: Resultados para a progesterona, após aplicação dos critérios de aceitação definidos: aplicação do método dos mínimos quadrados (1), análise de resíduos (2), teste das áreas normalizadas (3), teste de RIKILT (4) e teste de Mandel (5).

2.2. Limiares Analíticos

Os limiares analíticos, limite de detecção (LOD) e limite de quantificação (LOQ), foram determinados em condições de repetibilidade e com base na recta de calibração. Os resultados obtidos são descritos na tabela VII.6.

Tabela VII.6: Limiares analíticos do método LC-ESI-MS/MS.

Composto	Intervalo de linearidade ($\mu\text{g/L}$)	Recta de calibração		Em condições de repetibilidade (n=10)	
		LOD ($\mu\text{g/L}$)	LOQ ($\mu\text{g/L}$)	LOD ($\mu\text{g/L}$)	LOQ ($\mu\text{g/L}$)
Estriol	20 - 100	6,4	21	3,7	12
Bisfenol A	20 - 400	22	74	4,0	13
Dietilestilbestrol	1 - 40	0,55	1,8	0,27	0,89
Estrona	1 - 40	1,2	4,2	0,35	1,2
	40 - 348	12	39	3,1	10
β -Estradiol	40 - 400	21	71	11	38
Etinilestradiol	80 - 400	18	59	12	40
Progesterona	30 - 120	5,6	19	3,1	10
Octifenol	20 - 400	16	53	3,5	12
Mestranol	60 - 400	27	88	17	58
Nonilfenol	20 - 120	6,6	22	5,6	19
	60 - 348	8,4	28	6,4	21

O limite de quantificação determinado a partir do desvio padrão residual da recta e respectivo declive, nem sempre é inferior ao primeiro ponto da recta de calibração, indicando que a gama de trabalho ainda não está ajustada. No entanto, o LOQ determinado a partir dos resultados dos ensaios de repetibilidade cumpre sempre este requisito ($\text{LOQ} \leq$ primeiro ponto da curva de calibração).

2.3. Precisão

A precisão do método foi avaliada em termos de repetibilidade. Para o estudo da repetibilidade foram injectadas 10 soluções padrão correspondentes à concentração inferior e à concentração superior da gama de trabalho de cada composto.

Os resultados obtidos no estudo de repetibilidade são apresentados na tabela VII.7.

Tabela VII.7: Estudos de precisão do método em condições de repetibilidade (n=10).

Composto	Concentração inferior		Concentração superior	
	Conc. ($\mu\text{g/L}$)	CV (%)	Conc. ($\mu\text{g/L}$)	CV (%)
Estriol	20	4,5	100	2,3
Bisfenol A	20	7,1	400	2,4
Dietilestilbestrol	1	8,5	40	0,45
Estrona	1	17	40	2,1
	40	2,1	348	1,4
β -Estradiol	40	9,0	400	4,4
Etinilestradiol	80	6,5	400	3,6
Progesterona	30	2,9	120	5,0
Octifenol	20	6,4	400	1,7
Mestranol	60	12	400	2,2
Nonilfenol	20	6,8	120	7,8
	60	2,7	348	2,6

Consoante o composto em análise, os coeficientes de variação podem variar entre 2,5 e 17% para a concentração inferior e entre 0,45 e 7,8% para a concentração superior.

O mestranol e a estrona na concentração inferior da gama mais baixa (1-40 $\mu\text{g/L}$), apresentam um coeficiente de variação superior a 10%. No entanto, a estrona apresenta um coeficiente de variação muito melhor (2,1%) para a concentração de 40 $\mu\text{g/L}$. Para a maioria dos compostos, o coeficiente de variação, para a concentração superior, é inferior a 5%. Deste modo, podemos concluir que o método estudado é preciso. Os resultados obtidos no estudo de precisão intermédia são apresentados na tabela VII.8.

Conforme o composto em análise, os coeficientes de variação situam-se entre 0,15 e 17%, embora exista apenas um composto com um valor superior a 10%, o etinilestradiol. O erro relativo, ou seja o desvio dos valores experimentais face ao valor teórico da concentração, varia entre 4,3 e 13% para o mestranol e a estrona, respectivamente. Deste modo podemos concluir que o método cromatográfico (LC-ESI-MS/MS) apresenta uma boa precisão intermédia e uma boa exactidão.

Tabela VII.8: Estudos de precisão intermédia do método (n=13).

Composto	Intervalo de linearidade (µg/L)	Precisão intermédia	
		CV (%)	Erro (%)
Estriol	20 - 100	2,1	5,3
Bisfenol A	20 - 400	2,3	5,8
Dietilestilbestrol	1 - 40	0,15	7,8
Estrona	1 - 40	0,20	11
	40 - 348	0,20	11
Estradiol	40 - 400	9,1	13
Etinilestradiol	80 - 400	17	11
Progesterona	30 - 120	5,3	8,6
Octifenol	20 - 400	2,2	5,2
Mestranol	60 - 400	5,2	4,3
Nonilfenol	20 - 120	4,4	10
	60 - 348	4,4	10

2.4. Razão MRM1/MRM2

A variabilidade da razão MRM1/MRM2 foi estudada ao longo do intervalo de linearidade. A tabela VII.9 apresenta os resultados obtidos.

Tabela VII.9: Variabilidade da razão MRM1/MRM2 ao longo do intervalo de linearidade para cada um dos compostos em estudo.

Composto	Intervalo Linearidade (µg/L)	Média MRM1/MRM2	CV (%)
Estriol	20-100	1,3	4,6
Bisfenol A	20 - 400	2,1	2,8
Dietilestilbestrol	1 - 40	1,0	3,4
Estrona	1 - 40	5,0	16
	40 - 348	6,0	4,8
β-Estradiol	40 - 400	5,2	7,9
Etinilestradiol	80-400	2,1	12
Progesterona	30 - 120	1,8	2,1
Octifenol	20 - 400	1,0	4,8
Mestranol	60-400	5,6	7,1
Nonilfenol	20-120	8,1	15
	60-348	7,6	7,2

A variabilidade da razão MRM1/MRM2 do etinilestradiol, do nonilfenol (gama baixa) e da estrona (gama baixa) apresenta um coeficiente de variação superior a 10% (respectivamente 12, 15 e 16%). Para todos os outros compostos a variação da razão MRM1/MRM2 ao longo da gama de trabalho é inferior, resultando em coeficientes de variação entre 2,1 e 7,9%.

Como exemplo, apresenta-se graficamente na figura VII.9 a variabilidade da razão MRM1/MRM2 para a estrona (gama baixa) e para a progesterona ao longo do intervalo de linearidade. O eixo esquerdo das ordenadas representa a área do pico cromatográfico MRM1 e o eixo direito das ordenadas representa a razão das áreas MRM1/MRM2.

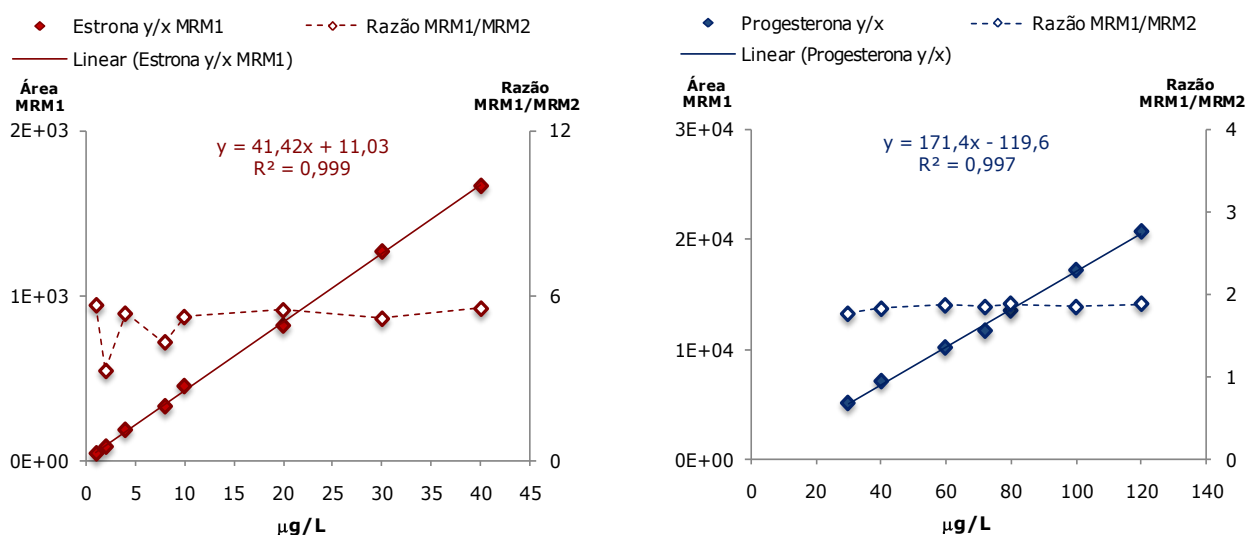


Figura VII.9: Variabilidade da razão MRM1/MRM2 para a estrona (à esquerda) e progesterona (à direita) ao longo do intervalo de linearidade.

3. Optimização da Técnica SPE

Para optimização da técnica de SPE seguiu-se o protocolo de análise definido na secção VI.3.4.

No decorrer do desenvolvimento experimental foram observadas algumas interferências na recuperação dos compostos fenólicos, nomeadamente no que se refere ao bisfenol A, octilfenol e nonilfenol. Uma vez que estes compostos são utilizados, entre outras aplicações, na produção dos plásticos, há que reduzir o risco de contaminação evitando a utilização do plástico durante a implementação da técnica.

No presente estudo, foi restringida a utilização deste material recorrendo, sempre que possível, a material de vidro.

3.1. Selecção do Cartucho

Os ensaios foram realizados de acordo com o procedimento descrito na tabela VI.8, usando o metanol:acetona (3:2) como eluente. Os resultados de comparação entre os cartuchos Oasis HLB e Isolute C18 (EC) são apresentados na tabela VII.10.

Tabela VII.10: Comparação entre o cartucho Isolute C18 (EC) e Oasis HLB (n=11).

Composto	Isolute C18 (EC)		Oasis HLB	
	Rec (%)	CV (%)	Rec (%)	CV (%)
Estriol	78	10	77	6,4
Bisfenol A	78	7,1	82	10
Dietilestilbestrol	76	9,0	78	6,9
Estrona	78	8,3	79	8,8
β-Estradiol	82	8,8	82	5,2
Etinilestradiol	84	10	80	5,8
Progesterona	76	9,3	77	10
Octifenol	55	9,3	59	15
Mestranol	80	9,9	67	9,4
Nonilfenol	66	6,7	69	4,9
Mínimo	55	6,7	59	4,9
Máximo	84	10	82	15
Média	75	8,9	75	8,3

Com base nos resultados obtidos, pode-se afirmar que se obtém bons níveis de recuperação, para a maioria dos compostos, para os dois cartuchos testados. Os compostos octilfenol e nonilfenol são os que revelam menor percentagem de recuperação.

A análise de variâncias (ANOVA) permitiu verificar que não existem diferenças estatisticamente significativas nas recuperações obtidas para os vários compostos ($p_{\text{value}}=0,94$). Deste modo, podemos concluir que em rotina pode ser usado qualquer um dos cartuchos.

3.2. Selecção do Eluente

Com o objectivo de otimizar o eluente a utilizar no processo de extracção em fase sólida foram realizados diversos ensaios seguindo as diversas metodologias descritas na tabela VI.7. A tabela VII.11 apresenta os resultados da percentagem de recuperação obtidos para os compostos em estudo, utilizando os diversos sistemas de activação/condicionamento e eluição.

Tabela VII.11: Comparação entre os vários sistemas de eluição (A, B, C, D, E e F).

Composto	A		B		C		D		E		F	
	Isolute C18 (EC)		Oasis HLB		Isolute C18 (EC)		Isolute C18 (EC)		Isolute C18 (EC)		Isolute C18 (EC)	
	n=11		n=3		n=3		n=3		n=8		n=6	
	Rec (%)	CV (%)	Rec (%)	CV (%)	Rec (%)	CV (%)	Rec (%)	CV (%)	Rec (%)	CV (%)	Rec (%)	CV (%)
Estriol	78	10	76	8,5	85	2,7	91	7,2	89	5,8	69	6,2
Bisfenol A	78	7,1	99	8,1	84	2,9	93	4,8	80	20	66	2,7
Dietilestilbestrol	76	9,0	52	1,3	52	5,0	67	3,3	62	6,2	51	4,0
Estrona	78	8,3	73	5,1	80	6,7	93	7,8	80	11	58	3,6
β-Estradiol	82	8,8	46	8,4	84	1,2	94	6,0	80	12	53	5,4
Etinilestradiol	84	10	ND	ND	ND	ND	ND	ND	66	2,5	54	6,9
Progesterona	76	9,3	79	6,2	71	1,8	77	9,4	92	14	61	6,7
Octifenol	55	9,3	32	4,6	25	16	24	1,1	45	9,1	41	7,6
Mestranol	80	10	65	8,4	100	2,1	105	2,9	88	7,1	67	6,8
Nonilfenol	66	6,7	77	8,7	45	12	37	8,7	58	14	43	7,8
	A		B		C		D		E		F	
Mínimo	55		32		25		24		45		41	
Máximo	84		99		100		105		92		69	
Média	75		66		70		76		74		56	

A: metanol:acetona(3:2)

B: metanol:éter metil tert-butilico 10%

C:hexano:diclorometano(9:1)-metanol:diclorometano(9:1)

ND: não determinado

D:metanol:diclorometano(1:1)-metanol:diclorometano(9:1)

E: metanol:diclorometano(9:1)-metanol:acetona(3:2)

F:metanol:diclorometano(1:1)-metanol:acetona(3:2)

A análise de variâncias (ANOVA, factor único) permitiu verificar que não existem diferenças estatisticamente significativas para os valores de recuperação ($p_{\text{value}}=0,28$) obtidos com os vários sistemas de eluição. Sendo assim, numa primeira fase, a selecção foi feita em função da média, dos valores mínimos e dos valores máximos

obtidos para a recuperação. Com base neste critério excluíram-se os seguintes eluentes:

- Eluente B, metanol:éter metil tert-butílico 10% (mínimo: 32%)
- Eluente C, hexano:diclorometano (9:1) e metanol:diclorometano (9:1) (mínimo: 25%)
- Eluente D, metanol:diclorometano (1:1) e metanol:diclorometano (9:1) (mínimo: 24%)
- Eluente F, metanol:diclorometano (1:1) e metanol:acetona (3:2) (média: 56%)

Deste modo, foram seleccionados os eluentes A e E.

Com o decorrer do tempo foi-se verificando que em rotina o eluente E não resultava devido à formação de duas fases no solvente, possivelmente proporcionado pelas diferentes polaridades entre si. Enquanto o metanol apresenta características de polaridade média o diclorometano é um solvente de baixa polaridade. Este facto fez reduzir as recuperações obtidas em cerca de 20%.

Com base nos resultados obtidos e na inviabilidade da utilização deste conjunto de solventes, o solvente mais adequado para a extracção dos compostos desreguladores endócrinos é o metanol:acetona (3:2).

Este sistema de eluição permite um bom valor médio de recuperação para a maioria dos compostos (75%), sendo de realçar que os compostos com as recuperações mais baixas são o octilfenol (55%) e o nonilfenol (66%). A variabilidade dos resultados situou-se entre 6,7 e 10%.

3.3. Efeito do fluxo de passagem da amostra

A figura VII.10 apresenta os resultados obtidos para a optimização do fluxo de passagem da amostra (10 e 30 mL/min).

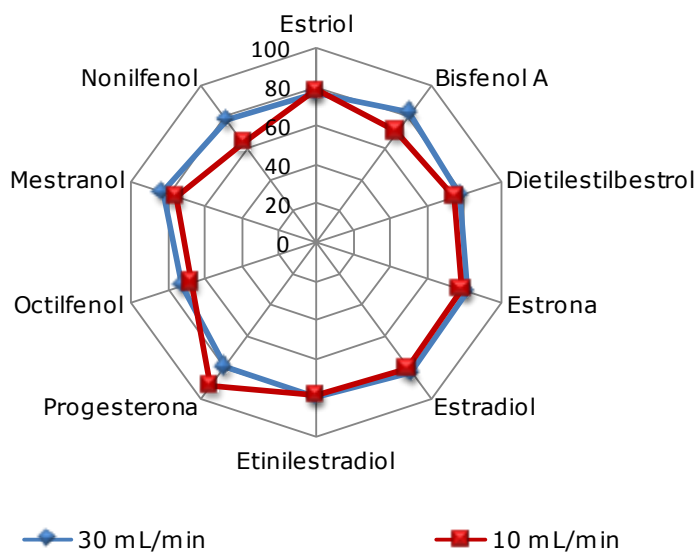


Figura VII.10: Percentagem de recuperação para um fluxo de passagem da amostra de 10 e de 30 mL/min (n=2).

Uma vez que os valores de recuperação obtidos não apresentam diferenças entre os dois fluxos de passagem da amostra estudados, seleccionou-se o fluxo de 30 mL/min, o qual se traduz numa diminuição do tempo de análise.

3.4. Efeito do Tempo de Secagem do Cartucho

A operação de secagem do cartucho é importante uma vez que tem influência no tempo dispendido na etapa subsequente, ou seja na concentração do eluído. Foi experimentalmente observado que quando se elimina a operação de secagem do cartucho pode demorar-se cerca de cinco horas para concentrar o eluído ao volume pretendido. No entanto, também se constata que a secagem do cartucho tem um efeito negativo nas recuperações dos compostos, possivelmente por arrastamento dos compostos pela corrente de azoto aplicada. Foram analisadas três amostras fortificadas com padrão de calibração (PCGA) sob três condições: "sem secagem de cartucho", "5 minutos de secagem de cartucho" e "10 minutos de secagem de cartucho" (figura VII.11). A restante metodologia foi mantida constante.

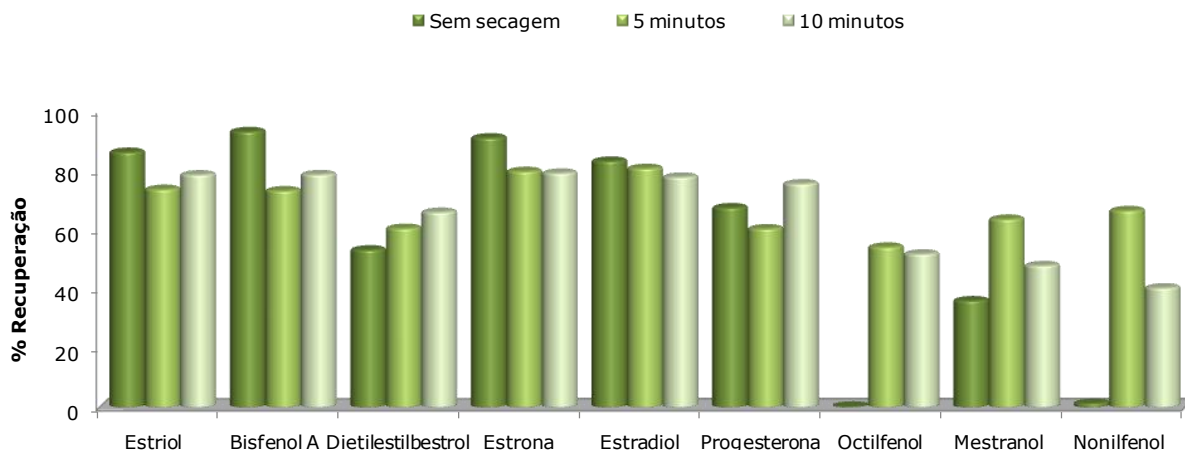


Figura VII.11: Efeito do tempo de secagem do cartucho por corrente de azoto.

O tratamento dos resultados por ANOVA permitiu concluir que a secagem do cartucho tem um efeito estatisticamente significativo ($p_{\text{value}} < 0,05$) na recuperação dos compostos octilfenol e o nonilfenol. Os restantes compostos não apresentam alterações significativas com a variação das condições de secagem do cartucho ($p_{\text{value}} = 0,95$).

Os resultados obtidos para a análise sem secagem de cartucho podem ser explicados pelo facto do eluído permanecer durante muito tempo, cerca de 5 horas, no Turbovap até se obter a redução ao volume de extracto pretendido (0,25 mL), devido à excessiva quantidade de água. Assim, a supressão da secagem de cartucho, apesar de eliminar a exposição à corrente de azoto nesta fase, implica um aumento substancial no tempo de exposição ao mesmo gás no Turbovap. A conjugação entre os dois factores, tempo de secagem de cartucho/tempo de permanência no Turbovap, que permite um melhor resultado é a secagem do cartucho durante 5 minutos.

3.5. Efeito da temperatura de evaporação

A temperatura de evaporação não é um factor crítico uma vez que não estamos em presença de compostos voláteis. Os estudos preliminares efectuados demonstraram que a exposição à corrente de azoto no Turbovap era um factor crítico, dado que provocava o arrastamento dos compostos octilfenol e nonilfenol. Observaram-se perdas destes compostos nos estudos de recuperação no Turbovap, mesmo usando valores de pressão de azoto no limite inferior operacional deste equipamento. Assim, de modo a reduzir o tempo de exposição à corrente de azoto, foram estudadas

temperaturas de evaporação acima de 35 °C, com o objectivo de otimizar as condições de evaporação, até obtenção do volume de extracto pretendido.

Na figura VII.12 apresenta-se as temperaturas testadas no Turbovap (35 °C, 40 °C, 45 °C e 50 °C) para a optimização da temperatura de evaporação. Foram analisadas três soluções padrão de calibração (PCGA) para cada temperatura testada, sem recorrer à técnica de SPE.

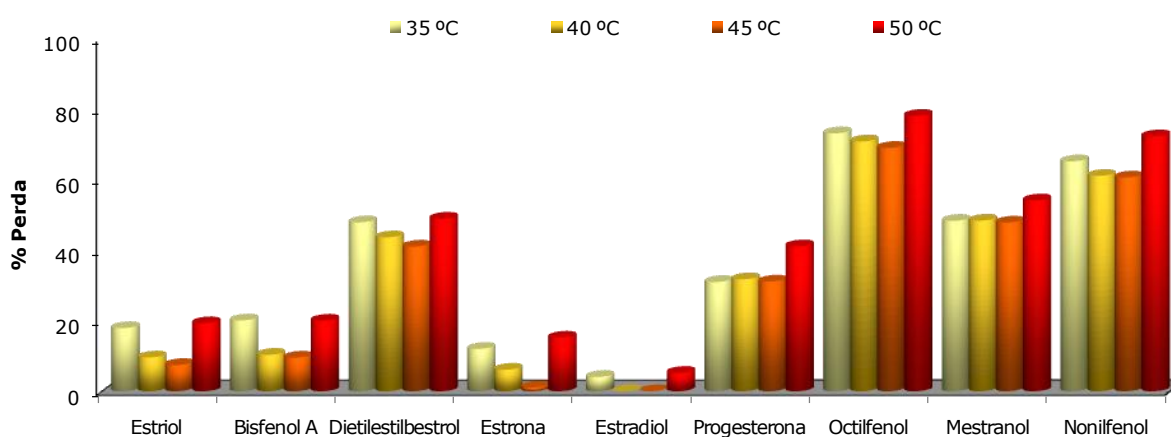


Figura VII.12: Efeito da temperatura de evaporação do Turbovap na perda dos compostos em estudo.

Constata-se que de um modo geral existe perda de todos os compostos estudados nesta etapa. As perdas são maiores a 35 °C e a 50 °C. Os compostos mais afectados são o dietilestilbestrol, a progesterona, o mestranol e especialmente, o octilfenol e o nonilfenol. A análise de variâncias (ANOVA) permitiu verificar que globalmente não existem diferenças estatisticamente significativas nas perdas dos compostos estudados em função da temperatura ($p_{\text{value}} = 0,81$).

No entanto, as perdas mínimas ocorrem com as temperaturas de 40 e 45 °C, não havendo diferenças significativas entre elas. Seleccionou-se a temperatura de 40 °C para a análise destes compostos, de modo a reduzir eventuais perdas.

As condições óptimas resultantes da optimização de alguns parâmetros previamente estabelecidos (tabela VI.6) e das condições de operação são descritas na tabela VII.12 e foram aplicadas nos estudos de recuperação e na análise de amostras.

Tabela VII.12: Condições ótimas para a técnica de SPE.

Cartucho	Oasis HLB Isolute C18 (EC)
Fluxo de condicionamento do cartucho	30 mL/min
Tempo de secagem do cartucho	5 minutos
Sistema de Eluentes	Metanol:acetona (3:2)
Turbovap	0,2 bar/40 °C

4. Estudos de Recuperação

Para os estudos de recuperação aplicaram-se os parâmetros definidos na tabela VII.2, VII.3 e VII.12.

Foram realizados vários ensaios em água ultra pura e em diferentes tipos de água para avaliar o efeito da matriz sobre a recuperação dos compostos em estudo e o limite de determinação (LD) do método global, SPE-LC-ESI-MS/MS.

4.1. Otimização do Volume de Fortificação

A figura VII.13 representa graficamente os valores de recuperação média e os respectivos coeficientes de variação para dois níveis de fortificação de amostras de água ultra pura.

O nível I e II correspondem à fortificação das amostras com 1 mL e 1,5 mL de padrão de calibração (PCGB), respectivamente.

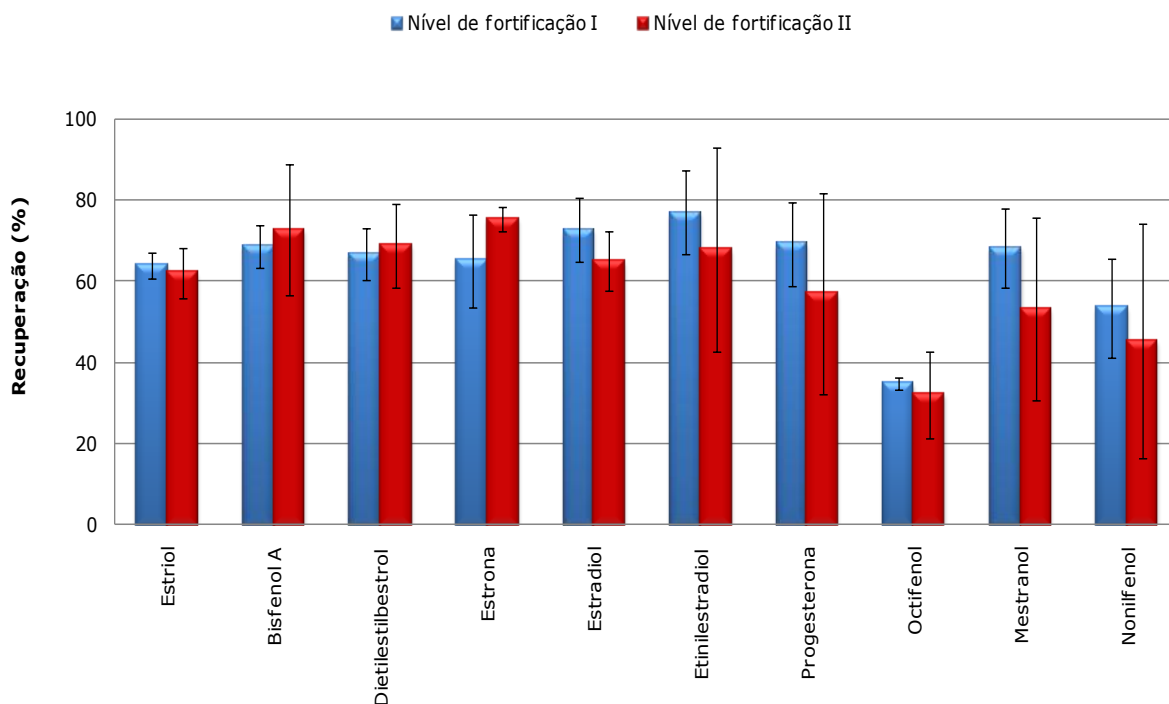


Figura VII.13: Comparação dos resultados obtidos para dois níveis de fortificação, I e II, em termos de percentagem de recuperação e coeficiente de variação (n=3).

O nível I de fortificação permite obter melhores recuperações médias para a maioria dos compostos, apresentando de uma maneira geral bons coeficientes de variação (<10%), à excepção da estrona e do nonilfenol (12%).

4.2. Efeito de Matriz

Para proceder ao estudo de efeito de matriz, analisaram-se amostras de água subterrânea (Poço Alenquer), superficial (captação de Castelo de Bode e captação Tejo) e água de consumo humano (rede de distribuição), fortificadas com o nível I de fortificação.

A tabela VII.13 apresenta os resultados da recuperação nas diversas matrizes estudadas.

Tabela VII.13: Valores médios de recuperação obtidos em amostras de água subterrânea, água superficial e água de consumo humano, fortificadas com o nível I de fortificação.

Composto	Conc. ($\mu\text{g/L}$)	Poço Alenquer (n=10)		Captação Castelo de Bode (n=10)		Captação Tejo (n=6)		Rede de distribuição (n=10)	
		Rec (%)	CV (%)	Rec (%)	CV (%)	Rec (%)	CV (%)	Rec (%)	CV (%)
Estriol	40	77	3,8	65	14	69	11	68	4,9
Bisfenol A	40	63	6,1	60	2,3	61	5,2	74	5,9
Dietilestilbestrol	2	41	5,1	40	15	32	9,4	60	7,8
Estrona	2	69	9,7	70	7,4	80	14	72	4,1
β -Estradiol	80	44	11	63	9,2	67	9,2	82	8,5
Etinilestradiol	160	47	9,1	53	8,5	61	14	67	9,3
Progesterona	60	51	9,2	58	7,7	50	11	71	8,7
Octifenol	40	44	10	50	3,5	49	7,0	54	3,5
Mestranol	120	68	6,0	69	7,3	95	4,6	82	7,2
Nonilfenol	40	56	9,5	67	11	66	13	63	6,8

A análise dos resultados das recuperações nas várias matrizes através do estudo da homogeneidade de variâncias permitiu concluir que não há diferenças significativas entre as várias matrizes estudadas, o valor teste (VT) é muito inferior ao valor tabelado de Fisher/Snedecor (F) (tabela VII.14).

Tabela VII.14: Valores teste resultantes do estudo de homogeneidade de variâncias das recuperações das várias matrizes.

Composto	VT
	$F = 10,2$ (9, 5; 95%)
Estriol	3,2
Bisfenol A	9,3
Dietilestilbestrol	6,4
Estrona	1,9
β -Estradiol	5,8
Etinilestradiol	5,7
Progesterona	2,3
Octifenol	6,5
Mestranol	6,5
Nonilfenol	2,1

5. Estimativa da Incerteza Expandida do Método

A Tabela VII.15 apresenta cada uma das componentes individuais das incertezas na análise dos desreguladores endócrinos por SPE-LC-ESI-MS/MS, assim como, a respectiva incerteza expandida determinada a partir da incerteza associada à interpolação da recta (u_{recta}), à preparação dos padrões ($u_{\text{padrão}}$) e à incerteza padrão associada à precisão intermédia dos ensaios de recuperação ($u_{\text{prec intermédia}}$). Os resultados são apresentados relativamente ao padrão mais baixo da gama de trabalho.

Tabela VII.15: Componentes individuais das incertezas na análise dos compostos em estudo por SPE-LC-ESI-MS/MS e respectiva incerteza expandida.

Composto	Conc. ($\mu\text{g/L}$)	u_{recta} (%)	$u_{\text{padrão}}$ (%)	$u_{\text{prec intermédia}}$ (%)	U(C) (%)
Estriol	40	8,4	4,9	2,4	20
Bisfenol A	40	11	4,9	2,4	25
Dietilestilbestrol	2	11	4,7	4,4	26
Estrona	2	8,6	4,7	2,6	20
β -Estradiol	80	9,7	4,8	5,3	24
Etinilestradiol	160	7,9	4,7	4,1	20
Progesterona	60	7,2	4,6	3,3	18
Octilfenol	40	6,6	5,9	2,7	18
Mestranol	120	9,9	4,7	3,2	23
Nonilfenol	40	9,9	6,0	3,0	24

A incerteza expandida do método para análise destes compostos varia entre 18% e 26%.

De acordo com esta abordagem, a maior componente de incerteza está associada à recta de calibração. A menor componente de incerteza está associada à precisão intermédia dos ensaios de recuperação.

A Tabela VII.16 apresenta os dados da incerteza expandida com base noutra ferramenta do controlo de qualidade, isto é, a incerteza expandida determinada a partir da incerteza associada à precisão e à exactidão obtidas nos estudos de recuperação.

Tabela VII.16: Componentes individuais das incertezas associadas à precisão e à exactidão obtidas nos estudos de recuperação dos compostos em estudo por SPE-LC-ESI-MS/MS e respectiva incerteza expandida.

Composto	Conc. ($\mu\text{g/L}$)	$U_{\text{precisão}}$ (%)	$U_{\text{exactidão}}$ (%)	$U(C)$ (%)
Estriol	40	5,2	5,5	15
Bisfenol A	40	5,2	5,5	15
Dietilestilbestrol	2	6,5	4,5	16
Estrona	2	5,4	7,2	18
β -Estradiol	80	7,2	10	25
Etinilestradiol	160	6,2	6,5	18
Progesterona	60	5,7	5,6	16
Octilfenol	40	7,0	2,4	15
Mestranol	120	5,7	14	30
Nonilfenol	40	6,7	5,2	17

Não existem diferenças estatisticamente significativas ($p_{\text{value}}=0,60$) entre a componente da incerteza associada à precisão e a componente da incerteza associada à exactidão. A incerteza expandida do método com base na precisão e exactidão dos estudos de recuperação varia entre 15% e 30%.

Os compostos com maior incerteza combinada são o mestranol e o β -estradiol. Os restantes compostos em estudo apresentam incertezas combinadas entre 15 - 18%.

As duas abordagens para a determinação da incerteza combinada do método (tabela VII.15 e tabela VII.16) conduzem a valores muito semelhantes, embora sejam inferiores pelo método associado à precisão e à exactidão obtidas nos estudos de recuperação dos compostos em estudo. No entanto, o tratamento dos resultados por ANOVA indica que as diferenças não são estatisticamente significativas (para um grau de confiança de 95%).

Após a determinação da componente da incerteza associada à curva de calibração, tiveram que ser eliminados alguns pontos experimentais, de modo a definir a gama de trabalho. Embora possa existir linearidade num intervalo de concentrações mais alargado, a gama de trabalho é, regra geral, muito mais reduzida. Para alguns compostos, o número de pontos experimentais foi reduzido de 21 para 5 após a aplicação dos vários testes de linearidade e da estimativa da incerteza. Em paralelo foram redefinidos os limiares analíticos cromatográficos. A tabela VII.17 apresenta os resultados dos vários testes de linearidade após a determinação das incertezas, isto é, apresenta os resultados das curvas de calibração representativas da gama de trabalho.

Tabela VII.17: Parâmetros das curvas de calibração dos compostos em estudo correspondentes à gama de trabalho.

Composto	N	Gama de Trabalho (µg/L)	R ²	b	a	CV _m (%)	Análise Resíduos (%)	Áreas Normalizadas (%)	RIKILT (%)	Mandel	
										F	VT
Estriol	5	30-100	0,9963	3,9999	26,5719	0,73	[-2,5; 4,6]	[98; 111]	[94; 106]	19	2,0
Bisfenol A	10	30-400	0,9996	17,0622	25,2024	0,11	[-3,4; 4,3]	[97; 105]	[96; 104]	5,6	2,7
Dietilestilbestrol	7	2-40	0,9998	89,8073	9,5785	0,01	[-2,8; 2,2]	[97; 103]	[97; 103]	7,7	1,6
Estrona	5	8-40	0,9994	41,2998	14,2698	0,06	[-4,4; 5,7]	[99; 109]	[97; 107]	19	0,0070
β-Estradiol	8	40-400	0,9994	1,5166	4,9160	1,3	[-3,4; 3,7]	[94; 103]	[96; 106]	6,6	0,012
Etinilestradiol	9	80-400	0,9977	0,7520	-9,2142	4,0	[-7,3; 5,7]	[86; 102]	[90; 107]	6,0	0,090
Progesterona	7	30-120	0,9972	171,4774	-119,6530	0,020	[-4,8; 4,2]	[96; 100]	[95; 103]	7,7	2,6
Octilfenol	10	20-248	0,9998	6,4295	3,2290	0,17	[-3,6; 1,6]	[98; 102]	[98; 103]	5,6	1,1
Mestranol	12	60-400	0,9977	2,1819	-6,7920	1,0	[-3,7; 3,5]	[95; 109]	[93; 106]	5,1	0,36
Nonilfenol	7	20-100	0,9976	9,8663	45,7308	0,25	[-5,3; 3,9]	[96; 109]	[94; 107]	7,7	0,070

N: número de pontos da recta, R²: coeficiente de determinação, b: declive da recta, a: ordenada na origem, CV_m: coeficiente de variação do método,

F (1,N-3;95%): valor tabelado da distribuição de Fisher/Snedecor, e VT: valor teste.

Os limiares analíticos cromatográficos (LOD e LOQ) determinados a partir das curvas da gama de trabalho estão representados na tabela VII.18.

Tabela VII.18: Limiares analíticos do método LC-ESI-MS/MS após a determinação das incertezas.

Composto	LOD ($\mu\text{g/L}$)	LOQ ($\mu\text{g/L}$)
Estriol	6,0	20
Bisfenol A	9,0	30
Dietilestilbestrol	0,59	2,0
Estrona	1,7	5,5
β -Estradiol	10	35
Etinilestradiol	18	60
Progesterona	5,6	19
Octifenol	3,4	11
Mestranol	17	58
Nonilfenol	4,6	16

Após a determinação das incertezas, todos os compostos em estudo cumprem o requisito da norma EA-4/02 ^[183], isto é, o limite de quantificação é inferior ou igual ao primeiro ponto da curva de calibração (gama de trabalho).

6. Limites de Determinação

Na tabela VII.19 apresentam-se os limites de determinação (LD) do método global, SPE-LC-ESI-MS/MS, calculados com base nos valores médios da recuperação obtida nas diferentes matrizes analisadas, para um factor de concentração de 1000.

Tabela VII.19: Estimativa do limite de determinação (LD) do método global para as várias matrizes.

Composto	Padrão de concentração inferior ($\mu\text{g/L}$)	LD ($\mu\text{g/L}$)				Valor médio
		Poço Alenquer	Captação Castelo de Bode	Captação Tejo	Rede de distribuição	
Estriol	30	0,039	0,046	0,043	0,044	0,044
Bisfenol A	30	0,05	0,05	0,05	0,04	0,05
Dietilestilbestrol	2	0,005	0,005	0,006	0,003	0,005
Estrona	8	0,012	0,011	0,010	0,011	0,012
Estradiol	40	0,09	0,06	0,06	0,05	0,07
Etinilestradiol	80	0,17	0,15	0,13	0,12	0,15
Progesterona	30	0,06	0,052	0,06	0,042	0,053
Octifenol	40	0,09	0,08	0,08	0,07	0,08
Mestranol	60	0,09	0,09	0,06	0,07	0,08
Nonilfenol	20	0,036	0,030	0,030	0,032	0,033

Como não existem diferenças significativas nas percentagens de recuperação para as diferentes matrizes, podemos definir um valor médio para o limite de determinação do método global. O limite de determinação (valor médio) varia entre 3 e 170 ng/L. O composto com menor limite de determinação é o dietilestilbestrol. O composto de maior limite de determinação é o etinilestradiol.

7. Análise de Amostras

Nas amostras analisadas verificou-se que nenhum dos compostos em estudo apresentava uma concentração igual ou superior ao limite de determinação do método.

Em todas as amostras analisadas foram encontrados vestígios não quantificáveis de alguns dos compostos em estudo: bisfenol A, dietilestilbestrol, etinilestradiol, progesterona e octilfenol. Os compostos estriol, estrona e estradiol não foram detectados em nenhuma amostra. A percentagem de resultados positivos (não quantificáveis) por tipo de grupo de amostra e por composto é apresentada na figura VII.14 para água de consumo humano e água bruta.

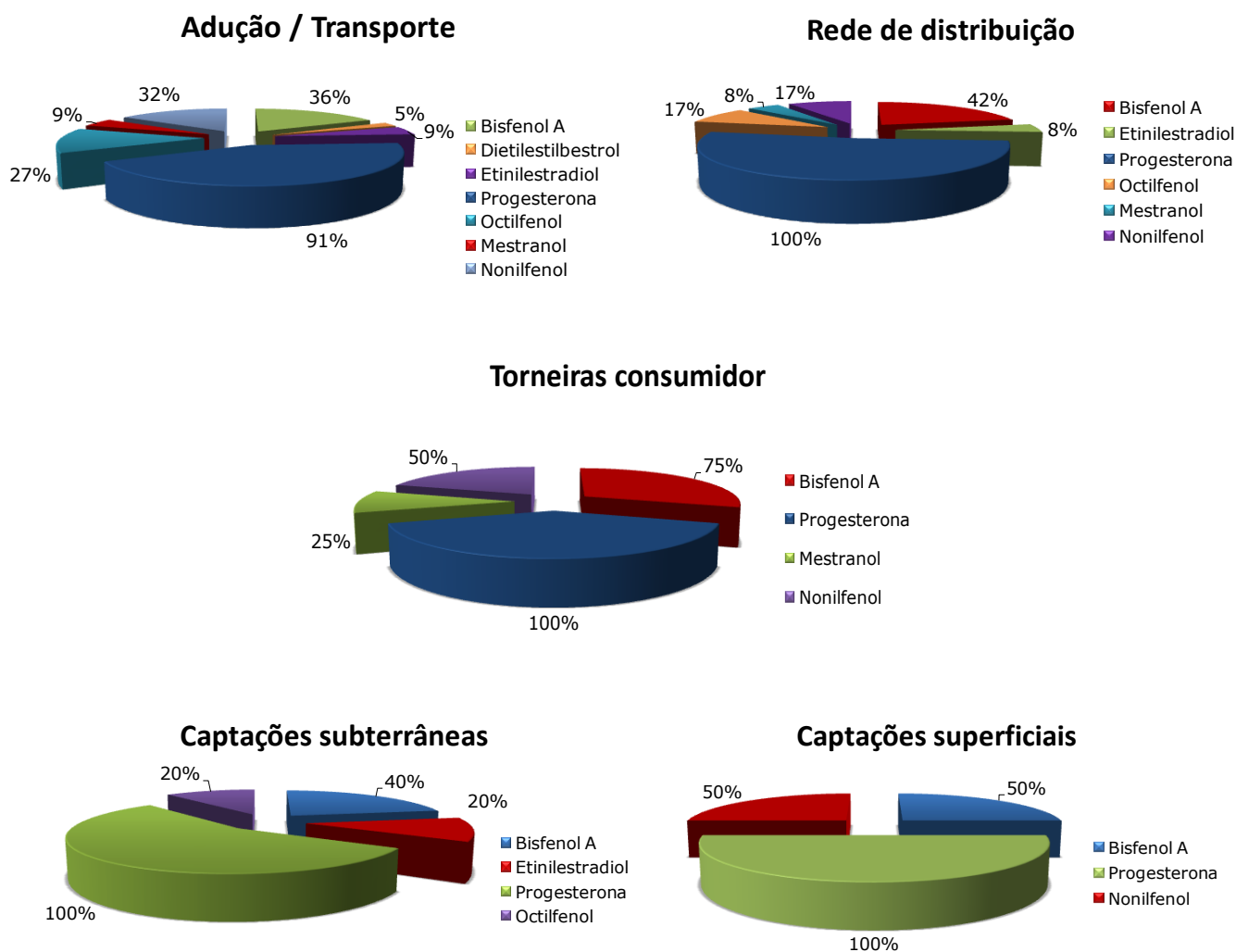


Figura VII.14: Percentagem de compostos desreguladores endócrinos detectados em quantidades vestigiais nos diversos grupos de amostras de água para consumo humano e águas naturais (subterrâneas e superficiais).

Os estrogénios estriol, estrona e estradiol não foram detectados em nenhuma amostra. A progesterona e bisfenol A foram os compostos com maior incidência, sendo detectados nos cinco grupos de amostras. Nenhuma das amostras das captações subterrâneas apresentou vestígios de nonilfenol.

Os resultados obtidos também foram tratados no sentido de avaliar a incidência nas amostras em função do composto e a sua relação com o limite de determinação para o método global (figuras VII.15 e VII.16).

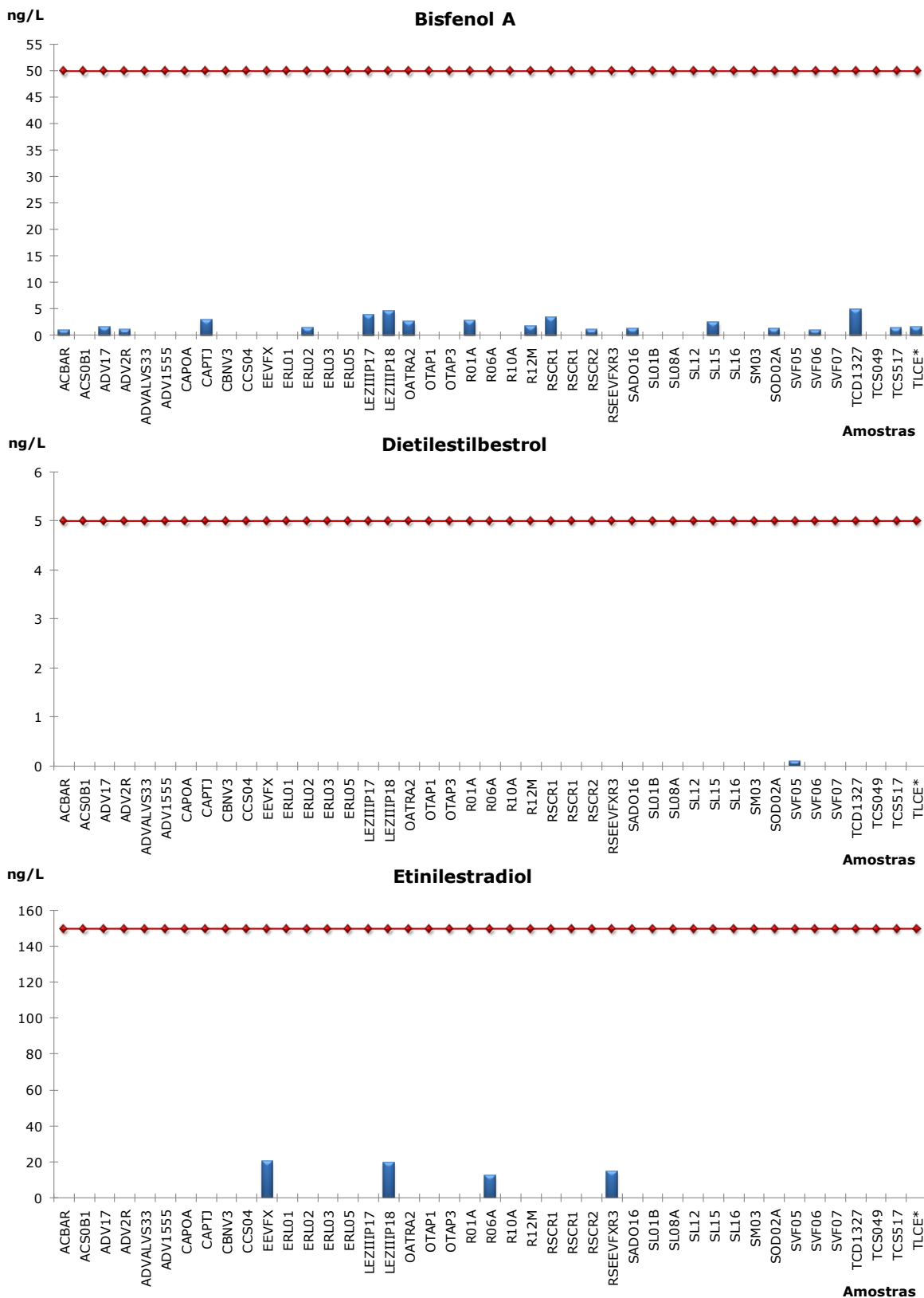


Figura VII.15: Resultados obtidos (bisfenol A, dietilestilbestrol e etinilestradiol) nas amostras analisadas por SPE-LC-ESI-MS/MS. As barras representam a concentração (ng/L) e a linha representa o limite de determinação calculado para o respectivo método.

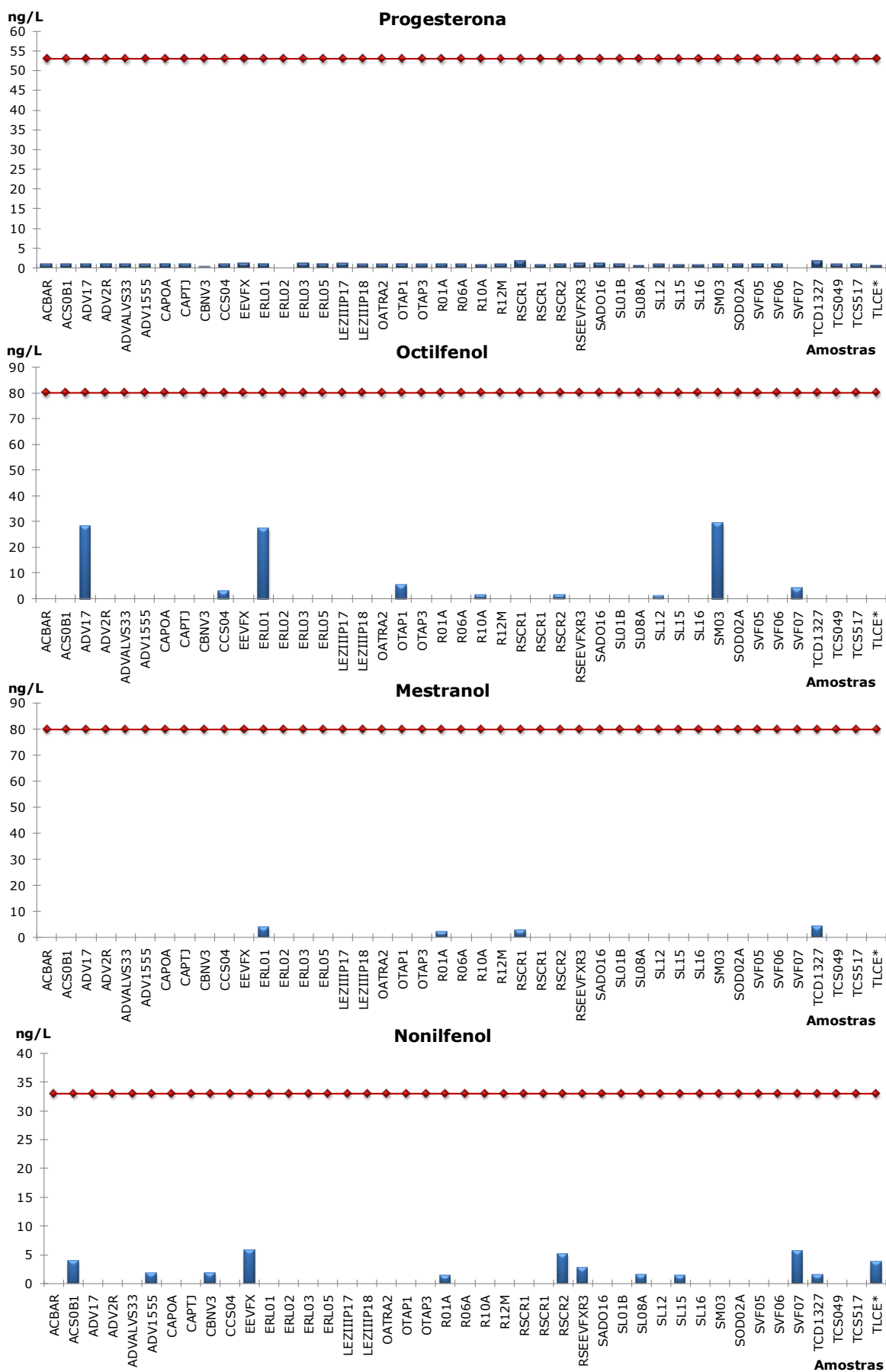


Figura VII.16: Resultados obtidos (progesterona, octilfenol, mestranol e nonilfenol) nas amostras analisadas por SPE-LC-ESI-MS/MS. As barras representam a concentração (ng/L) e a linha representa o limite de determinação calculado para o respectivo método.

Conforme os resultados apresentados, pode concluir-se os resultados obtidos, para todos os compostos, são muito inferiores ao limite de determinação do método. O octilfenol foi o composto cuja concentração mais se aproximou do limite de determinação.