

UNIVERSIDADE DE LISBOA

FACULDADE DE CIÊNCIAS

DEPARTAMENTO DE QUÍMICA E BIOQUÍMICA



**Ciências
ULisboa**

IMPLEMENTAÇÃO E VALIDAÇÃO DE UM MÉTODO DE ENSAIO PARA ANÁLISE
DE CIANOTOXINAS EM ÁGUAS POR HPLC-DAD E UPLC-MS/MS

Mestrado em Química Tecnológica

Sara Margarida Monteiro Anacleto

Dissertação orientada por:

Prof. Doutora Maria José Vitoriano Lourenço

2016

*“If you find a path with no obstacles,
it probably doesn't lead anywhere.”*

- Frank A. Clark

Resumo

Esta dissertação tem como principal objetivo a implementação e validação de um método de ensaio para a análise de cianotoxinas em amostras de águas de consumo e águas naturais do sistema de abastecimento EPAL (Empresa Portuguesa das Águas Livres, S.A.).

O presente trabalho apresenta uma breve introdução onde é abordado o tema relativo à ocorrência de cianotoxinas no meio ambiente bem como os respetivos riscos para a saúde humana. São ainda descritos alguns métodos para a remoção destes compostos dos sistemas de água, durante o processo de tratamento. É também apresentada uma breve introdução relativa à EPAL como entidade gestora de água de abastecimento público, bem como o enquadramento legal relacionado com a temática das cianotoxinas na água.

O desenvolvimento do método de ensaio teve como ponto de partida a otimização das melhores condições cromatográficas de forma a permitir a análise das respetivas cianotoxinas, assim como a definição das condições ótimas de deteção por *diode array detection* (DAD) e espetrometria de massa “*Tandem*” (MS/MS).

Foram efetuados diversos estudos de forma a desenvolver e validar os métodos de ensaio por HPLC-DAD e UPLC-MS/MS. Este último permitiu apresentar um melhor desempenho. Assim, o método de UPLC-MS/MS foi validado para os compostos em estudo, através da aplicação de diversos testes estatísticos, que permitiram definir a gama de trabalho, os limiares analíticos e a precisão.

O trabalho apresenta o desenvolvimento de várias metodologias analíticas, nomeadamente um método de injeção direta em UPLC-MS/MS que permite a análise da cilindropermopsina, homoanatoxina-a e da anatoxina-a e um método de UPLC-MS/MS com uma etapa inicial de concentração de amostras através de extração em fase sólida (SPE) que permite a análise das restantes cianotoxinas.

Para ambos os métodos desenvolvidos foram efetuados ensaios em branco, estudos de recuperação a diferentes níveis de fortificação, a partir dos quais foi avaliado a existência de interferências e onde foi avaliado o efeito de matriz na análise de cianotoxinas por SPE-UPLC-MS/MS.

Palavras-chave: água, cianotoxinas, cromatografia líquida, espetrometria de massa “tandem”, extração em fase sólida.

Abstract

The main goals of this work are the implementation and validation of a method for the analysis of cyanotoxins in samples of drinking water and natural waters of the EPAL (Empresa Portuguesa das Águas Livres, S.A.) water supply system.

This report presents a brief introduction where the question of the occurrence of cyanotoxins in the environment as well as the respective risks to human health. Some methods are described for the removal of these compounds from water systems, during the treatment process. It also presented a brief introduction of EPAL as a public water supply and also legal approach on the issues arising from the presence of cyanotoxins in drink water.

The optimization of the method had as a starting point the determination of the best chromatographic conditions to allow the analysis of target compounds as well as the definition of the optimal conditions of diode array detection (DAD) and tandem mass spectrometry (MS/MS).

Several studies were carried out in order to develop and validate the test methods by HPLC-DAD and UPLC-MS/MS, which allowed to present a better performance. The method for UPLC-MS/MS was validated for the compounds under investigation, through the application of several statistical tests in order to study its linearity, the analytical limits and precision.

This dissertation presents the development of several analytical methods, including method for the analysis of direct injection in UPLC-MS/MS which allows the analysis of cylindrospermopsin, homoanatoxin-a and anatoxin-a and a method of solid-phase extraction which allows the analysis of the remaining cyanotoxins.

For both methods developed, blank tests, recovery studies at different levels of fortification, from which the existence of interferences were evaluated in the analysis of cyanotoxins by SPE-UPLC-MS/MS.

Keywords: water, cyanotoxins, liquid chromatography, mass spectrometry, solid-phase extraction.

Agradecimentos

A realização desta dissertação marca o termo de uma importante etapa da minha vida. Gostaria de agradecer a todos aqueles que contribuíram de forma decisiva para a sua concretização.

Expresso a minha gratidão à EPAL, pela oportunidade da realização deste trabalho de dissertação, agradecendo em particular à Eng.^a Maria João Benoliel que, como responsável da Direção de Laboratórios e Controlo da Qualidade da Água, permitiu a colaboração com a Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa para a realização deste trabalho.

Ao Dr. Vítor Cardoso, supervisor da equipa de Química Orgânica, agradeço todas as sugestões feitas durante a realização desta dissertação, bem como a forma harmoniosa e acolhedora com que me recebeu na EPAL.

Ao Dr. Alexandre Rodrigues, responsável no laboratório por este trabalho, quero agradecer todo o apoio científico e acompanhamento prestado, por todos os desafios, críticas e sugestões relevantes feitas durante a execução experimental. Agradeço ainda a forma objetiva, construtiva e interessada com que orientou este trabalho, bem como toda a disponibilidade e simpatia revelada, decisiva para que este trabalho contribuísse para o meu desenvolvimento pessoal.

À Prof.^a Dra. Maria José Lourenço, minha orientadora, agradeço todo o apoio científico e acompanhamento, bem como a forma interessada e objetiva com que orientou esta tese, demonstrando sempre total disponibilidade.

Ao Andrés Castaño García e à Marta Loureiro, por todos os conhecimentos transmitidos, pela entreajuda, boa disposição e principalmente pela amizade criada.

À restante equipa de Química Orgânica, Cristina Correia, João Rodrigues, Ana Neto, Ana Penetra e Vânia Constantino, por toda a simpatia, ajuda prestada e pela forma acolhedora com que me receberam, um muito obrigado por tudo.

Aos meus amigos, André, Adhan, Bebiana, Sara, por toda a amizade e motivação, por estarem sempre presentes e por proporcionarem bons momentos de descontração.

À minha família, especialmente aos meus pais, irmã e avós, por todo o apoio que me deram ao longo desta dissertação, por estarem presentes nos bons e maus momentos e principalmente por acreditarem em mim. Sem eles não teria sido possível a concretização deste objetivo.

Índice

Resumo.....	I
Abstract.....	II
Agradecimentos.....	III
Índice.....	IV
Índice de Figuras.....	VII
Índice de Tabelas.....	IX
Abreviaturas.....	X
Capítulo I - A água.....	1
1. Perspetivas Gerais.....	1
2. Ciclo hidrológico.....	2
3. Tratamento da água.....	3
Capítulo II – Ocorrência de cianotoxinas no meio aquático.....	5
1. Eutrofização.....	5
2. Fitoplâncton e Cianobactérias.....	6
3. Florações de Cianobactérias.....	6
4. Cianotoxinas.....	8
4.1 Microcistinas.....	9
4.2 Nodularina.....	10
4.3 Cilindrospermopsina.....	11
4.4 Anatoxina-a e Homoanatoxina-a.....	12
5. Remoção de cianotoxinas.....	13
Capítulo III – EPAL - Empresa Portuguesa das Águas Livres.....	14
1. Enquadramento do trabalho na empresa.....	16
Capítulo IV – Legislação relativa à qualidade da água.....	17
1. Legislação Europeia relacionada com a qualidade da água.....	17
2. Legislação comunitária relativa à qualidade da água.....	17
3. Legislação nacional relativa à qualidade da água.....	19
4. A atividade do Laboratório Central da EPAL.....	20
Capítulo V – Metodologia analítica.....	21
1. Técnica de preparação da amostra - Extração em Fase Sólida.....	21
1.1 Procedimento de Extração em Fase Sólida.....	23
1.2 Mecanismos de retenção em SPE e respetivas fases sólidas.....	24
2. A cromatografia como técnica analítica.....	26
2.1 Cromatografia Líquida de Elevada Eficiência (HPLC).....	27
2.2 Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência (UPLC).....	29

2.3	A espectrometria de massa como sistema de detecção	31
3.	<i>Validação do método analítico</i>	38
3.1	Seletividade/Especificidade	38
3.2	Linearidade/Gama de trabalho	38
3.3	Precisão	40
3.4	Sensibilidade	41
3.5	Exatidão	42
3.6	Ensaio de recuperação	42
Capítulo VI – Parte experimental		43
1.	<i>Equipamento</i>	43
2.	<i>Material</i>	44
3.	<i>Reagentes</i>	44
3.1	Reagentes Gerais.....	44
3.2	Padrões primários.....	44
4.	<i>Preparação de soluções</i>	45
4.1	Soluções Gerais	45
4.2	Fase Móvel	45
4.3	Soluções Padrão utilizadas na análise por HPLC.....	46
4.4	Soluções Padrão utilizadas na análise por UPLC.....	46
4.5	Soluções Padrão para o estudo das recuperações por injeção direta.....	47
4.6	Soluções Padrão para o estudo das recuperações através da técnica de SPE.....	48
5.	<i>Análise de cianotoxinas por HPLC-DAD</i>	50
6.	<i>Otimização do método analítico UPLC-MS/MS</i>	50
6.1	Condições do triplo quadrupolo.....	50
6.2	Condições cromatográficas.....	51
6.3	Validação do método de UPLC-MS/MS	54
7.	<i>Método de injeção direta na análise de cianotoxinas</i>	55
8.	<i>Otimização da técnica analítica de SPE</i>	56
8.1	Seleção do cartucho de SPE.....	56
8.2	Fortificação das amostras.....	56
8.3	Efeitos de matriz	57
Capítulo VII – Resultados e discussão		58
1.	<i>Análise de cianotoxinas por HPLC-DAD</i>	58
2.	<i>Otimização das condições UPLC-MS/MS</i>	59
2.1	Otimização do espectrómetro de massa	59
2.2	Condições cromatográficas.....	63
3.	<i>Validação do método UPLC-MS/MS</i>	66
3.1	Estudo da linearidade	66
3.2	Limites analíticos instrumentais	72
3.3	Razão MRM1/MRM2.....	73
3.4	Precisão	74
4.	<i>Estudos de recuperação</i>	75
4.1	Método de injeção direta na análise de cianotoxinas.....	75
4.2	Otimização do método de extração em fase sólida.....	76
4.3	Análise de diferentes matrizes de água com realização de etapa de SPE.....	79
4.4	Efeitos de matriz	80

Segurança e Ambiente	81
Custos associados	82
Capítulo VIII – Conclusões e perspetivas futuras	83
Referências bibliográficas	85
Anexos	91
<i>Anexo 1: Método dos Mínimos Quadrados</i>	91
<i>Anexo 2: Análise de Resíduos</i>	93
<i>Anexo 3: Teste das áreas normalizadas</i>	94
<i>Anexo 4: Teste de RIKILT</i>	95
<i>Anexo 5: Teste de Mandel ou Teste de Fisher-Snedcor</i>	96

Índice de Figuras

Figura 1.1: Disponibilidade de água na superfície terrestre (adaptado de [3]).	1
Figura 1.2: Ciclo hidrológico com os fluxos representados em 10^{12} m ³ /ano (adaptado de [7]).	2
Figura 1.3: Esquema-tipo do tratamento de água realizado na ETA da Asseiceira.	3
Figura 1.4: Esquema-tipo do tratamento de água realizado na ETA de Vale da Pedra.	3
Figura 2.1: Exemplo de um lago com elevado nível de eutrofização [18].	5
Figura 2.2: Origem dos blooms de cianobactérias e consequente exposição da saúde humana (adaptado de [23]).	7
Figura 2.3: Estrutura geral das microcistinas, em que as posições X e Y correspondem aos aminoácidos variáveis [27].	9
Figura 2.4: Estrutura química da nodularina [36].	10
Figura 2.5: Estrutura química da cilindrospermopsina [39].	11
Figura 2.6: Representação estrutural da molécula de anatoxina-a (a) e homoanatoxina-a (b) [31].	12
Figura 3.1: Sistema de abastecimento da EPAL para águas de consumo humano [49].	15
Figura 3.2: Organograma representativo da estrutura organizacional da Direção de Laboratórios e Controlo da Qualidade da Água (LAB) [51].	16
Figura 5.1: Evolução das metodologias de extração em SPE que contribuem para a “Química Verde” (adaptado de [63]).	21
Figura 5.2: Cromatograma representativo da presença de um analito na amostra original (a) e na amostra após a realização de SPE (b) (adaptado de [67]).	22
Figura 5.3: Exemplo de um cromatograma resultante da análise de uma amostra em que não foi realizado SPE (a) e onde foi realizado SPE (b) (adaptado de [67]).	22
Figura 5.4: Exemplo de um cromatograma onde se verifica o isolamento seletivo de analitos, resultante da análise de uma amostra em que não foi realizado SPE (a) e onde foi realizado SPE (b) (adaptado de [67]).	22
Figura 5.5: Procedimento realizado na extração em fase sólida (adaptado de [68]).	23
Figura 5.6: Procedimento realizado na extração em fase sólida, para analitos com baixa interação com o cartucho (adaptado de [68]).	24
Figura 5.7: Estrutura simplificada de um HPLC (adaptado de [74]).	27
Figura 5.8: Representação esquemática de um Diode-Array Detector (DAD) (adaptado de [76]).	28
Figura 5.9: Curva de Van Deemter para partículas de 10, 5, 3 e ≤ 2 μ m [79].	30
Figura 5.10: Diagrama representativo de um espectrómetro de massa.	32
Figura 5.11: Processo de ionização por electrospray (adaptado de [90]).	33
Figura 5.12: Estrutura simplificada de um quadrupolo (adaptado de [91]).	34
Figura 5.13: Esquema simplificado de um espectrómetro de massa tandem (adaptado de [93]).	35
Figura 5.14: Esquema representativo do modo de aquisição Product Ion Scan (adaptado de [94]).	35
Figura 5.15: Esquema representativo do modo de aquisição Precursor Ion Scan (adaptado de [94]).	36
Figura 5.16: Esquema representativo do modo de aquisição Neutral Loss Scan (adaptado de [94]).	36
Figura 5.17: Esquema representativo do modo de aquisição Multiple Reaction Monitoring (adaptado de [95]).	36

Figura 7.1: Efeito da voltagem de cone para a anatoxina-a.	60
Figura 7.2: Efeito da energia de colisão para a anatoxina-a.	61
Figura 7.3: a) Espectro de massa do íão precursor da anatoxina-a no modo de ionização positivo, com uma voltagem de cone de 30 V. b) Espectro de massa resultante da fragmentação do íão precursor obtido.	61
Figura 7.4: Cromatogramas representativos do efeito da temperatura da coluna no tempo de retenção e intensidade dos picos obtidos. a) 30 °C, b) 35, c) 40 °C.....	65
Figura 7.5: Resultados iniciais da gama total de concentrações estudada para a microcistina YR: a) aplicação do método dos mínimos quadrados, b) análise de resíduos, c) Teste de RIKILT, d) Teste das áreas normalizadas e e) Teste de Mandel.	70
Figura 7.6: Resultados finais obtidos para a microcistina YR após ajuste dos testes estatísticos: a) aplicação do método dos mínimos quadrados, b) análise de resíduos, c) Teste de RIKILT, d) Teste das áreas normalizadas e e) Teste de Mandel.	71
Figura 7.7: Percentagens de recuperação obtidas para os três compostos analisados por injeção direta, para três matrizes diferentes.....	75
Figura 7.8: Recuperações obtidas para os diferentes cartuchos, utilizando água ultrapura acidificada, água ultrapura com tiosulfato de sódio e água ultrapura.	77
Figura 7.9: Taxas de recuperação obtidas para as cianotoxinas, em diferentes matrizes de água.	79
Figura 7.10: Taxas de recuperação obtidas para as cianotoxinas, quantificadas em matriz ajustada.	80

Índice de Tabelas

Tabela 2.1: Diferentes tipos de microcistinas e os respetivos aminoácidos variáveis (adaptado de [33]).	10
Tabela 6.1: Fases móveis testadas para otimização das condições cromatográficas.	45
Tabela 6.2: Preparação de soluções padrão de calibração.	47
Tabela 6.3: Preparação de soluções padrão de calibração, para o estudo das recuperações por injeção direta.	48
Tabela 6.4: Preparação de soluções padrão de calibração.	49
Tabela 6.5: Preparação de soluções padrão de calibração, para o estudo das recuperações.	49
Tabela 6.6: Condições cromatográficas utilizadas na técnica de HPLC-DAD.	50
Tabela 6.7: Gradiente utilizado nas fases móveis, para seleção da coluna cromatográfica.	51
Tabela 6.8: Gradiente utilizado na fase móvel.	52
Tabela 6.9: Condições aplicadas aos métodos criados no software para análise das cianotoxinas por UPLC-MS/MS.	53
Tabela 6.10: Preparação dos níveis de fortificação nos ensaios de recuperação.	55
Tabela 6.11: Condições utilizadas nos estudos de recuperações.	56
Tabela 7.1: Resultados obtidos para as cianotoxinas, pela técnica de HPLC-DAD.	58
Tabela 7.2: Condições ótimas para a obtenção do ião precursor e dos iões produto.	62
Tabela 7.3: Resumo dos tempos de retenção e das intensidades de sinal obtidas para as várias colunas cromatográficas.	64
Tabela 7.4: Resultados do estudo inicial da linearidade e respetiva aplicação dos testes estatísticos.	67
Tabela 7.5: Resultados obtidos no estudo da linearidade após ajuste dos testes estatísticos aplicados.	68
Tabela 7.6: Limiares analíticos do método UPLC-MS/MS, determinados com base no desvio padrão residual da reta de calibração e em condições de repetibilidade.	72
Tabela 7.7: Variabilidade da razão MRM1/MRM2 ao longo do intervalo de linearidade para cada um dos compostos.	73
Tabela 7.8: Estudo da precisão instrumental do método, em termos de repetibilidade, na gama de trabalho (n=5).	74
Tabela 7.9: Coeficientes de variação (%) obtidos para os compostos nas diferentes matrizes, através da análise por injeção direta.	76
Tabela 7.10: Coeficientes de variação (%) obtidos para os compostos nas diferentes matrizes e com diferentes cartuchos.	78
Tabela 7.11: Custos associados ao trabalho desenvolvido.	82

Abreviaturas

a: ordenada na origem (equação da reta $y = a + bx$)

Adda: ácido 3-amino-9-metoxi-2,6,8-trimetil-10-fenildeca-4E, 6E-dienóico

AdP: Águas de Portugal

ALVT: Águas de Lisboa e Vale do Tejo

Ala: D-Alanina

APCI: *Atmospheric Pressure Chemical Ionization*, Ionização Química à Pressão Atmosférica

APPI: *Atmospheric Pressure Photoionization*, Fotoionização à Pressão Atmosférica

b: Declive da reta (equação da reta $y = a + bx$)

β - Me-Asp: ácido D-eritro- β -metilaspártico

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

C_t - concentração esperada do composto na amostra fortificada ($\mu\text{g/L}$)

C_v : Coeficiente de variação

C_{vm} : Coeficiente de variação do método

C_{vr} : Coeficiente de variação de repetibilidade

CAL: Companhia das Águas de Lisboa

DL: Decreto-Lei

DNA: *deoxyribonucleic acid*, ácido desoxirribonucleico

DAD: *Diode Array Detector*, Detetor de Arranjo de Diódos

DL₅₀: Dose Letal para 50% dos animais

EPAL: Empresa Portuguesa das Águas Livres

ESI: *Electrospray Ionization*, Ionização por *electrospray*

ETA: Estação de tratamento de água

GC: *Gas Chromatography*, Cromatografia Gasosa

Glu: Ácido D-isoglutâmico

HILIC: *Hidrophilic Interaction Chromatography*

HPLC: *High Performance Liquid Chromatography*, Cromatografia Líquida de Elevada Eficiência

HPLC-DAD: *High Performance Liquid Chromatography – Diode Array Detector*, Cromatografia Líquida de Elevada Eficiência - Detetor de Arranjo de Diódos

ISO: *International Standard Normalization* – Organização Internacional de Normalização

LAB: Direção de Laboratórios e Controlo de Qualidade da Água

LC: *Liquid Chromatography*, Cromatografia Líquida

LD: Limite de Detecção

LLE: *Liquid-Liquid Extraction*, Extração Líquido-Líquido

LQ: Limite de Quantificação

Mdha: N-metil-desidroalanina

Mdhb: N-metil-desidrobutilina

MRM: *Multiple Reaction Monitoring*

MS: *Mass spectrometry*, espectrometria de massa

MS/MS: “*Tandem Mass Spectrometry*”, espectrometria de massa tandem

m/z: razão massa/carga

n: número de ensaios

NQA: Normas de Qualidade Ambiental

OMS: Organização Mundial de Saúde

PTFE: Politetrafluoretileno

Pa: Pascal

RNA: *Ribonucleic Acid*, Ácido Ribonucleico

SFC: *Supercritical Fluid Chromatography*, Cromatografia de Fluido Supercrítico

SIM: *Single Ion Monitoring*

SPE: *Solid-Phase Extraction*, Extração em Fase Sólida

S: Sensibilidade

Stj: Desvio padrão da repetibilidade

Sxo: Desvio padrão correspondente a várias leituras da solução com concentração mais baixa da gama de linearidade.

Sy/x: Desvio padrão residual da curva de calibração

TN: Total Nitrogen, Azoto Total

TP: Total Phosphorus, Fósforo Total

UNICEF: United Nation Children’s Fund

UPLC: Ultra Performance Liquid Chromatography, Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência

UV: Ultravioleta

UV-VIS: Ultravioleta-visível

WHO: *World Health Organization*

\bar{x} : média aritmética do número de medições

x_i : valor individual de uma medição

Δc : Variação da concentração

Δy : Variação do sinal analítico

Capítulo I - A água

1. Perspetivas Gerais

A água constitui um elemento fundamental do ecossistema, nomeadamente a água potável, sendo essencial à sobrevivência da biosfera, do Homem e de todas as espécies existentes na terra [1].

O Homem utiliza a água, diariamente, em inúmeras situações, domésticas e industriais, no entanto, a percentagem de água potável existente no planeta é ínfima, quando comparada ao volume de água não potável disponível [2], ou seja, dos cerca de 1.3 biliões de quilómetros cúbicos de água existentes à superfície da terra, cerca de 97,5 % encontra-se sob a forma de água salgada e apenas 0,01% está disponível na criosfera, em rios e lagos (Figura 1.1) [3].

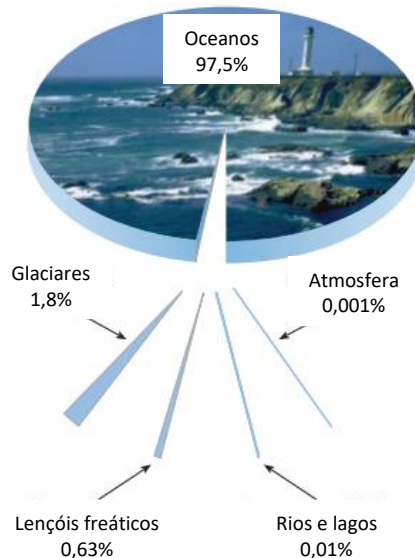


Figura 1.1: Disponibilidade de água na superfície terrestre (adaptado de [3]).

Segundo a WHO & UNICEF, cerca de 1,1 bilião de pessoas não consegue aceder a qualquer tipo de água potável e, frequentemente, populações residentes nas proximidades de rios e lagos, utilizam diretamente a água para consumo sem qualquer tratamento, o que aumenta o risco de transmissão de doenças por via hídrica [4].

A água encontra-se disponível através de infraestruturas que permitem a sua distribuição aos consumidores através de um sistema de abastecimento público, no entanto, dependendo da sua origem, a água captada destinada ao consumo humano pode ser subterrânea ou superficial [1].

Como recurso natural indispensável à vida, a água utilizada pelo Homem deve possuir características de potabilidade, definidas pela Organização Mundial de Saúde (OMS) como a água que durante o seu consumo não apresenta nenhum risco significativo para a saúde [5], ou seja, o objetivo do tratamento de água potável é a produção de água que é química, biológica, e esteticamente agradável [1].

Nas áreas urbanas, uma quantidade significativa da população usufrui de um sistema de abastecimento de água municipal, enquanto nas áreas rurais, o abastecimento de água, geralmente, vem de poços privados ou partilhados. A produção de água potável é um processo que requer muita energia, nomeadamente se a fonte hídrica for pouco limpa [1].

O objetivo principal das entidades gestoras de abastecimento de água é demonstrar o nível de qualidade da água de acordo com a lei em vigor, manter um controlo operacional que permita identificar

possíveis anomalias na qualidade da água e, desta forma, pôr em prática medidas preventivas e eficazes [6].

2. Ciclo hidrológico

O ciclo hidrológico descreve as trocas de água existentes entre os oceanos, a atmosfera, a superfície terrestre, a biosfera, os solos e o sistema de águas subterrâneas [7].

Este ciclo consiste numa sequência fechada de fenómenos pelos quais a água passa do globo terrestre para a atmosfera, na fase de vapor, e regressa nas fases líquida e sólida.

A figura 1.2 ilustra os fluxos à escala global, existentes nos vários reservatórios de água, expressos em 10^{12} m³/ano (triliões de m³/ano). A evaporação e a precipitação nos oceanos dominam os fluxos, dentro do ciclo hidrológico [7].



Figura 1.2: Ciclo hidrológico com os fluxos representados em 10^{12} m³/ano (adaptado de [7]).

A transferência de água da superfície da terra para a atmosfera, sob a forma de vapor, ocorre por evaporação, que consiste na mudança de fase da água, de líquida para vapor, devido principalmente à energia da radiação solar [8].

A água condensada dá lugar à formação de nevoeiros e nuvens, surgindo a precipitação a partir de ambos. A água que precipita nos continentes pode tomar vários destinos [8].

Uma parte é devolvida diretamente à atmosfera por evaporação e a outra parte infiltra-se, ou seja, penetra no interior do solo formando lençóis aquíferos, que por sua vez surgem à superfície através de nascentes, de modo a fornecer água às plantas e a todos os sistemas biológicos [8].

3. Tratamento da água

O tratamento da água é feito na ETA e consiste no conjunto de operações necessárias para que a água se enquadre nos padrões de potabilidade pré-estabelecidos [8].

O processo de tratamento de água destinado ao consumo humano tornou-se uma preocupação por parte das entidades responsáveis, pois é cada vez mais frequente a contaminação de água potável, a partir de fontes antropogénicas, por produtos químicos e metais pesados [9].

Antes de se iniciar o processo de tratamento de água na ETA, esta é captada diretamente nos rios e nas albufeiras (águas superficiais) ou no subsolo (águas subterrâneas), no entanto, a água captada apresenta várias impurezas como lamas, areias, lixos, micróbios e bactérias [10].

Os processos de tratamento variam consoante a origem e qualidade da água. Normalmente as águas superficiais necessitam de processos de tratamento mais complexos que as águas subterrâneas [10].

O tratamento realizado na EPAL, nomeadamente na água captada na albufeira de Castelo do Bode e tratada na ETA da Asseiceira passa pelas seguintes fases (figura 1.3): pré-oxidação com cloro gasoso, remineralização e correção da agressividade, coagulação, flotação, ozonização, filtração, correção do pH e desinfeção final [11].

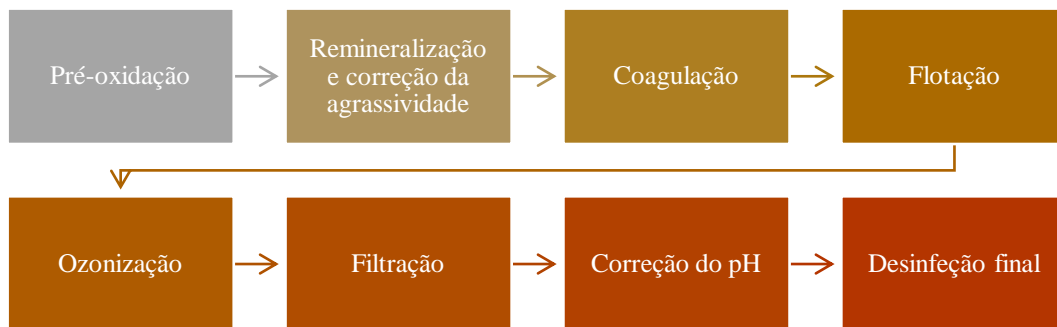


Figura 1.3: Esquema-tipo do tratamento de água realizado na ETA da Asseiceira.

No caso da água captada em Valada Tejo, o tratamento é efetuado na ETA de Vale da Pedra e inclui as seguintes fases: pré-oxidação com cloro gasoso, coagulação/floculação, decantação, filtração, correção de pH e desinfeção final [11] (figura 1.4).

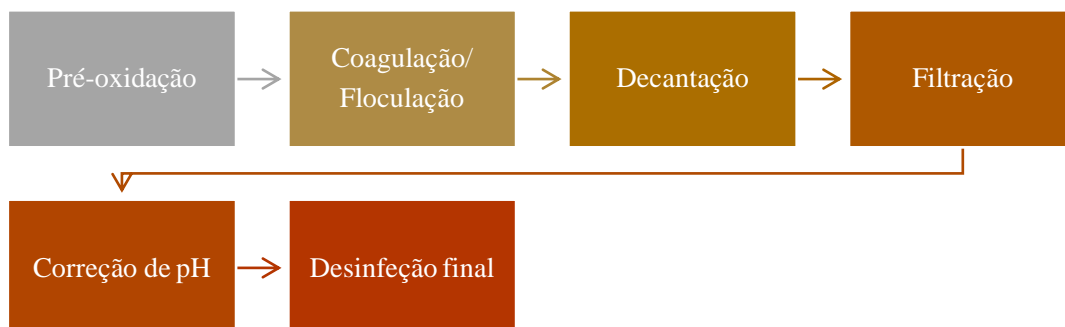


Figura 1.4: Esquema-tipo do tratamento de água realizado na ETA de Vale da Pedra.

O tratamento da água inclui várias fases, que já foram mencionadas anteriormente.

A pré-oxidação é realizada com cloro gasoso e consiste numa injeção de cloro com o objetivo de reduzir a quantidade de matéria orgânica presente na água captada.

A remineralização corrige o caráter doce da água, onde é criada uma fina camada de calcário protetora da corrosão do interior de tubagens de água.

A coagulação/floculação é um processo químico que tem como objetivo a agregação de partículas em suspensão levando à formação de flocos com dimensões adequadas para a fase de decantação ou flotação.

Na fase de decantação os flocos de maior dimensão são depositados no fundo de tanques eliminando-se, assim, a maioria das partículas em suspensão. A água decantada segue para a filtração.

Na fase de flotação, os flocos de menor dimensão agregam-se com microbolhas de ar que facilitam a sua elevação e posterior remoção.

A fase de ozonização usa o ozono como forte agente oxidante, sendo este utilizado para a eliminação de algas e outra matéria orgânica, possuindo propriedades antissépticas e bactericidas, com aplicação importante ao nível do tratamento da água.

Na etapa de filtração a água passa através de filtros, de areia ou areia e antracite, nos quais ficam retidas as partículas mais pequenas, sendo possível removê-las da água. A filtração clarifica a água e aumenta a eficácia da desinfeção.

Seguidamente ocorre a etapa de correção do pH, procedendo-se ao ajuste deste, garantindo que este parâmetro se mantém no intervalo de valores definidos na legislação.

Por fim ocorre a desinfeção final onde é adicionado cloro para garantir que não se desenvolvem micro-organismos, mantendo-se um teor residual que garanta a qualidade da água ao longo da rede de transporte e distribuição até à torneira do cliente [11].

Perante este tipo de tratamento realizado nas águas, apenas são removidas baixas percentagens de toxinas. A remoção eficaz de cianobactérias dissolvidas em água depende da concentração dos produtos químicos adicionados no processo de tratamento relativamente à concentração de cianobactérias presentes. Depende também da espécie de cianobactéria, do pH da água e do tempo de contacto da toxina com a água [12].

Capítulo II – Ocorrência de cianotoxinas no meio aquático

1. Eutrofização

A eutrofização consiste na modificação de ambientes aquáticos pela acumulação de nutrientes [13], nomeadamente compostos de fósforo e azoto, provocando o crescimento biológico em rios, lagos e reservatórios [14].

A eutrofização pode ser potenciada por processos naturais ou artificiais.

Enquanto processo natural, a eutrofização resulta da deposição da matéria mineral ou orgânica que aflui a albufeiras e lagos, transportada por águas drenantes ao longo de centenas ou milhares de anos [15], provocando o aumento da produção biológica [16].

Ao contrário da eutrofização natural, a eutrofização artificial é desencadeada por diversos processos antropogénicos, resultado do crescimento descontrolado da população humana e do despejo de efluentes urbanos e industriais ou fertilizantes agrícolas no ecossistema aquático [14], pois os agroquímicos e os adubos utilizados de forma excessiva acabam por ser transportados para os rios, através da chuva, provocando assim o aumento de nutrientes na água [17].

A eutrofização provoca mudanças na qualidade da água, nomeadamente a diminuição da concentração de oxigénio dissolvido, a redução da biodiversidade aquática, a perda de características estéticas do ambiente (figura 2.1) e, para além disso, provoca a morte extensiva de peixes e também o aumento da incidência de florações de microalgas e cianobactérias, constituindo um sério risco para a saúde pública [14] e [17].



Figura 2.1: Exemplo de um lago com elevado nível de eutrofização [18].

2. Fitoplâncton e Cianobactérias

A comunidade fitoplanctônica vive em suspensão na água e é constituída por algas microscópicas que suportam a produtividade dos ecossistemas aquáticos. Estas utilizam a luz, o dióxido de carbono e nutrientes orgânicos e inorgânicos para produzir biomassa, que fornece energia e materiais que estão na base da cadeia alimentar [19].

As cianobactérias são conhecidas como algas azul-esverdeadas devido à combinação de características comuns às bactérias e às algas [2].

As cianobactérias fazem parte do fitoplâncton natural de água doce, salgada e salobra, essencial num ecossistema aquático, e proliferam massivamente em condições ambientais favoráveis [20]. Os principais fatores que proporcionam a ocorrência de cianobactérias são o aumento anormal da quantidade de compostos azotados e fosfatados na água; o aumento de matéria orgânica, que favorece o aumento de micro-organismos decompositores livres na água e nos sedimentos, resultando no consumo do oxigênio dissolvido na água e favorecendo a atividade fotossintética das cianobactérias [2].

Além disso, nos meios anaeróbicos, ocorre o aumento da disponibilidade das formas inorgânicas de azoto e fósforo, facilitando grandes proliferações de cianobactérias [2].

A fotossíntese é o seu principal modo de metabolismo e energia, no entanto, em ambiente natural, conhecem-se espécies capazes de sobreviver longos períodos na escuridão [21].

As cianobactérias são micro-organismos procariotas, ou seja, são organismos maioritariamente unicelulares e não apresentam o seu material genético delimitado por uma membrana, no entanto podem também apresentar-se em formas coloniais e multicelulares filamentosas, podendo estas serem ou não ramificadas e portadoras ou não de células especializadas (heterocistos) [2] e [22].

As características das cianobactérias têm dificultado a sua classificação. Inicialmente foram classificadas segundo o código de Nomenclatura Internacional de Botânica, devido ao facto de o principal pigmento fotossintético ser a clorofila- α e de realizarem fotossíntese oxigénica. O aparecimento da microscopia ótica e os testes bioquímicos acabaram por fazer com que estes organismos fossem classificados no reino das bactérias, por serem organismos procariotas, passando a ser regidos pelo Código de Nomenclatura Bacteriológica [20].

3. Florações de Cianobactérias

Nos ambientes aquáticos (naturais ou artificiais), em condições apropriadas, as cianobactérias multiplicam-se em larga escala, denominando-se de florações ou *blooms* [12], dando origem a grandes populações com a capacidade de formar vesículas gasosas que lhe permitem flutuar à superfície da água em que se encontram [21]. As populações de bactérias podem acumular-se na periferia das águas utilizadas para fins recreativos (por exemplo nos lagos) ou em tanques de abastecimento de água para consumo [12].

Não existe um número de células definido para se poder considerar uma floração, no entanto, este fenómeno ocorre quando existe uma produção significativa de biomassa, durante um curto período de tempo, correlacionada com uma diminuição da diversidade de fitoplâncton [23].

Os *blooms* de cianobactérias nem sempre são compostos por espécies tóxicas, no entanto, entre 50 a 70% das florações apresentam toxicidade. O aparecimento de florações tóxicas não é apenas um fenómeno local, regional ou específico de um determinado país mas sim de proporções globais [17].

Normalmente, a proliferação de florações de cianobactérias em ecossistemas aquáticos é regulada pela combinação de três fatores ambientais. O primeiro corresponde à temperatura da água, pois vários tipos de cianobactérias preferem água quente (25 °C ou superior). Consequentemente, o aquecimento global pode aumentar a frequência e a magnitude das florações, favorecendo cianobactérias e outras espécies de fitoplâncton [23].

O segundo fator ambiental que influencia o aparecimento de *blooms* de cianobactérias é a exposição à luz pois a maioria das espécies precisam de um mínimo de disponibilidade de luz para que a fotossíntese ocorra [23]. A pigmentação das cianobactérias protege a célula da foto inibição e melhora a absorção de luz, em comparação com outras espécies de fitoplâncton, no entanto, algumas espécies são extremamente flexíveis na resposta à exposição à luz, pois algumas cianobactérias podem persistir em cavernas durante meses, praticamente sem luz, e são capazes de crescer imediatamente após exposição a esta [23].

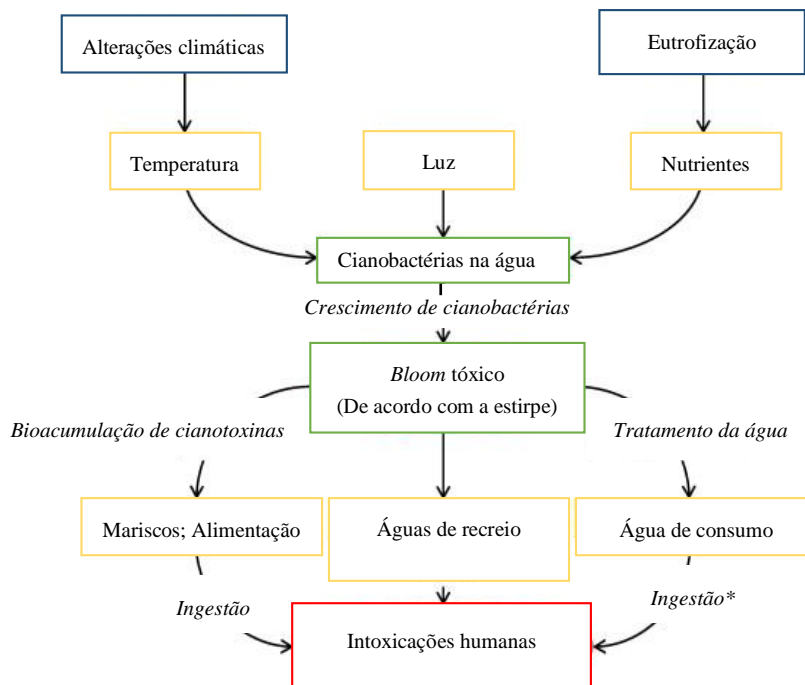
O terceiro fator ambiental que favorece o aparecimento de *blooms* é o estado trófico do meio aquático.

Pesquisas apontam que elevadas concentrações de Fósforo (P) e baixos rários Azoto (N): Fósforo (P) são favoráveis ao aparecimento de florescências de cianobactérias, concluindo-se que o rácio N:P de 29:1 poderá diferenciar o domínio de cianobactérias ($N:P < 29:1$) e outras massas de água que não apresentariam esse domínio ($NP > 29:1$) [24].

O domínio de cianobactérias a que corresponde um baixo rácio Azoto Total (TN): Fósforo Total (TP) deve-se ao facto das cianobactérias competirem mais eficazmente para o azoto (N) do que outro fitoplâncton, quando este se apresenta em pequenas quantidades [24].

Para além dos três fatores referidos anteriormente, também a eutrofização a partir de resíduos domésticos, industriais e agrícolas, bem como as alterações climáticas, assumem um papel importante na proliferação destas algas nocivas [25].

Na figura 2.2 está representado um esquema-resumo dos vários fatores que influenciam o aparecimento de *blooms* de cianobactérias bem como da forma como o ser humano está exposto a estes.



* 80% dos seres humanos estão expostos a cianotoxinas

Figura 2.2: Origem dos *blooms* de cianobactérias e consequente exposição da saúde humana (adaptado de [23]).

4. Cianotoxinas

Durante a fase de floração, as cianobactérias produzem metabolitos secundários designados por cianotoxinas [12], que apresentam elevada toxicidade para outros organismos e podem causar alterações nas propriedades organolépticas da água, ou seja, promovem paladar e odor desagradáveis a esta devido à presença de dois compostos (geosmina e 2-metilsoborneol) [23].

As cianotoxinas pertencem a três classes químicas distintas (péptidos cíclicos, alcalóides e lipopolissacarídeos) e são produzidas no interior das células de cianobactérias. A sua libertação ocorre durante a lise celular, no entanto, também pode ocorrer libertação ativa da toxina durante o crescimento celular [12].

A contaminação por cianotoxinas em humanos ocorre principalmente por ingestão de água contaminada mas também pode ocorrer por inalação, contacto dérmico e por modo intravenoso, como por exemplo nas unidades de hemodiálise [12] e [26].

Os seres humanos estão potencialmente expostos a estas substâncias, através de atividade recreativas, tais como tomar banho em água superficial contaminada e através do consumo de água potável tratada inadequadamente, produzida a partir de recursos contaminados [23].

Outros sintomas possíveis após o contacto com fontes contaminadas são as dores abdominais, vômitos, fraqueza, irritação da pele e membranas mucosas dos olhos, nariz e garganta, ataques de asma, tremores musculares, náuseas, visão turva, dor de cabeça, tonturas, febre, paragem cardiorrespiratória e até mesmo a morte [12].

O mecanismo de ação das cianotoxinas depende essencialmente da sua estrutura química, no entanto também é possível estabelecer uma classificação de acordo com o mecanismo de toxicidade que estas apresentam.

Dependendo dos órgãos-alvo, as cianotoxinas podem classificar-se em hepatotoxinas, que atuam no fígado, neurotoxinas, que atuam no sistema nervoso e dermatotoxinas que atuam na pele [23].

De acordo com a sua estrutura química, as cianotoxinas podem ser divididas em péptidos cíclicos, alcalóides e lipopolissacarídeos [12].

Neste trabalho foram analisadas várias cianotoxinas tais como as microcistinas, a anatoxina-a, a homoanatoxina-a, a cilindrospermopsina e a nodularina.

4.1 Microcistinas

As microcistinas são hepatotoxinas de peptídeos cíclicos, cuja estrutura se apresenta na figura 2.3. As microcistinas são o tipo de cianotoxinas mais frequentes em água doce [12].

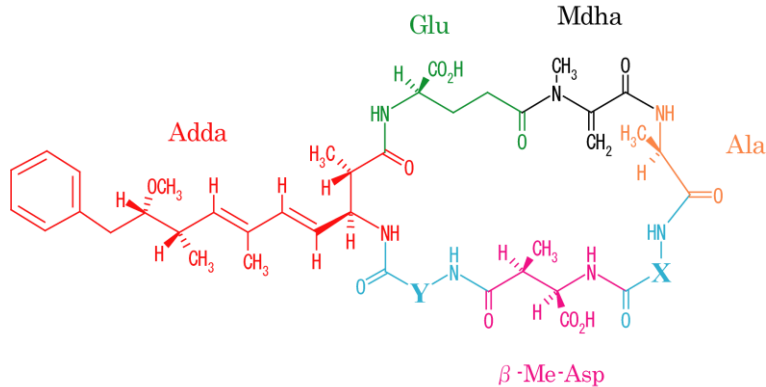


Figura 2.3: Estrutura geral das microcistinas, em que as posições X e Y correspondem aos aminoácidos variáveis [27].

Têm um peso molecular entre 900-1100 Daltons [28] e são constituídas por três D-aminoácidos [D-alanina (Ala), ácido D-eritro- β -metilaspártico (β -Me-Asp), ácido D-isoglutâmico (Glu)], dois L-aminoácidos variáveis e dois aminoácidos invulgares [N-metil-desidroalanina (Mdha) e ácido 3-amino-9-metoxi-2,6,8-trimetil-10-fenildeca-4E, 6E-dienóico (Adda)] [29].

Nas posições 2 e 4 da estrutura (figura 2.3) são encontrados resíduos de L-aminoácidos responsáveis pela nomenclatura das diferentes variantes de microcistinas [17].

As microcistinas são moléculas anfipáticas contendo funções hidrofílicas (grupos carboxilo e grupo guanidina da arginina) e hidrofóbicas (resíduo Adda) [29].

A sua estrutura cíclica proporciona uma elevada estabilidade em água e tolerância a mudanças radicais de pH e temperatura, mantendo a toxicidade das microcistinas, mesmo após a fervura [17].

Por serem tão estáveis, resistem ao pH do estômago e não sofrem a ação das peptidases gástricas, sendo absorvidas ao nível do duodeno e tendo como órgão-alvo principal, o fígado.

As microcistinas podem atuar como promotores de tumores estimulando a proliferação de células cancerígenas, em animais e seres humanos, através da inibição das proteínas fosfatases [12].

As microcistinas constituem um dos principais grupos de cianotoxinas devido à ocorrência mundial e elevada toxicidade [30], podendo ser produzidas por inúmeros géneros como *Microcystis*, *Anabaena*, *Planktothrix* e em pequenas proporções pelos géneros *Nostoc*, *Hapalosiphon*, *Anabaenopsis* [31].

De entre as variantes de microcistinas já identificadas, a microcistina-LR destaca-se pela elevada frequência com que é encontrada e pela sua elevada hepatotoxicidade [32].

Na tabela 2.1 podem observar-se os diferentes tipos de microcistinas que irão ser abordados neste estudo, bem como os aminoácidos variáveis que lhe correspondem.

Tabela 2.1: Diferentes tipos de microcistinas e os respectivos aminoácidos variáveis (adaptado de [33]).

Microcistina	Aminoácido variável 1	Aminoácido variável 2
Microcistina-LR	Leucina	Arginina
Microcistina-RR	Arginina	Arginina
Microcistina-YR	Tirosina	Arginina
Microcistina-LA	Leucina	Alanina
Microcistina-LY	Leucina	Tirosina
Microcistina-LF	Leucina	Fenilalanina

A DL₅₀ da MC-LR após injeção intraperitoneal, em murganhos, varia entre 25-150 µg/kg, no entanto, este valor pode variar de acordo com a variante da microcistina, sendo a MC-LR normalmente usada como referência [23].

A Organização Mundial de Saúde (OMS) propôs o valor de referência de 1 µg L⁻¹ em águas de consumo, para a microcistina-LR [34].

4.2 Nodularina

A nodularina é uma espécie de cianobactéria isolada a partir da estirpe *Nodularia spumigena* [31].

É um pentapéptido (m/z 824 Da), com estrutura cíclica, constituída pelo ácido *D-eritro-β*-metil aspártico, pela *L*-arginina, pelo aminoácido Adda, pelo ácido *D*-glutâmico e pela *N*-metildesidrobutilina (Mdhb) (figura 2.4) [35].

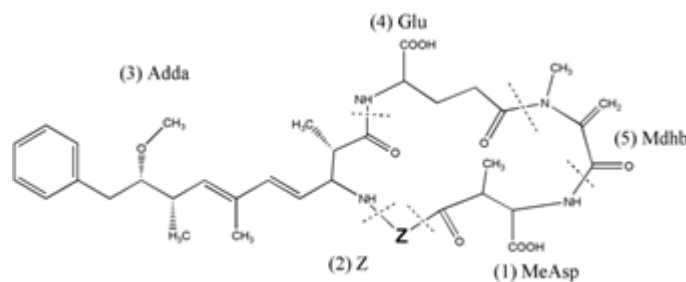


Figura 2.4: Estrutura química da nodularina [36]

As nodularinas são semelhantes às microcistinas hepatotóxicas de péptidos cíclicos, que se julgava serem produzidas unicamente por estirpes de cianobactérias provenientes de água salobra ou salgada, no entanto, recentemente, foi detetada a espécie nodularina em organismos de água doce [36].

Tal como as microcistinas, também as nodularinas são hepatotóxicas, agindo como promotores de tumores através da inibição das proteínas fosfatases, que desempenham um papel fundamental na regulação celular. A aminoácido Adda é, em grande parte, responsável pela sua toxicidade [36].

A nodularina provoca *stress* oxidativo nas células, causando hepatotoxicidade e carcinogenicidade [12].

Esta espécie de cianotoxinas é solúvel em água e a sua estrutura cíclica permite que seja bastante estável, tornando a molécula resistente à ebulição, à hidrólise química e à oxidação a um pH próximo do neutro [12].

Alguns estudos referem que a nodularina se degrada muito lentamente, quando localizadas no interior de células vivas, no entanto esta toxina pode ser degradada através de radiação UV intensa, ozono e cloro [12].

Os *blooms* de *Nodularia spumigena* são frequentes perante altas concentrações de fósforo, baixa razão N:P e salinidade moderada. Em resposta à presença de macronutrientes, incluindo a luz, o azoto e o fósforo, a maioria dos estudos referem que a concentração de nodularina aumenta sob condições que promovam o crescimento ótimo [37].

Até à data foram identificadas nove variantes desta toxina sendo a NOD-R, com a arginina como aminoácido variável, a mais comum [23].

A DL₅₀ da nodularina em murganhos, após injeção intraperitoneal, varia entre 30-70 µg/kg, no entanto, até à atualidade, não foi reportada nenhuma intoxicação humana com nodularina [23].

Não existe nenhum valor limite para esta toxina na água devido à inexistência de dados, no entanto, as autoridades de saúde devem ser avisadas imediatamente se forem detetados *blooms* de nodularina em água potável [38].

4.3 Cilindrospermopsina

A cilindrospermopsina é uma toxina produzida por uma variedade de cianobactérias incluindo a *Cylindrospermopsin raciborskii* (*C. raciborskii*), *Aphanizomenon flos-aquae*, *Aphanizomenon gracile*, *Aphanizomenon ovalisporum*, *Umezakia natans*, *Anabaena bergii*, *Anabaena lapónica*, *Anabaena planctónica*, *Lyngbya wollei*, *Rhaphidiopsis curvata* e *Rhaphidiopsis mediterranea* [39].

Este composto é um alcaloide tricíclico com a fórmula molecular C₁₅H₂₁N₅O₇S e com um peso molecular de 415,43 g/mol, tratando-se de um ião dipolar com cargas positivas e negativas localizadas [39].

A estrutura da cilindrospermopsina está representada na figura 2.5.

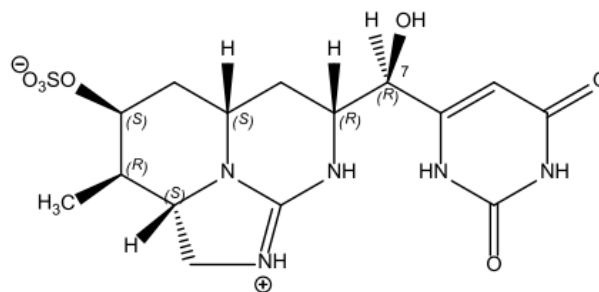


Figura 2.5: Estrutura química da cilindrospermopsina [39].

A cilindrospermopsina é um derivado do uracilo policíclico contendo grupos guanidina e sulfato, sendo também altamente solúvel na água [40].

Este composto é tóxico para o tecido do fígado e para os rins, inibindo a síntese de proteínas e alterando covalentemente o DNA e/ou o RNA [40].

Esta substância é relativamente estável no escuro, a temperaturas entre 4°C a 50°C, até cinco semanas. É também resistente a alterações de pH, sendo estável até 8 semanas a um pH de 4, 7 e 10 [39].

Na ausência de pigmentos celulares, a cilindrospermopsina tende a ser estável quando exposta à luz solar, em águas superficiais. Esta toxina continua a ser bastante tóxica mesmo após ferver a água durante 15 minutos, sendo difícil a sua remoção devido à estabilidade que apresenta [39].

Após ingestão desta toxina, verificam-se efeitos principalmente no fígado, através da inibição irreversível da síntese de proteínas, conduzindo à morte das células [23].

Em murganhos, esta toxina apresenta uma DL₅₀ de 2100 µg/kg, 24 horas após injeção peritoneal [23] e o valor de referência é de 1 µg L⁻¹ em águas de consumo [34].

4.4 Anatoxina-a e Homoanatoxina-a

A anatoxina-a (figura 2.6-a) e a sua homóloga homoanatoxina-a (figura 2.6-b) são aminas secundárias bicíclicas, de baixo peso molecular, produzidas exclusivamente por cianobactérias [31]. A homoanatoxina-a resulta da metilação do carbono que se encontra na extremidade da função cetona [23].



Figura 2.6: Representação estrutural da molécula de anatoxina-a (a) e homoanatoxina-a (b) [31].

A anatoxina-a apresenta um peso molecular de 165,2 g/mol e a homoanatoxina-a apresenta um peso molecular de 179,2 g/mol.

A anatoxina-a é sintetizada por várias estirpes do género *Anabaena*, *Aphanizomenon*, *Cylindrospermum*, *Microcystis*, *Oscillatoria*, *Planktothrix* e *Raphidiopsis* [31].

A Homoanatoxina-a é sintetizada por algumas espécies correspondentes ao género *Oscillatoria*, *Anabaena*, *Raphidiopsis* e *Phormidium* [31].

A anatoxina-a e a homoanatoxina-a são agonistas nicotínicos de recetores da acetilcolina [31], funcionando como agentes pós-sinápticos e bloqueadores neuromusculares [41].

Estas toxinas são alcalóides e podem ser encontradas numa grande variedade de recursos hídricos, devido ao elevado número de cianobactérias responsáveis pela sua produção [34].

Fatores como os níveis de nutrientes, o pH, a intensidade da luz e a temperatura influenciam o crescimento destas cianobactérias e estimulam a produção de toxinas [42].

Uma vez absorvidas no organismo, inibem a acetilcolinesterase e induzem a paralisia muscular [23], perda de coordenação, convulsões e morte rápida por paragem respiratória [43].

Estas cianotoxinas apresentam elevada toxicidade, nomeadamente, um valor de DL₅₀ entre 200-250 µg kg⁻¹, em murganhos [45].

Embora a OMS não tenha determinado um valor guia para as águas de consumo, esta entidade recomenda que esse valor seja de 1 µg L⁻¹, para a anatoxina [12].

Os problemas com *blooms* de cianobactérias são comuns na Nova Zelândia e, por isso, foram estipulados valores provisórios para a anatoxina-a (6 µg L⁻¹) e para a homoanatoxina-a (2 µg L⁻¹) [46].

5. Remoção de cianotoxinas

O aumento da frequência e da intensidade na proliferação de cianobactérias, tendo como consequência o aumento do teor de cianotoxinas na água, tornou-se um problema a nível global [12].

O primeiro passo no controlo de cianotoxinas é a prevenção da eutrofização, reduzindo assim o aparecimento de florações de cianobactérias em águas superficiais utilizadas para consumo humano [12].

A remoção de cianotoxinas pode ser feita de três formas, nomeadamente por remoção física, por inativação química e por inativação biológica [12]. A remoção física inclui a adsorção com carvão ativado e a filtração por membrana, no entanto, as cianotoxinas são substâncias solúveis em água, sendo necessário utilizar procedimentos químicos para reduzir ou remover completamente estas toxinas [12].

Habitualmente utilizam-se produtos químicos como o hipoclorito de sódio, o permanganato de potássio e o sulfato de cobre que inibem a síntese da parede celular, inibem as reações enzimáticas e a fotossíntese [12].

Não é recomendado o tratamento de cianotoxinas com herbicidas, algicidas ou sulfato de cobre pois, como consequência, serão libertadas grandes quantidades de produtos químicos para o meio ambiente que poderão produzir substâncias cancerígenas e mutagénicas [12].

A remoção de cianotoxinas pode ser feita por tratamentos de oxidação convencionais ou tecnologias avançadas. Os tratamentos convencionais incluem métodos como a coagulação, filtração, cloração e adsorção em carvão ativado. As tecnologias avançadas incluem a ozonização, a fotólise UV, a oxidação química com reagente de *Fenton* ou a sonólise [12].

Na estrutura das microcistinas, apenas as cadeias laterais de aminoácidos de arginina e tirosina são potencialmente vulneráveis à oxidação, por outro lado, na cilindrospermopsina apenas o uracilo pode ser quimicamente suscetível à oxidação. Já a anatoxina-a tem dois grupos funcionais que podem ser oxidados, nomeadamente a amina e a cetona β -insaturada [12].

O valor de pKa da amina presente na anatoxina é 9,4, o que significa que a anatoxina-a é solúvel na maioria das águas naturais e a sua oxidação é dependente do pH [12].

Os métodos convencionais para o tratamento de água apenas eliminam baixas percentagens de toxinas, no entanto, se se incluir neste procedimento um tratamento com carvão ativado, as toxinas presentes na água são removidas na totalidade [12].

A remoção eficaz de cianobactérias dissolvidas em água depende da concentração dos produtos químicos adicionados no processo de tratamento relativamente à concentração de cianobactérias presentes. Depende também da espécie de cianobactéria, do pH da água e do tempo de contacto da toxina com a água [12].

Capítulo III – EPAL - Empresa Portuguesa das Águas Livres

A EPAL é a sucessora da centenária CAL – Companhia das Águas de Lisboa, concessionária do abastecimento de água na cidade de Lisboa, entre 2 de Abril de 1868 e 30 de Outubro de 1974. Posteriormente é constituída a EPAL - Empresa Pública das Águas de Lisboa, designação que mantém até 1981, quando passa a denominar-se por EPAL – Empresa Pública das Águas Livres [47].

Atualmente a EPAL – Empresa Portuguesa das Águas Livres, S.A., é uma empresa do setor empresarial do estado, detida a 100% pela AdP – Águas de Portugal, SGPS, S.A.

Até 1935, a área de intervenção da EPAL limitava-se ao abastecimento e distribuição de água no concelho de Lisboa. A partir deste ano, a EPAL passa a abastecer em alta os municípios de Oeiras (1935), Cascais (1941), Azambuja (1945), Vila Franca de Xira (1946), Sintra, Loures e Odivelas (1948), Alenquer (1950), Alcanena (1955), Santarém (1958), Arruda dos Vinhos e Sobral de Monte Agraço (1964), Cartaxo (1978), Amadora (1979), Mafra (1981), Torres Vedras (1988), Entroncamento e Torres Novas, (1993), Ourém (1994), Vila Nova da Barquinha e Tomar (1995), Constância (1996), Porto de Mós e Leiria (1998), Batalha (2003) e o Sistema Multimunicipal Águas do Oeste (2003) que serve os municípios de Alcobaça, Bombarral, Cadaval, Caldas da Rainha, Lourinhã, Óbidos, Peniche, Rio Maior e Nazaré. Os municípios de Sobral de Monte Agraço, Arruda dos Vinhos, Azambuja, Alenquer e Torres Vedras passaram a ser abastecidos pela Águas do Oeste. Os municípios de Entroncamento e Vila Nova da Barquinha passaram a ser servidos pelo Sistema Multimunicipal Águas do Centro (2010) e o município de Torres Novas passou a ser abastecido pelas Águas do Ribatejo (2011) [48].

Na figura 3.1 está representado o sistema de abastecimento da EPAL, para águas de consumo humano.

Desde Julho de 2015, que a EPAL é responsável pela gestão delegada do sistema multimunicipal de abastecimento de água e de saneamento de Lisboa e Vale do Tejo (ALVT), pelo decreto-lei nº 94/2015 de 29 de maio, que integra 86 municípios [48].

Atualmente a área servida pela EPAL e ALVT abrange 96 municípios que ocupam uma área territorial correspondente a 33% do território continental português e serve 3,8 milhões de habitantes (figura 3.1). Esta solução, para além da coesão territorial, tem em vista gerar as eficiências necessárias à sustentabilidade económica, social e ambiental destes sistemas [48].

O objetivo social da EPAL consiste no abastecimento público de água para consumo humano e outras atividades e serviços interligados com o ciclo urbano da água, onde reúne competências de qualidade reconhecida [49].

O mercado da EPAL na prestação dos serviços de abastecimento de água compreende uma área de 7095 km², com 349.151 clientes diretos, 17 clientes municipais e 3 clientes multimunicipais, que representam, no seu todo, 35 municípios, envolvendo aproximadamente 2,9 milhões de consumidores [49].

O sistema de abastecimento da EPAL inclui o sistema de produção e transporte e o sistema de distribuição. O primeiro é responsável pela captação, tratamento e transporte da água necessária aos clientes da empresa e compreende duas captações superficiais, 20 subterrâneas, cerca de 710 Km de adutores e 2 estações de tratamento [50].

O abastecimento de água no que se refere às operações de produção, transporte e distribuição de água é gerido por um sistema de telegestão com um elevado grau de automatização que centraliza a operação e o controlo de mais de 170 instalações, desde estações elevatórias e estações de tratamento, a reservatórios e adutores.

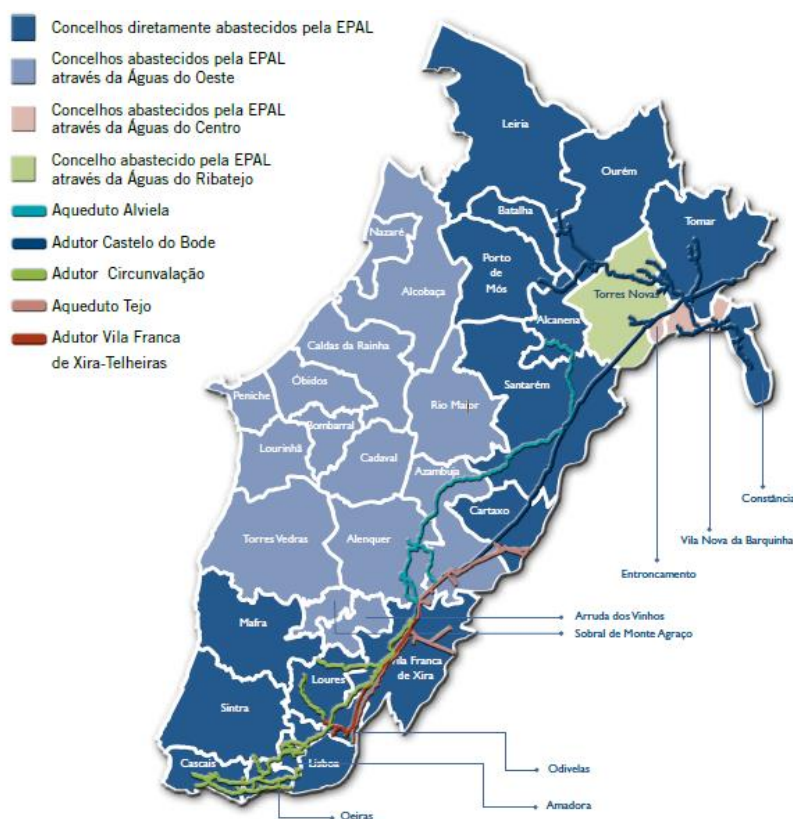


Figura 3.1: Sistema de abastecimento da EPAL para águas de consumo humano [49].

A produção de água para consumo humano da EPAL compreende dois tipos de origens distintas:

- Superficial (92% da água captada)
 - Captação da Albufeira de Castelo do Bode
 - Captação de Valada do Ribatejo
- Subterrânea (8% da água captada)
 - Furos das Lezírias;
 - Poços da OTA e Alenquer.

A água captada é submetida a um programa de tratamento desde a fase de captação até à fase de distribuição [50].

Após captação na albufeira de Castelo do Bode, a água é transportada para a ETA da Asseiceira, através de um adutor com cerca de 9 km de comprimento.

Na ETA estão instaladas duas linhas distintas de tratamento. A linha 1 tem capacidade nominal de produção de 500 000 m³/dia e a linha 2 tem capacidade nominal de produção de 125 000 m³/dia.

A ETA de Vale da Pedra recebe a água proveniente da captação superficial do Rio Tejo.

Nas captações subterrâneas o tratamento aplicado consiste na desinfecção por cloro. Nos poços de Alenquer, existe ainda uma estação de descarbonatação que trata parte da água captada, com vista à diminuição da dureza e alcalinidade da água [19].

A rede de distribuição é abastecida pelo Aqueduto Tejo, Adutor Vila Franca-de-Xira/Telheiras, Adutor de Circunvalação e Aqueduto Alviela.

A Direção de Controlo da Qualidade da Água (LAB) é o órgão da EPAL que tem a responsabilidade de proceder à conceção, implementação e gestão do Plano de Controlo da Qualidade da Água no Sistema de Abastecimento da EPAL (PCQA) [51].

A Unidade de Apoio Técnico de LAB assegura a prestação de serviços de amostragem e de monitorização da qualidade das águas em águas para consumo humano, águas de piscinas, águas de processo e águas naturais [51].

A evolução tecnológica registada no laboratório de controlo da qualidade da água da EPAL esteve sempre associada à evolução do conhecimento dos riscos para a saúde do consumidor devidos à contaminação microbiológica e química da água, investindo-se continuamente em novas tecnologias quer seja para disponibilização mais rápida de resultados quer seja em função de exigências de limites de quantificação e precisão mais exigentes e ambiciosos [50].

Atualmente, o controlo da qualidade da água no sistema de abastecimento da EPAL é feito com base na análise de mais de cerca de 190 parâmetros, 334 substâncias microbiológicas e físico-químicas, efetuando-se cerca de 221.000 determinações por ano [50].

1. Enquadramento do trabalho na empresa

Os parâmetros de análise relacionados com a qualidade da água são cada vez mais rigorosos, tornando-se necessária a existência de métodos que permitam a identificação e quantificação de vários compostos em simultâneo, através de uma análise rápida e eficiente.

A execução deste trabalho, realizado no Laboratório Central da EPAL, nomeadamente na equipa de Química Orgânica (figura 3.2), permitiu o desenvolvimento de um método capaz de analisar 10 cianotoxinas através de uma técnica rápida e com elevada sensibilidade.

Apesar de no laboratório de Química Orgânica da EPAL, estar implementado um método que permite a análise da cilindropermopsina, da microcistina -RR, -YR e -LR, existia a necessidade de ter um método de análise mais rápido, sensível e que permitisse a pesquisa de maior número de substâncias.



Figura 3.2: Organograma representativo da estrutura organizacional da Direção de Laboratórios e Controlo da Qualidade da Água (LAB) [51].

Capítulo IV – Legislação relativa à qualidade da água

É cada vez mais evidente a importância da água para a vida e enquanto componente do ecossistema global. Trata-se de um recurso que, não só satisfaz as necessidades básicas da população humana como é fundamental para o desenvolvimento, em particular para a criação e manutenção de riqueza através da agricultura, da pesca comercial, da produção de eletricidade, da indústria, dos transportes e do turismo [52].

Este recurso também é vital para todos os ecossistemas globais, sendo importante criar instrumentos legislativos eficazes que abordem os problemas de forma clara e ajudem a preservar os recursos para as gerações futuras [52].

1. Legislação Europeia relacionada com a qualidade da água

A legislação europeia relativa à qualidade da água iniciou-se em 1975, com a criação de normas, pela necessidade de existirem valores padrão na análise da água destinada ao consumo humano. O ano de 1980 culminou com a inclusão de metas de qualidade para a água potável, onde se inclui legislação da qualidade da água para os peixes, águas conquícolas, águas balneares e águas subterrâneas [53].

Em 1988 realizou-se, em Frankfurt, o seminário ministerial, que reviu a legislação existente e identificou algumas melhorias que poderiam ser feitas, o que resultou na segunda fase da legislação sobre a água (1991) em que as consequências foram a adoção de uma diretiva relativa ao tratamento de águas residuais urbanas, uma diretiva relativa aos nitratos, uma nova diretiva para água potável e uma diretiva relativa à poluição e controlo integrado da prevenção [53].

Depois da implementação da legislação referida anteriormente, os cidadãos de outros países, bem como as autoridades e organizações, começaram a ser mais conscientes da importância da qualidade da água e, em 1996, 250 delegados de diferentes países reuniram-se numa conferência sobre a água para criar uma gestão coerente para toda a legislação relacionada com a água [53].

Após a conferência, a comissão apresentou uma proposta de uma diretiva-estrutura da água, que tinha como objetivos:

- A proteção de todos os tipos de água, incluindo águas superficiais e subterrâneas
- Obtenção de boa qualidade das águas num prazo estabelecido
- Gestão da água com base em bacias hidrográficas
- Tratamento da água com base em normas de qualidade
- Preços adequados [53].

2. Legislação comunitária relativa à qualidade da água

A poluição química das águas superficiais pode causar toxicidade aguda e crónica nos organismos aquáticos, acumulação no ecossistema e perda de habitats e de biodiversidade, para além de constituir uma ameaça para a saúde humana [54].

A 3 de Novembro de 1998, a União Europeia aprovou a diretiva 98/83/EC relativa à qualidade da água destinada ao consumo humano, que tem como objetivo proteger a saúde humana dos efeitos nocivos resultantes de qualquer contaminação [55]. Esta diretiva vem substituir a diretiva 80/778/EEC, de 1980 [56].

A diretiva 98/83/CE aplica-se a todos os sistemas de distribuição de água, a água engarrafada ou em recipientes e, aplica-se também, a água utilizada na indústria de processamento de alimentos apenas não se aplicando a águas minerais naturais (Diretiva 80/777/EEC).

A diretiva 98/83/CE estabelece as normas de qualidade essenciais a nível da União Europeia, em que devem ser monitorizados, regularmente, um total de 48 parâmetros microbiológicos, químicos e indicadores.

Esta diretiva esclarece que os estados-membro devem garantir que a água potável não contém qualquer concentração de microrganismos parasitas e que cumpre os requisitos mínimos previstos [57].

Relativamente à legislação comunitária aplicável ao meio aquático, a diretiva n.º 2000/60/CE [58], de 23 de Outubro de 2000, designada Diretiva Quadro da Água, transposta pela Lei n.º 58/2005, de 29 de dezembro, alterada pelos Decretos-Lei n.º 245/2009 de 22 de setembro, 60/2012 de 14 de março e 130/2012 de 22 de junho e pelo Decreto -Lei n.º 77/2006 de 30 de março, alterado pelo Decreto -Lei n.º 103/2010 de 24 de setembro, estabelece um quadro de ação no domínio da política da água e define uma estratégia de combate à poluição da água que envolve a identificação de substâncias prioritárias que constituem um risco significativo para o meio aquático, ou por intermédio deste [54].

A Diretiva Quadro da Água é o principal instrumento da política da União Europeia relativa à água, estabelecendo um quadro de ação comunitária para a proteção das águas de superfície interiores, das águas de transição, das águas costeiras e das águas subterrâneas.

A primeira lista de substâncias prioritárias no domínio da política da água foi definida pela Decisão n.º 2455/2001/CE[59], do Parlamento Europeu e do Conselho, de 20 de novembro de 2001, e adotada pelo Decreto-Lei n.º 77/2006, de 30 de março, alterado pelo Decreto -Lei n.º 103/2010, de 24 de setembro.

Através da diretiva n.º 2008/105/CE, do Parlamento Europeu e do Conselho, de 16 de dezembro de 2008, relativa a normas de qualidade ambiental (NQA) no domínio da política da água, foram posteriormente definidas NQA, nos termos da Diretiva n.º 2000/60/CE, do Parlamento Europeu e do Conselho, de 23 de outubro de 2000, para as 33 substâncias prioritárias identificadas na Decisão n.º 2455/2001/CE, do Parlamento Europeu e do Conselho, de 20 de novembro de 2001, e para oito outros poluentes.

Face à evolução do conhecimento técnico e científico, a Diretiva n.º 2013/39/UE, do Parlamento Europeu e do Conselho, de 12 de agosto de 2013, altera as Diretivas n.º 2000/60/CE, do Parlamento Europeu e do Conselho, de 23 de outubro de 2000, e n.º 2008/105/CE, do Parlamento Europeu e do Conselho, de 16 de dezembro de 2008, e revê a lista de substâncias prioritárias, identifica novas substâncias para ação prioritária estabelecendo as correspondentes NQA, procede à atualização das NQA de determinadas substâncias existentes e ainda à definição de NQA no biota para substâncias prioritárias existentes e novas.

As especificações técnicas para a análise e monitorização químicas do estado da água e os critérios de desempenho mínimo para os métodos analíticos utilizados na monitorização do estado da água, estabelecidos na Diretiva n.º 2009/90/CE, da Comissão, de 31 de julho de 2009, transposta pelo Decreto-Lei n.º 83/2011, de 20 de junho, garantem a obtenção de dados significativos e relevantes através de métodos analíticos suficientemente sensíveis para garantir a deteção e medição fiáveis dos valores que excedem as NQA.

O Decreto-Lei n.º 218/2015 procede à transposição da Diretiva n.º 2013/39/UE, do Parlamento Europeu e do Conselho, de 12 de agosto de 2013, que altera as Diretivas n.º 2000/60/CE, do Parlamento Europeu e do Conselho, de 23 de outubro de 2000 e n.º 2008/105/CE, do Parlamento Europeu e do Conselho, de 16 de dezembro de 2008, no que respeita às substâncias prioritárias no domínio da política da água, procedendo à alteração do Decreto-Lei n.º 103/2010, de 24 de setembro, alterado pelo Decreto -Lei n.º 83/2011, de 20 de junho, que estabelece as normas de qualidade ambiental no domínio da

política da água e procedeu à transposição das Diretivas n.º 2008/105/CE, do Parlamento Europeu e do Conselho, de 16 de dezembro de 2008 e n.º 2009/90/CE, da Comissão, de 31 de julho de 2009.

Face aos desenvolvimentos ocorridos desde a publicação do Decreto-Lei n.º 103/2010, de 24 de setembro, alterado pelo Decreto-Lei n.º 83/2011, de 20 de junho, são ainda atualizadas as normas referentes aos inventários de emissões, descargas e perdas, bem como às zonas de misturas [54].

3. Legislação nacional relativa à qualidade da água

Os requisitos da legislação comunitária são cada vez mais exigentes relativamente à qualidade da água, existindo atualmente a transposição da legislação comunitária para a legislação nacional, o que resulta na normalização das regulamentações existentes entre todos os Estados Membro.

No âmbito da legislação nacional respeitante à qualidade da água para consumo humano há a referir três Decretos-Lei:

- ✓ O Decreto-Lei n.º 236/98 de 1 de agosto que estabelece as normas, critérios e objetivos da qualidade tendo em vista a proteção do meio aquático através da melhoria da qualidade das águas em função dos seus principais usos. É aplicável a águas doces superficiais e subterrâneas destinadas à produção de água para consumo humano;
- ✓ O Decreto-Lei 103/2010 de 24 de setembro que revoga o Decreto-lei n.º 236/98 no que diz respeito a alguns parâmetros das águas superficiais, nomeadamente, cádmio, chumbo, hidrocarbonetos dissolvidos ou emulsionados, hidrocarbonetos aromáticos polinucleares, mercúrio, níquel, pesticidas, bifenilospoliclorados, substâncias extraíveis com clorofórmio, hexaclorociclohexano e clorofenóis;
- ✓ O Decreto-Lei n.º 306/2007 de 27 de agosto que regula a qualidade da água para consumo humano, segundo o qual, o controlo da qualidade da água deve ser feito em laboratórios acreditados.

Devido à falta de dados relativamente a outras toxinas, apenas a microcistina-LR consta na legislação, apresentando um valor guia provisório de 1 µg/L [60]. Esse valor foi estabelecido pela Organização Mundial de Saúde (OMS) e importado para a legislação portuguesa através do Decreto-Lei n.º 306/2007, de 27 de Agosto de 2007, que estabelece o regime da qualidade da água destinada ao consumo humano, revendo o Decreto-Lei n.º 243/2001, de 5 de Setembro, que transpôs para a ordem jurídica interna a Diretiva n.º 98/83/CE, de 3 de Novembro [61].

Este parâmetro deve ser determinado à saída da estação de tratamento de água, quando há suspeitas de eutrofização da massa de água superficial. Caso seja confirmado um número de cianobactérias potencialmente produtoras de microcistinas superior a 2000 células/ml deve ser aumentada a frequência da amostragem, no âmbito do programa de controlo operacional [61].

4. A atividade do Laboratório Central da EPAL

A Empresa Portuguesa das Águas Livres segue toda a legislação relacionada com a qualidade da água. O Laboratório Central da EPAL está acreditado desde 1999, segundo a norma NP EN ISO/IEC 17025- “Requisitos gerais de competência para laboratórios de ensaio e calibração”, para as seguintes atividades:

- Colheita, preservação e transporte de amostras de água (para águas de consumo humano e águas naturais destinadas à produção de águas para consumo humano);
- Análise de 190 parâmetros da qualidade da água (correspondendo a 198 compostos. Alguns parâmetros/compostos estão acreditados para mais de um método de ensaio);
- 135 métodos analíticos para ensaios em águas;
- Testes a materiais orgânicos em contacto com água para consumo humano, correspondendo a 6 métodos/normas (sendo um dos 2 laboratórios a nível nacional com esta acreditação) [62].

A Direção de Controlo da Qualidade da Água da EPAL possui o Certificado de Acreditação nº L0242, ao qual estão associados dois Anexos Técnicos, o L0242-1 relativo ao Laboratório Central, localizado em Lisboa e o L0242-2 relativo ao Laboratório de Vale da Pedra [62].

Capítulo V – Metodologia analítica

1. Técnica de preparação da amostra - Extração em Fase Sólida

A monitorização de compostos presentes em amostras a níveis vestigiais, requer, geralmente, uma etapa de isolamento e/ou enriquecimento de analitos, pois normalmente as técnicas analíticas não são suficientemente sensíveis na determinação direta de compostos em matrizes complexas [63].

A extração em fase sólida (SPE) é uma técnica de separação líquido-sólido bastante utilizada para extrair analitos semi-voláteis e não voláteis de amostras líquidas mas também pode ser utilizada para amostras sólidas pré-extraídas com solventes [64].

O SPE para amostras líquidas tornou-se uma técnica bastante utilizada em laboratório, em 1970, na sequência da introdução de cartuchos descartáveis contendo partículas porosas, permitindo assim o processamento da amostra por sucção [65].

Durante a década de 90, um dos fenómenos mais importantes foi a introdução de discos de extração de membrana, desafiando assim a supremacia dos cartuchos no processamento de amostras *off-line* [65]. Estas membranas consistem numa matriz homogénea fibrosa de Politetrafluoretileno (PTFE) contendo cerca de 80% (m/m) ou mais de partículas adsorventes em discos circulares de 0,5 mm de espessura, com diâmetros entre 4-96 mm [65].

Têm surgido também outras variações na extração em fase sólida, com o objetivo de melhorar o desempenho, facilitando a automação e diminuindo o tempo de análise, permitindo assim uma redução nos custos de análise. Uma dessas variações consiste em combinar o cartucho de SPE com o disco, possibilitando o uso de sistemas de automação utilizados para os cartuchos convencionais [64]

A figura 5.1 representa a evolução das várias metodologias de SPE, registada ao longo dos anos.

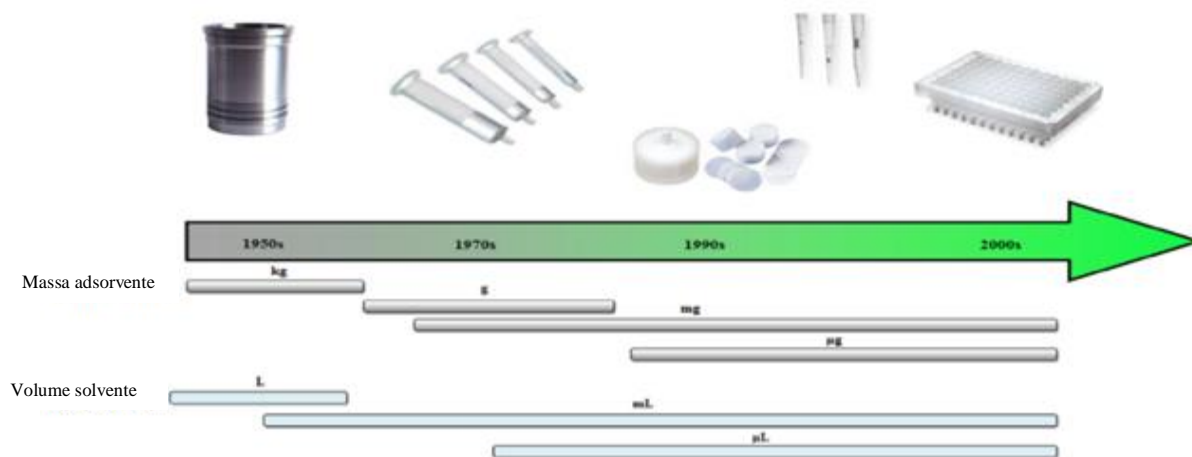


Figura 5.1: Evolução das metodologias de extração em SPE que contribuem para a “Química Verde” (adaptado de [63]).

A extração em fase sólida foi inicialmente concebida com o objetivo de ser um complemento à extração líquido-líquido (LLE) [66]. Atualmente, é reconhecida como uma alternativa à LLE [63].

Os principais objetivos do SPE são a concentração das amostras (Figura 5.2), através da extração/purificação das mesmas, a simplificação da matriz (*clean-up*) (Figura 5.3), através da remoção de interferentes e o isolamento seletivo de analitos (Figura 5.4) [66].

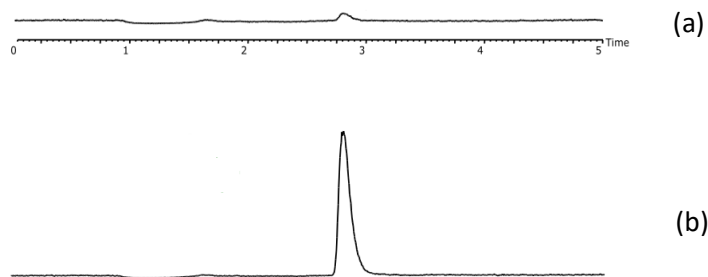


Figura 5.2: Cromatograma representativo da presença de um analito na amostra original (a) e na amostra após a realização de SPE (b) (adaptado de [67]).

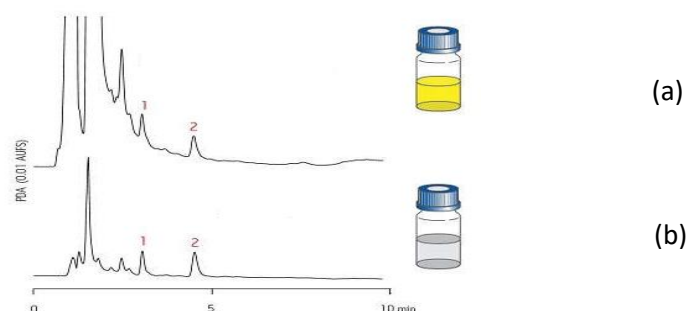


Figura 5.3: Exemplo de um cromatograma resultante da análise de uma amostra em que não foi realizado SPE (a) e onde foi realizado SPE (b) (adaptado de [67]).

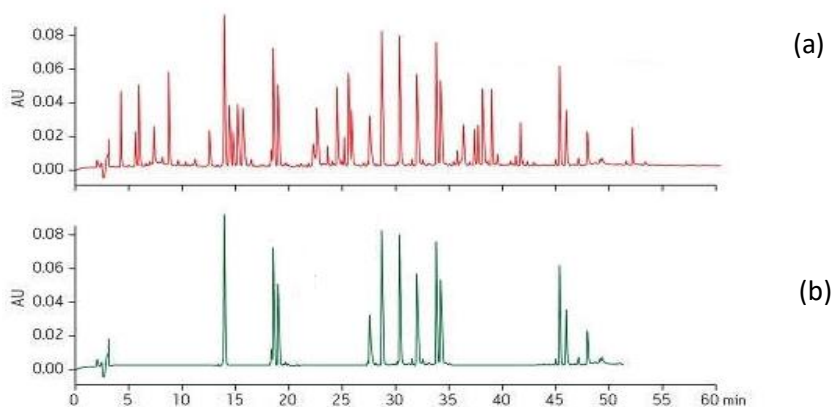


Figura 5.4: Exemplo de um cromatograma onde se verifica o isolamento seletivo de analitos, resultante da análise de uma amostra em que não foi realizado SPE (a) e onde foi realizado SPE (b) (adaptado de [67]).

Se os interferentes não forem eliminados poderemos ter resultados falsos positivos pois estes interferentes podem co-eluir com os compostos de interesse. A remoção dos interferentes garante ainda a longevidade das colunas analíticas ou dos capilares, evitando assim limpezas constantes no sistema de injeção do UPLC ou HPLC [64].

A otimização de um método de preparação de amostra depende da natureza da amostra, da matriz, das características do analito e da técnica analítica a ser utilizada na sua determinação [64].

O SPE proporciona um baixo consumo de solventes, baixos custos intrínsecos, redução no tempo de processamento e um processo automatizado. Além disso, o SPE não exige a separação de fases, eliminando assim alguns erros verificados na LLE [63].

A extração em fase sólida apresenta como desvantagens o tempo elevado de análise, os elevados custos dos cartuchos e dos *manifolds* e a dificuldade em selecionar o cartucho adequado para a aplicação desejada [64].

O SPE pode ser realizado nos modos *off-line* e *on-line* [64].

Em modo *off-line*, o processamento das amostras e a separação cromatográfica são conduzidas separadamente. Após a etapa de pré-tratamento, a amostra é introduzida de modo convencional no sistema cromatográfico. O modo *off-line* é o mais utilizado em SPE [64].

No sistema *on-line*, o mesmo equipamento incorpora os dispositivos de extração, *clean-up*, eluição da amostra e cromatógrafo, resultando numa operação sequencial e automatizada. Os sistemas *on-line* são extremamente vantajosos na rotina analítica [64].

1.1 Procedimento de Extração em Fase Sólida

Geralmente, os procedimentos de extração em fase sólida consistem em quatro importantes etapas, nomeadamente o condicionamento do cartucho, a aplicação da amostra, a lavagem da coluna e a eluição do analito [64] (Figura 5.5).

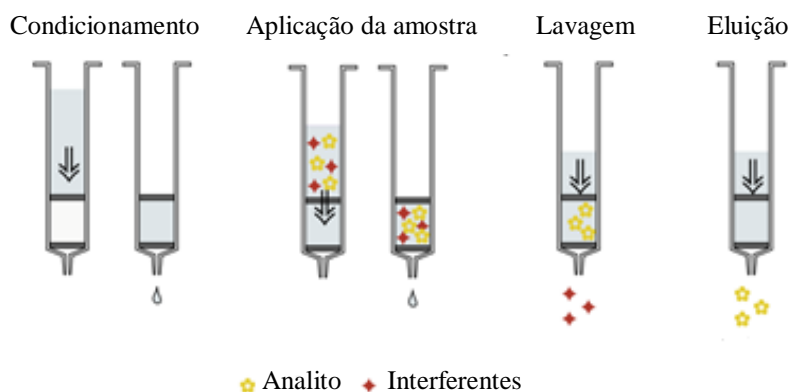


Figura 5.5: Procedimento realizado na extração em fase sólida (adaptado de [68]).

Inicialmente, o cartucho é condicionado com um solvente para melhorar a reprodutibilidade de retenção do analito e para reduzir o transporte de impurezas na fase de eluição [65].

O solvente a ser utilizado no condicionamento depende da fase sólida que se quer ativar e da amostra a ser tratada, devendo optar-se por um solvente com características idênticas ao solvente no qual a amostra está dissolvida [64].

Seguidamente ocorre a passagem de um determinado volume de amostra, com uma taxa de fluxo controlada [65]. Para se obter o volume máximo de extração é necessário determinar o volume de *breakthrough* [64].

Quando a amostra é introduzida na coluna os analitos são retidos pelo cartucho, até que o volume da amostra seja superior à capacidade de retenção deste. Posteriormente, a amostra passará a não ser retida pela fase sólida e, eventualmente, a concentração de analitos a entrar e a sair da coluna é idêntica.

O ponto em que uma certa quantidade de amostra é detetada à saída do dispositivo de SPE designa-se por volume de *breakthrough* [65].

Depois de a amostra ter sido processada, é adicionado um solvente fraco para remover os interferentes, sem eluir os analitos e, finalmente, os analitos de interesse são eluídos a partir de um pequeno volume de solvente forte para posterior determinação [65]. O eluente deve eluir os analitos de interesse mas não permitir a eluição dos interferentes que não tenham sido removidos na etapa anterior [64].

Para melhorar a eluição dos analitos, em certos casos, poderá realizar-se o passo de secagem do cartucho, contribuindo assim para a obtenção de melhores resultados.

Em alguns casos os analitos não apresentam nenhuma interação com a fase sólida e, contrariamente, os interferentes apresentam uma interação muito forte com a fase sólida e ficam lá retidos. Esta pode ser utilizada apenas como um “filtro” para a amostra [68]. Nessas situações, não se realiza a etapa de lavagem e apenas são eluídos os analitos (Figura 5.6).

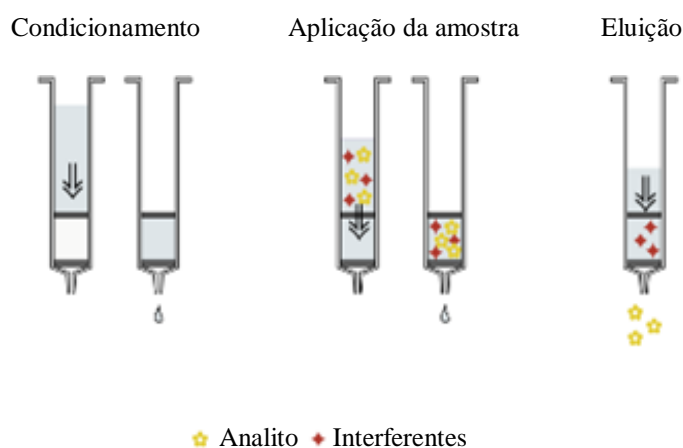


Figura 5.6: Procedimento realizado na extração em fase sólida, para analitos com baixa interação com o cartucho (adaptado de [68]).

1.2 Mecanismos de retenção em SPE e respetivas fases sólidas

Existem diferentes mecanismos de retenção e métodos de separação na extração em fase sólida.

A cromatografia de fase normal é geralmente utilizada para separar compostos orgânicos neutros, cuja natureza química varia de hidrofóbica a moderadamente polar. Para realizar este tipo de cromatografia é recomendado usar-se um gradiente de solventes não-polares e uma fase estacionária polar. A retenção de um analito nestas condições ocorre, essencialmente, devido à interação entre os grupos polares funcionais da substância a analisar e os grupos polares da superfície do cartucho, através de ligações de hidrogénio, interações π - π , interações dipolo-dipolo, entre outras [69].

A cromatografia de fase reversa envolve uma matriz polar ou moderadamente polar e uma fase estacionária não polar. O analito de interesse apresenta, normalmente, uma polaridade média ou apolar.

A retenção de analitos orgânicos polares, nestas condições, ocorre devido às ligações carbono-hidrogénio do analito. Para eluir o composto adsorvido deve utilizar-se um solvente não-polar, de forma a quebrar as ligações entre o analito e a fase sólida [69].

A cromatografia de troca iónica é utilizada para compostos carregados positiva ou negativamente. O mecanismo de retenção baseia-se na interação electrostática do grupo funcional do analito carregado ao grupo carregado do adsorvente (sílica). Para eluir o composto de interesse é utilizada uma solução

com um pH que neutralize um dos grupos funcionais, ou seja, quando um desses grupos funcionais é neutralizado, a força electrostática é interrompida e o composto é eluído [69].

O enchimento da coluna deve ser suficientemente reativo, de modo a facilitar a modificação da sua superfície através da reação química e, também, suficientemente estável para possibilitar a utilização de uma ampla variedade de tipos de amostras e solventes [70]. Na seleção da fase sólida, o primeiro critério a ser considerado refere-se à estrutura química do analito, às propriedades do adsorvente e à composição da matriz da amostra [64].

2. A cromatografia como técnica analítica

A análise de cianotoxinas é feita, maioritariamente, por cromatografia líquida, nomeadamente Cromatografia Líquida de Elevada Eficiência (HPLC) e Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência (UPLC). Neste trabalho foi realizada a técnica de HPLC-DAD e a técnica de UPLC-MS/MS. Seguidamente irão ser abordadas ambas as técnicas cromatográficas.

A cromatografia é uma técnica utilizada para a separação de componentes presentes em amostras complexas e considerada um dos procedimentos mais importantes no isolamento e purificação de substâncias químicas, bem como na análise quantitativa destas [71].

Esta técnica atua no mesmo princípio da extração em fase sólida.

As separações cromatográficas envolvem uma fase móvel, que pode ser líquida ou gasosa, e uma fase estacionária que é geralmente um líquido viscoso quimicamente ligado ao interior da coluna cromatográfica [72].

Os métodos cromatográficos podem ser classificados de acordo com a natureza destas fases. Se a fase móvel for um líquido designa-se por cromatografia líquida (LC), se for um gás designa-se por cromatografia gasosa (GC) e se for um fluido supercrítico designa-se por cromatografia de fluido supercrítico (SFC).

Na compreensão dos métodos cromatográficos existem alguns conceitos básicos fundamentais.

A resolução (R) define-se como o grau ou a magnitude da separação, em que a expressão matemática dada relaciona a diferença entre os volumes de eluição de dois componentes da amostra (V_1 e V_2) com a média da largura do sinal cromatográfico de ambos (W_1 e W_2). A resolução é dada por [73]:

$$R = \frac{V_2 - V_1}{\frac{1}{2}(W_1 + W_2)} \quad (\text{Equação 5.1})$$

O tempo de retenção (t_r) para cada composto é o tempo que decorre entre a injeção da mistura na coluna e a chegada do composto ao detetor. O volume de retenção (V_r) é o volume requerido pela fase móvel para eluir a partícula do soluto da coluna.

O tempo morto (t_m) é o tempo que uma molécula passa exclusivamente na fase móvel, sem que fique retida na coluna [72].

Sendo assim, o tempo de retenção ajustado (t'_r) corresponde ao tempo em que as moléculas são retidas pela fase estacionária e é dado por:

$$t'_r = t_r - t_m \quad (\text{Equação 5.2})$$

A razão de partição ou o fator de capacidade (k) representa a afinidade de um componente para a fase estacionária do sistema cromatográfico, ou seja, é proporcional ao tempo que o soluto permanece na fase estacionária relativamente ao tempo que leva a percorrer a fase móvel [72]. É dado por:

$$k = \frac{t_r - t_m}{t_m} \quad (\text{Equação 5.3})$$

O fator de capacidade pode ser expresso da seguinte forma:

$$k = \frac{t_r}{t_m} \quad (\text{Equação 5.4})$$

Outro fator a considerar é a seletividade do sistema cromatográfico, que nos permite saber quando é que um sinal elui relativamente a outro, estando diretamente relacionado com a capacidade que o sistema tem em promover a separação [73]. Assim, a seletividade (α) é dada por:

$$\alpha = \frac{k_2}{k_1} \quad (\text{Equação 5.5})$$

O número de pratos teóricos (N) de um determinado sistema varia consoante o comprimento da coluna cromatográfica, devendo existir uma relação de proporcionalidade. A expressão que define esta relação é a seguinte:

$$H = \frac{L}{N} \quad (\text{Equação 5.6})$$

Onde N se refere ao nº de pratos teóricos, L é o comprimento da coluna cromatográfica e H refere-se à altura equivalente de um prato teórico [73].

2.1 Cromatografia Líquida de Elevada Eficiência (HPLC)

A cromatografia líquida consiste num método analítico que tem como objetivo a separação de diferentes espécies químicas presentes numa amostra. A separação processa-se através de um mecanismo de interação seletiva entre as moléculas do soluto (amostra) e a fase móvel e estacionária.

A fase estacionária refere-se à coluna cromatográfica e a fase móvel flui continuamente através do sistema, arrastando a amostra injetada, até ao detetor.

As substâncias presentes na amostra apresentam diferentes graus de afinidade com a fase móvel e estacionária e, conseqüentemente, as suas velocidades de migração serão também diferentes, permitindo assim a separação cromatográfica. Conclui-se então que a substância com maior afinidade com a coluna é aquela que elui por último e a que elui primeiro será a de menor afinidade com esta [73].

Na figura 5.7 está representado um esquema simplificado dos vários componentes que constituem um sistema de HPLC.

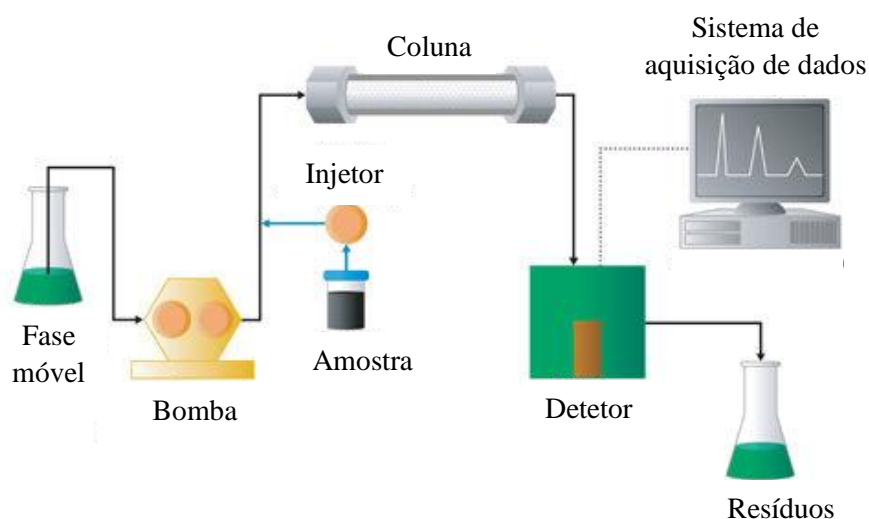


Figura 5.7: Estrutura simplificada de um HPLC (adaptado de [74]).

2.1.1 Instrumentação

O sistema de bombagem é o “coração” do cromatógrafo de líquidos. As características que o definem como um bom sistema de bombagem são as seguintes:

- ✓ O fluxo deve ser estável de forma a minimizar o ruído no detetor;
- ✓ A gama de fluxos deve ser ajustável aos vários modos de operação de HPLC, mas sem ser muito ampla para permitir uma boa reprodutibilidade;
- ✓ O volume da cabeça da bomba deve ser constante, de forma a facilitar análises quantitativas e qualitativas;
- ✓ A bomba deve suportar elevadas pressões.

Os sistemas de injeção podem ser de três tipos, nomeadamente, injeção direta por seringa, válvula de injeção e válvula de injeção automática (injetor automático) [73].

Relativamente aos detetores, atualmente existe uma vasta gama destes, em que a escolha por qualquer um deles dependerá essencialmente das características químicas ou estruturais das espécies a detetar.

Os detetores podem ser do tipo UV-VIS, de fluorescência, de condutividade, de rede de díodos (DAD), de massas (MS), entre outros [73].

O detetor acoplado ao HPLC, utilizado neste trabalho, foi do tipo DAD (*Diode-Array Detector*), que irá ser abordado de seguida.

Para terminar, é necessário que exista um sistema de tratamento de dados, para a obtenção do registo gráfico do cromatograma obtido [73].

Diode-Array Detector (DAD)

Um detetor DAD possui múltiplos agrupamentos de fotodíodos que permitem obter informação sobre uma ampla gama de comprimentos de onda, de uma só vez [75].

Neste tipo de detetor, a radiação policromática passa através da amostra e é dispersa numa superfície de difração, consoante os comprimentos de onda dos vários componentes da amostra, sendo depois direcionada para a rede de díodos (figura 5.8).

Os detetores do tipo DAD tem a capacidade de registar o espectro completo do composto numa pequena fração de segundos, em que cada díodo recebe um comprimento de onda diferente e todos estes irão ser medidos simultaneamente, permitindo a aquisição mais rápida do espectro ou de uma razão sinal-ruído, ou de ambos [72].

O *diode-array detector* permite obter espectros em intervalos de 1 segundo, durante a separação por HPLC. Se a medição for realizada a um comprimento de onda fixo, os componentes da amostra são identificados através dos seus tempos de retenção [75].

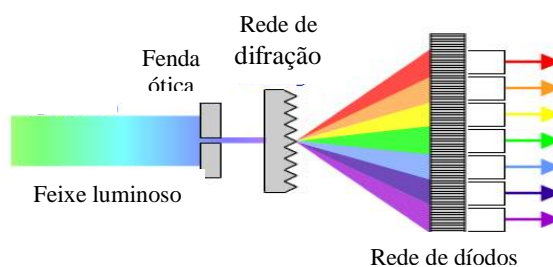


Figura 5.8: Representação esquemática de um *Diode-Array Detector* (DAD) (adaptado de [76]).

Este tipo de detetor apresenta vantagens tais como o facto de permitir obter o melhor comprimento de onda para a análise, o que se torna importante quando não há informação disponível sobre absorptividades molares a diferentes comprimentos de onda.

Outra vantagem importante é o poder de identificação dos sinais, permitindo saber se o sinal corresponde a um único componente da amostra ou a vários, o que se torna muito importante em amostras complexas [77]. Permite também criar bibliotecas de espectros de UV-VIS que podem constituir uma ferramenta adicional na identificação dos analitos.

2.2 Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência (UPLC)

Durante os últimos 30 anos, a cromatografia líquida de elevada eficiência (HPLC) provou ser a técnica predominante em laboratórios de todo o mundo. Um fator determinante para esta situação foi a evolução dos materiais utilizados na preparação das fases estacionárias. Desde 1970 até à atualidade, verificou-se uma diminuição do tamanho das partículas utilizadas na preparação destas [78].

O tamanho das partículas diminuiu de 10 μm até cerca de 3,5 μm e, em 1990, alcançou eficiências significativamente maiores que as anteriores, tornando também as análises mais rápidas [78] [79].

Vários anos depois surgiram as partículas esféricas porosas de 2,5 μm e poucos anos mais tarde surgiram as partículas de 1,7 μm , que permitiram melhores resoluções e altas eficiências [79].

O uso de colunas empacotadas com partículas menores que 2 μm em sistemas cromatográficos com pressões convencionais (41368543 Pa) tem diminuído bastante o tempo de análise, porém, o máximo desempenho cromatográfico é limitado pela pressão.

Como tal, para contornar esse obstáculo, foram desenvolvidos sistemas capazes de trabalhar a elevadas pressões (103421359 Pa), designando-se assim por Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência [79].

O princípio subjacente a esta evolução tem como base a equação de *Van Deemter*, que é uma fórmula empírica que descreve a relação entre a altura do prato teórico (H , μm), a velocidade linear da fase móvel (μ , mm/s) e o tamanho da partícula (d_p):

$$H = Ad_p + \frac{BD_M}{\mu} + \frac{Cd_p^2\mu}{D_M} \quad (\text{Equação 5.7})$$

onde D_M se refere ao coeficiente de difusão do analito e A, B e C são constantes.

O termo A refere-se ao alargamento dos sinais devido aos diferentes caminhos seguidos pelas moléculas do analito, o termo B está relacionado com a difusão longitudinal ou difusão do soluto na fase móvel e o termo C descreve a transferência de massa do analito entre a fase móvel e a fase estacionária [79].

O valor mínimo da curva de *Van Deemter* (Figura 5.9) pode ajudar na determinação do fluxo ótimo para se obter a eficiência máxima da coluna. As partículas menores têm tendência a reduzir a altura do prato (H), obtendo-se assim colunas mais eficientes [79].

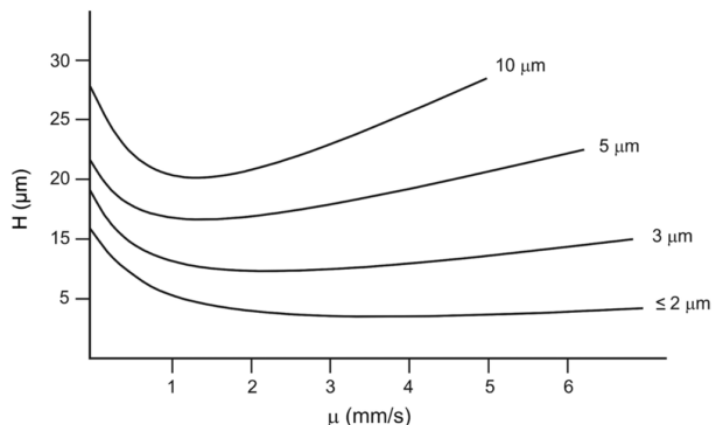


Figura 5.9: Curva de Van Deemter para partículas de 10, 5, 3 e ≤ 2 μ m [79].

Devido à menor profundidade dos poros, as partículas pequenas permitem trocas de soluto mais rápidas na fase móvel e nos poros das partículas, existindo menos tempo entre a fase móvel e a fase estacionária, o que permite obter sinais mais estreitos [79].

Utilizando partículas mais pequenas na fase estacionária, é necessário aumentar a pressão no sistema. As colunas de HPLC podem atingir uma pressão máxima de 60000000 Pa enquanto nos sistemas de UPLC podem atingir uma pressão de 120000000 Pa [80].

O aumento da pressão permite atingir maior velocidade de análise e maior eficiência na separação dos compostos [80].

Visto que a altura do sinal é inversamente proporcional à sua largura pode concluir-se que a diminuição do tamanho das partículas está relacionada com o aumento da sensibilidade do equipamento e, por isso, o UPLC é mais sensível que o HPLC [81].

De acordo com a técnica de deteção (MS), a sensibilidade é maior para o UPLC uma vez que a redução da dispersão cromatográfica a baixas velocidades de fluxo, promove a eficiência da ionização e, conseqüentemente, o aumento de sensibilidade [81].

A transição entre a técnica de HPLC e UPLC exigiu também algumas alterações, nomeadamente, desenvolvimento de novas bombas, injetores redesenhados, detetores com elevada taxa de aquisição, entre outras [82].

Para concluir, a técnica de UPLC fundamenta-se nos mesmos princípios da técnica de HPLC, tendo como principais diferenças nas colunas cromatográficas (que são de dimensões reduzidas na técnica de UPLC), o aumento da resolução e sensibilidade e a redução do tempo de análise [83].

2.2.1 Instrumentação

O sistema de UPLC possui um sistema binário de solventes, o sistema de injeção da amostra, a coluna cromatográfica e respetiva fase estacionária, bomba e detetor.

As bombas individuais, em série, são capazes de impulsionar a fase móvel, de forma a proporcionar elevadas pressões. Nas saídas das bombas, existe um filtro e um misturador para proporcionar um volume e uma mistura adequada da fase móvel [79].

Para proteger a coluna cromatográfica de possíveis oscilações resultantes das elevadas pressões aplicadas, o processo de injeção da amostra deve ser feito num curto intervalo de tempo e com fluxo contínuo. Sendo assim, a injeção da amostra é realizada de forma automática e o amostrador é sujeito a

um controlo de temperatura, que pode variar entre 4 °C a 40 °C [79]. O volume de injeção da amostra deve ser reduzido para evitar o alargamento do sinal cromatográfico, portanto, os equipamentos de UPLC possuem uma gama de volume de injeção entre 0,1 µL a 50 µL [79].

É necessário também um ciclo rápido durante a injeção da amostra, de forma a obter o máximo rendimento da velocidade proporcionada por esta técnica, uma vez que se pretende separar o maior número de compostos por unidade de tempo [79].

Relativamente às colunas cromatográficas usadas em UPLC, estas apresentam um diâmetro interno entre 1 mm e 2,1 mm, para partículas com dimensão menor ou igual a 2 µm. Estas dimensões têm como objetivo minimizar o efeito de aquecimento dos solventes da fase móvel, que sucede quando se utilizam pressões elevadas, pois este aquecimento poderia provocar um gradiente de temperatura ao longo do ensaio, prejudicando a separação cromatográfica [79]. Neste trabalho foram utilizadas quatro colunas cromatográficas diferentes. Na tabela 5.1 podem observar-se algumas das principais características.

Tabela 5.1: Colunas cromatográficas utilizadas e respetivas características.

Fabricante	Coluna	Fase estacionária	Tamanho da partícula (µm)	Dimensão da coluna
Waters	Acquity UPLC BEH	C18	1,7 µm	2,1 x 50 mm
		C8		2,1 X 100 mm
	Acquity UPLC HSS	HILIC	1,8 µm	
		T3 (sílica)		

As colunas cromatográficas que utilizam partículas C8 e C18 na sua fase estacionária contêm cadeias alquila ligadas à superfície da sílica, de forma a proporcionar maior estabilidade. As fases estacionárias com cadeias C8 são menos hidrofóbicas, oferecendo menos retenção dos compostos [79].

As colunas cromatográficas “HILIC” (Hydrophilic Interaction Chromatography) são adequadas para reter bases muito polares. Os compostos ácidos, neutros, e/ou não polares terão retenção limitada [84].

As colunas cromatográficas Acquity UPLC HSS T3 incorporam partículas 100% sílica e foram concebidas para trabalhar a pressões até 103421359 Pa. Esta coluna tem características que lhe permitem reter e separar pequenos compostos orgânicos polares solúveis em água [85].

Para manter a exatidão e reprodutibilidade no processo de aquisição de dados, os detetores UV-VIS, DAD ou espectrómetros de massa, precisam de atuar com elevadas taxas de amostragem, para obter o número de pontos necessário para a construção do sinal cromatográfico [79].

Teoricamente, a detetabilidade de um sistema UPLC é aproximadamente 2 a 3 vezes superior a um sistema de HPLC, dependendo do tipo de detetor usado [79].

2.3 A espectrometria de massa como sistema de deteção

A cromatografia líquida é, provavelmente, o método mais utilizado na separação de cianotoxinas pois permite a adaptabilidade a uma vasta gama de detetores, nomeadamente detetores de UV-VIS, de fluorescência e de espectrometria de massa [23].

A espectrometria de massa acoplada à cromatografia líquida possibilita a detecção de cianotoxinas a níveis de concentração muito baixos. Esta técnica permite obter confiança nos resultados, sensibilidade, seletividade e informações quantitativas e estruturais da análise [31].

A análise por espectrometria de massa consiste na produção de iões, com base em compostos orgânicos ou inorgânicos, através de um método de ionização apropriado. Seguidamente, os iões são separados através da sua razão massa-carga (m/z), por um analisador de massas e são detetados qualitativamente ou quantitativamente. A magnitude do sinal elétrico em função da razão m/z é convertida por um processador de dados, o qual origina o espectro de massas correspondente [86].

Na figura 5.10 é possível observar as principais etapas existentes num espectrómetro de massa.



Figura 5.10: Diagrama representativo de um espectrómetro de massa.

2.3.1 Fonte de Iões

Na fonte de iões, as amostras a analisar são ionizadas antes da sua análise no espectrómetro de massa. São utilizadas diversas técnicas de ionização em espectrometria de massa, em que as considerações mais importantes para a escolha da técnica a utilizar são a energia interna transferida durante o processo de ionização e as propriedades físico-químicas do analito que irá ser ionizado.

Algumas técnicas de ionização são bastante enérgicas e provocam grande fragmentação. No entanto, há outras técnicas mais moderadas que apenas produzem iões de espécies moleculares [87].

A ionização eletrónica, a ionização química e a ionização de campo são técnicas adequadas para ionização em fase gasosa e para compostos suficientemente voláteis e termicamente estáveis. No entanto, a grande maioria dos compostos são termicamente instáveis e pouco voláteis e por isso as moléculas destes compostos devem ser extraídas diretamente da fase condensada (líquida ou sólida) para a fase gasosa [87].

As fontes de ionização direta são de dois tipos: fontes de ionização em fase líquida e fontes de ionização em fase sólida. Nas fontes de ionização em fase líquida, o analito encontra-se em solução. Esta solução é introduzida, por nebulização, na fonte onde são produzidos os iões.

A ionização por *electrospray* (ESI), a ionização química à pressão atmosférica (APCI) e a fotoionização à pressão atmosférica (APPI) são fontes de ionização em fase líquida [87].

O surgimento da fonte de ionização por *electrospray* (ESI) acoplada à cromatografia líquida proporcionou um método simples para a ionização de substâncias não-voláteis, como as cianotoxinas, na detecção por espectrometria de massa [36].

Ionização por *electrospray* (ESI)

Tendo em conta que as microcistinas são facilmente ionizadas por *electrospray*, em modo positivo, esta é a técnica mais utilizada [88].

Esta fonte de ionização é produzida através da aplicação de um campo elétrico forte, sob pressão atmosférica, ao eluente que passa através de um tubo capilar com um fluxo reduzido (normalmente entre 1 $\mu\text{L}/\text{min}$ a 10 $\mu\text{L}/\text{min}$).

O campo elétrico é obtido pela aplicação de uma diferença de potencial entre 3 kV e 6 kV entre o capilar e o contra-eléctrodo [87].

Em modo positivo, os iões positivos movem-se na direcção do contra-eléctrodo e acumulam-se na superfície do líquido, na ponta do capilar. Com um valor de campo eléctrico crítico, o menisco na ponta do capilar deforma-se, designando-se “cone de *Taylor*”, produzindo gotas, continuamente, enriquecidas em iões positivos.

Alterando a polaridade da fonte de alimentação, formar-se-ão gotas carregadas negativamente [89]. Após a libertação das gotas, ocorre, devido a colisões com um gás neutro, a evaporação do solvente.

À medida que o solvente evapora, a densidade de carga aumenta até ser atingido o limite de *Rayleigh*, em que as forças de repulsão entre as cargas ultrapassam a tensão superficial, ocorrendo a libertação de gotas menores, provenientes da gota inicial [89].

Para a última etapa deste processo, foram propostos dois mecanismos diferentes.

O mecanismo de evaporação de iões sugere que a desadsorção de iões ocorra numa fase intermédia da gota, em que o campo eléctrico na superfície da gotícula é suficientemente elevado para que os iões solvatados sejam emitidos a partir de gotículas carregadas [89].

O mecanismo de carga residual determina a formação de gotas cada vez menores até à formação de gotículas que contenham apenas um ião e a evaporação do solvente fará com que estas gotas se convertam em iões na fase gasosa [89].

Na figura 5.11 está representado o esquema que ilustra o processo de ionização por *electrospray* (ESI).

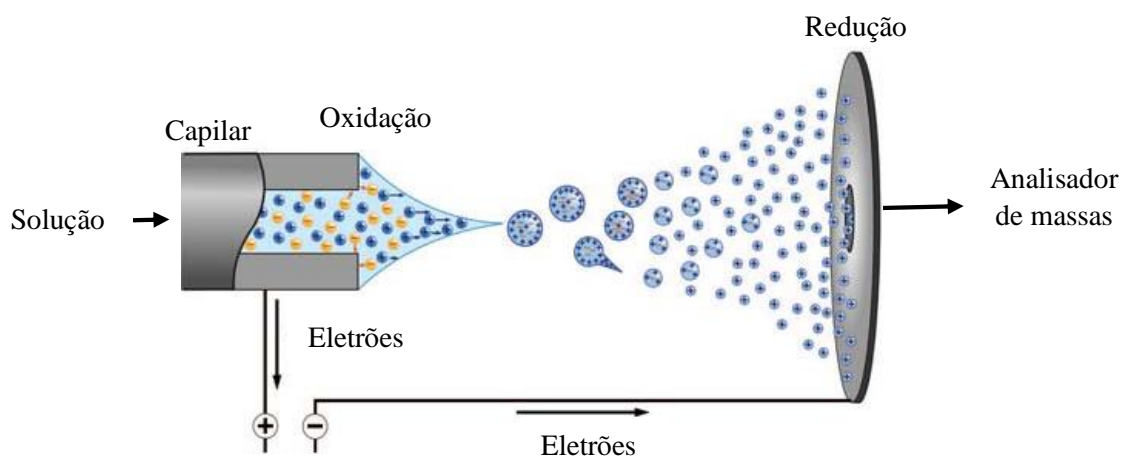


Figura 5.11: Processo de ionização por *electrospray* (adaptado de [90]).

2.3.2 Analisadores de Massa

Após a produção de iões, por *electrospray*, estes são separados de acordo com a sua razão massa-carga (m/z).

Tendo em conta a grande variedade de fontes de iões, foram desenvolvidos vários tipos de analisadores de massa, nomeadamente, analisadores de setor elétrico e magnético, quadrupolos, *ion trap*, *time-of-flight*, entre outros.

A separação de iões de acordo com a sua razão massa-carga pode ser baseada em princípios diferentes. Todos os analisadores de massa utilizam campos elétricos e magnéticos, estáticos ou dinâmicos, que podem ser isolados ou combinados [87].

Neste trabalho foi utilizado um analisador do tipo quadrupolo (triplo quadrupolo).

O quadrupolo é constituído por quatro cilindros metálicos paralelos (Figura 5.12), aos quais são aplicados uma tensão constante e uma voltagem de rádio-frequência oscilante [72].

O campo elétrico faz com que os iões sejam desviados em trajetórias complexas, à medida que migram desde a câmara de ionização até ao detetor. Apenas os iões com uma proporção m/z específica conseguem atingir o detetor. Os outros iões colidem com os cilindros metálicos e são perdidos antes de chegar ao detetor.

O quadrupolo pode adquirir entre 2 a 8 espectros por segundo e desdobrar sinais separados por razões massa-carga de 0,3 [72].

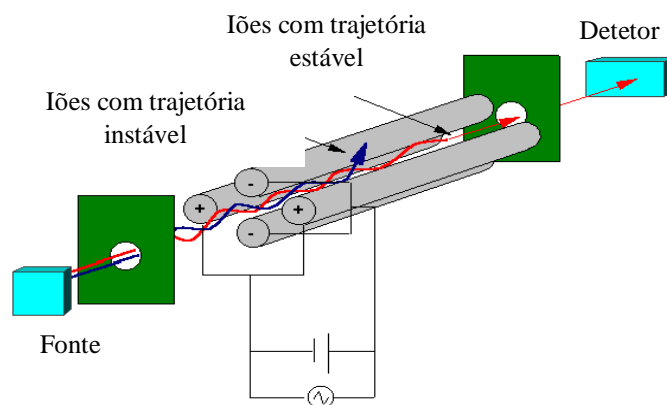


Figura 5.12: Estrutura simplificada de um quadrupolo (adaptado de [91]).

O quadrupolo pode funcionar em dois modos distintos, nomeadamente, no modo *full scan* ou no modo SIM (*Single Ion Monitoring*).

O modo *full scan* permite que sejam detetados todos os iões, de uma determinada gama de massas, presentes na fonte de iões. Este modo fornece uma visão completa de todos os compostos ionizados, acima do limite de deteção, com um tempo de varrimento de aproximadamente 1 segundo. Este modo de análise é útil para caracterização de uma amostra, para determinação estrutural e análise de impurezas. É também o ponto de partida para o desenvolvimento de métodos de aquisição de dados SIM [92].

Para obter melhor sensibilidade, o quadrupolo funciona no modo SIM. Neste modo, o quadrupolo analisa apenas os sinais dos iões para valores de m/z específicos, ao invés de percorrer todos os valores m/z de um determinado intervalo de massa. O tempo de varrimento é dividido por um número menor de iões, daí o aumento de sensibilidade [92].

Enquanto o modo *full scan* é mais utilizado em análises qualitativas ou na quantificação de analitos desconhecidos, o modo SIM é utilizado na quantificação e monitorização de compostos alvo [92].

Espectrometria de massa tandem (MS/MS)

A espectrometria de massa *tandem* (MS/MS) envolve, pelo menos, duas fases de análise de massas (figura 5.13), quer em conjunto com um processo de dissociação ou com uma reação química que provoca uma alteração na massa ou na carga do ião.

Na espectrometria de massa mais comum, um primeiro analisador é utilizado para isolar um ião precursor, o qual sofre uma fragmentação para produzir iões produto e fragmentos neutros. O segundo espectrómetro de massa analisa os iões produto [87].

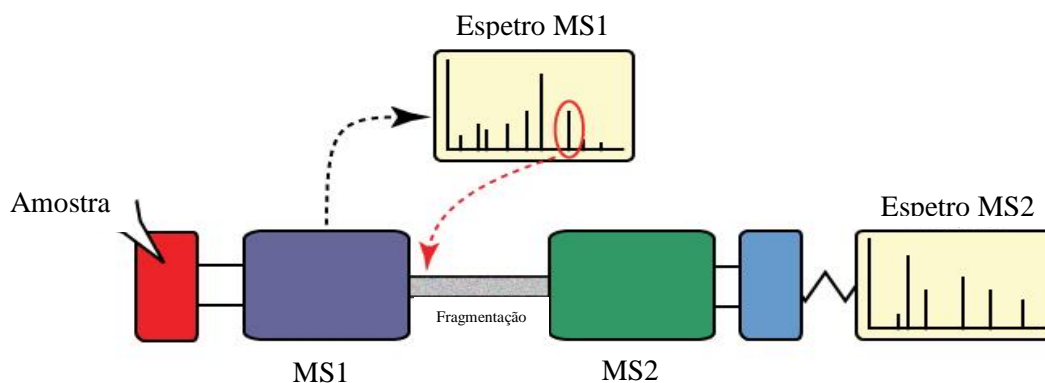


Figura 5.13: Esquema simplificado de um espectrómetro de massa tandem (adaptado de [93]).

O espectrómetro de massa *tandem* pode funcionar em quatro modos distintos, nomeadamente no modo *Product ion scan*, no modo *Precursor ion scan*, no modo *Neutral loss scan* e no modo *Multiple reaction monitoring*.

O modo *Product Ion Scan* consiste na seleção de um ião precursor com uma determinada razão m/z e na análise de todos os iões produto resultantes da colisão desse ião com o gás (Figura 5.14).

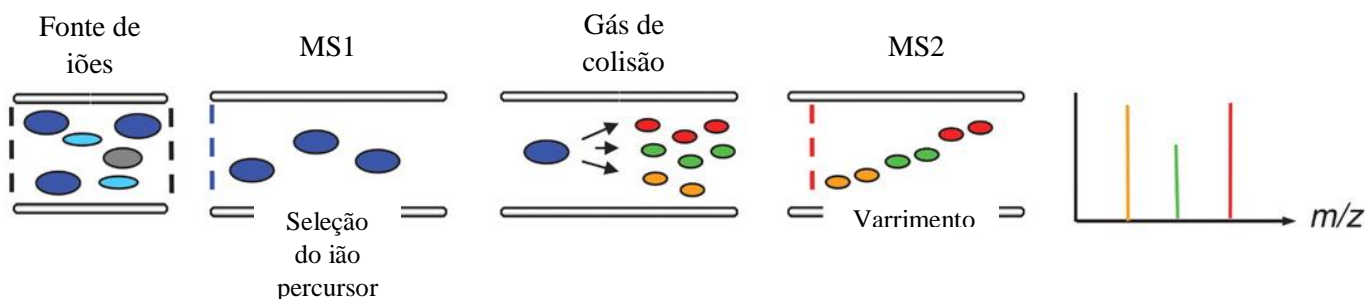


Figura 5.14: Esquema representativo do modo de aquisição *Product Ion Scan* (adaptado de [94]).

O modo *Precursor Ion Scan* consiste na seleção de um ião produto e na determinação de iões precursores, em que é necessária a focalização do segundo espectrômetro num determinado ião, previamente selecionado em modo *Full Scan*. Assim, todos os iões precursores que produzem iões com uma determinada razão m/z são detetados (Figura 5.15).

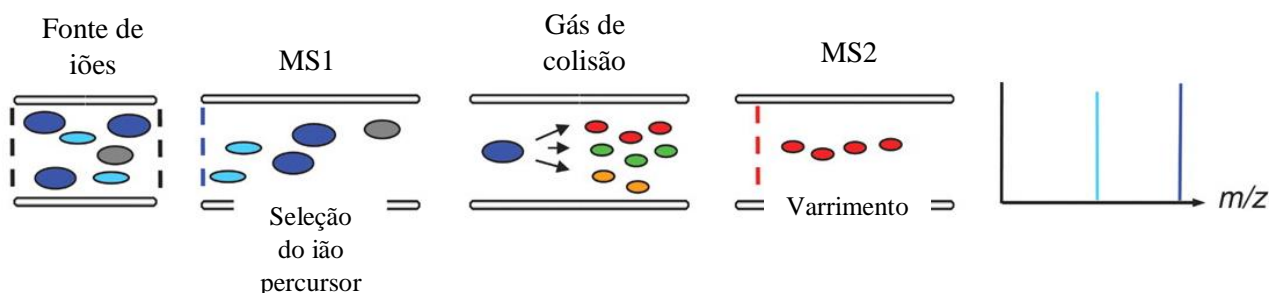


Figura 5.15: Esquema representativo do modo de aquisição *Precursor Ion Scan* (adaptado de [94]).

O modo *Neutral Loss Scan* consiste na seleção de um fragmento neutro e na deteção de todos os fragmentos obtidos a partir do primeiro. Este tipo de varrimento requer que ambos os quadrupolos sejam varridos ao mesmo tempo, no modo *Full Scan*, mas com uma diferença de massa constante entre os dois (Figura 5.16).

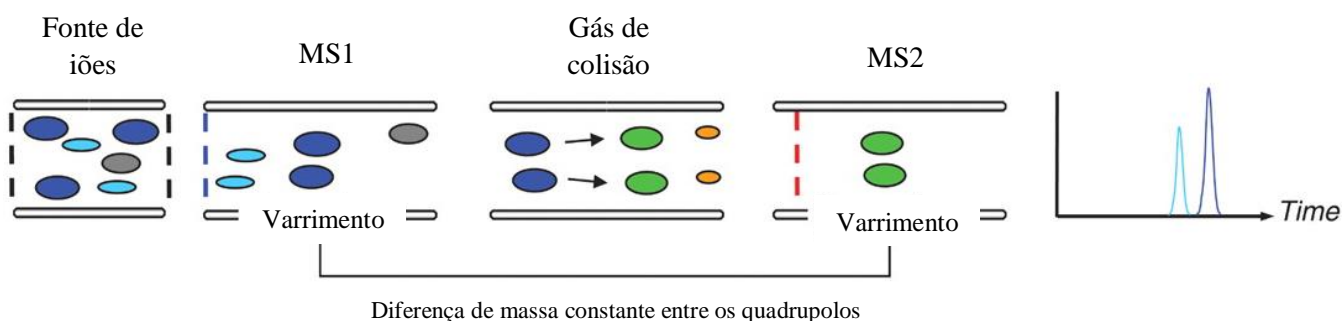


Figura 5.16: Esquema representativo do modo de aquisição *Neutral Loss Scan* (adaptado de [94]).

O modo *Multiple Reaction Monitoring* consiste na seleção de reações de fragmentação específicas, em que os dois quadrupolos estão focados em massas selecionadas, não existindo varrimento em nenhum dos quadrupolos. Os iões selecionados no primeiro analisador só são detetados se produzirem fragmentos específicos. A ausência de varrimento permite focar os iões precursores e produtos, por maior período de tempo, aumentando assim a sensibilidade e seletividade (Figura 5.17) [87].

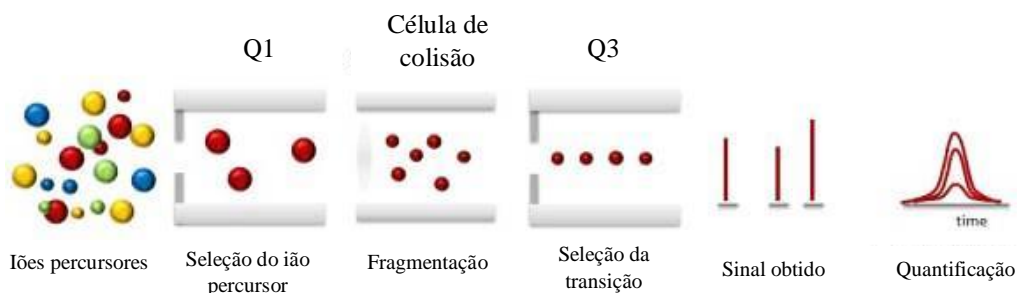


Figura 5.17: Esquema representativo do modo de aquisição *Multiple Reaction Monitoring* (adaptado de [95]).

O desenvolvimento do método analítico abordado neste trabalho utilizou como técnica a espectrometria de massa *tandem*, utilizando como fonte de ionização a técnica de *electrospray*. Utilizou-se o modo *Full Scan* para seleccionar o ião precursor, seguidamente utilizou-se o modo *Product Ion Scan* para seleccionar os iões produto e por fim o modo MRM (*Multiple Reaction Monitoring*), em que se optimizou a voltagem de cone e a energia de colisão. A voltagem de cone foi optimizada para obter melhor resposta do ião precursor enquanto que a energia de colisão foi optimizada para obter iões produto sensíveis e estáveis.

3. Validação do método analítico

Os métodos desenvolvidos em laboratório necessitam de ser validados para demonstrar a existência de bases científicas de suporte [96].

A Norma NP EN ISO/IEC 17025:2005 define a validação de métodos analíticos como “a confirmação através de exame e apresentação de evidência objetiva, de que os requisitos específicos relativos a uma utilização pretendida são satisfeitos”.

Esta norma refere os requisitos de gestão e os requisitos técnicos dos métodos de ensaio e respetiva validação, que um laboratório deve implementar com vista à acreditação [97].

Os parâmetros de validação de métodos analíticos envolvem a seletividade/especificidade, a gama de trabalho/linearidade, o limite de deteção e o limite de quantificação, a precisão e a sensibilidade [96].

3.1 Seletividade/Especificidade

A seletividade/especificidade refere-se à capacidade de detetar o analito na presença de outros compostos, tais como produtos de degradação, interferentes, impurezas, entre outros [80].

Um método de elevada seletividade diz-se específico.

Para avaliação da sua aplicabilidade, o método deverá ser estudado através de ensaios de recuperação usando várias amostras, desde soluções padrão puras a misturas com matrizes mais complexas, em que deverá ser determinada a influência das interferências eventualmente presentes, tendo como base as taxas de recuperação obtidas [96].

3.2 Linearidade/Gama de trabalho

A linearidade refere-se à capacidade que o método tem em gerar resultados linearmente proporcionais à concentração do analito [98].

Num método quantitativo é necessário determinar a gama de concentrações onde o método de ensaio é aplicável. É conveniente que a gama de trabalho escolhida seja uma zona de linearidade do sistema cromatográfico [96].

3.2.1 Curva de calibração

Como referência para as calibrações analíticas, em particular para efetuar regressões lineares pelo método dos mínimos quadrados, deve ser utilizada a norma ISO 8466/1.

A curva de calibração é criada com soluções padrão numa gama total que abrange as concentrações das amostras, de forma a que os resultados sejam obtidos por interpolação.

Para a obtenção da curva de calibração devem ser usados pelo menos seis soluções padrão com concentrações diferentes, preparados por diluição de uma solução padrão individual ou conjunta. Para a verificação da linearidade do método cromatográfico é aconselhável o uso de 10 soluções padrão.

A representação dos dados obtidos pela curva de calibração é feita de forma gráfica, em que o eixo das ordenadas corresponde à área de sinal e o eixo das abcissas corresponde à concentração das soluções padrão.

Após representação gráfica, é avaliado o ajuste dos pontos à reta para identificar se existe uma ou mais zonas de linearidade. Posteriormente, determina-se a função de calibração linear ($y = mx + b$) e o coeficiente de determinação (r^2), que deve apresentar um valor igual ou superior a 0,990 [96].

3.2.2 Gama de trabalho

A gama de trabalho de um procedimento de análise cromatográfica é o intervalo entre a concentração mais alta e a mais baixa dos compostos onde o método de ensaio é aplicável e para a qual foi demonstrado que o procedimento analítico tem uma precisão, rigor e linearidade aceitáveis.

A concentração mais baixa da gama de trabalho é limitada pelo valor do limite de quantificação do método cromatográfico. Na maioria dos casos a concentração mais baixa é superior ao limite de quantificação do método e designa-se por limite de quantificação instrumental ou do método cromatográfico [96].

3.2.3 Linearidade

A linearidade pode ser avaliada através de um modelo estatístico, de acordo com a norma ISO 8466/1, pelo teste de Mandel (Anexo 5), através da análise de resíduos (Anexo 2), pelo teste de RIKILT (Anexo 4) ou pelo teste de áreas normalizadas.

3.2.4 Limite de Detecção (LD)

O limite de deteção de um método é definido como a concentração mínima, a partir da qual é possível detetar a presença de um analito, com uma certeza estatística razoável.

Este limiar corresponde à mais pequena quantidade de substância a analisar que pode ser detetada numa amostra, mas não necessariamente quantificada com valor exato.

Em termos quantitativos, o conceito de limite de deteção corresponde a concentração mínima que é possível distinguir do branco, isto é, de uma amostra que contém a mesma matriz, mas não contém o analito.

O limite de deteção pode ser calculado por três formas distintas, nomeadamente através da avaliação do nível de ruído em sistemas cromatográficos (razão sinal-ruído), através de um ensaio de repetibilidade com o primeiro padrão da gama de linearidade, e com base no desvio padrão residual da curva de calibração.

O nível de ruído é determinado através da comparação entre a medição dos sinais de amostra com uma concentração baixa e conhecida e um branco da amostra.

Se o limite de deteção for determinado através de um ensaio de repetibilidade, o valor é dado por:

$$LD = 3 \times S_{XO} \quad (\text{Equação 5.8})$$

Onde S_{XO} é o desvio padrão correspondente a várias leituras da solução com concentração mais baixa da gama de linearidade.

Se o método analítico envolver a utilização de uma calibração linear, o limite de deteção pode ser calculado através do desvio padrão residual da curva de calibração:

$$LD = \frac{|3 \times S_{y/x}|}{b} \quad (\text{Equação 5.9})$$

Onde:

$S_{y/x}$ é o desvio padrão residual da curva de calibração
 b é o declive da curva de calibração [96].

3.2.5 Limite de Quantificação (LQ)

O limite de quantificação corresponde à mais pequena concentração medida a partir da qual é possível a quantificação do analito, com uma determinada exatidão e precisão, ou seja, o limite de quantificação corresponde ao início da gama de trabalho em que o coeficiente de variação do sinal se reduziu a valores razoáveis (normalmente 10 %) para se poder efetuar uma análise quantitativa.

O limite de quantificação pode ser calculado pelos mesmos métodos referidos para o limite de deteção, mas com algumas alterações.

O valor obtido pelo cálculo do limite de quantificação através da avaliação sinal-ruído deverá ser multiplicado por 10 e convertido em concentração.

O limite de quantificação calculado através de ensaios de repetibilidade é dado por:

$$LQ = 10 \times S_{x0} \quad (\text{Equação 5.10})$$

Se o método analítico envolver a utilização de uma calibração linear, o limite de quantificação pode ser calculado através do desvio padrão residual da curva de calibração [96]:

$$LQ = \frac{|10 \times S_{y/x}|}{b} \quad (\text{Equação 5.11})$$

3.3 Precisão

A precisão é um termo geral que pretende avaliar, para o mesmo método de ensaio, a dispersão de resultados entre ensaios independentes, repetidos sobre uma mesma amostra, amostras semelhantes ou padrões, em condições definidas.

Esta dispersão pode ser avaliada de três formas, nomeadamente, ensaios de repetibilidade, reprodutibilidade ou precisão intermédia. A validação de um método de ensaio em laboratório envolve estudos de repetibilidade e de precisão intermédia.

Os fatores que podem contribuir para a variabilidade dos resultados num método analítico são o operador, o equipamento utilizado, a calibração do equipamento, o ambiente (temperatura, humidade, poluição do ar, entre outros), reagentes e tempo entre medições [96].

A precisão de medição é geralmente expressa numericamente por características como a dispersão, o desvio-padrão, a variância ou o coeficiente de variação, sob condições de medição específicas [99].

3.3.1 Repetibilidade

A repetibilidade exprime a precisão de um método de ensaio efetuado em condições idênticas, pelo mesmo analista, utilizando o mesmo equipamento, o mesmo tipo de reagentes, sobre a mesma amostra, num curto intervalo de tempo.

A precisão em condições de repetibilidade é, normalmente, expressa em termos de desvio padrão ou desvio padrão relativo. O desvio padrão de repetibilidade (S_{rj}) para cada nível de concentração (j) é dado por:

$$S_{rj} = \sqrt{\frac{\sum (x_i - \bar{x})^2}{n-1}} \quad (\text{Equação 5.12})$$

Onde:

\bar{x} : média aritmética do número de medições

x_i : valor individual de uma medição

n : número de medições

O coeficiente de variação de repetibilidade (CV_r) para cada nível de concentração, expresso sob a forma de percentagem do valor médio obtido, é dado por:

$$CV_r(\%) = \frac{S_{rj}}{\bar{x}} \times 100 \quad \text{(Equação 5.13)}$$

Onde,

S_{rj} representa o desvio padrão obtido nos ensaios de repetibilidade

\bar{x} representa a média aritmética do número de medições [96] [100].

3.3.2 Reprodutibilidade

A reprodutibilidade expressa a precisão de um método em determinadas condições, utilizando o mesmo método de ensaio, sobre uma mesma amostra ou amostras idênticas mas variando as condições de medição, ou seja, em diferentes laboratórios, com diferentes analistas, utilizando equipamentos diferentes [100].

3.3.3 Precisão intermédia

A precisão intermédia refere-se à precisão avaliada, sobre a mesma amostra, amostras idênticas ou padrões, utilizando o mesmo método, no mesmo laboratório, mas definindo exatamente quais as condições a variar (uma ou mais), ou seja: diferentes analistas, diferentes equipamentos e diferentes épocas.

Esta medida de precisão é reconhecida como a mais representativa da variabilidade dos resultados num laboratório e, como tal, a mais recomendada [96].

3.4 Sensibilidade

A sensibilidade mede a capacidade de um método para distinguir pequenas diferenças de concentração do analito em estudo ou para detetar pequenas concentrações do analito na amostra.

Este parâmetro é dado pelo quociente entre a variação do sinal analítico (Δy) e a variação da concentração (ΔC) correspondente e pode exprimir-se da seguinte forma [96]:

$$S = \frac{\Delta y}{\Delta C} \quad \text{(Equação 5.14)}$$

3.5 Exatidão

A exatidão consiste num método de validação por avaliação direta e este parâmetro indica o grau de concordância entre o resultado do ensaio e o valor de referência aceite convencionalmente como verdadeiro.

Existem vários processos que podem ser usados para avaliar a exatidão de um método de ensaio, nomeadamente materiais de referência certificados, ensaios interlaboratoriais e testes comparativos [96].

3.6 Ensaio de recuperação

Os ensaios de recuperação representam um parâmetro de validação analítica importante na avaliação da exatidão e precisão, já que permitem estudar o efeito da matriz (presença de interferentes) e podem ser utilizados caso não se encontre disponível um material de referência certificado [100].

Os ensaios de recuperação permitem comparar a quantidade de analito que é recuperada após aplicação do método analítico à matriz que o contém, com a quantidade que estava efetivamente presente na amostra [101].

A percentagem de recuperação obtida para os diferentes níveis de concentração é dada por:

$$\% \text{ recuperação} = \frac{C_{\text{analito na amostra}} - C_{\text{analito nativo na amostra}}}{C_t} \times 100 \quad (\text{Equação 5.15})$$

Onde,

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

$C_{\text{analito nativo na amostra}}$ - Concentração do composto existente na amostra ($\mu\text{g/L}$)

C_t - Concentração esperada do composto na amostra fortificada ($\mu\text{g/L}$)

Capítulo VI – Parte experimental

1. Equipamento

- Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiência, modelo Agilent/HP 1100 series, equipado com:
 - Software ChemStation B.04.03
 - Coluna cromatográfica WATERS Atlantis dC18 (2,1 x 150 mm, 5 µm)
 - Desgaseificador
 - Bomba quaternária
 - Injetor automático
 - Compartimento termostaticado para coluna
 - Detetor de Díodos (DAD)

- Cromatógrafo líquido de ultra eficiência, modelo Waters UPLC Acquity System, equipado com:
 - Software Masslynx versão 4.1 SCN714, Micromass Ltd
 - Coluna cromatográfica Acquity UPLC BEH C18 (2,1 x 50 mm; 1,7 µm), Waters
 - Coluna cromatográfica Acquity UPLC BEH HILIC (2,1 x 100 mm; 1,7 µm), Waters
 - Coluna cromatográfica Acquity UPLC BEH C8 (2,1 x 100 mm; 1,7 µm), Waters
 - Coluna cromatográfica Acquity UPLC HSS T3 (2,1 x 100 mm; 1,8 µm), Waters
 - Desgaseificador
 - Bomba binária
 - Injetor automático
 - Compartimento termostaticado para coluna

- Espectrômetro de massa (MS/MS), Mass Spectrometer Acquity TQ, Waters, equipado com:
 - Sonda de ionização por *electrospray* (ESI)
 - Analisador de triplo quadrupolo
 - Fotomultiplicador

- Balança analítica, modelo XS204, Metler Toledo
- Vórtex, modelo IKA MS3 digital
- Sistema de obtenção de água ultrapura, modelo Milli-Q, Millipore
- Banho ultra-sons P Selecta
- Sistema de extração em fase sólida – SPE Dionex Autotrace 280, versão 1.00.00
- Sistema de evaporação sob fluxo de azoto, Turbovap II, Zymark.

2. Material

Nesta secção descreve-se apenas o material específico utilizado na aplicação das respetivas técnicas e não o material de uso corrente de laboratório.

- Membranas de filtro de Nylon, 0,2 μm , 47 mm, Life Sciences
- Membranas de filtro de Nylon, 0,45 μm , 47 mm, Waters
- Vials de vidro, âmbar, 12 x 32 mm, Teknokroma
- Vials de vidro, âmbar, 9 mm, Supelco
- Microseringas de vidro de 10 μL , 25 μL , 50 μL , 100 μL , 250 μL , 500 μL , Agilent Technologies
- Seringas automáticas de 50 μL e 500 μL , SGE Analytical Science
- Cartuchos para SPE:
 - Bond Elut-ENV, 6 mL, 200 mg, Agilent Technologies
 - ENVI-Carb, 6 mL, 250 mg, Supelco
 - C18 Isolute, 6 mL, 1 g, Biotage
 - Oasis HLB, 6 mL, 500 mg, Waters

3. Reagentes

3.1 Reagentes Gerais

- Acetato de amónio, ($\text{CH}_3\text{COONH}_4$), 98%, Merck
- Acetonitrilo, (CH_3CN), 99,9%, Carlo Erba Reagents
- Ácido fórmico, (HCOOH), 99%, Carlo Erba Reagents
- Ácido sulfúrico, (H_2SO_4), 97%, Merck
- Ácido trifluoroacético, ($\text{C}_2\text{HF}_3\text{O}_2$), 99,8%, Merck
- Água ultrapura (Millipore)
- Metanol, (CH_3OH), 99,9%, Carlo Erba Reagents
- Tiosulfato de sódio, ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$), 99,5%, Merck

3.2 Padrões primários

- Anatoxina-a, ($\text{C}_{10}\text{H}_{15}\text{NO}$), 98%, n^oTox
- Cilindrospermopsina, ($\text{C}_{15}\text{H}_{21}\text{N}_5\text{O}_7\text{S}$), 95%, Sigma-Aldrich
- Homoanatoxina-a, ($\text{C}_{11}\text{H}_{18}\text{NO}$), n^oTox
- Microcistina LA, ($\text{C}_{46}\text{H}_{67}\text{N}_7\text{O}_{12}$), 95%, n^oTox
- Microcistina LF, ($\text{C}_{52}\text{H}_{71}\text{N}_7\text{O}_{12}$), 95%, n^oTox
- Microcistina LR, ($\text{C}_{49}\text{H}_{74}\text{N}_{10}\text{O}_{12}$), 95%, n^oTox

- Microcistina LY, (C₅₂H₇₁N₇O₁₃), 95%, n^oTox
- Microcistina RR, (C₄₉H₇₅N₁₃O₁₂), 95%, n^oTox
- Microcistina YR, (C₅₂H₇₂N₁₀O₁₃), 95%, n^oTox
- Nodularina, (C₄₁H₆₀N₈O₁₀), 95%, n^oTox

4. Preparação de soluções

4.1 Soluções Gerais

Mistura de água:metanol (9:1). Adicionar 100 mL de metanol a 900 mL de água.

4.2 Fase Móvel

A tabela 6.1 apresenta as cinco fases móveis utilizadas na otimização das condições cromatográficas.

Tabela 6.1: Fases móveis testadas para otimização das condições cromatográficas.

Fase móvel	Solvente A	Solvente B
I	Água + 0,1% de ácido fórmico	Metanol
II	Água + 0,1% de ácido fórmico	Acetonitrilo + 0,1% de ácido fórmico
III	Água + 0,1% de TFA	Acetonitrilo + 0,1% de TFA

- Fase móvel I:

Adicionar 999 mL de água ultrapura filtrada e 1 mL de ácido fórmico, num balão de 1000 mL (solvente A). Para preparar o solvente B, adicionar 1000 mL de metanol filtrado num balão volumétrico.

- Fase móvel II:

Para um balão volumétrico de 1000 mL, adicionar 1 mL de ácido fórmico e perfazer com água ultrapura filtrada (solvente A). Para preparar o solvente B, adicionar 1 mL de ácido fórmico e perfazer com acetonitrilo, num balão de 1000 mL.

- Fase móvel III:

Para um balão volumétrico de 1000 mL, adicionar 1 mL de TFA e perfazer com água ultrapura filtrada (solvente A). Para preparar o solvente B, adicionar 1 mL de TFA e perfazer com acetonitrilo, num balão de 1000 mL.

A fase móvel selecionada para a análise de cianotoxina em águas por UPLC-MS/MS foi a fase móvel II e a fase móvel utilizada na análise por HPLC-DAD foi a fase móvel III, presente na tabela 6.1.

4.3 Soluções Padrão utilizadas na análise por HPLC

4.3.1 Soluções padrão individuais para injeção cromatográfica

Para cada composto, pipetar 10 µL de cada padrão comercial individual (10 µg/mL) para um vial e 200 µL de solvente A:B (7:3), utilizado na fase móvel III.

4.4 Soluções Padrão utilizadas na análise por UPLC

4.4.1 Soluções padrão individuais para infusão no espectrômetro de massa

Para cada composto, pipetar 200 µL do padrão comercial (10 µg/mL) para um vial e adicionar 800 µL da solução, descrita no ponto 4.1 (soluções gerais).

4.4.2 Soluções padrão individuais para injeção cromatográfica

Para cada composto, pipetar 20 µL de cada padrão comercial individual (10 µg/mL) para um vial e 250 µL de solvente A:B (9:1), utilizado na fase móvel I.

4.4.3 Solução padrão conjunta para injeção cromatográfica

Adicionar, num vial, 30 µL de cada solução padrão individual (descrita em 4.4.2)

4.4.4 Solução padrão conjunta para o estudo da linearidade

Adicionar 40 µL de cada padrão comercial (10 µg/mL) para um volume final de 1 mL, perfazendo esse volume com o solvente água:metanol (9:1).

4.4.5 Soluções padrão para o estudo da linearidade

A partir da solução padrão conjunta (4.4.4), preparar treze soluções padrão com concentrações entre 0,8 µg/L e 114,28 µg/L, como descrito na tabela 6.2, utilizando como solvente água:metanol (9:1).

Tabela 6.2: Preparação de soluções padrão de calibração.

Solução Padrão	Volume de solução conjunta (μL)	Volume final de padrão (μL)	Concentração aproximada ($\mu\text{g/L}$)
P1	10	5010	0,80
P2	10	2010	2,00
P3	10	1010	3,96
P4	20	1020	7,84
P5	40	1040	15,38
P6	60	1060	22,64
P7	80	1080	29,60
P8	60	560	42,85
P9	80	580	55,17
P10	100	600	66,66
P11	120	570	84,20
P12	125	500	100,00
P13	150	525	114,28

4.5 Soluções Padrão para o estudo das recuperações por injeção direta

4.5.1 Solução padrão conjunta para o estudo das recuperações

Adicionar 20 μL de cada padrão comercial (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$) para um volume final de 500 μL , perfazendo esse volume com o solvente água:metanol (9:1).

4.5.2 Soluções padrão de calibração para o estudo das recuperações

A partir da solução padrão conjunta (4.5.1), preparar onze soluções padrão com concentrações entre 0,4 $\mu\text{g}/\text{L}$ e 8 $\mu\text{g}/\text{L}$, como descrito na tabela 6.3, utilizando como solvente água:metanol (9:1).

Tabela 6.3: Preparação de soluções padrão de calibração, para o estudo das recuperações por injeção direta.

Solução Padrão	Volume de solução conjunta (μL)	Volume final de padrão (μL)	Concentração aproximada ($\mu\text{g/L}$)
P1	20	20020	0,40
P2	30	20030	0,60
P3	20	10020	0,80
P4	30	10030	1,20
P5	40	10040	1,60
P6	25	5025	2,00
P7	38	5038	3,04
P8	50	5050	4,00
P9	62	5062	4,96
P10	30	2030	6,00
P11	40	2040	8,00

4.6 Soluções Padrão para o estudo das recuperações através da técnica de SPE

4.6.1 Solução padrão conjunta para o estudo das recuperações

Adicionar 40 μL de cada padrão comercial (10 $\mu\text{g/ mL}$) para um volume final de 1 mL, perfazendo esse volume com o solvente água:metanol (9:1).

4.6.2 Soluções padrão de calibração para o estudo das recuperações

A partir da solução padrão conjunta (4.6.1), preparar nove soluções padrão com concentrações entre 15,38 $\mu\text{g/L}$ e 114,28 $\mu\text{g/L}$, como descrito na tabela 6.4, utilizando como solvente água:metanol (9:1).

Tabela 6.4: Preparação de soluções padrão de calibração.

Solução Padrão	Volume de solução conjunta (μL)	Volume final de padrão (μL)	Concentração aproximada ($\mu\text{g/L}$)
P1	40	1040	15,38
P2	60	1060	22,64
P3	80	1080	29,60
P4	60	560	42,85
P5	80	580	55,17
P6	100	600	66,66
P7	120	570	84,20
P8	125	500	100,00
P9	150	525	114,28

4.6.3 Soluções padrão de calibração para o estudo das recuperações em matriz ajustada

A partir da solução padrão conjunta (4.6.1), preparar seis soluções padrão com concentrações entre 30,8 $\mu\text{g/L}$ e 229,0 $\mu\text{g/L}$ (tabela 6.5).

A partir de cada um dos padrões já preparados (30,8-229,0 $\mu\text{g/L}$), retirar 100 μL de cada um e adicionar 100 μL de branco de matriz, de forma a tentar eliminar os efeitos associados a fenômenos de matriz (supressão ou enriquecimento iônico).

O branco de matriz efetua-se em simultâneo com as amostras, integrando todo o processo analítico.

Tabela 6.5: Preparação de soluções padrão de calibração, para o estudo das recuperações.

Solução Padrão	Volume de solução conjunta (μL)	Volume final de padrão (μL)	Concentração aproximada ($\mu\text{g/L}$)	Volume a retirar do padrão anterior (μL)	Concentração final ($\mu\text{g/L}$)
P1	40	1040	→ 30,8	100	→ 15,4
P2	60	1060	→ 45,3	100	→ 22,6
P3	60	560	→ 85,7	100	→ 42,3
P4	100	600	→ 133,3	100	→ 66,7
P5	120	495	→ 193,5	100	→ 100,0
P6	150	525	→ 229,0	100	→ 114,3

5. Análise de cianotoxinas por HPLC-DAD

Para a análise de cianotoxinas por HPLC-DAD, realizaram análises de soluções individuais e de mistura destes mesmos compostos, como descrito em 4.3.

Para tal, seguiu-se o procedimento já implementado no laboratório EPAL [102], em que é utilizada uma coluna cromatográfica Waters Atlantis dC18, 2,1 x 150 mm, 5 μ m, com uma temperatura de forno de 35 °C.

São injetados 20 μ L de amostra em cada injeção cromatográfica.

Foi utilizada a fase móvel III, descrita no ponto 4.2. As condições cromatográficas estão descritas na tabela 6.6.

Tabela 6.6: Condições cromatográficas utilizadas na técnica de HPLC-DAD.

Tempo (min)	Fluxo (mL/min)	Solvente A (%)	Solvente B (%)
0,00		70	30
10,00		50	50
12,00	0,800	0	100
20,00		0	100
21,00		70	30
28,00		70	30

6. Otimização do método analítico UPLC-MS/MS

As condições de operação são otimizadas em duas etapas principais, nomeadamente MS/MS e UPLC-ESI-MS/MS.

A primeira fase tem por objetivo a obtenção do ião precursor, resultante da ionização do analito, e a obtenção dos iões produto. Nesta fase vão ser otimizados os seguintes parâmetros:

- Modo de ionização
- Voltagem de cone
- Energia de colisão

Numa segunda fase é avaliado o comportamento dos compostos no sistema completo UPLC-ESI-MS/MS e definidos os parâmetros cromatográficos.

6.1 Condições do triplo quadrupolo

O 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 (tensão do capilar) e no cone de extração (voltagem de cone). A voltagem do capilar foi mantida constante a 3,5 kV.

Para otimizar as condições operacionais de obtenção do ião precursor, são analisados isoladamente cada um dos compostos em estudo, injetando as soluções padrão individuais para infusão, com uma concentração na ordem dos 2 μ g/mL.

A otimização baseia-se essencialmente na seleção do modo de ionização (negativo ou positivo) e da voltagem de cone.

A injeção é realizada por infusão direta no espectrómetro de massa em modo de aquisição *full scan* para o primeiro quadrupolo. Nesta fase como não é aplicada nenhuma energia de colisão, não há fragmentação e o terceiro quadrupolo não é utilizado.

A voltagem de cone foi testada, em modo de ionização positivo e negativo, entre 5 e 100 V. Este ensaio permite selecionar o modo de ionização e a voltagem de cone em que o ião precursor de cada composto apresenta sinal de maior intensidade, com o menor ruído da linha de base.

Uma vez definidas as condições para o primeiro quadrupolo, é avaliado o efeito da energia de colisão fazendo-a variar entre 5 e 80 eV. A avaliação dos espectros de massa obtidos obedece a vários requisitos, nomeadamente:

- ✓ Os iões produto com melhor resultado em termos de intensidade de sinal que resultem da fragmentação do ião precursor.
- ✓ Quando os iões produto são selecionados deve haver a presença do ião precursor.

Esta fase é realizada em modo de aquisição *Product Ion Scan*, ou seja, modo SIM (*Selected Ion Monitoring*) para o primeiro quadrupolo e modo *full scan* para o terceiro 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.

6.2 Condições cromatográficas

6.2.1 Seleção da coluna cromatográfica

Para a seleção da coluna cromatográfica adequada à separação dos compostos, foi utilizado um método em que a fase móvel A era constituída por água + 0,1% de ácido fórmico e fase móvel B era constituída por acetonitrilo + 0,1% de ácido fórmico (fase móvel II, tabela 6.1)

As colunas C18, C8 e HILIC foram testadas com o método descrito na tabela 6.7 e a coluna HSS T3 foi testada com o método descrito na tabela 6.8.

Tabela 6.7: Gradiente utilizado nas fases móveis, para seleção da coluna cromatográfica.

Tempo (min)	Fluxo (mL/min)	Solvente A (%)	Solvente B (%)
0		98	2
0,8		98	2
9,0	0,450	30	70
10,0		20	80
10,20		20	80
11,0	0,050	20	80

6.2.2 Método cromatográfico

Mediante a análise dos resultados é estabelecida a constituição da fase móvel que permite uma melhor separação cromatográfica e melhor definição dos sinais cromatográficos. Na tabela 6.8 está representado o gradiente utilizado na fase móvel, após otimização do método. A fase móvel em que se obtiveram melhores resultados e, por conseguinte, a utilizada neste trabalho foi a fase móvel constituída por água + 0,1% de ácido fórmico (A) e acetonitrilo + 0,1% de ácido fórmico (B).

Tabela 6.8: Gradiente utilizado na fase móvel.

Tempo (min)	Fluxo (mL/min)	Solvente A (%)	Solvente B (%)
0		98	2
0,8		98	2
3,5		10	90
6,0	0,450	10	90
6,2		98	2
7,5		98	2
7,6		98	2
7,8		0	100
9,0	0,020	0	100

Após a escolha do gradiente adequado, estão reunidos os dados necessários para definir, no software do equipamento, os métodos para a análise das cianotoxinas (tabela 6.9).

O método de análise tem de definir, para cada composto, o modo de ionização, a janela correspondente ao intervalo dos tempos de retenção, o ião precursor e os respetivos iões produto, a voltagem de cone e a energia de colisão (para as duas transições selecionadas).

Tabela 6.9: Condições aplicadas aos métodos criados no software para análise das cianotoxinas por UPLC-MS/MS.

Cianotoxinas	Modo de ionização	Janela de tempos de retenção (min)	Voltagem de cone (V)	Transição MRM – Ião precursor – Ião Produto	Energia de colisão (eV)
Cilindrospermopsina	ES+	0-1,3	40	MRM1 416,2→194,2	35
				MRM2 416,2→336,1	22
Anatoxina-a	ES+	0,7-1,4	30	MRM1 166,1→131,1	20
				MRM2 166,1→149,1	10
Homoanatoxina-a	ES+	0,8-2,5	30	MRM1 180,1→57,1	20
				MRM2 180,1→163,1	10
Nodularina	ES+	2,5-4,0	70	MRM1 825,6→107,2	70
				MRM2 825,6→135,2	50
Microcistina YR	ES+	3,0-4,0	65	MRM1 1045,6→107,2	70
				MRM2 1045,6→134,9	70
Microcistina RR	ES+	3,0-4,0	40	MRM1 521→103,0	40
				MRM2 521→135,0	30
Microcistina LR	ES+	3,0-4,1	60	MRM1 995,6→87,2	50
				MRM2 995,6→135,3	60
Microcistina LY	ES+	3,5-4,5	50	MRM1 1002,7→135,2	70
				MRM2 1002,7→265,3	50
Microcistina LA	ES+	3,5-4,5	40	MRM1 910,7→135,2	60
				MRM2 910,7→213,0	50
Microcistina LF	ES+	3,5-7,0	40	MRM1 986,7→213,1	50
				MRM2 986,7→375,2	30

6.3 Validação do método de UPLC-MS/MS

A validação do método UPLC-ESI-MS/MS implicou a realização de vários testes com o objetivo de avaliar o intervalo de linearidade e gama de trabalho, os limiares analíticos instrumentais e a precisão instrumental em condições de repetibilidade.

6.3.1 Estudo da linearidade

Para a determinação do intervalo de linearidade, foram analisadas várias soluções padrão.

O estudo da linearidade foi dividido em duas partes, nomeadamente em gama baixa e gama alta. A gama baixa inclui padrões com concentrações entre 0,4 µg/L e 4 µg/L e a gama alta inclui padrões que variam entre 15,38 µg/L e 114,28 µg/L.

Os resultados obtidos foram tratados através da realização de uma regressão linear pelo método dos mínimos quadrados, de acordo com a norma ISO 8466-1 (Anexo 1), obtendo-se uma reta de calibração (área vs concentração).

A estes resultados foram aplicados vários testes, nomeadamente, o teste da análise de resíduos (Anexo 2), o teste de Mandel (Anexo 5), o teste de RIKILT (Anexo 4) e o teste das áreas normalizadas (Anexo 3).

Os critérios de aceitação internos foram:

- Coeficiente de determinação (r^2) $\geq 0,990$
- Coeficiente de variação do método (CV_m) $\leq 10\%$
- Teste de análise de resíduos $\pm 15\%$
- Teste das áreas normalizadas $\geq 85\%$ e $\leq 115\%$
- Teste de RIKILT $\geq 90\%$ e $\leq 110\%$
- Teste de Mandel $VT < F$
- O limite de quantificação calculado deverá ser inferior ao ponto correspondente ao limite inferior da reta de calibração.

6.3.2 Limiares analíticos e precisão instrumental

Os limites de deteção e de quantificação instrumentais foram calculados em condições de repetibilidade, considerando os dados da equação da reta obtida após o estudo do intervalo de linearidade.

A precisão instrumental foi estudada em condições de repetibilidade. Para a avaliação da mesma, as soluções conjuntas correspondentes ao limite inferior e superior da gama de trabalho foram analisadas 10 vezes durante a mesma série.

7. Método de injeção direta na análise de cianotoxinas

Após validação do método de análise de cianotoxinas por UPLC-MS/MS, implementou-se um método de injeção direta para três compostos diferentes (cilindrospermopsina, anatoxina e homoanatoxina), pois estes apresentam um limite de quantificação inferior ao limite recomendado pela OMS, para a Microcistina-LR, considerando-se este valor como referência para todas as cianotoxinas.

Para a realização da injeção direta de amostras, filtraram-se 200 mL de cada uma das diferentes matrizes (água de consumo humano, superficial e subterrânea), em filtros de Nylon de 0,45 μm . O volume de filtrado foi utilizado na preparação dos vários níveis de fortificação, como descrito na tabela 6.10.

Para a injeção direta de amostras, utilizou-se a curva de calibração descrita no ponto 4.5.2.

Na preparação dos ensaios de recuperação através de injeção direta de amostras de diferentes matrizes, preparou-se um padrão primário com 28 μL de cada padrão comercial (10 $\mu\text{g/mL}$) para um volume final de 700 μL . Para perfazer o volume final de 700 μL utilizou-se a matriz em estudo para cada caso, nomeadamente água de consumo humano, superficial ou subterrânea.

Para o estudo das recuperações em matriz real, por injeção direta, fortificaram-se as amostras a quatro níveis diferentes, para cada matriz, com cinco replicados por cada nível de fortificação (tabela 12).

Para cada matriz adicionou-se um determinado volume de padrão primário (V_p) para um volume final (V_f) que é perfeito com a matriz desejada para análise.

Tabela 6.10: Preparação dos níveis de fortificação nos ensaios de recuperação

Nível de fortificação	0,6 $\mu\text{g/L}$		0,8 $\mu\text{g/L}$		2 $\mu\text{g/L}$		4 $\mu\text{g/L}$	
	V_p	V_f	V_p	V_f	V_p	V_f	V_p	V_f
Matriz/volumes								
Água de consumo humano								
Água superficial	30 μL	20 mL	20 μL	10 mL	25 μL	5 mL	50 μL	5 mL
Água subterrânea								

8. Otimização da técnica analítica de SPE

Para os compostos que apresentam um limite de quantificação superior ao limite legal, é necessário realizar um tratamento prévio da amostra, de forma a que sejam detetados por UPLC-MS/MS, a um nível igual ou inferior ao nível permitido na legislação.

Para a obtenção de melhores resultados pela técnica de extração em fase sólida (SPE) podem ser avaliadas e otimizadas várias condições. Neste trabalho procedeu-se ao estudo da eficiência de alguns tipos de cartuchos nos valores das recuperações.

As condições previamente estabelecidas em SPE, que foram posteriormente utilizadas nos vários estudos estão representadas na tabela 6.11.

Tabela 6.11: Condições utilizadas nos estudos de recuperações.

Condicionamento do cartucho	Metanol + 0,1% TFA (1); Metanol (2); Água ultrapura (3)
Fluxo do condicionamento do cartucho	5 mL/min
Volume de amostra	110 mL
Lavagem do cartucho	2 mL de água ultrapura
Secagem do cartucho	15 minutos com azoto
Eluição das amostras	Frações de 4 mL com metanol + 0,1% TFA
Turbovap (temperatura/pressão)	35°C/34473 Pa

8.1 Seleção do cartucho de SPE

Neste estudo foram testados os cartuchos Oasis HLB, Isolute C18, BondElut-ENV e Envi-Carb, nas condições descritas na tabela 6.11.

Inicialmente, para cada um dos cartuchos, testaram-se três diferentes tipos de matriz mais simples, nomeadamente água ultrapura, água ultrapura com tiosulfato de sódio e água ultrapura acidificada com H₂SO₄.

Após verificar a resposta dada por cada um dos tipos de cartuchos às diferentes matrizes, selecionou-se a que conduziu a melhores percentagens de recuperação (água com tiosulfato de sódio) e analisaram-se posteriormente matrizes reais (águas de consumo humano, superficiais e subterrâneas) contendo tiosulfato de sódio.

Após a análise das matrizes reais foi possível selecionar qual o melhor cartucho a utilizar.

8.2 Fortificação das amostras

Este tópico é referente ao capítulo V, nomeadamente ao ponto 3.6 (Ensaio de recuperação).

Após a seleção do melhor cartucho a utilizar, fortificaram-se as três matrizes de águas, com dois níveis de fortificação diferentes para cada matriz, de forma a verificar quais as recuperações obtidas.

A cada 750 mL de água a analisar, são adicionados 0,15 g de tiosulfato de sódio e posteriormente a quantidade de padrão necessária de forma a obter a concentração pretendida.

Para a preparação do padrão primário utilizado para a fortificação adicionaram-se 120 µL de cada padrão comercial (10 µg/mL) para um volume final de 3 mL. Para perfazer o volume final utilizou-se a matriz em estudo, para cada caso. Por exemplo, se se pretendesse analisar água de consumo humano, o volume final do padrão primário era perfeito com essa mesma matriz e assim sucessivamente para as restantes matrizes.

Para o nível de fortificação de 0,48 µg/L, adicionaram-se 900 µL do padrão primário descrito anteriormente para um volume final de 750 mL.

Para o nível de fortificação de 0,96 µg/L, adicionaram-se 1800 µL do padrão primário descrito anteriormente para um volume final de 750 mL.

O valor de 0,48 µg/L tem como objetivo fortificar as amostras com uma concentração de aproximadamente metade do permitido na legislação (1 µg/L) e o valor de 0,96 µg/L já se aproxima mais do valor legislado, situando-se ambos os valores no intervalo da gama de trabalho (15,4 µg/L-114,3 µg/L), assumindo um fator de concentração de 100 vezes.

Após a realização do SPE, as amostras foram concentradas no TurboVap, onde evaporaram até cerca de 0,25 mL e, seguidamente, foi adicionado solvente até 1 mL, permitindo assim a concentração das amostras.

Sendo assim, as amostras de 0,48 µg/L, após SPE, apresentam teoricamente uma concentração de 48 µg/L e as amostras de 0,96 µg/L uma concentração de 96 µg/L, podendo, deste modo, serem interpoladas na curva de calibração descrita no ponto 4.6.2, tabela 6.4.

Após a realização do SPE, a análise por UPLC-MS/MS decorreu com os parâmetros já otimizados, presentes nas tabelas 6.8 e 6.9.

A percentagem de recuperação obtida para os diferentes níveis de concentração é dada por:

$$\% \text{ recuperação} = \frac{C_{\text{analito na amostra}} - C_{\text{analito nativo na amostra}}}{C_t} \times 100 \quad (\text{Equação 6.1})$$

Onde,

$C_{\text{analito na amostra}}$ - concentração do composto na amostra fortificada, determinada experimentalmente (µg/L)

$C_{\text{analito nativo na amostra}}$ - concentração do composto existente na amostra (µg/L)

C_t - concentração esperada do composto na amostra fortificada (µg/L)

8.3 Efeitos de matriz

Uma vez que foram observados efeitos de matriz significativos, para as três matrizes testadas, realizaram-se estudos de recuperação em matriz ajustada utilizando os padrões de calibração descritos no ponto 4.6.3 (tabela 6.5).

Os padrões utilizados têm uma concentração variável entre 15,4 µg/L e 114,3 µg/L.

As amostras foram fortificadas a 0,48 µg/L e a 0,96 µg/L. Após o processo de extração em fase sólida, estas são concentradas até concentrações teóricas aproximadas de 48 µg/L e 96 µg/L, como descrito no ponto anterior.

Após a concentração das amostras, estas são diluídas de 1:2, ou seja, a cada 100 µL da amostra fortificada são adicionados 100 µL de solvente água:metanol (9:1), de forma a tentar eliminar o efeito de matriz. Sendo assim, as amostras fortificadas têm uma concentração de 24 µg/L e 48 µg/L, sendo interpoladas na curva de calibração que varia entre 15,4 µg/L e 114,3 µg/L.

Capítulo VII – Resultados e discussão

O desenvolvimento de um método analítico para análise de compostos em águas implica a realização de vários estudos com vista à sua validação, posterior implementação em rotina e eventual acreditação segundo a Norma ISO/IEC 17025. Todos os compostos foram analisados por HPLC-DAD e por UPLC-MS/MS.

1. Análise de cianotoxinas por HPLC-DAD

Para compreender qual o método mais vantajoso na análise de cianotoxinas, procedeu-se à análise de soluções individuais dos vários compostos em estudo, pela técnica de HPLC-DAD.

A análise destes compostos foi baseada num método existente, no laboratório da EPAL, para microcistinas, como referido no ponto 5 do procedimento experimental.

Os resultados estão expressos na tabela 7.1.

Tabela 7.1: Resultados obtidos para as cianotoxinas, pela técnica de HPLC-DAD.

Composto	Tempo de retenção (min)	Intensidade da absorvância (mAU)
Cilindrospermopsina	1,070	212
Anatoxina-a	1,070	212
Homoanatoxina-a	1,073	212
Nodularina	1,073	212
Microcistina RR	3,262	212
Microcistina YR	4,561	212
Microcistina LR	5,130	214
Microcistina LA	7,626	217
Microcistina LY	8,322	219
Microcistina LF	10,882	220

Através da análise de resultados verifica-se que quatro compostos têm tempos de retenção muito próximos, o que irá resultar numa co-eluição cromatográfica que compromete a identificação e quantificação individual destes quatro compostos. Apenas as microcistinas têm tempos de retenção distintos. No entanto, estes resultados revelam que seriam necessárias várias otimizações para que estes compostos fossem separados com tempos de retenção diferentes. Os tempos de retenção apresentados pelas microcistinas, apesar de distintos, são superiores aos tempos de retenção obtidos por UPLC-MS/MS, como iremos ver mais à frente.

Um dos objetivos deste trabalho é a implementação de um método de análise de cianotoxinas mais rápido, seguindo-se assim a otimização das condições por UPLC-MS/MS.

2. Otimização das condições UPLC-MS/MS

2.1 Otimização do espectrómetro de massa

A análise de cianotoxinas em amostras de água requer o desenvolvimento de um método analítico que permita a deteção e quantificação dos compostos alvo em concentrações iguais ou inferiores a 1 µg/L [34] pelo que a otimização das condições de operação do sistema UPLC-MS/MS é de extrema importância.

Desta forma, este trabalho teve como ponto de partida a otimização de diversos parâmetros relacionados com o espectrómetro de massa. Esta otimização teve como objetivo definir as melhores condições de monitorização, de forma a alcançar o máximo de seletividade e sensibilidade para cada composto alvo.

Tendo em conta que se utilizou uma fonte de ionização por *electrospray* e um triplo quadrupolo, foram otimizados os parâmetros relacionados com a formação do ião precursor na fonte de ionização, nomeadamente, modo de ionização e voltagem de cone e, com a formação dos iões produto no segundo quadrupolo, nomeadamente, a energia de colisão aplicada na célula de colisão.

2.1.1 Condições da fonte de ionização-ião precursor

De forma a otimizar as condições da fonte de ionização, foi realizada a infusão de cada um dos padrões, individualmente, estudando-se assim o efeito da variação da voltagem de cone na intensidade do ião precursor formado, como descrito no ponto 6.1 do procedimento experimental.

A ionização dos compostos foi realizada no modo de *electrospray* positivo devido à maior intensidade de sinal observada neste modo, uma vez que estes compostos são constituídos por aminas (NH) e a presença do átomo de azoto nestas estruturas proporciona um sinal mais elevado no modo positivo [103].

Devido à presença do grupo NH nestes compostos, estes apresentam propriedades básicas pelo que o ião precursor usualmente formado para este tipo de analitos, corresponde ao ião protonado (M-H⁺).

Após a infusão dos compostos no espectrómetro de massa, verificou-se a existência de uma voltagem de cone ótima para cada composto, o que corresponde a um máximo de intensidade do ião precursor.

Na figura 7.1 está representada a variação da intensidade de sinal do ião precursor, com o aumento da voltagem de cone, para a anatoxina-a.

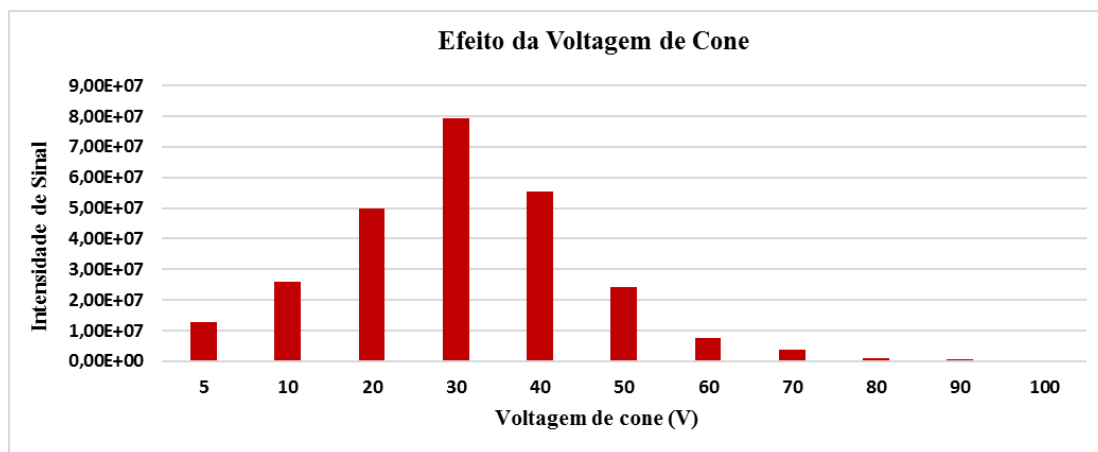


Figura 7.1: Efeito da voltagem de cone para a anatoxina-a.

Para os restantes compostos procedeu-se da mesma forma. Os iões percursoros e as respetivas voltagens de cone encontram-se representadas na tabela 7.2.

De uma forma geral, verificou-se que a massa do ião percursor corresponde à massa molecular do composto, somada à massa de um átomo de hidrogénio.

2.1.2 Condições do triplo quadrupolo-ião produto

Após estabelecidas as condições ótimas de ionização de cada analito, é necessário otimizar e estabelecer as condições de operação do analisador de massas. De forma a atingir a seletividade e sensibilidade necessárias a este tipo de análise vestigial, o modo de operação do triplo quadrupolo que será utilizado em rotina é o modo MRM (*Multiple Reaction Monitoring*), sendo utilizadas duas transições ião precursor-ião produto, uma transição MRM1 para quantificação dos compostos e uma transição MRM2 de qualificação, que permita a confirmação dos compostos alvo.

O critério de confirmação é baseado na razão entre a intensidade do sinal da transição MRM1 e a intensidade do sinal da transição MRM2, a qual deverá ser constante para cada composto. Desta forma, é necessário escolher dois iões produto que permitam a definição das transições MRM1 e MRM2, bem como otimizar os parâmetros que conduzam a uma maior intensidade dos iões produto selecionados, nomeadamente, otimização da energia de colisão. Esta etapa é realizada com o triplo quadrupolo a funcionar em modo *Product Ion Scan*.

A figura 7.2 apresenta como exemplo o efeito da variação da energia de colisão na fragmentação do ião percursor da anatoxina-a.

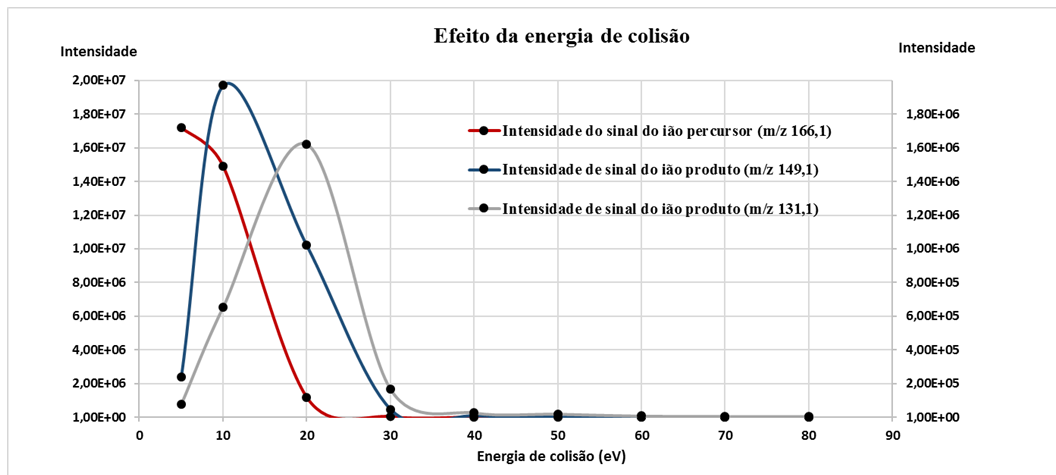


Figura 7.2: Efeito da energia de colisão para a anatoxina-a.

À medida que a energia de colisão aumenta, observa-se uma diminuição da intensidade do íon precursor, pois este fragmenta-se.

Com a fragmentação do íon precursor e com o aumento da energia de colisão, surgem vários íons produtos resultantes da dissociação direta do íon precursor. Existem dois que se destacam representando os potenciais fragmentos ótimos para a definição das duas transições.

A energia de colisão ótima correspondente à anatoxina é de 10 eV para o íon produto 149,1 m/z e de 20 eV para o íon produto 131,1 m/z, uma vez que estas energias permitem obter a intensidade máxima na formação dos dois íons produto.

Na figura 7.3 a) está representado o espectro de massa do íon precursor da anatoxina-a no modo de ionização positivo e na figura 7.3 b) está representado o espectro de massa resultante da fragmentação do íon precursor, em que se obtêm dois íons produto.

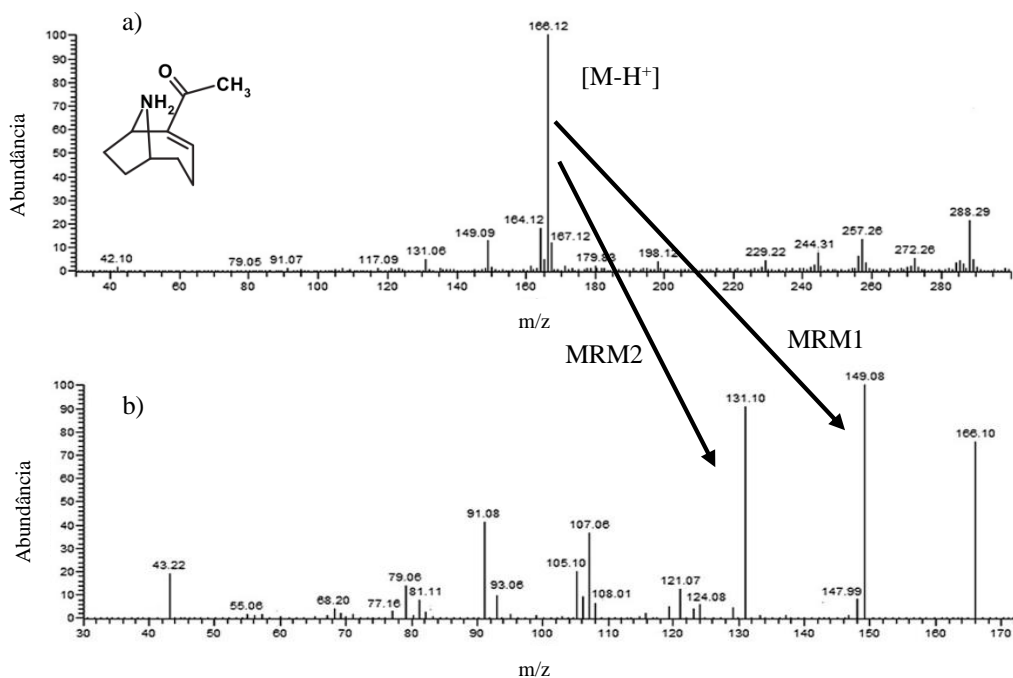


Figura 7.3: a) Espectro de massa do íon precursor da anatoxina-a no modo de ionização positivo, com uma voltagem de cone de 30 V. b) Espectro de massa resultante da fragmentação do íon precursor obtido.

A obtenção do íon precursor e dos íões produto realizou-se da mesma forma para todos os compostos em estudo, apresentando-se assim, na tabela 7.2, as informações obtidas para cada composto.

A microcistina-RR apresenta uma massa molecular de 1038,20 g/mol e um íon precursor a 521 m/z. Este é um caso particular e trata-se de um íon $[M+2H]^{2+}$.

Tabela 7.2: Condições ótimas para a obtenção do íon precursor e dos íões produto.

Cianotoxinas	ES+				
	Massa molecular (g/mol)	Íon precursor (m/z)	Voltagem de cone (V)	Íon produto (m/z)	Energia de colisão (eV)
Nodularina-R	824,96	825,6	70	135,2	50
				107,2	70
Anatoxina-a	165,23	166,1	30	149,1	10
				131,1	20
Cilindrospermopsina	415,1	416,2	40	194,2	35
				336,1	22
Homoanatoxina-a	179,26	180,1	30	57,1	20
				163,1	10
Microcistina-LA	910,06	910,7	40	135,2	60
				213	50
Microcistina-LF	986,2	986,7	40	375,2	30
				213,1	50
Microcistina-LY	1002,2	1002,7	50	135,2	70
				265,3	50
Microcistina-YR	1045,18	1045,6	65	134,9	70
				107,2	70
Microcistina-RR	1038,2	521,0	40	103	40
				135	30
Microcistina-LR	994,6	995,6	60	135,3	60
				87,2	50

2.2 Condições cromatográficas

Estabelecidas as condições de monitorização de cada analito, procedeu-se à injeção de cada solução padrão individual e da mistura no sistema UPLC-MS/MS utilizando as condições de operação aplicadas para o espectrómetro de massa (tabela 6.9), para o sistema cromatográfico (tabela 6.8) e a fase móvel II (tabela 6.1), de forma a avaliar o perfil cromatográfico, a resolução cromatográfica e determinar o tempo de retenção de cada composto (T_r) e avaliar a existência de algum tipo de interferência.

2.2.1 Seleção da coluna cromatográfica

Foram realizados alguns estudos com o objetivo de selecionar a coluna cromatográfica que permitisse analisar todas as cianotoxinas em simultâneo. As colunas C18, C8 e HILIC foram testadas com o método descrito na tabela 6.7 e a coluna HSS T3 foi testada com o método descrito na tabela 6.8.

As colunas C8 e C18 apresentam uma fase estacionária que contém cadeias alquilo ligadas à superfície da sílica, de forma a oferecer melhor estabilidade hidrolítica. As fases estacionárias com cadeias C8 são menos hidrofóbicas, proporcionando menor retenção dos compostos na coluna [79].

Com a coluna cromatográfica C18, conseguiram separar-se todos os compostos, exceto a cilindrospermopsina, que não foi retida. Esta coluna tem a capacidade de reter todos os compostos. No entanto, a cilindrospermopsina apresenta um tempo de retenção muito baixo, devido à fraca interação com a fase estacionária.

A coluna HILIC apenas conseguiu reter a anatoxina-a, a homoanatoxina-a e a cilindrospermopsina, embora com tempos de retenção muito baixos, inferiores a 1 minuto, pois estas colunas são adequadas para reter bases muito polares e os compostos ácidos, neutros, e/ou não polares terão retenção limitada, como é o caso [84].

A coluna cromatográfica HSS T3 tem características que lhe permitem reter e separar pequenos compostos orgânicos polares solúveis em água, conseguido, deste modo, a separação de todos os compostos pretendidos com uma intensidade de sinal elevada.

A elevada sensibilidade obtida com a coluna HSS T3 pode dever-se ao facto de se observar uma maior retenção dos analitos, conduzindo a uma maior eficiência de ionização no espectrómetro de massa com o aumento da percentagem de solvente orgânico na fase móvel, o que faz com que todos os analitos apresentem um tempo de retenção igual ou inferior a quatro minutos, de acordo com o método cromatográfico aplicado [85].

Na tabela 7.3 estão representadas as várias colunas utilizadas bem como os respetivos tempos de retenção e intensidades de sinal obtidas.

Tabela 7.3: Resumo dos tempos de retenção e das intensidades de sinal obtidas para as várias colunas cromatográficas.

Compostos/Tipo de Coluna	BEH C18		BEH C8		BEH HILIC		HSS T3	
	Tempo de retenção	Intensidade do sinal	Tempo de retenção	Intensidade do sinal	Tempo de retenção	Intensidade do sinal	Tempo de retenção	Intensidade do sinal
Cilindrospermopsina	-	-	0,660	1,62 x 10 ⁴	-	-	1,850	1,59 x 10 ⁶
Anatoxina-a	2,590	1,90 x 10 ⁵	3,930	1,57 x 10 ⁵	2,590	1,90 x 10 ⁵	1,940	5,62 x 10 ⁶
Homoanatoxina-a	2,990	3,41 x 10 ⁵	4,350	3,10 x 10 ⁵	2,990	3,41 x 10 ⁵	2,100	9,34 x 10 ⁶
Nodularina-R	5,730	2,10 x 10 ⁴	6,940	2,16 x 10 ⁴	5,730	2,10 x 10 ⁴	2,820	1,93 x 10 ⁶
Microcistina-LA	6,760	3,83x 10 ⁴	7,950	4,29 x 10 ⁴	6,760	3,83 x 10 ⁴	3,410	6,34 x 10 ⁵
Microcistina-LF	7,620	5,99 x 10 ³	8,750	1,06 x 10 ⁴	7,620	5,99 x 10 ³	3,720	3,34 x 10 ⁵
Microcistina-LY	6,930	2,47 x 10 ³	8,050	5,18 x 10 ³	6,930	2,47 x 10 ³	3,430	2,31 x 10 ⁵
Microcistina-RR	5,570	1,01 x 10 ⁴	6,690	9,69 x 10 ³	5,570	1,01 x 10 ⁴	2,670	5,62 x 10 ⁵
Microcistina-LR	6,080	6,23 x 10 ³	7,230	4,60 x 10 ³	6,080	6,23 x 10 ³	2,890	2,41 x 10 ⁵
Microcistina-YR	5,920	1,88 x 10 ⁴	7,090	1,34 x 10 ⁴	5,920	1,88 x 10 ⁴	2,870	4,51 x 10 ⁵

Tendo em conta os resultados obtidos, concluiu-se que a coluna que permitiu alcançar melhores resultados foi a coluna HSS T3, devido à retenção cromatográfica, pois esta foi a que permite que os compostos fossem eluídos em menor período de tempo.

Com esta coluna cromatográfica verifica-se melhor resolução e sensibilidade na análise, na medida em que é possível obter sinais com um formato mais bem definido e com intensidades mais elevadas, respetivamente.

2.2.2 Estudo do efeito da temperatura da coluna

Após a seleção da coluna, realizou-se um estudo sobre o efeito da temperatura desta, no processo cromatográfico.

Foram testadas três temperaturas diferentes, nomeadamente 30 °C, 35 °C e 40 °C.

Na figura 7.4 estão representados os três cromatogramas obtidos para um dos compostos em estudo, a cilindrospermopsina.

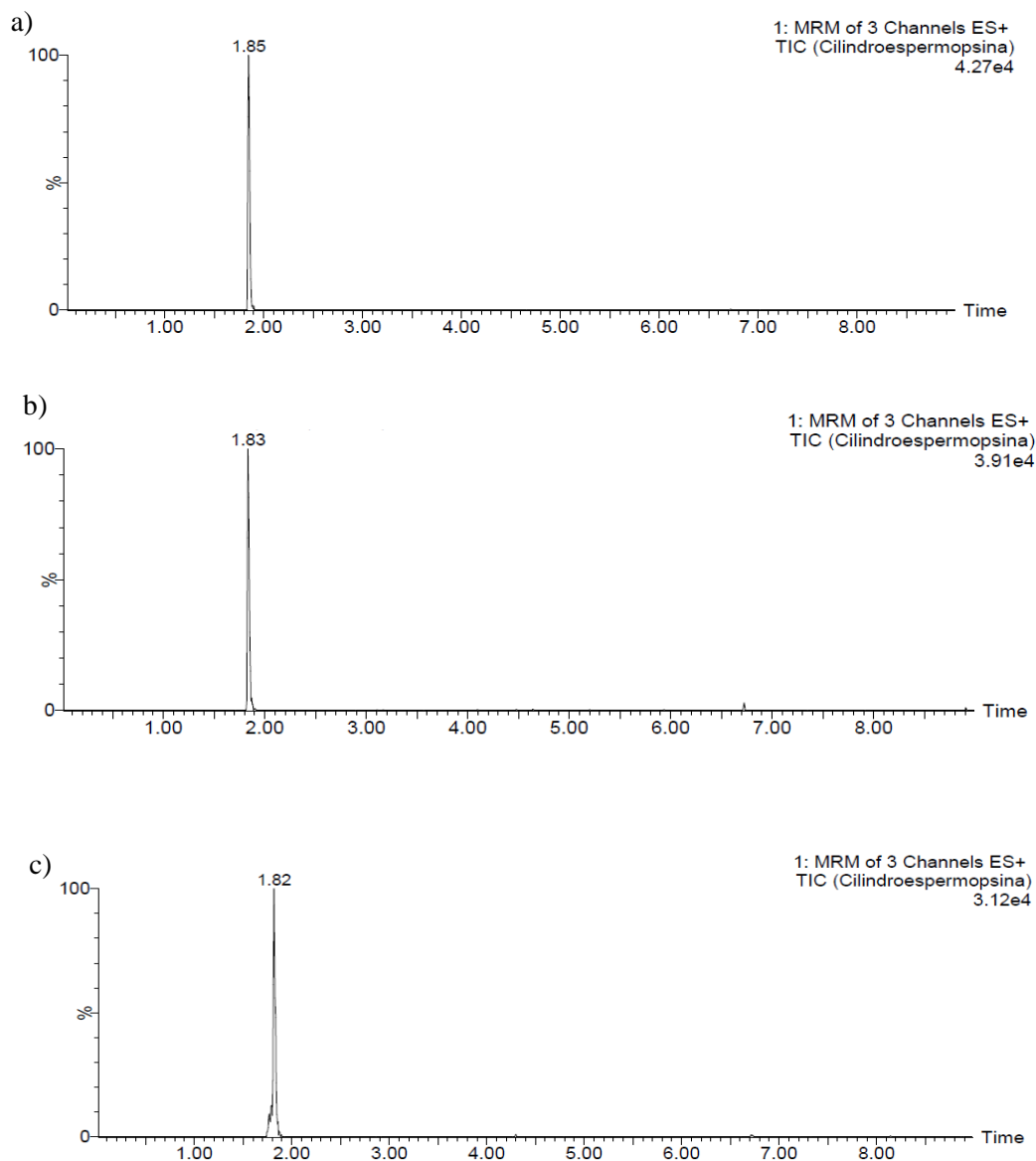


Figura 7.4: Cromatogramas representativos do efeito da temperatura da coluna no tempo de retenção e intensidade dos picos obtidos. a) 30 °C, b) 35, c) 40 °C.

Através dos resultados obtidos pode afirmar-se que o tempo de retenção e a intensidade de sinal diminuem com o aumento da temperatura da coluna. Verifica-se também que a área correspondente ao sinal foi alargada e o pico se torna mais largo com o aumento desta.

A seletividade e a eficiência cromatográfica são dois parâmetros influenciados pela temperatura. Com o aumento da temperatura, a viscosidade é reduzida e a velocidade de difusão aumenta fazendo com que a velocidade de transferência de massa entre a fase estacionária e a fase móvel aumente, aumentando também a eficiência, tornando possível diminuir substancialmente o tempo de análise [104].

Após a análise dos resultados obtidos para as três temperaturas concluiu-se que a temperatura de trabalho ideal seria 35 °C. Foi rejeitada a temperatura de 30 °C por ser a que apresenta tempos de retenção ligeiramente mais elevados.

A temperatura de 40 °C foi excluída pois temperaturas elevadas reduzem o tempo de vida útil da coluna, uma vez que o uso de água na fase móvel associado a temperaturas elevadas favorece a ocorrência de hidrólise e, conseqüentemente, perda da fase estacionária (sílica) [104].

3. Validação do método UPLC-MS/MS

3.1 Estudo da linearidade

Na validação de um método, a fase inicial consiste no estudo de linearidade. Para proceder a esse estudo foram analisadas soluções conjuntas de diferentes concentrações, preparadas por diluições de padrões comerciais (de acordo com a descrição em 4.4.5).

O estudo da linearidade foi dividido em duas partes, nomeadamente em gama baixa e gama alta. A gama baixa inclui padrões com concentrações entre 0,4 µg/L e 8 µg/L e a gama alta inclui padrões que variam entre 15,4 µg/L e 114,3 µg/L.

A linearidade pode ser analisada recorrendo a um conjunto de testes estatísticos. Compreende a análise com base em retas de calibração, relacionando o sinal obtido experimentalmente, ou seja, a área do pico em função da concentração do padrão. O intervalo de linearidade para cada um dos compostos foi definido recorrendo ao seguinte conjunto de testes estatísticos: o método dos mínimos quadrados (Anexo 1), a análise de resíduos (Anexo 2), o teste das áreas normalizadas (Anexo 3), o teste de RIKILT (Anexo 4) e o teste de Mandel (Anexo 5).

Os resultados iniciais dos testes estatísticos aplicados para o estudo da linearidade encontram-se na tabela 7.4, que está dividida em duas gamas diferentes, nomeadamente gama alta e gama baixa.

O critério interno de aceitação para o valor de coeficiente de determinação é de $r^2 \geq 0,990$, representativo da relação entre a concentração e o sinal. Com base apenas neste critério de aceitação a gama de concentrações estudada cumpre o valor limite estipulado para a maioria dos compostos, exceto para a cilindrospermopsina que apresenta baixa linearidade em gama alta, no entanto, os critérios de aceitação dos restantes testes estatísticos não foram inicialmente satisfeitos.

De forma a cumprir os critérios de aceitação estabelecidos, para os testes estatísticos aplicados é necessário o ajuste do intervalo de concentrações da gama de trabalho.

O ajuste da gama de trabalho e os respetivos resultados obtidos para cada teste estatístico estão representados na tabela 7.5.

Tabela 7.4: Resultados do estudo inicial da linearidade e respetiva aplicação dos testes estatísticos.

Composto	Gama de trabalho (µg/L)	R ²	Coefficiente de variação (%)	Análise de Resíduos (%)	Teste de Rikilt (90-110) %	Teste de Mandel (VT<F)	Teste das áreas normalizadas (85-115)	
Gama baixa	Cilindrospermopsina	0,4-8,0	0,9994	2,16	-12,8 → 3,3	88→104	VT= 4,15 F=5,32	97,7 → 116,3
	Anatoxina	0,4-8,0	0,9989	2,07	-11,4 → 3,2	91→108	VT= 6,14×10 ⁻¹ F=5,32	90,0 → 102,3
	Homoanatoxina	0,4-8,0	0,9997	1,57	-2,7 → 10,5	83→107	VT= 9,50 F=5,32	100,0 → 129,1
Gama alta	Cilindrospermopsina	15,4-114,3	0,8657	24,99	-37,4 → 22,6	68→117	VT= 8,05×10 ⁺¹ F=5,99	98,5 → 168,9
	Anatoxina	15,4-114,3	0,9988	2,24	-7,4 → -3,5	81→134	VT= 6,45 F=5,99	66,6 → 114,0
	Homoanatoxina	15,4-114,3	0,9984	2,55	-5,6 → 2,0	86→124	VT= 3,21 F=5,99	70,1 → 101,1
	Nodularina	15,4-114,3	0,9999	0,73	-1,7 → 0,9	98→103	VT= 5,34 F=5,99	75,4 → 100,0
	Microcistina LA	15,4-114,3	0,9996	1,22	-2,2 → 2,1	96→103	VT= 2,29×10 ⁻⁵ F=5,99	94,6 → 102,0
	Microcistina LF	15,4-114,3	0,9929	5,35	-17,4 → 8,1	79→126	VT= 5,14 F=5,99	100,0 → 160,3
	Microcistina LR	15,4-114,3	0,9986	2,38	-3,5 → 5,9	94→106	VT= 1,46×10 ⁻² F=5,99	88,3 → 100,0
	Microcistina RR	15,4-114,3	0,9994	1,56	-3,8 → 4,4	83→107	VT= 2,35×10 ⁻² F=5,99	99,4 → 128,9
	Microcistina YR	15,4-114,3	0,9987	2,30	-2,8 → 3,0	84→109	VT= 1,72×10 ⁻¹ F=5,99	77,1 → 100,0
	Microcistina LY	15,4-114,3	0,9914	5,90	-13,2 → 12,3	85→123	VT= 1,11 F=5,99	73,9 → 110,3

Tabela 7.5: Resultados obtidos no estudo da linearidade após ajuste dos testes estatísticos aplicados.

Composto	Gama de trabalho (µg/L)	R ²	Coefficiente de variação (%)	Análise de Resíduos (%)	Teste de Rikilt (90-110) %	Teste de Mandel (VT<F)	Teste das áreas normalizadas (85-115)
Gama baixa	Cilindrospermopsina	0,80-4,00	0,9997	1,19	-2,5 → 3,1	97→101 VT= 4,47×10 ⁻¹ F=10,13	99,4 → 103,3
	Anatoxina	0,40-4,00	0,9993	2,07	-5,5 → 3,9	94→106 VT= 3,48×10 ⁻¹ F=6,61	90,0 → 100,0
	Homoanatoxina	0,60-4,00	0,9988	2,50	-2,5 → 8,0	94→107 VT= 6,88 F=7,71	92,4 → 104,7
Gama alta	Cilindrospermopsina	15,4-55,27	0,9993	1,43	-2,5 → 2,2	97→102 VT= 7,24 F=18,51	98,5 → 104,1
	Anatoxina	22,6-114,3	0,9989	1,83	-3,1 → 3,5	94→108 VT= 1,77 F=6,61	88,4 → 101,9
	Homoanatoxina	29,0-100,0	0,9963	2,81	-2,6 → 2,7	90→110 VT= 1,60 F=10,13	88,2 → 111,7
	Nodularina	15,4-114,3	0,9999	0,73	-1,7 → 0,9	98→103 VT= 5,34 F=5,99	95,2 → 100,4
	Microcistina LA	15,4-114,3	0,9996	1,22	-2,2 → 2,1	96→103 VT= 2,29×10 ⁻⁵ F=5,99	94,6 → 102,0
	Microcistina LF	42,9-114,3	0,9984	1,58	-1,7 → 1,5	94→110 VT= 1,53 ×10 ⁻¹ F=10,13	91,5 → 107,1
	Microcistina LR	15,4-114,3	0,9986	2,38	5,9 → - 3,5	94→106 VT= 1,46×10 ⁻² F=5,99	88,3 → 100,0
	Microcistina RR	22,6-114,3	0,9992	1,54	-3,9 → 4,1	92→105 VT= 8,77×10 ⁻² F=6,61	99,4 → 114,1
	Microcistina YR	22,6-114,3	0,9983	2,28	- 2,8 → 3,0	90→107 VT= 2,03×10 ⁻¹ F=6,61	89,2 → 106,4
	Microcistina LY	42,9-114,3	0,9984	1,57	-1,6 → 1,4	95→108 VT= 6,12×10 ⁻² F=10,13	100,0 → 114,5

A cilindrospermopsina, a anatoxina-a e a homoanatoxina-a apresentaram linearidade em gama baixa. O primeiro padrão da gama de linearidade para estes três compostos é inferior a 1 µg/L, cumprindo o valor recomendado pela OMS.

Assim sendo, foi possível analisar estes três compostos através de um método de injeção direta, que será abordado mais à frente.

O limite de quantificação corresponde ao início da gama de trabalho em que o coeficiente de variação do sinal se reduziu a valores razoáveis (normalmente 10 %) para se poder efetuar uma análise quantitativa. Verificou-se que todas as cianotoxinas apresentaram um valor inferior a este.

De acordo com a análise de resíduos, estes apresentam um desvio inferior a 15%, cumprindo assim os critérios para a existência de linearidade, o que também se verifica na aplicação do teste de Rikilt, observando-se uma variação entre 90% e 110%.

Relativamente ao teste de Mandel, verifica-se, para todos os compostos, que $VT < F$, logo a função de calibração polinomial é linear e conduz a um bom ajuste dos pontos experimentais.

Para admitir a existência de linearidade para uma determinada gama de concentração, definiu-se que os valores normalizados não podem ter um desvio superior a 15%, devendo estar compreendidos entre 85 e 115%, o que se verifica para todas as cianotoxinas.

A título de exemplo, a figura 7.5 ilustra a aplicação dos testes estatísticos, utilizados no estudo inicial da linearidade para uma das cianotoxinas em estudo, a microcistina YR, com um intervalo de concentrações entre 15,4 $\mu\text{g/L}$ a 114,3 $\mu\text{g/L}$ e a figura 7.6 apresenta a sequência dos testes aplicados à microcistina YR após ajuste do intervalo de concentrações, cumprindo os respetivos critérios de aceitação.

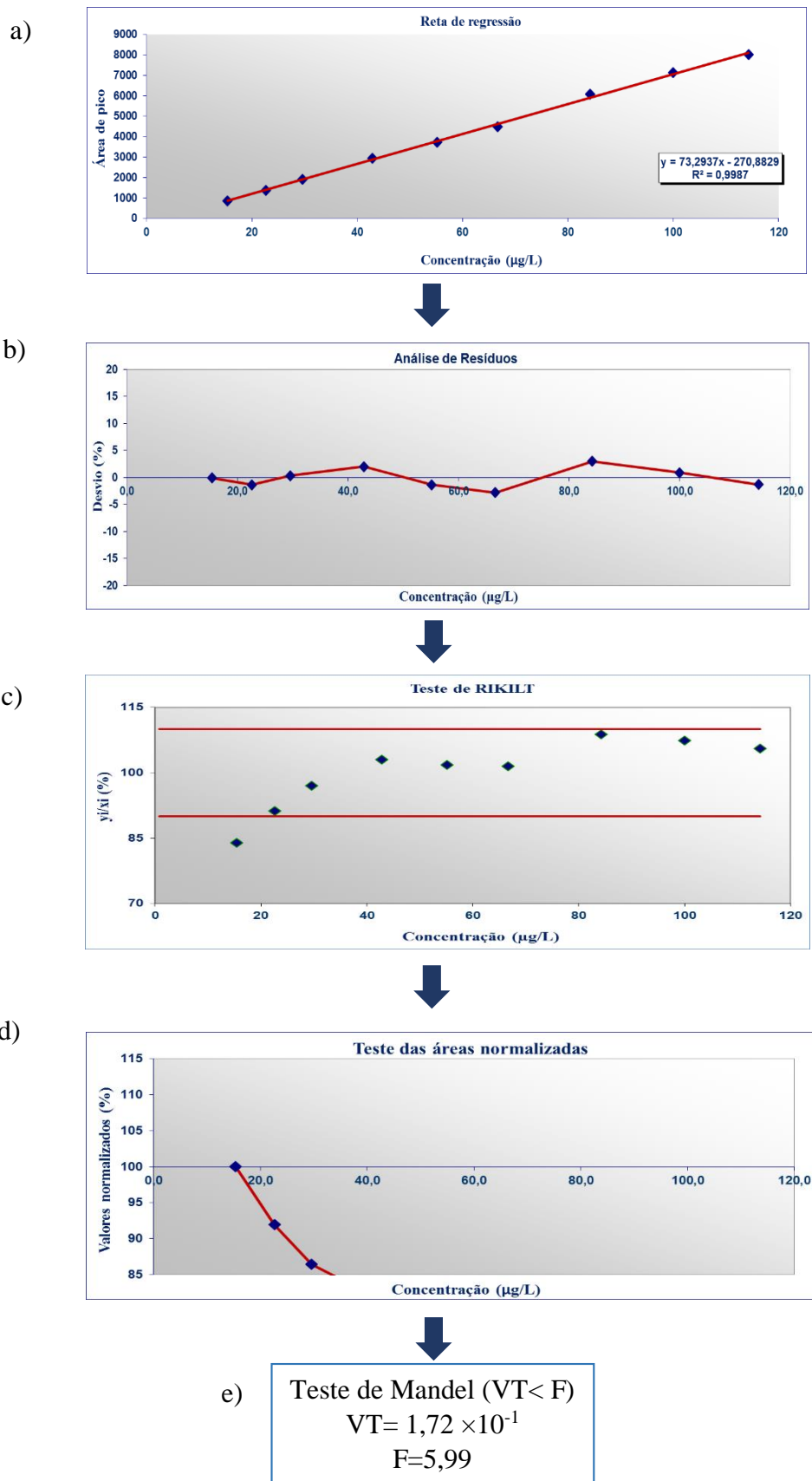


Figura 7.5: Resultados iniciais da gama total de concentrações estudada para a microcistina YR: a) aplicação do método dos mínimos quadrados, b) análise de resíduos, c) Teste de RIKILT, d) Teste das áreas normalizadas e e) Teste de Mandel.

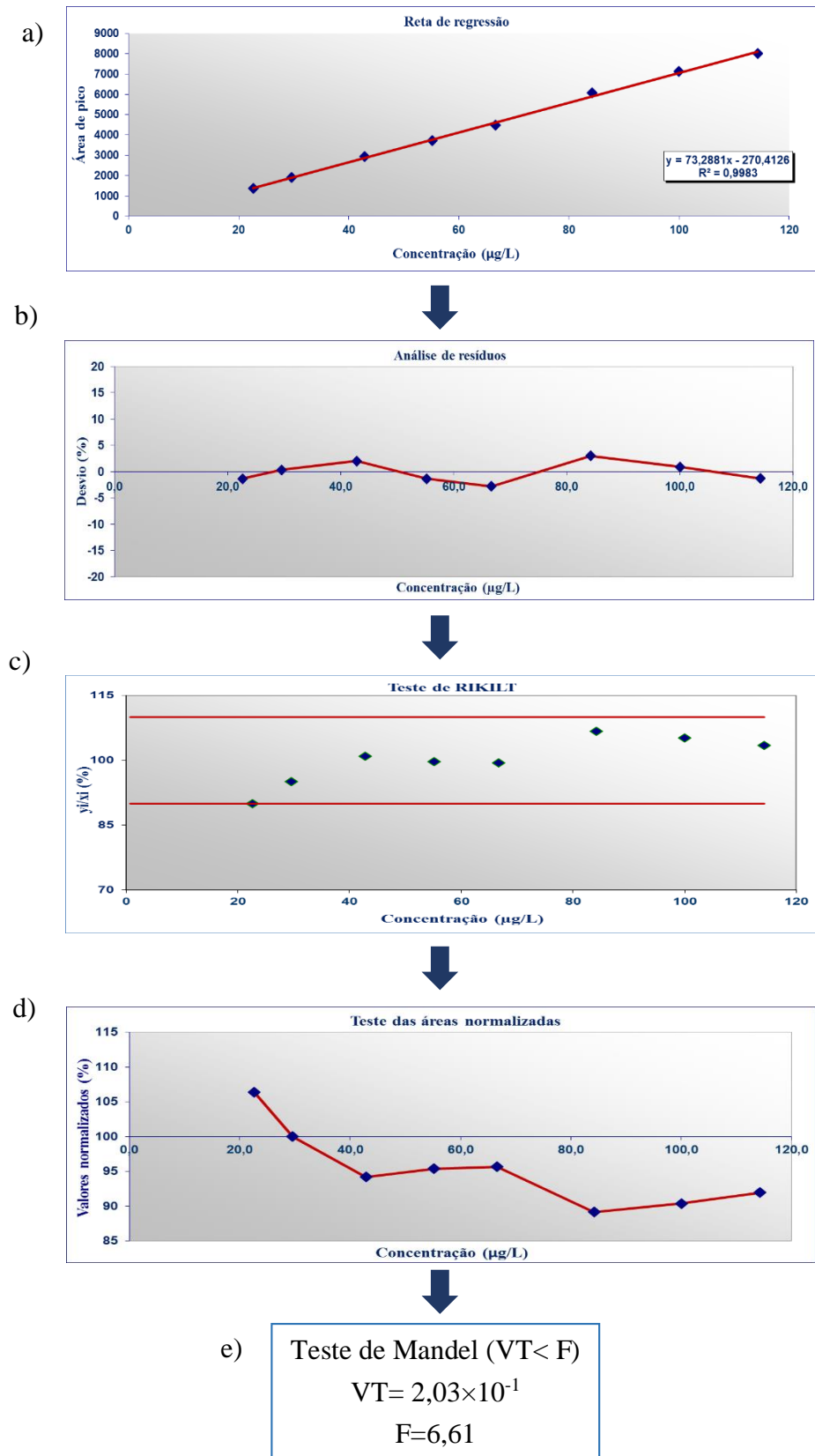


Figura 7.6: Resultados finais obtidos para a microcistina YR após ajuste dos testes estatísticos: a) aplicação do método dos mínimos quadrados, b) análise de resíduos, c) Teste de RIKILT, d) Teste das áreas normalizadas e e) Teste de Mandel.

3.2 Limiares analíticos instrumentais

O estudo dos limiares analíticos consiste na determinação do limite de deteção (LD) e do limite de quantificação (LQ). Os mesmos foram determinados para cada uma das cianotoxinas em estudo com base no desvio padrão residual da curva de calibração e com base em estudos de precisão obtidos em condições de repetibilidade (tabela 7.6).

Os limites de quantificação determinados a partir dos diferentes métodos são iguais ou inferiores ao primeiro ponto da curva de calibração, cumprindo o requisito de que a concentração do primeiro padrão do intervalo de linearidade seja igual ou superior ao LQ, confirmando que a gama de trabalho está bem ajustada. No entanto, os LQ inferiores ao primeiro ponto da curva de calibração são meramente teóricos, uma vez que a quantificação só pode ser realizada na gama de concentrações do intervalo de linearidade, de forma a garantir valores exatos.

Tabela 7.6: Limiares analíticos do método UPLC-MS/MS, determinados com base no desvio padrão residual da reta de calibração e em condições de repetibilidade.

Composto	Gama de linearidade ($\mu\text{g/L}$)	Reta de calibração		Repetibilidade (n=5)	
		LD ($\mu\text{g/L}$)	LQ ($\mu\text{g/L}$)	LD ($\mu\text{g/L}$)	LQ ($\mu\text{g/L}$)
Cilindrospermopsina	0,80-4,00	0,10	0,30	0,20	0,70
Anatoxina	0,40-4,00	0,10	0,40	0,10	0,20
Homoanatoxina	0,60-4,00	0,10	0,50	0,10	0,30
Cilindrospermopsina	15,4-55,3	1,4	4,8	1,3	4,3
Anatoxina	22,6-114,3	3,5	11,8	1,3	4,4
Homoanatoxina	29,0-100,0	5,3	17,7	1,8	6,2
Nodularina	15,4-114,3	1,3	4,3	2,4	7,2
Microcistina LA	15,4-114,3	2,2	7,2	1,0	3,4
Microcistina LF	42,9-114,3	3,7	12,2	6,8	22,7
Microcistina LR	15,4-114,3	4,2	14,0	3,8	12,6
Microcistina RR	22,6-114,3	3,0	9,9	1,8	6,0
Microcistina YR	22,6-114,3	4,4	14,7	1,9	6,5
Microcistina LY	42,9-114,3	3,6	12,1	6,8	22,6

Através da análise da tabela 7.6 verifica-se que os limites de deteção e quantificação mais elevados pertencem à microcistina LR e YR, quando estes são determinados com base no desvio padrão residual da curva de calibração, enquanto que em condições de repetibilidade, as microcistinas LF e LY são as que apresentam valores mais elevados.

No entanto, os valores estipulados de acordo com o Decreto-Lei nº 306/2007, de 27 de Agosto, para a microcistina-LR são bastante inferiores, nomeadamente na ordem de 1 $\mu\text{g/L}$. Posto isto, é de extrema importância realizar o método de preparação como etapa de concentração prévia à análise cromatográfica, para os compostos com LQ superior a 1 $\mu\text{g/L}$, de forma a aumentar significativamente a sensibilidade do método.

Apenas existe valor definido na legislação para a microcistina-LR. Assim, para os restantes compostos, considerou-se esse valor como referência.

3.3 Razão MRM1/MRM2

A identificação de cianotoxinas em amostras de água é efetuada com base na comparação de tempos de retenção e na razão entre o sinal da transição MRM1 e o sinal da transição MRM2. Contudo este critério só pode ser utilizado caso se verifique que a razão entre os sinais provenientes das duas transições é estável ao longo da gama de linearidade definida. Desta forma, estudou-se para cada composto e ao longo do intervalo de linearidade, a variabilidade da razão MRM1/MRM2 (tabela 7.7).

A microcistina-LR é a cianotoxina que apresenta uma variabilidade de razão MRM1/MRM2 maior, com um coeficiente de variação de 16,6%. Para todos os outros compostos a variação da razão MRM1/MRM2 ao longo da gama de trabalho é inferior a 10%, resultando em coeficientes de variação entre 0,5% e 7,9%.

Tabela 7.7: Variabilidade da razão MRM1/MRM2 ao longo do intervalo de linearidade para cada um dos compostos.

Composto	N	Intervalo de linearidade (µg/L)	Média MRM1/MRM2	CV (%)
Cilindrospermopsina	6	0,8-4,0	2,7	7,6
Anatoxina	8	0,4-4,0	2,2	7,0
Homoanatoxina	7	0,6-4,0	7,5	7,9
Cilindrospermopsina	5	15,4-55,2	2,8	2,3
Anatoxina	8	22,6-114,3	1,7	1,3
Homoanatoxina	6	29,0-100,0	6,3	0,8
Nodularina	9	15,4-114,3	2,3	2,8
Microcistina LA	9	15,4-114,4	1,7	1,4
Microcistina LF	6	42,9-114,3	1,3	0,5
Microcistina LR	9	15,4-114,4	15,1	16,6
Microcistina RR	8	22,6-114,3	1,9	2,3
Microcistina YR	8	22,6-114,3	3,0	2,4
Microcistina LY	6	42,9-114,3	2,8	2,9

3.4 Precisão

A precisão instrumental foi avaliada em condições de repetibilidade (n=5). Por análise dos valores obtidos para a precisão instrumental, referidos na Tabela 7.8, conclui-se que o método cromatográfico apresenta uma boa repetibilidade, admitindo 3,92% como coeficiente de variação mais elevado na gama de concentração mais baixa e 7,33% como coeficiente de variação mais elevado na gama de concentração mais alta. De uma forma geral, para valores de concentração inferiores da gama de trabalho associam-se valores de coeficientes de variação superiores, como previsto.

Tabela 7.8: Estudo da precisão instrumental do método, em termos de repetibilidade, na gama de trabalho (n=5).

Composto	Concentração inferior da gama (µg/L)	CV (%)	Concentração superior da gama (µg/L)	CV (%)
Cilindrospermopsina	0,8	3,51	4,0	1,67
Anatoxina	0,4	3,26	4,0	0,75
Homoanatoxina	0,6	3,92	4,0	1,73
Cilindrospermopsina	15,4	3,26	55,3	2,84
Anatoxina	22,6	2,17	114,3	1,99
Homoanatoxina	29,0	1,65	100,0	1,06
Nodularina	15,4	2,24	114,3	1,17
Microcistina LA	15,4	0,75	114,3	0,55
Microcistina LF	42,9	1,65	114,3	0,94
Microcistina LR	15,4	7,33	114,3	3,79
Microcistina RR	22,6	3,36	114,3	1,1
Microcistina YR	22,6	3,99	114,3	2,38
Microcistina LY	42,9	0,44	114,3	2,38

4. Estudos de recuperação

4.1 Método de injeção direta na análise de cianotoxinas

Foram avaliadas as taxas de recuperação em matrizes reais para três compostos, através de um método de injeção direta.

Para a realização deste método, seguiu-se o procedimento descrito no ponto 7 do capítulo VI, onde se prepararam quatro níveis de fortificação, como descrito na tabela 6.10.

Como referido anteriormente, foi possível conceber um método direto para a cilindropermopsina, para a homoanatoxina-a e para a anatoxina, uma vez que estes três compostos apresentam limites de detecção e quantificação inferiores ao limite recomendado pela Organização Mundial de Saúde, que é de 1 µg/L.

De acordo com a análise da figura 7.7, verifica-se que para os três compostos analisados e para as três matrizes diferentes se obtêm percentagens de recuperação entre 65% e 100%, aproximadamente, representando valores bastante aceitáveis para poder analisar estas cianotoxinas por injeção direta, rentabilizando assim esta análise, uma vez que não é necessário qualquer tipo de extração prévia da amostra.

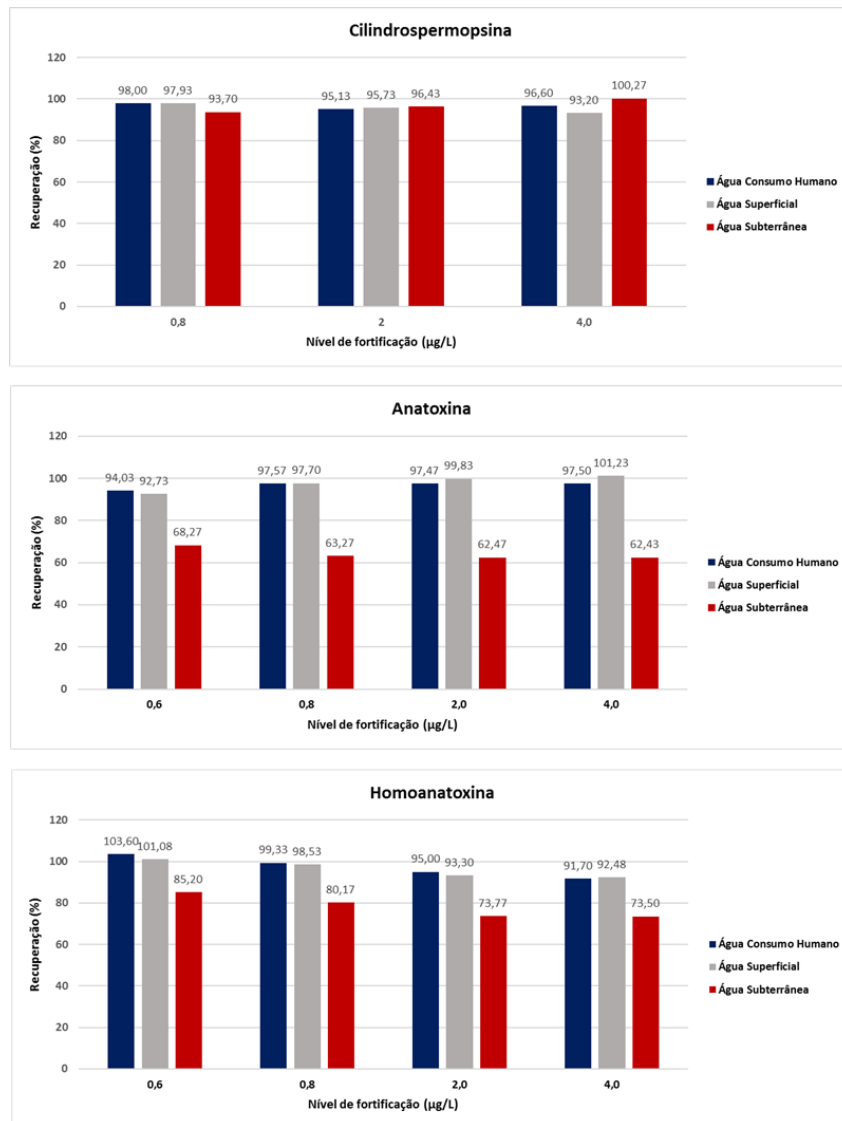


Figura 7.7: Percentagens de recuperação obtidas para os três compostos analisados por injeção direta, para três matrizes diferentes.

Os ensaios de recuperação foram realizados em condições de precisão intermédia, para as diferentes matrizes. Na tabela 7.9 estão representados os coeficientes de variação (C_V) obtidos para os diferentes compostos, em diferentes matrizes.

Tabela 7.9: Coeficientes de variação (%) obtidos para os compostos nas diferentes matrizes, através da análise por injeção direta.

Matriz	Coeficiente de variação (%)											
	Água de consumo humano				Água superficial				Água subterrânea			
	0,6 µg/L	0,8 µg/L	2 µg/L	4 µg/L	0,6 µg/L	0,8 µg/L	2 µg/L	4 µg/L	0,6 µg/L	0,8 µg/L	2 µg/L	4 µg/L
Cilindrospermopsina	-	7,36	4,99	3,43	-	20,40	12,62	11,44	-	6,36	6,22	4,28
Anatoxina-a	10,96	14,21	11,66	11,80	11,34	10,10	15,19	16,10	11,88	16,02	4,25	4,79
Homoanatoxina-a	5,54	6,85	6,70	7,58	7,77	4,80	5,74	6,26	10,03	10,31	10,14	8,63

Os coeficientes de variação mais elevados, como por exemplo os C_V superiores a 20% estão relacionados com a variação global do método, desde a preparação das soluções, heterogeneidade das amostras, efeitos de matriz e análise instrumental, nomeadamente o passo de ionização.

4.2 Otimização do método de extração em fase sólida

Para otimização da técnica de SPE, seguiu-se o protocolo de análise descrito no ponto 8 do capítulo VI.

Para a realização da técnica de SPE procedeu-se à otimização de algumas condições, tais como o cartucho a utilizar bem como o solvente de eluição que permite obter melhores recuperações.

4.2.1 Seleção do cartucho

Para a seleção do cartucho que proporcionasse melhor eficiência na extração foram testados os seguintes: Bond Elut-ENV, ENVI-Carb, C18 Isolute e Oasis HLB. Testaram-se também várias condições instrumentais de forma a otimizar o método para alcançar melhor recuperação dos compostos em estudo.

Os ensaios foram realizados de acordo com o ponto 8.1, descrito no capítulo do procedimento experimental, onde os cartuchos foram estudados com a matriz água ultra-pura, água acidificada com H_2SO_4 e água com tiosulfato de sódio, para concluir quais as condições que permitem obter melhores resultados.

Na figura 7.8 estão representados os gráficos obtidos para os diferentes cartuchos testados.

Através da análise desses mesmos gráficos, verifica-se que os cartuchos Bond Elut-ENV retêm a maioria dos compostos, exceto a cilindrospermopsina, enquanto que os cartuchos ENVI-Carb apenas apresentam recuperações razoáveis para a cilindrospermopsina, para a anatoxina e para a homoanatoxina.

Tanto os cartuchos C18 como o Oasis HLB apresentam boas taxas de recuperação para a maioria dos compostos, exceto para a cilindrospermopsina.

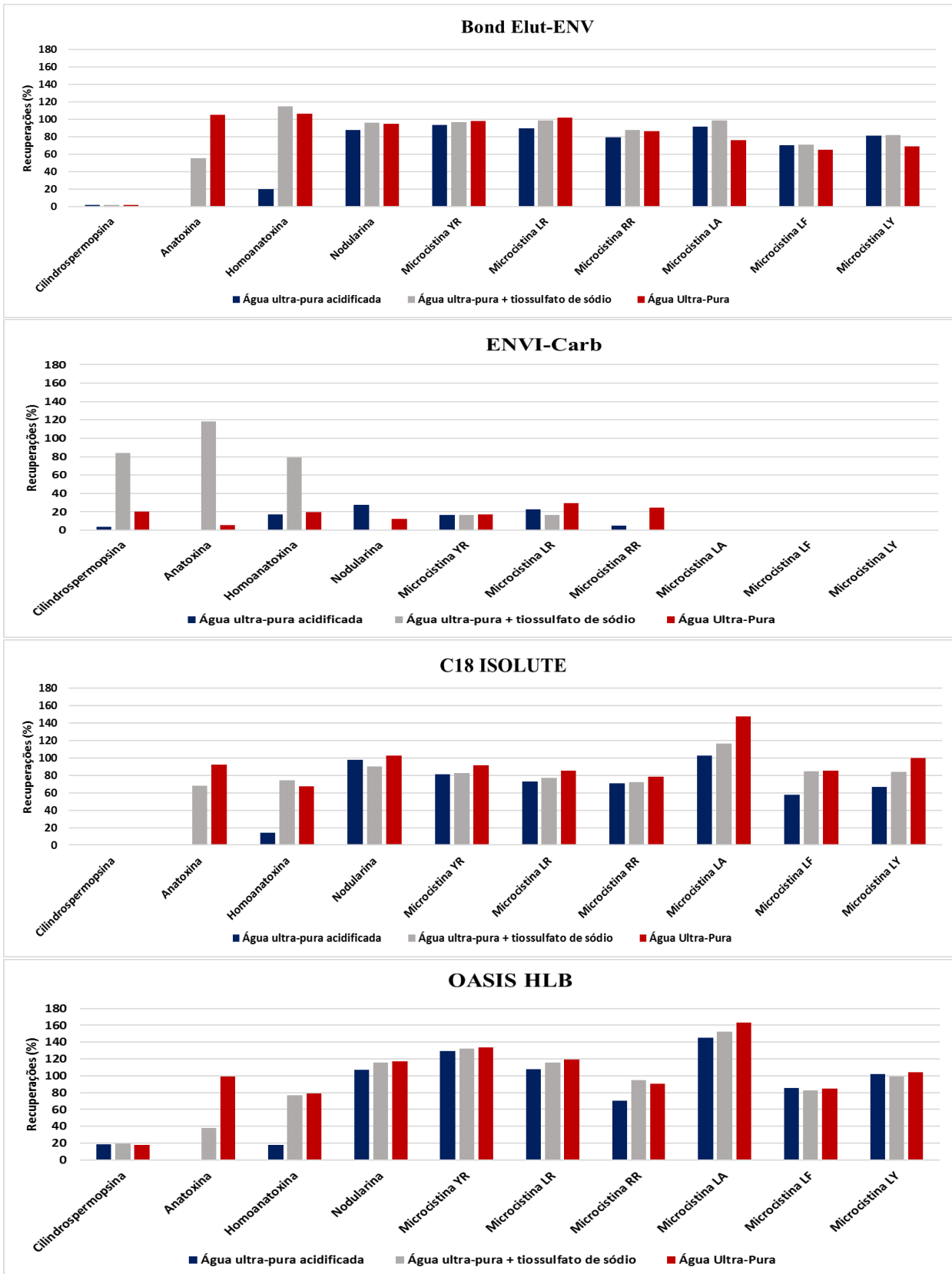


Figura 7.8: Recuperações obtidas para os diferentes cartuchos, utilizando água ultrapura acidificada, água ultrapura com tiosulfato de sódio e água ultrapura.

De acordo com os resultados obtidos, o cartucho selecionado para prosseguir este estudo foi o cartucho C18 Isolute, utilizando amostras de água contendo tiosulfato de sódio, pois este cartucho apresenta taxas de recuperação razoáveis bem como valores de coeficiente de variação aceitáveis. Este composto é utilizado na análise de águas potáveis, com o intuito de inibir a ação do cloro presente, evitando assim o efeito oxidante deste composto.

O cartucho Bond Elut-ENV, que também apresenta boas recuperações, foi rejeitado pois apresentou um elevado coeficiente de variação nos resultados obtidos e o cartucho Oasis HLB foi rejeitado pois verificaram-se recuperações superiores a 120%, para alguns compostos.

Na tabela 7.10 é possível observar os diversos coeficientes de variação obtidos para os diferentes compostos, com os diferentes solventes de eluição, nomeadamente água ultra-pura acidificada ($H_2O + H_2SO_4$), água ultra-pura com tiosulfato de sódio ($H_2O + Na_2S_2O_3$) e água ultra-pura (H_2O UP).

Tabela 7.10: Coeficientes de variação (%) obtidos para os compostos nas diferentes matrizes e com diferentes cartuchos.

Tipo de cartucho	Coeficiente de variação (%)											
	Bond Elut-ENV			ENVI-Carb			C18 Isolute			OASIS HLB		
Analito/Solvente de eluição	H ₂ O + H ₂ SO ₄	H ₂ O + Na ₂ S ₂ O ₃	H ₂ O UP	H ₂ O + H ₂ SO ₄	H ₂ O + Na ₂ S ₂ O ₃	H ₂ O UP	H ₂ O + H ₂ SO ₄	H ₂ O + Na ₂ S ₂ O ₃	H ₂ O UP	H ₂ O + H ₂ SO ₄	H ₂ O + Na ₂ S ₂ O ₃	H ₂ O UP
Cilindropermopsina	32,7	11,4	22,7	17,2	0,9	9,9	39,8	113,9	71,3	3,0	6,9	2,4
Anatoxina-a	n/a	7,3	14,3	n/a	6,4	69,5	n/a	7,3	7,1	n/a	6,0	3,2
Homoanatoxina-a	13,1	5,9	15,3	11,7	1,1	6,7	5,3	5,9	10,5	0,7	2,9	0,8
Nodularina	12,0	5,1	2,9	23,4	425,5	11,2	8,0	5,1	2,0	2,1	3,3	2,5
Microcistina-YR	4,4	6,7	3,8	0,2	0,3	0,5	12,9	3,6	5,6	4,44	4,1	3,4
Microcistina-LR	12	5,7	5,0	9,3	0,9	3,8	12,6	4,0	2,6	3,4	2,2	4,5
Microcistina-RR	11,8	7,1	7,7	68,3	n/a	17,5	4,0	5,4	7,0	5,1	2,4	3,0
Microcistina-LA	17,5	10,4	43,2	n/a	n/a	n/a	8,8	3,6	12,1	8,2	4,7	3,4
Microcistina-LF	32,0	12,1	44,6	n/a	n/a	n/a	15,8	16,4	26,1	9,2	9,9	6,7
Microcistina-LY	20,7	8,4	40,4	n/a	n/a	n/a	13,9	8,9	17,0	8,6	4,4	3,9

4.3 Análise de diferentes matrizes de água com realização de etapa de SPE

Após proceder à escolha do cartucho adequado, foram analisadas diferentes matrizes de água, em que se realizou uma etapa de concentração da amostra através da técnica de extração em fase sólida.

As condições utilizadas nos estudos das recuperações estão descritas na tabela 6.11 do capítulo VI e os níveis de fortificação realizados estão descritos mais detalhadamente no ponto 8.2, do capítulo VI.

O método de SPE otimizado foi aplicado a amostras representativas das diferentes matrizes de água que constituem o sistema de abastecimento da EPAL, nomeadamente, água para consumo humano, água superficial e água subterrânea

De acordo com a análise de resultados registados na figura 7.9, confirma-se que a cilindropermopsina não é retida, como referido anteriormente para a matriz “água ultrapura”.

A anatoxina e a homoanatoxina apenas apresentam valores de taxas de recuperação superiores a 60% para a matriz “água superficial”. Para as outras matrizes verificam-se valores muito baixos.

Para os restantes compostos, nomeadamente para a microcistina YR, LR, LA, LF e LY obtiveram-se valores de taxas de recuperação, para algumas matrizes, muito superiores a 120%.

Tanto os valores muito baixos como os valores muito elevadas de taxas de recuperação podem ter sido provocados por efeitos de matriz.

Os efeitos de matriz podem ser provocados pelo facto de se utilizar um processo de ionização por *electrospray* (ESI). Estes efeitos de matriz estão relacionados com compostos presentes na amostra que poderão suprimir ou aumentar o sinal dos compostos-alvo, podendo ser responsáveis por dados pouco reprodutíveis ou exatos.

Embora não se conheçam exatamente os mecanismos responsáveis pelos efeitos de matriz, é geralmente aceite que os compostos presentes na matriz co-eluem com os compostos alvo, podendo influenciar a intensidade do sinal devido à sua participação no processo de ionização [105].

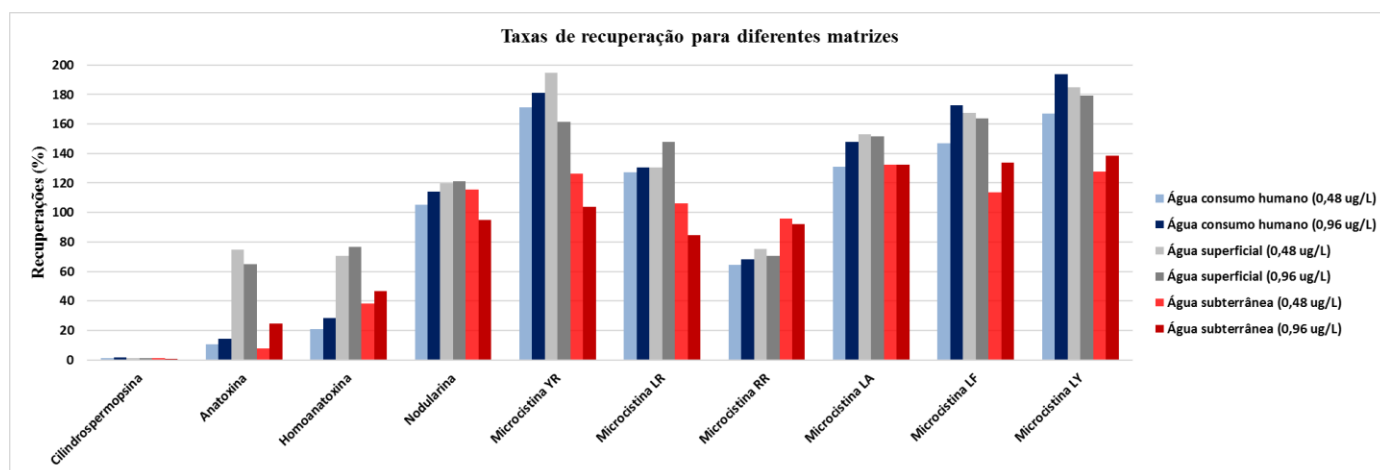


Figura 7.9: Taxas de recuperação obtidas para as cianotoxinas, em diferentes matrizes de água.

4.4 Efeitos de matriz

De forma a comprovar se as taxas de recuperação obtidas tinham como principal justificação os efeitos de matriz derivados do processo de ionização, a calibração foi realizada com padrões preparados em matriz ajustada no extrato das diferentes matrizes. Os padrões utilizados foram preparados de acordo com o ponto 4.6.3, capítulo VI e as amostras fortificadas estão descritas no ponto 8.3 desse mesmo capítulo.

Os resultados obtidos para as cianotoxinas, em matriz ajustada, estão representados na figura 7.10.

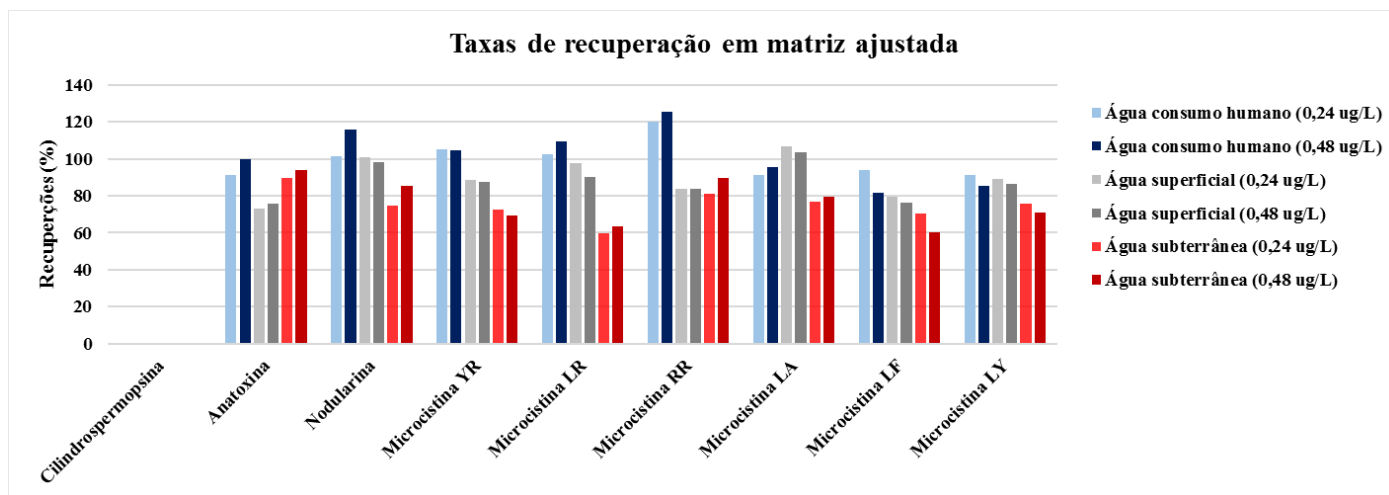


Figura 7.10: Taxas de recuperação obtidas para as cianotoxinas, quantificadas em matriz ajustada.

Por observação da figura 7.10, verifica-se que aplicando esta metodologia, é possível obter taxas de recuperação superiores a 60 % para todas as matrizes, tanto para o nível de concentração de 0,24 $\mu\text{g/L}$ como para o nível de 0,48 $\mu\text{g/L}$. Estas taxas de recuperação não ultrapassam os 125%, o que comprova que os resultados obtidos anteriormente (sem curva de calibração em matriz ajustada) foram influenciados por efeitos de matriz.

Verifica-se que a água de consumo humano é a matriz que apresenta taxas de recuperações mais elevadas, para a maioria dos compostos.

Desta forma, pode considerar-se que o método de preparação da amostra otimizado permite a extração simultânea de 9 compostos nas matrizes estudadas. Embora a homoanatoxina-a não tenha sido testada no método em matriz ajudada devido a rutura de *stock* do padrão comercial, pelos resultados obtidos para as restantes cianotoxinas, conclui-se que este método também seria possível de aplicar a este composto.

Este estudo permite também concluir que a quantificação dos compostos alvo não poderá ser realizada unicamente por calibração instrumental com padrões preparados em solvente, o que iria originar a obtenção de resultados pouco exatos, devido a efeitos de matriz.

No caso em que as cianotoxinas sofrem supressão iónica, a sua quantificação seria por defeito e haveria uma maior probabilidade de falsos negativos. No caso de enriquecimento iónico, a quantificação seria por excesso, podendo existir falsos positivos.

Segurança e Ambiente

As instalações e condições ambientais existentes nos laboratórios da EPAL visam assegurar as condições necessárias a um bom funcionamento dos laboratórios de ensaio, proporcionando segurança e bem-estar aos profissionais e tentando minimizar a possibilidade de acidente.

Os locais de trabalho estão providos de condições de arejamento/ventilação, de iluminação e de limpeza adequadas. O ambiente nos laboratórios está termostaticado, permitindo um controlo da temperatura ambiente.

Para a manipulação de produtos que produzem vapores tóxicos e/ou inflamáveis estão disponíveis *hottes* para a seu manuseamento. Na preparação das soluções utilizadas no desenvolvimento deste trabalho foi necessário trabalhar sempre em *hottes*, devido à toxicidade e irritabilidade dos padrões, podendo a exposição repetida a estes compostos altamente tóxicos provocar, a longo prazo, efeitos na saúde dos profissionais. Foi também utilizado material corrente de laboratório tal como, luvas, bata e óculos de proteção, uma vez que os produtos eram extremamente perigosos em contacto com a pele.

Como é sabido, em caso de acidente é necessário ter em conta determinadas medidas de socorro, nomeadamente, se houver contacto do produto com os olhos deve-se lavar imediatamente os olhos com água corrente; em caso de contacto direto com a pele, por exemplo nas mãos, deve-se proceder à lavagem de imediato com água corrente e caso a irritação persista, é necessário procurar um médico. Se o reagente cair sobre a roupa, é necessário retirá-la o mais rapidamente possível. Em caso de inalação e ingestão deve procurar-se um médico. Em caso de acidente existe um manual de primeiros socorros em cada laboratório de ensaio.

Encontra-se também instalado no laboratório um sistema de alarme e deteção de incêndios, com vista a diminuir os efeitos causados por um eventual acidente, para além dos extintores distribuídos pelas diversas áreas laboratoriais. O laboratório possui ainda um sistema automático de deteção de gases, garantindo a segurança em caso de fuga.

A EPAL possui um sistema integrado de desenvolvimento organizacional de recolha de resíduos laboratoriais. Promove os valores e as preocupações ambientais com o objetivo de contribuir ativa e responsabilmente para um futuro ambientalmente sustentado prevenindo a poluição e acidentes ambientais graves.

Todos os resíduos resultantes das atividades laboratoriais são classificados e enviados posteriormente para reciclagem, usando para o efeito recipientes adequados existentes nas instalações.

O presente trabalho teve como principais resíduos sólidos *vials*, pipetas de *Pasteur* e frascos de reagentes. Para a recolha destes resíduos sólidos existem recipientes apropriados nos diferentes laboratórios. Para os resíduos líquidos existem recipientes de plástico nos laboratórios (*Jerricans*), uns para os solventes halogenados e outros para os não halogenados.

Os resíduos são armazenados provisoriamente no ECOLAB (armazém específico de resíduos), sendo posteriormente reencaminhados para tratamento por uma empresa licenciada para o efeito.

Custos associados

Os custos envolvidos nos ensaios realizados são elevados e os resultados obtidos neste trabalho devem ser rentabilizados. Na tabela 7.24 estão discriminados esses custos, sem incluir material consumível de laboratório, entre outras despesas.

Uma análise de cianotoxinas custará ao cliente aproximadamente 50€.

Tabela 7.11: Custos associados ao trabalho desenvolvido.

Produto	Quantidade	Preço (€)
Padrão de anatoxina	10 mL	450
Padrão de cilindrospermopsina		630
Padrão de nodularina		870
Padrão de homoanatoxina		1110
Padrão de microcistina-RR		1250
Padrão de microcistina-YR	5 mL	1750
Padrão de microcistina-LR		1775
Padrão de microcistina-LA		1900
Padrão de microcistina-LF		2060
Padrão de microcistina-LY		2060
Coluna Acquity UPLC HSS T3	1 unidade	755
Cartuchos SPE Bond Elut		220
Cartuchos SPE ENVI-Carb	2 unidades	246
Cartuchos SPE Oasis HLB		366
Acetato de amónio	100 g	25
Acetonitrilo	6 L	810
Ácido fórmico	1L	43
Ácido trifluoroacético	5 mL	18
Metanol	6 L	131
Tiosulfato de sódio	250 g	47

Capítulo VIII – Conclusões e perspectivas futuras

O objetivo deste trabalho consistiu na análise de cianotoxinas em diferentes matrizes de água, por UPLC-MS/MS. Saliento a existência de um método validado para microcistinas no laboratório da EPAL, por HPLC-DAD. Como tal, as cianotoxinas em estudo foram analisadas pelo método referido anteriormente (HPLC-DAD), utilizando as condições cromatográficas desse mesmo método, já implementado anteriormente pela empresa [102].

Os resultados obtidos pela técnica de HPLC-DAD permitem concluir que este é um método que requer mais tempo de análise e conseqüentemente maior gasto de solventes para conseguir separar todos os compostos, apresentando também menor sensibilidade e seletividade uma vez que existem alguns compostos que apresentam co-eluição cromatográfica e, em caso de suspeita de presença de um dos analitos em amostras, o DAD não permite a sua identificação “inequívoca”.

A análise por UPLC apresenta um melhor relação custo-benefício, a médio ou longo prazo e minimiza o impacto ambiental decorrente do uso de solventes e outras substâncias.

Sendo assim, após a análise destes resultados, prosseguiu-se com a otimização do método por UPLC-MS/MS.

A otimização das condições do sistema UPLC-MS/MS permitiu desenvolver um método cromatográfico em que todas as cianotoxinas apresentam um comportamento cromatográfico aceitável, quer pelo método de injeção direta, quer pelo método com concentração da amostra.

Para tal, foi utilizada a coluna cromatográfica HSS T3 que permite reter e separar compostos orgânicos polares solúveis em água, com uma intensidade de sinal elevada.

Os resultados dos ensaios de validação das cianotoxinas indicam que o método cromatográfico é linear na gama de concentrações de 0,4-8,0 µg/L para a gama baixa e entre 15,4-114,3 µg/L para a gama alta. A existência do método cromatográfico em gama baixa permite a quantificação da cilindrospermopsina, da homoanatoxina-a e da anatoxina, através de um método rápido, que não requer concentração da amostra, uma vez que estes três compostos apresentam limites de quantificação inferiores ao limite recomendado pela Organização Mundial de Saúde, que é de 1 µg/L.

O método de quantificação na gama baixa permite alcançar curvas de calibração com um coeficiente de determinação (r^2) superior a 0,9988 e um coeficiente de variação do método (Cv) inferior a 2,5%, enquanto que o método em gama alta apresenta um coeficiente de determinação (r^2) superior a 0,9963 e um coeficiente de variação do método (Cv) inferior a 2,8%.

Os limites de deteção (LD) e quantificação (LQ) instrumentais, calculados com base no desvio padrão residual da reta de calibração variaram entre 0,10 µg/L e 0,50 µg/L para a gama baixa e entre 1,3 µg/L e 17,7 µg/L para a gama alta. Esses mesmos limites, calculados em condições de repetibilidade variaram entre 0,10 µg/L e 0,70 µg/L para a gama baixa e entre 1,0 e 22,7 µg/L para a gama alta.

A razão MRM1/MRM2 mostrou ser estável ao longo do intervalo de linearidade, apresentando coeficientes de variação entre 0,5% e 7,9% para todos os compostos alvo, à exceção da Microcistina-LR (16,6%).

Em termos cromatográficos o método desenvolvido apresenta bons resultados de precisão em condições de repetibilidade, com desvios padrão relativos inferiores a 3,9 %, no extremo inferior da gama de trabalho, para a homoanatoxina em gama baixa. Apresenta também desvios padrão relativos inferiores a 7,3 % para a microcistina-LR em gama alta.

Como já foi referido anteriormente, o método de análise direta por UPLC-MS/MS otimizado apenas apresenta, para três compostos, limites de quantificação inferiores aos valores paramétricos estipulados pela legislação em vigor.

Para esses compostos, realizaram-se várias análises através de um método de injeção direta, o que permitiu a obtenção de taxas de recuperação variáveis entre 65% e 100%, aproximadamente,

representando valores bastante aceitáveis para poder analisar estas cianotoxinas por injeção direta, rentabilizando assim esta análise, uma vez que não é necessário qualquer tipo de extração prévia da amostra.

De forma a ser possível aumentar a sensibilidade do método de ensaio para a análise dos restantes compostos, recorreu-se ao método de extração em fase sólida (SPE), para a concentração da amostra.

Para tal, selecionou-se o cartucho C18 Isolute, pois permitiu obter melhores taxas de recuperação em amostras de água contendo tiosulfato de sódio. Este reagente é normalmente adicionado a amostras de água tratada uma vez que inibe a ação do cloro presente, evitando assim o efeito oxidante do cloro.

A cilindropermopsina foi testada no método de gama alta, no entanto, o cartucho escolhido para a extração, não apresenta características que possibilitem a retenção deste composto. A sua análise efetuou-se apenas pelo método de injeção direta.

Os ensaios de recuperação realizados permitiram concluir que os resultados são influenciados por efeitos de matriz, visto que se obtiveram valores de taxas de recuperação muito baixos ou muito elevados, nomeadamente inferiores a 7,8% para algumas matrizes ou superiores a 194,7% para outras matrizes.

Os efeitos de matriz ocorrem devido à co-eluição dos compostos presentes na matriz com os compostos alvo, podendo influenciar a intensidade do sinal devido à sua participação no processo de ionização.

Para eliminar esses efeitos, procedeu-se à realização de uma curva de calibração em matriz ajustada, que permitiu determinar taxas de recuperação aceitáveis, nomeadamente entre 60%-120%.

Embora uma maior diluição do extrato pudesse resolver os efeitos de matriz e por conseguinte tornar possível utilizar as retas preparadas em solvente, o efeito no aumento dos limiares analíticos do método global poderia ser muito significativo, diminuindo a sensibilidade do método. Para tal, futuramente, deveriam preparar-se as devidas diluições das amostras fortificadas, na tentativa de perceber qual seria o efeito nos valores dos limiares analíticos.

Caso se comprove que as retas em matriz ajustada são a melhor hipótese para a realização deste método, seria conveniente fazer a validação do mesmo, através do cálculo dos intervalos de linearidade, dos limiares analíticos, da precisão e exatidão, entre outros parâmetros necessários à validação de um método analítico.

Apesar de não ter sido possível, seria interessante no futuro, proceder a ensaios para determinar a exatidão, através de ensaios interlaboratoriais. Seria também indispensável fazer ensaios de precisão intermédia e o cálculo da incerteza associada para ambos os métodos, que é uma etapa importante antes de proceder à acreditação.

Após participação do laboratório com bom desempenho num ensaio interlaboratorial, considera-se que o método de ensaio estará apto para que se possa solicitar a extensão da acreditação junto do Instituto Português da Acreditação (IPAC).

Como perspetiva futura, poderia verificar-se a existência de outros métodos para a análise de águas (IST ou IPMA) e avaliar a importância que o procedimento poderá ter, por exemplo, em zonas costeiras, na análise de bivalves.

Referências bibliográficas

- [1] M. Odlare, Introductory Chapter for Water Resources, in: Ref. Modul. Earth Syst. Environ. Sci., Elsevier, Sweden, 2014: pp. 1–2.
- [2] S.M. Sanches, E.L. do Prado, I.M. Ferreira, H.F. Braga, E.M. Vieira, Presença da toxina microcistina em água, impactos na saúde pública e medidas de controle, *Rev. Ciencias Farm. Basica E Apl.* 33 (2012) 181–187.
- [3] G.R. Thompson, J. Turk, E. Editor, P. Adams, A. Editor, C. Benedict, et al., *Earth Science and the Environment*, 4th ed., USA, 2007.
- [4] F. Bellém, S. Nunes, M. Morais, R. Fonseca, Cianobactérias e Toxicidade: Impacte na Saúde Pública em Portugal e no Brasil, *Rev. Bras. Geogr. Física.* 6 (2012) 1374–1389.
- [5] WHO (World Health Organization), *Guidelines for Drinking-water Quality*, 3rd ed., Switzerland, 2004.
- [6] EPAL, *Qualidade da Água Para Consumo Humano-Relatório Anual*, 2010.
- [7] J. Evans, H. Perlman, *The Water Cycle*, Elsevier Inc., 2014.
- [8] W.A. De Souza, *Tratamento da água*, 2007.
- [9] S. Khan, M. Shahnaz, N. Jehan, S. Rehman, M.T. Shah, I. Din, Drinking water quality and human health risk in Charsadda district, Pakistan, *J. Clean. Prod.* (2012) 1–9.
- [10] L. Simas, P. Gonçalves, J. Leal, C. Alexandre, *Controlo da Qualidade da Água Para Consumo Humano em Sistemas Públicos de Abastecimento*, Instituto Regulador de Águas e Resíduos, 2005.
- [11] EPAL, *Qualidade da água*, (n.d.).
<http://www.epal.pt/EPAL/menu/água/campanhas/qualidade-da-água> (accessed August 5, 2016).
- [12] D. Pantelić, Z. Svirčev, J. Simeunović, M. Vidović, I. Trajković, Cyanotoxins: Characteristics, production and degradation routes in drinking water treatment with reference to the situation in Serbia, *Chemosphere.* 91 (2013) 421–441.
- [13] J. Xiong, X.C. Wang, Q. Zhang, R. Duan, N. Wang, Characteristics of a landscape water with high salinity in a coastal city of China and measures for eutrophication control, *Ecol. Indic.* 61 (2015) 268–273.
- [14] M.T. Cabrita, A. Silva, P.B. Oliveira, M.M. Angélico, M. Nogueira, Assessing eutrophication in the Portuguese continental Exclusive Economic Zone within the European Marine Strategy Framework Directive, *Ecol. Indic.* 58 (2015) 286–299.
- [15] P.D. Abel, *Water Pollution Biology*, Second Edi, Taylor & Francis, London, 2002.
- [16] V. Vasconcelos, Eutrophication, toxic cyanobacteria and cyanotoxins: When ecosystems cry for help, *Limnetica.* 25 (2006) 425–432.
- [17] S.T.A. Cassini, P.W.P. Antunes, R. Keller, Validação de método analítico livre de acetonitrilo para análise de microcistinas por cromatografia líquida de alta eficiência, *Quim. Nov.* 36 (2013) 1208–1213.

- [18] Effects of Eutrophication on the Environment, (n.d.).
<http://www.buzzle.com/articles/how-does-eutrophication-affect-the-environment.html>
 (accessed May 2, 2016).
- [19] H.W. Paerl, R.S. Fulton, P.H. Moisander, J. Dyble, Harmful Freshwater Algal Blooms, With an Emphasis on Cyanobacteria, *Sci. World.* 1 (2001) 76–113.
- [20] E. Dittmann, C. Wiegand, Cyanobacterial toxins-occurrence, biosynthesis and impact on human affairs, *Mol. Nutr. Food Res.* 50 (2006) 7–17.
- [21] World Health Organization, Algae and cyanobacteria in fresh water, in: *Guidel. Safe Recreat. Water Environ.*, 2003: pp. 136–158.
- [22] C. Churro, E. Dias, E. Valério, N. De Saúde, R. Jorge, Risk Assessment of Cyanobacteria and Cyanotoxins , the Particularities and Challenges of *Planktothrix* spp . Monitoring, *Nov. Approaches Their Appl. Risk Assess.* (n.d.).
- [23] S. Merel, D. Walker, R. Chicana, S. Snyder, E. Baurès, O. Thomas, State of knowledge and concerns on cyanobacterial blooms and cyanotoxins, *Environ. Int.* 59 (2013) 303–327.
- [24] K.E. Havens, R.T. James, T.L. East, V.H. Smith, N:P ratios, light limitation, and cyanobacterial dominance in a subtropical lake impacted by non-point source nutrient pollution., *Environ. Pollut.* 122 (2003) 379–90.
- [25] R.P. Rastogi, D. Madamwar, A. Incharoensakdi, Bloom Dynamics of Cyanobacteria and Their Toxins: Environmental Health Impacts and Mitigation Strategies, *Front. Microbiol.* 6 (2015) 1–22.
- [26] S. Merel, M.C. Villarín, K. Chung, S. Snyder, Spatial and thematic distribution of research on cyanotoxins, *Toxicon.* 76 (2013) 118–131.
- [27] <http://science.shinshu-u.ac.jp/~park/img/microcystins.gif>, (n.d.).
- [28] D. Dietrich, S. Hoeger, Guidance values for microcystins in water and cyanobacterial supplement products (blue-green algal supplements): a reasonable or misguided approach?, *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 203 (2005) 273–89.
- [29] P.S.M. Vesterkvist, J.A.O. Meriluoto, Interaction between microcystins of different hydrophobicities and lipid monolayers, *Toxicon.* 41 (2003) 349–355.
- [30] J. Ma, F. Yan, F. Chen, L. Jiang, J. Li, L. Chen, et al., C 18 -Functionalized Magnetic Silica Nanoparticles for Solid Phase Extraction of Microcystin-LR in Reservoir Water Samples Followed by HPLC-DAD Determination, *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.* 38 (2015) 655–661.
- [31] R. Aráoz, J. Molgó, N. Tandeau de Marsac, Neurotoxic cyanobacterial toxins, *Toxicon.* 56 (2010) 813–828.
- [32] M. Campàs, D. Szydłowska, M. Trojanowicz, J.L. Marty, Enzyme inhibition-based biosensor for the electrochemical detection of microcystins in natural blooms of cyanobacteria, *Talanta.* 72 (2007) 179–186.
- [33] U.S. Epa, Drinking Water Health Advisory for the Cyanobacterial Microcystin Toxins, (2015).
- [34] P.B. Fayad, A. Roy-Lachapelle, S.V. Duy, M. Prévost, S. Sauvé, On-line solid-phase

- extraction coupled to liquid chromatography tandem mass spectrometry optimized for the analysis of cyanotoxins in algal blooms, *Toxicon*. 108 (2015) 167–175.
- [35] H. Twist, G.A. Codd, Degradation of the cyanobacterial hepatotoxin, nodularin, under light and dark conditions, *FEMS Microbiol. Lett.* 151 (1997) 83–88.
- [36] T. Kaloudis, S.K. Zervou, K. Tsimeli, T.M. Triantis, T. Fotiou, A. Hiskia, Determination of microcystins and nodularin (cyanobacterial toxins) in water by LC-MS/MS. Monitoring of Lake Marathonas, a water reservoir of Athens, Greece, *J. Hazard. Mater.* 263 (2013) 105–115.
- [37] B.A. Neilan, L.A. Pearson, J. Muenchhoff, M.C. Moffitt, E. Dittmann, Environmental conditions that influence toxin biosynthesis in cyanobacteria, *Environ. Microbiol.* 15 (2013) 1239–1253.
- [38] D.I. Chorus, Current approaches to Cyanotoxin risk assessment, risk management and regulations in different countries, Federal Environment Agency, Germany, 2012.
- [39] United States Environmental Protection Agency, Drinking Water Health Advisory for the Cyanobacterial Toxin Cylindrospermopsin, (2015).
- [40] L. Kamp, J.L. Church, J. Carpino, E. Faltin-Mara, F. Rubio, The Effects of Water Sample Treatment, Preparation, and Storage prior to Cyanotoxin Analysis for Cylindrospermopsin, Microcystin and Saxitoxin, *Chem. Biol. Interact.* 246 (2016) 45–51.
- [41] G.A. Codd, L.F. Morrison, J.S. Metcalf, Cyanobacterial toxins: risk management for health protection, *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 203 (2005) 264–272.
- [42] EPA, Health Effects Support Document for the Cyanobacterial Toxin Microcystins, 2015.
- [43] R. Hindle, D. Noot, LC / MS / MS Analysis of Cylindrospermopsin and Anatoxin-a in Drinking Water Using US EPA Method 545, *Agil. Technol.* (2014).
- [44] A. Furey, J. Crowley, M. Lehane, K.J. James, Liquid chromatography with electrospray ion-trap mass spectrometry for the determination of anatoxins in cyanobacteria and drinking water, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* (2003) 583–588.
- [45] World Health Organization, Toxic Cyanobacteria in Water: A guide to their public health consequences, monitoring and management, 1999.
- [46] K.E. Haven, Cyanobacterial Harmful Algal Blooms: State of the Science and Research Needs, Volume 619, Springer, 2008.
- [47] EPAL, Relatório de Sustentabilidade, 2014.
- [48] <http://www.epal.pt/EPAL/menu/epal/quem-somos>, (n.d.).
- [49] EPAL, Relatório e Contas, 2014.
- [50] EPAL, Qualidade da água para consumo humano-Relatório Anual, 2013.
- [51] EPAL, www.epal.pt/EPAL/menu/produtos-e-serviços/laboratórios-de-ensaio-e-amostragem, (n.d.).
- [52] C. Europeia, A Água é vida-A Diretiva quadro da Água, 2002.

- [53] Introduction to the new EU Water Framework Directive, (n.d.). http://ec.europa.eu/environment/water/water-framework/info/intro_en.htm (accessed May 31, 2016).
- [54] Diário da República, Decreto-Lei nº 218/2015 de 7 de Outubro, 2015.
- [55] Drinking water legislation, (n.d.). http://ec.europa.eu/environment/water/water-drink/legislation_en.html (accessed June 2, 2016).
- [56] EU Monitor, (n.d.). https://www.eumonitor.nl/9353000/1/j9vvik7m1c3gyxp/vicg8sg0sazk?start_00g=80 (accessed June 2, 2016).
- [57] EUR-Lex, (n.d.). <http://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/?uri=URISERV:l28079> (accessed June 2, 2016).
- [58] Jornal Oficial das Comunidades Europeias, Directiva 2000/60/CE do parlamento europeu e do conselho de 23 de Outubro de 2000 que estabelece um quadro de ação comunitária no domínio da política da água, 2000.
- [59] Jornal Oficial das Comunidades Europeias, Decisão nº 2455/2001/CE do Parlamento Europeu e do Conselho de 20 de Novembro de 2001 que estabelece a lista das substâncias prioritárias no domínio da política da água e altera a Directiva 2000/60/CE, 2001.
- [60] World Health Organization, Cyanobacterial toxins : Microcystin-LR in Drinking-water Background document for development of WHO Guidelines for Drinking-water Quality, 1998.
- [61] Diário da República, Decreto-Lei nº306/2007 de 27 de Agosto, 2007.
- [62] <http://www.epal.pt/EPAL/menu/produtos-e-serviços/laboratórios-de-ensaio-e-amostragem/acreditação>, (n.d.).
- [63] J. Płotka-Wasyłka, N. Szczepańska, M. de la Guardia, J. Namieśnik, Modern trends in solid phase extraction: New sorbent media, *Trends Anal. Chem.* 77 (2016) 23–43.
- [64] I.C.S.F. Jardim, Extração em Fase Sólida : Fundamentos Teóricos e Novas Estratégias para Preparação de Fases Sólidas, *Sci. Chromatogr.* 2 (2010) 13–25.
- [65] C.F. Poole, A.D. Gunatilleka, R. Sethuraman, Contributions of theory to method development in solid-phase extraction, *J. Chromatogr. A.* 885 (2000) 17–39.
- [66] C.F. Poole, New trends in solid-phase extraction, *TrAC - Trends Anal. Chem.* 22 (2003) 362–373.
- [67] T. Webinar, Fundamentals of Solid-Phase Extraction (SPE): Principles and Practical Tips for Developing Sample Preparation Methods Introduction – Joe Arsenault, (2013).
- [68] Macherey-Nagel, Solid Phase Extraction Application Guide, (2012) 245.
- [69] Sigma-Aldrich, Guide to Solid Phase Extraction, 1998.
- [70] M. da C. Castilho, F. Ramos, M.I.N. Silveira, Extração em Fase Sólida (EFS)- Tipos de Enchimento, *QUÍMICA.* 59 (1995).
- [71] J. Miller, *Chromatography: Concepts and Contrasts*, Second Edi, Wiley Interscience, 2005.

- [72] D. Harris, Quantitative Chemical Analysis, Eighth Edi, W.H. Freeman and Company, 2010.
- [73] R.B. Chust, Introdução Cromatografia de Líquidos, Cromatogr. Líquidos. 39 (1990) 43–54.
- [74] Waters, Identifying and Quantitating Compounds, (n.d.). http://www.waters.com/waters/en_EE/How-Does-High-Performance-Liquid-Chromatography-Work?/nav.htm?cid=10049055 (accessed July 5, 2016).
- [75] Principle and Feature of Various Detection Methods, (n.d.). <http://www.hitachi-hightech.com/global/products/science/tech/ana/lc/basic/course7.html> (accessed July 5, 2016).
- [76] HPLC Detectors, (n.d.). <http://www.chromacademy.com/images/hplc-detectors-jan2014.jpg> (accessed July 5, 2016).
- [77] Diode-array detectors, (n.d.). http://hplc.chem.shu.edu/NEW/HPLC_Book/Detectors/det_uvda.html (accessed July 5, 2016).
- [78] M.E. Swartz, B.J. Murphy, Ultra performance liquid chromatography : tomorrow's HPLC technology today, LabPlus Int. (2004).
- [79] L. Maldaner, I.C.S.F. Jardim, O estado da arte da cromatografia líquida de ultra eficiência, Quim. Nova. 32 (2009) 214–222.
- [80] M. Gumustas, S. Kurbanoglu, B. Uslu, S.A. Ozkan, UPLC versus HPLC on drug analysis: Advantageous, applications and their validation parameters, Chromatographia. 76 (2013) 1365–1427.
- [81] M. Swartz, Ultra performance liquid chromatography (UPLC): An introduction, Sep. Sci. Re-Defined. (2005) 8–14.
- [82] A. Patil, A review on ultra performance liquid chromatography, Asian J. Pharm. Technol. Innov. 3 (2015).
- [83] L. Maldaner, I.C.S.F. Jardim, UHPLC – Uma abordagem atual: desenvolvimentos e desafios recentes, Sci. Chromatogr. 4 (2012) 197–207.
- [84] Waters, Acquity UPLC BEH COLUMNS Care and Use Manual, 2009.
- [85] L.-S. New, E.C.Y. Chan, Evaluation of BEH C18, BEH HILIC, and HSS T3 (C18) column chemistries for the UPLC-MS-MS analysis of glutathione, glutathione disulfide, and ophthalmic acid in mouse liver and human plasma., J. Chromatogr. Sci. 46 (2008) 209–214.
- [86] C.R. Ferreira, S.A. Saraiva, J.S. Garcia, G.B. Sanvido, F. Perecin, R.R. Catharino, et al., Princípios e aplicações da espectrometria de massas em produção animal, São Carlos, Brasil, 2009.
- [87] E. De Hoffmann, V. Stroobant, Mass Spectrometry - Principles and Applications., Third Edit, 2007.
- [88] M. a. Rodrigues, M.P. Reis, M.C. Mateus, Liquid chromatography/negative electrospray ionization ion trap MS2 mass spectrometry application for the determination of microcystins occurrence in Southern Portugal water reservoirs,

- Toxicon. 74 (2013) 8–18.
- [89] V. Gabelca, E. De Pauw, Internal energy and fragmentation of ions produced in electrospray sources, *Mass Spectrom. Rev.* (2005).
- [90] Common Ionization, (n.d.). http://www.waters.com/waters/pt_PT/Common-Ionization/nav.htm?cid=10073251&locale=pt_PT (accessed June 27, 2016).
- [91] Quadrupole Mass Spectrometry, (n.d.). http://www.chemicool.com/definition/quadrupole_mass_spectrometry.html (accessed July 2, 2016).
- [92] A. Technologies, Agilent 6100 Series Quadrupole LC/MS Systems, 2011.
- [93] Overview of Mass Spectrometry for Protein Analysis, ThermoFischer Sci. (n.d.). <https://www.thermofisher.com/ps/en/home/life-science/protein-biology/protein-biology-learning-center/protein-biology-resource-library/pierce-protein-methods/overview-mass-spectrometry.html.html> (accessed July 3, 2016).
- [94] HPLC-Tandem Mass Spectrometry, (n.d.). <http://inac-sk.blogspot.pt/p/appendix.html> (accessed August 25, 2016).
- [95] Multiple Reaction Monitoring, (n.d.). <http://www.biognosys.ch/technology/mrm.html> (accessed August 25, 2016).
- [96] Sistema de Gestão da Qualidade dos Laboratórios de Ensaio (EPAL), Validação de métodos de ensaio cromatográficos (GC, HPLC), n.d.
- [97] NP EN ISO/IEC 17025:2005, “General Requirements for the Competence of Testing and Calibration Laboratories,” 2005.
- [98] N. Mesquita Brito, O. DE Possidônio Amarante Junior, L. Polese, M. Lúcia Ribeiro, Validação De Métodos Analíticos: Estratégia E Discussão, 2003.
- [99] Vocabulário Internacional de Metrologia (VIM), Instituto Português da Qualidade, 2012.
- [100] A.P. Monteiro, Ocorrência de derivados azotados em alguns produtos destinados à alimentação infantil: nitratos e nitritos, Universidade de Lisboa, 2014.
- [101] M. Loureiro, Determinação de compostos orgânicos não específicos em águas por cromatografia gasosa associada à espetrometria de massa, Universidade de Lisboa-Faculdade de Ciências, 2014.
- [102] EPAL, Análise de microcistinas por Extração em Fase Sólida e Cromatografia Líquida de Elevada Eficiência com detetor de díodos (SPE-HPLC-DAD), n.d.
- [103] J.Z. Chen, J.C. Wang, Y. Gao, R.J. Zeng, Z. Jiang, Y.W. Zhu, et al., A novel UPLC/MS/MS method for rapid determination of metapristone in rat plasma, a new cancer metastasis chemopreventive agent derived from mifepristone (RU486), *J. Pharm. Biomed. Anal.* 95 (2014) 158–163.
- [104] F.M. Lanças, Efeitos de temperatura em Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC), 4 (2012) 13–19.
- [105] D. Patel, Matrix effect in a view of LC-MS/MS: An overview, *Int. J. Pharma Bio Sci.* 2 (2011) 559–564.

Anexos

Anexo 1: Método dos Mínimos Quadrados

O método dos mínimos quadrados pressupõe o cálculo de parâmetros de calibração, tendo como base a equação da reta de regressão, dada por:

$$y = a + bx \quad (\text{Equação 1})$$

Em que a representa a ordenada na origem, b representa o declive da reta e x os valores individuais de concentração conhecida na solução padrão.

Esta reta é formada por um conjunto de pares ordenados independentes (x_1, y_1) ; (x_2, y_2) ; ...; (x_n, y_n) onde n se refere ao número de pontos da reta. A média dos valores de x (concentração dos padrões utilizados) representa-se por \bar{x} e a média dos valores de y (sinal instrumental) representa-se por \bar{y} .

O cálculo do coeficiente de correlação, R , pode ser usado como um dos parâmetros para avaliar uma calibração analítica [100]:

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

As curvas de calibração devem apresentar valores de coeficiente de correlação superiores a 0,995, no entanto, quanto mais próximo do valor de 1 (correlação positiva) ou de -1 (correlação negativa) estiver este coeficiente maior será a qualidade dos resultados.

Para o cálculo do coeficiente de correlação é necessário ter em conta algumas precauções para que não se cometam erros de interpretação, pois um bom coeficiente de correlação não é sinónimo da existência de uma relação linear.

O coeficiente de determinação da reta (R^2) é dado pelo quadrado do coeficiente de correlação.

Neste método demonstra-se que os coeficientes a e b da reta de regressão de y em x , são dados por:

$$b = \frac{\sum_{i=1}^N [(x_i - \bar{x})(y_i - \bar{y})]}{\sum_{i=1}^N (x_i - \bar{x})^2} \quad (\text{Equação 3})$$

$$a = \bar{y} - b\bar{x} \quad (\text{Equação 4})$$

Onde:

x se refere aos valores individuais de concentração conhecida na solução padrão

y se refere a valores individuais do sinal instrumental

\bar{x} se refere à média dos valores individuais do sinal instrumental (concentração dos padrões utilizados)

\bar{y} se refere à média dos valores de y (sinal instrumental)

Os coeficientes a e b dão uma estimativa verdadeira da função que é limitada pela dispersão inevitável do método. A precisão da estimativa é quantificada pelo desvio padrão residual ($S_{y/x}$) da reta de regressão:

$$S_{y/x} = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^N [y_i - (a + bx_i)]^2}{N-2}} \quad (\text{Equação 5})$$

Este desvio padrão exprime a dispersão dos valores do sinal em torno da curva de calibração. Os desvios padrão de declive, S_b e da ordenada na origem, S_a , são dados por:

$$S_b = \frac{S_{y/x}}{\sqrt{\sum_{i=1}^N (x_i - \bar{x})^2}} \quad (\text{Equação 6})$$

$$S_a = S_{y/x} \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^N x_i^2}{N \sum_{i=1}^N x_i - \bar{x}^2}} \quad (\text{Equação 7})$$

e podem ser usados para calcular os limites de confiança de a e b :

$$b \pm tS_b \quad (\text{Equação 8})$$

$$a \pm tS_a \quad (\text{Equação 9})$$

Sendo t o valor da variável de Student para o nível de confiança desejado de $(n-2)$ graus de liberdade [101].

Cálculo da concentração

Após determinar o declive e a ordenada na origem de uma reta de regressão, pode-se calcular o valor de x correspondente a um valor médio de y . A concentração de uma amostra por interpolação da curva de calibração é calculada da seguinte forma:

$$x_i = \frac{y_i - a}{b} \quad (\text{Equação 10})$$

Desvio Padrão do método (S_m)

Este parâmetro permite ao operador verificar a qualidade do seu trabalho, com a seguinte fórmula:

$$S_m = \frac{S_{y/x}}{b} \quad (\text{Equação 11})$$

Coefficiente de variação do método

Este parâmetro permite comparar diferentes calibrações e métodos analíticos e é expresso pela seguinte equação:

$$CV_m = \frac{S_m}{\bar{x}} \times 100 \quad (\text{Equação 12})$$

Anexo 2: Análise de Resíduos

A análise de resíduos é um bom indicador de linearidade, tendo em conta que se baseia na avaliação da distância entre os valores de y experimentais e os valores de y' ideais da reta de calibração. A determinação dos resíduos implica a representação gráfica destes valores em função das concentrações, dando origem a um conjunto de pontos que se dispõem aleatoriamente em torno do eixo dos x .

Para admitir a existência de linearidade, numa determinada gama de concentração, os valores devem apresentar um desvio igual ou inferior a 15%, ou seja, devem estar compreendidos entre -15 e 15%. Sempre que existam resíduos que apresentam um desvio superior a 15%, devem ser excluídos, reduzindo a gama de concentrações e aplicando novamente o teste até que estes requisitos sejam satisfeitos.

O sinal instrumental estimado (y') é calculado com base na equação da reta obtida para o composto em estudo:

$$Y' = a + bx \quad (\text{Equação 13})$$

Onde:

a representa a ordenada na origem (correspondente à reta de calibração para o analito)

b representa o declive da reta

x representa os valores individuais de concentração conhecida na solução-padrão.

O resíduo representa o quociente entre os valores experimentais e os valores estimados a partir da reta de calibração, em percentagem.

Após o cálculo destes valores, é traçado um gráfico de resíduos (%) versus concentração ($\mu\text{g/L}$) [100].

Anexo 3: Teste das áreas normalizadas

A distribuição dos valores normalizados tem como objetivo a avaliação da dispersão dos valores obtidos na calibração em relação aos valores ótimos, de forma a que não seja superior a um intervalo previamente estabelecido.

A partir da equação da reta obtida na regressão linear, estimam-se as áreas de pico, para as concentrações usadas.

Para cada uma destas áreas, é calculada a razão entre o valor da área obtida experimentalmente e o valor da área estimada através da regressão linear.

A concentração para a qual esta razão se aproxima mais de 1, designa-se por C_{100} , ou seja, é a concentração correspondente ao ponto experimental com melhor correlação, aplicando-se assim a seguinte fórmula:

$$\text{Área normalizada} = \frac{\left(\frac{A_i}{C_i}\right) \times (100 \times C_{100})}{A_{100}} \quad (\text{Equação 14})$$

Onde:

A_i se refere à área do pico correspondente a uma determinada concentração

C_i se refere à concentração correspondente à área A_i

A_{100} se refere à área do pico correspondente ao ponto experimental com melhor correlação

C_{100} se refere à concentração correspondente ao ponto experimental com melhor correlação

Após o cálculo destes valores, é traçado um gráfico de valores normalizados vs concentração ($\mu\text{g/L}$).

Para admitir a existência de linearidade para uma determinada gama de concentração, definiu-se que os valores normalizados não podem ter um desvio superior a 15%, devendo estar compreendidos entre 85 e 115% [100].

Anexo 4: Teste de RIKILT

O teste de RIKILT permite a análise da linearidade em cada ponto da reta de calibração. Para tal, deve-se traçar um gráfico de linearidade de modo a avaliar o seu comportamento linear em que para cada concentração x e para cada sinal instrumental y , se determina a razão y/x .

Após o cálculo da razão y/x , é calculada a média de todas essas razões para todos os pontos de calibração (x).

A percentagem de cada valor y/x em relação ao valor médio é calculada da seguinte forma:

$$y/x(\%) = 100 \times \frac{(y/x)}{\bar{y/x}} \quad (\text{Equação 15})$$

No eixo das abcissas é colocado o valor das concentrações e no eixo das ordenadas coloca-se o valor, em percentagem, da razão y/x .

Para uma linearidade perfeita, cada ponto de calibração, deveria corresponder a um valor de 100%, no entanto, para admitir linearidade numa gama de trabalho, definiu-se que a razão percentual de y/x não deve apresentar um valor de desvio superior a 10%, ou seja, os valores devem estar compreendidos entre 90 e 110% [101].

Anexo 5: Teste de Mandel ou Teste de Fisher-Snedcor

A linearidade pode ser avaliada através de um modelo estatístico, de acordo com a norma ISO 8466/1, pelo teste de Fisher-Snedcor ou teste de Mandel.

A partir de um conjunto de pares ordenados (sinal vs concentração), calcula-se a função de calibração linear (ISO 8466-1) e a função de calibração não-linear (ISO 8466-2), bem como os respectivos desvios-padrões residuais, $S_{y/x}$ e S_{y2} , do seguinte modo:

$$S_{y/x} = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^N (y_i - \bar{y}_i)^2}{N-2}} \quad (\text{Equação 16})$$

$$S_{y2} = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^N (y_i - \bar{y}_{i2})^2}{N-3}} \quad (\text{Equação 17})$$

Em que:

N : número de padrões de calibração

y_i : Sinal obtido por um padrão de determinada concentração

\bar{y}_i : Sinal estimado pela função de calibração linear para um padrão da mesma concentração

\bar{y}_{i2} : Sinal estimado pela função de calibração polinomial do segundo grau para um padrão da mesma concentração

Calcula-se a diferença de variâncias (DS^2) através da seguinte equação:

$$DS^2 = (N - 2) \times S_{y/x}^2 - (N - 3) \times S_{y2}^2 \quad (\text{Equação 18})$$

Por fim calcula-se o valor de teste (PG ou VT)

$$VT = \frac{DS^2}{S_{y2}^2} \quad (\text{Equação 19})$$

Após obter o valor teste, este é comparado com o valor tabelado da distribuição F de Snedcor/Fisher, de acordo com o número de graus de liberdade em causa. A decisão é tomada de acordo com o resultado desta comparação:

- Se $VT \leq F$: a função de calibração polinomial é linear e conduz a um bom ajuste dos pontos experimentais;
- Se $VT > F$: a função de calibração é não linear e por isso a gama de trabalho deve ser reduzida tanto quanto possível de forma a cumprir a primeira alternativa. Caso não seja possível deverá ser utilizada uma função de calibração não-linear [96] [100].

