



Aprender a conhecer o ambiente marinho de Portugal

Técnicas analíticas em LC-MS/MS

22 a 25 de Setembro de 2015

CIIMAR & IPMA



Técnicas analíticas em LC-MS/MS

22 Setembro

Introdução à cromatografia

Principais tipos de cromatografia líquida

Princípios teóricos:

- Processos de separação
- Velocidade de migração
- Pico cromatográfico
- Colunas
- Eluentes
- Detecção

Optimização de método cromatográfico

Croma

- Do grego “cor” e “grafia”
- Método físico de separação no qual os componentes a separar estão distribuídos entre duas fases:

uma é estacionária (**fase estacionária**) enquanto que a outra (**fase móvel**) se move numa determinada direcção

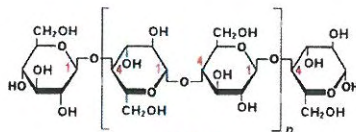
- A separação ocorre porque os componentes têm afinidades diferentes para as duas fases: a estacionária e a móvel
- Um componente com maior afinidade para a fase móvel move-se mais depressa
- Um componente com maior afinidade para a fase estacionária move-se mais devagar

Tipos de cromatografia

- Cromatografia em papel
- Cromatografia em camada fina – TLC
- Cromatografia em coluna
- Cromatografia líquida de alta pressão (eficiência) - HPLC

Cromatografia em papel

- Papel composto por celulose
- Celulose é polar devido aos grupos hidróxido

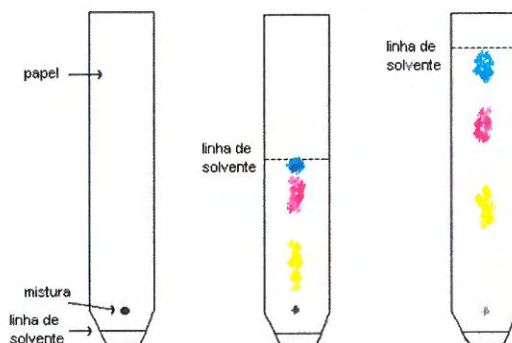


Celulose

<http://www.k2chemistry.com/chem-topics/organic-chemistry/1024/1024-00002-010>

- Água ligada ao papel = fase estacionária
- Solvente adicionado (**eluente**) = fase móvel

- Mistura aplicada ao papel
- Papel é suspenso em pequena quantidade de eluente
- Eluente sobe pelo papel
- À medida que o eluente sobe pelo papel os componentes separam-se entre as duas fases
- Marca-se a frente do eluente no final da separação
- Componentes com cor podem ser vistos e/ou medidos
- Outros componentes “sem cor” podem ser tornados visíveis com corantes (ex. iodo ou ninidrina)



Cálculo dos factores de retenção (R_f)

$$R_f = \frac{\text{distância percorrida pelo componente}}{\text{distância percorrida pelo eluente}}$$

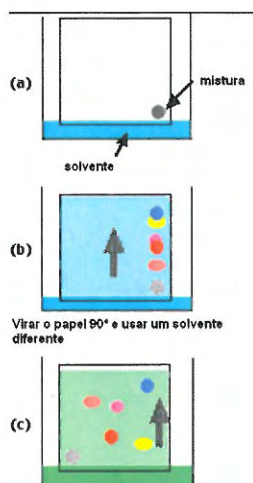


$$R_{f(\text{cyan})} = \frac{4.2 \text{ cm}}{4.5 \text{ cm}} = 0.93$$

$$R_{f(\text{magenta})} = \frac{3.2 \text{ cm}}{4.5 \text{ cm}} = 0.71$$

$$R_{f(\text{yellow})} = \frac{1.8 \text{ cm}}{4.5 \text{ cm}} = 0.40$$

- Cada componente terá um R_f constante, para um dado eluente
- Se dois componentes têm R_f semelhante o papel pode ser virado 90° e com um eluente diferente consegue-se continuar a separação
 - cromatografia “two-way”
 - usada, por ex., para a separação de aminoácidos



Cromatografia de camada fina

- Princípio teórico semelhante à cromatografia em papel – cromatografia de partição
- Usa um sólido “inerte” que retem um solvente na sua superfície
- Uma cada fina de um sólido é usada sobre um suporte (ex. vidro)

Sólidos comuns:

- Óxido de alumínio (Al_2O_3)
- Sílica (SiO_2)

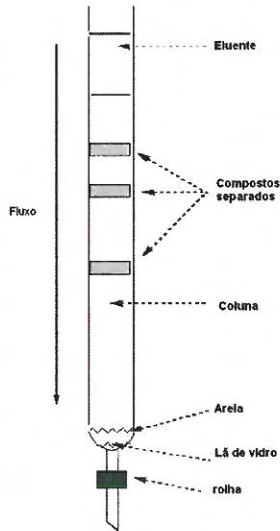
- Tal como o papel, a sílica e o óxido de alumínio são muito higroscópicos (absorvem facilmente a água)
 - os componentes são separados através da partição entre a fase estacionária e o eluente (a fase móvel)
- Os componentes separados podem ser recuperados – por exemplo raspando a secção que contém o componente e dissolvendo-o num solvente adequado

Cromatografia em coluna

- Aumento da área de contacto entre os componentes a separar e a fase estacionária
- Útil para separar componentes de uma mistura, quando o que se pretende é a sua utilização futura
- Fase estacionária mais usada é sílica
- Outras fases estacionárias:
 - Alumina (Al_2O_3)
 - Hidroxiapatite
 - Agarose
 - Carbono (Grafite porosa – PGC)

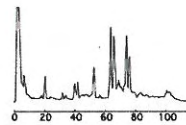
Cromatografia em coluna

- Mistura dissolvida no eluente – pode ser em quantidade pequena (pré-concentração)
- Adicionada no topo da coluna
- Eluente adicionado no topo da coluna, para deslocar amostra ao longo da fase estacionária
- Componentes separados por se moverem a velocidades diferentes – recolhidos no final como fracções diferentes



Cromatografia líquida em coluna

- Cromatografia de troca iónica
- Cromatografia de exclusão de tamanho
- Cromatografia de fase normal
- Cromatografia de fase reversa



Cromatografia de troca iónica

- usada para separar iões e moléculas que são facilmente ionizáveis
- as interações electrostáticas entre os iões, fase móvel e fase estacionária contribuem para a separação
- é comum serem colunas cuja fase móvel é constituída por aminas, ou ácido sulfónico, ou estireno-divinilbenzeno, entre outros

Cromatografia de exclusão de tamanho

- usada para separar moléculas com base no seu tamanho
- é comum serem colunas cuja fase móvel é constituída por zeólitos, ou polissacarídeos, entre outros, que actuam como uma “peneira molecular”
- as moléculas de menor tamanho ficam retidas nos poros e percorrem um caminho maior, sendo as moléculas maiores as primeiras a sair

Cromatografia de fase normal

- utiliza uma fase estacionária mais polar e uma fase móvel menos polar
- principalmente utilizada quando o composto de interesse é polar (funciona bem para compostos pouco solúveis em água)
- à medida que aumenta a polaridade do composto aumenta o tempo de retenção
- a utilização de solventes mais polares na fase móvel diminui o tempo de retenção dos compostos
- a utilização de solventes mais hidrofóbicos tende a aumentar o tempo de retenção

Cromatografia de fase reversa

- utiliza uma fase estacionária menos polar e uma fase móvel mais polar
- à medida que diminui a polaridade do composto aumenta o tempo de retenção
- a utilização de solventes mais hidrofóbicos na fase móvel diminui o tempo de retenção dos compostos
- a utilização de solventes menos polares tende a aumentar o tempo de retenção

- cromatografia de fase normal por vezes apresenta problemas de reprodutibilidade pois com a passagem da fase móvel pode ocorrer alteração do estado de hidratação da sílica
- em cromatografia de fase reversa esse problema geralmente não ocorre, uma vez que as partículas de sílica são quimicamente modificadas
- em cromatografia de fase reversa é possível usar a água como fase móvel – mais barata que outros solventes e não tóxica

Cromatografia de fase reversa é o método de cromatografia líquida mais comum

Sílica

- Sílica é comumente usada como fase estacionária, por exemplo, na cromatografia de fase normal, e é usada como base para numerosas fases estacionárias quimicamente ligadas
- Sílica é estável na gama de pH 3 – 8
- Sílica modificada: estável na gama de pH 1 - 12
- Material amorfo com superfície heterogénea saturada com grupos Si-OH (grupos silanol)

Grupos silanol

- A superfície da sílica está coberta com grupos silanol, que são fortemente polares
- Silanol livre – moderadamente ácidos (adsorção de grupos básicos)
- Silanol geminal – não ácidos
- Silanol vicinal (associados) - não ácidos (adsorção de compostos com grupos OH)
- Siloxanos – produto da condensação de grupos vicinais reduzem a concentração de grupos silanol

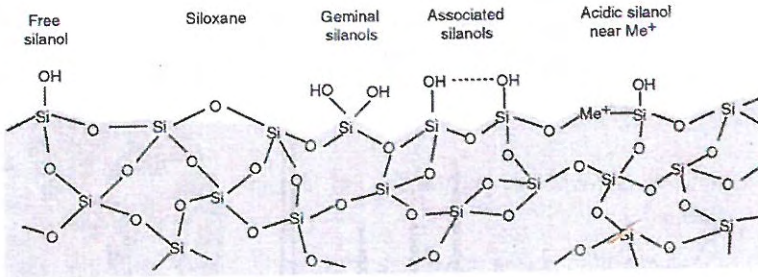
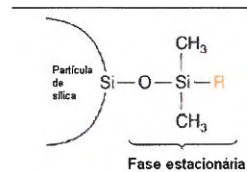


Fig. 7.6 Chemical structure of silica.

Se a fase móvel é não polar o silanol liga os componentes a separar

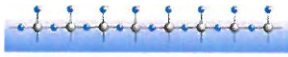
Se a fase móvel é polar o silanol serve de centro de reacção para ligações químicas



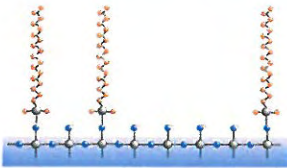
Sílica quimicamente modificada:

Dimetiloctadecilclorosilano (ODS) R= $-(\text{CH}_2)_{17}\text{CH}_3$ **C18**

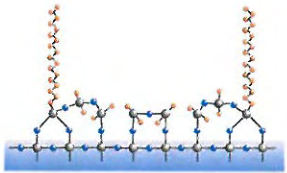
Dimetiloctilclorosilano R= $-(\text{CH}_2)_7\text{CH}_3$ **C8**



Superfície da sílica



Reacção com ODS



Desativação dos grupos silanol

Sílica quimicamente modificada em fases estacionárias

Fases polares

Amino R= (CH₂)₃NH₂

Ciano R= (CH₂)₃C≡N

Diol R= (CH₂)₂OCH₂CH(OH)CH₂OH

Fases não polares

Octadecil R= (CH₂)₁₇CH₃

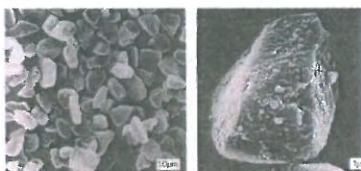
Octil R= (CH₂)₇CH₃

Fenil R= (CH₂)₃C₆H₅

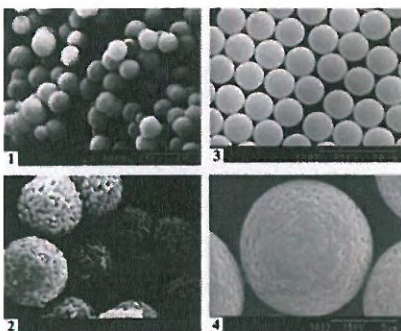
Para além da composição química, ao escolher a fase estacionária há a considerar:

- Geometria
- Microestrutura
- Tamanho
- Homogeneidade

ex. Irregulares



ex. Esféricas (porosas/ não porosas)



- Geometria (esféricas / irregulares)
- Microestrutura (porosas / não porosas)
- Tamanho (2 - 5 μm)
- Homogêneas (baixa dispersão do diâmetro da partícula)

Cromatografia líquida de alta pressão (HPLC)

- Semelhante à cromatografia em coluna, mas usa a pressão, em vez da gravidade, para fazer deslocar o eluente ao longo da coluna

Maior pressão

Tempos de separação (corridas) mais curtas

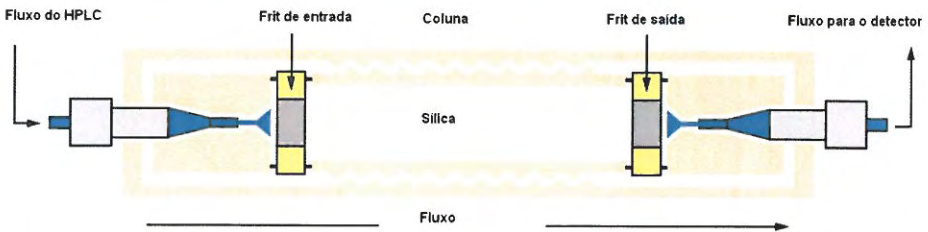
- Devido à maior pressão, o material usado para empacotar a coluna (fase estacionária) pode ser de menor dimensão - aumento da área superficial

Colunas mais comuns:

2.1 a 4.6 mm id (diâmetro interno)

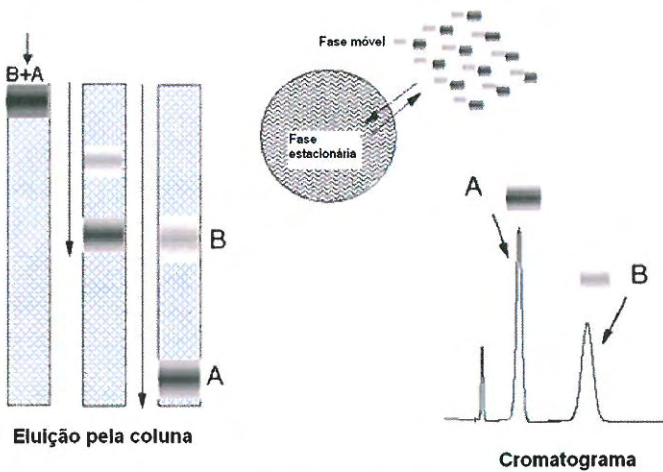
100 a 250 mm comprimento

2 a 5 μm tamanho da partícula



Solvente	Classe	Mecanismo de separação
Aquoso/Orgânico	Hidrocarbonetos aromáticos policíclicos	Fase reversa C18
	Ácidos orgânicos	Fase reversa com emparelhamento iônico
	Mono e dissacarídeos	Fase normal Troca iônica
	Oligossacarídeos	Troca iônica
	Polares	Fase normal (amino/ciano/diol)
	Básicos	Fase reversa C18, C8
	Isômeros posicionais	Fase reversa C8
	Aromáticos (ou com estrutura semelhante)	Fase reversa (fenil/fenil-hexil/difenil)
Muito polares	Fase reversa	
Orgânico	Não polar	Fase normal (Si)

Processo de separação cromatográfico

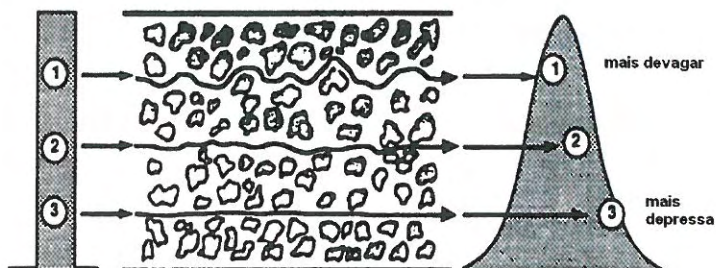


Teoria das placas

- Coluna cromatográfica: série de pequenas secções (pratos teóricos) no qual o soluto está em equilíbrio dinâmico entre as duas fases
- A migração do soluto ao longo da coluna é vista como uma transferência gradual de massa de um prato para o seguinte
- Um sistema eficiente deve ter o maior número de pratos teóricos. Ou a largura de cada prato deve ser a menor possível

Pico cromatográfico

- percurso das moléculas de um componente através da coluna (sistema cromatográfico) segue uma distribuição gaussiana
- a “dispersão” dos percursos possíveis faz aumentar a largura (desvio padrão, σ) da curva



Propriedades da Curva Gaussiana

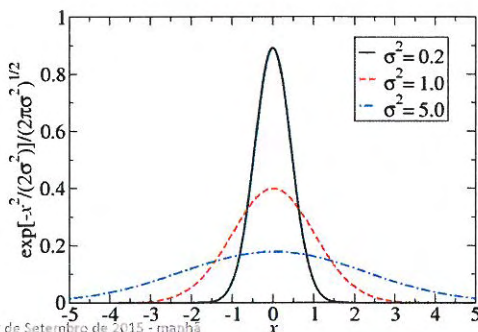
$$f(x) = a \cdot e^{-\frac{1}{2} \left(\frac{x-b}{c} \right)^2}$$

Gráfico é uma "curva do sino" simétrica

O parâmetro **a** é a altura do pico da curva, **b** é a posição do centro do pico, e **c** controla a largura do "sino".

Em curvas gaussianas normalizadas em que a média é μ e a variância é σ^2 a função pode ser escrita como:

$$f(x) = \frac{1}{\sigma\sqrt{2\pi}} e^{-\frac{1}{2} \left(\frac{x-\mu}{\sigma} \right)^2}$$



35

A eficiência da coluna é afectada por:

- Tamanho
- Diâmetro
- Tamanho da partícula

- Composição do eluente (particularmente viscosidade)
- Fluxo do eluente
- Velocidade linear

Eficiência do sistema cromatográfico

$$N = \frac{L}{H}$$

N - número de pratos teóricos

L - comprimento da coluna

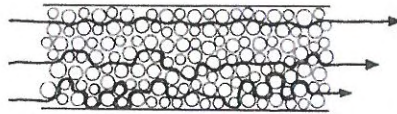
H - altura de cada prato

mais concretamente:

H - altura equivalente a um prato teórico

(Height equivalent to a theoretical plate - *HETP*)

$$HETP = A + \frac{B}{u} + C \cdot u$$



A - difusão de turbilhão (eddy diffusion)

B - difusão longitudinal

C - coeficiente de transferência de massa entre a fase estacionária (C_s) e a móvel (C_m)

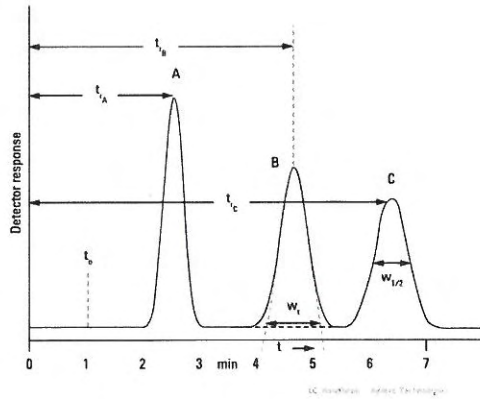
u - velocidade de passagem do componente através do sistema cromatográfico

Esta equação é frequentemente usada para descrever a eficiência de uma coluna

$$N = 16 \left(\frac{t_r}{w_t} \right)^2$$

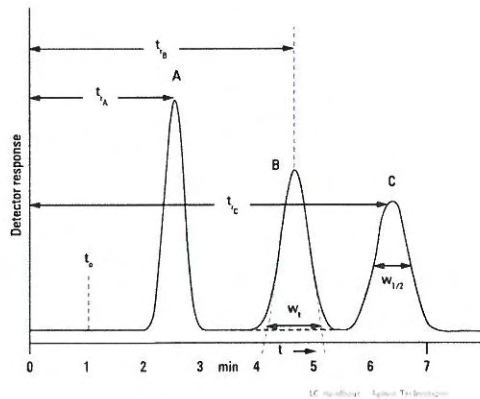
t_r - tempo de retenção

w_t - largura da base do pico



A largura da base do pico é definida pelo local onde a linha de base intercepta as tangentes ao pico gaussiano

$$N = 5.54 \left(\frac{t_r}{w_{1/2}} \right)^2$$



A largura do pico é calculada pela metade da altura do pico - facilmente é possível calcular o valor

É o método mais comum (usado pela EP - Pharmacopeia Europeia, entre outras ex. Alemã e Britânica)

Existem outras fórmulas que podem ser aplicadas

ex.
$$N = 2\pi \left(\frac{h_p t_r}{A_p} \right)^2$$

h_p - altura do pico
 A_p - área do pico
 t_r - tempo de retenção

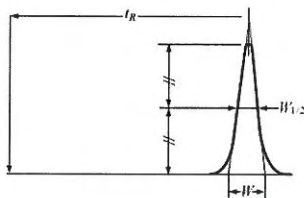
Cada uma, em princípio, originará um valor de N diferente, que será tanto menor quanto maior for a distorção do pico, ou se este apresentar sobreposição com outros picos

Essencialmente, ao comparar dois métodos é necessário usar a mesma fórmula

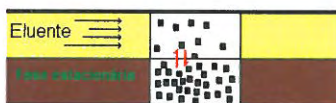
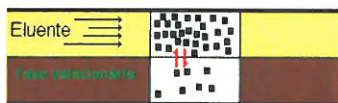
Colunas com maior N são mais eficientes

- uma coluna com maior N origina picos mais estreitos, a um dado t_r

Tempo de retenção, t_r , depende do coeficiente de distribuição K do componente em causa



K determina a ordem de eluição da coluna



$K > 1$ maior afinidade para a fase estacionária

$K < 1$ maior afinidade para a fase móvel

$$K = \frac{C_s}{C_m} \quad C_s; C_m - \text{concentração na fase estacionária (s) e móvel (m)}$$

Factor de retenção k (anteriormente factor de capacidade k')

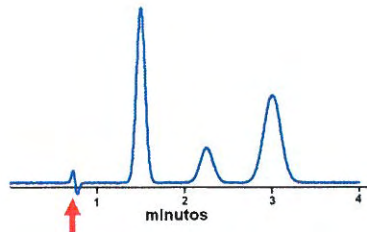
Mede o período de tempo que um componente de uma amostra se mantém na fase estacionária, relativamente ao tempo em que se mantém na fase móvel

$$k = \frac{t_r - t_0}{t_0}$$

Calcula-se através do tempo de retenção (t_r) de um dado pico, dividido pelo tempo de um pico não retido (t_0)

Estimar t_0

usando detectores sensíveis à concentração, tais como UV/VIS ou fluorescência é possível, por vezes, ver uma disrupção na linha de base



Quando isso não acontece, ex. detectores de massas, podemos estimar o t_0 a partir do volume da coluna e do fluxo

Estimar t_0

V_{col} - volume da coluna em mL

d - diâmetro da coluna em mm

L - comprimento da coluna em mm

V_{poro} - assumimos um volume médio de poro de 0.70 (70%) para um suporte de sílica (não modificada)

$$V_{col} = \frac{d^2 \cdot \pi \cdot L \cdot V_{poro}}{4000}$$

Para converter o volume da coluna em tempo dividimos pelo fluxo (mL eluente/min)

$$t_0 = \frac{V_{col}}{F}$$

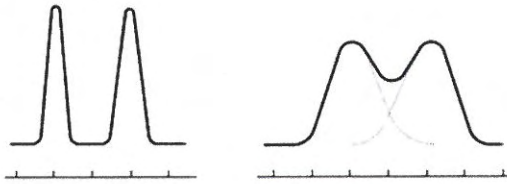
Fabricantes de colunas

Injectar na coluna um composto que se saiba que não vai ficar retido para medir o t_0

ex. uracil é um marcador t_0 muito usado por ter boa resposta em detectores UV e não ser retido em fases móveis de $\geq 60\%$ metanol: água

Factor de separação α $\alpha = \frac{k_1}{k_2}$

Medida do tempo, ou distância, entre o máximo de dois picos
 Se $\alpha = 1$, então os picos têm o mesmo t_r e co-eluem



Resolução R $R = \frac{\sqrt{N} (\alpha - 1)}{4} \frac{k}{(\alpha + 1)}$

Capacidade da coluna para separar 2 picos

$R = 0.6$ - valor mínimo para discernir “um vale” entre dois picos adjacentes com a mesma altura

$R = 1$ - valor mínimo para que a separação seja mensurável

$R = 2$ - valor desejado para a implementação de métodos quantitativos

Aumento da selectividade é o que mais se reflecte na resolução:

- alterar a fase estacionária
- alterar a fase móvel

ex. aumentando o tamanho da coluna para o dobro, e mantendo as mesmas condições, a resolução aumenta, mas aumenta também o tempo de análise - necessário estabelecer compromissos

Pressão P

$$\Delta P = \frac{\eta \cdot F \cdot L}{K^0 \cdot \pi \cdot r^2 \cdot d_p^2}$$

Factores chave que afectam a pressão do sistema:

- viscosidade do eluente (η)
- fluxo (F)
- comprimento da coluna (L)
- Permeabilidade da coluna (K^0)
- raio da coluna (r)
- diâmetro da partícula (d_p)

ex. a diminuição de d_p possibilita pressões mais elevadas, e tempos de corrida mais curtos (sistemas de UPLC)

$$u_A = u \cdot \left(\frac{1}{1+k} \right) \quad \mu_A - \text{fluxo do componente A através do sistema cromatográfico}$$

μ_A depende de:

fluxo do eluente (μ)

volume da fase móvel (V_m)

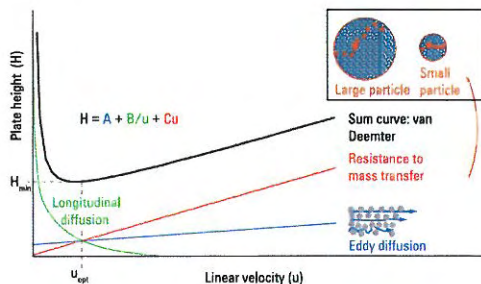
factor de retenção (k)

A equação de van Deemter, que avalia a eficiência, é função do fluxo

$$HETP = A + \frac{B}{u} + C \cdot u$$

O objectivo é ter um baixo HETP (altura equivalente de um prato teórico):

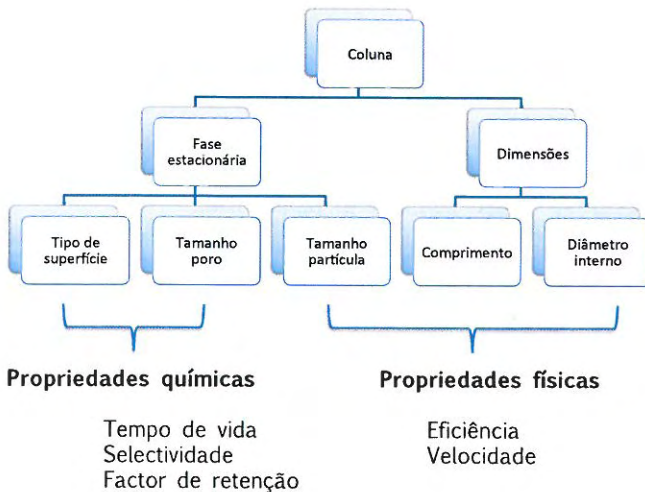
- eluentes da fase móvel com baixa viscosidade
- fluxos otimizados
- d_p menores



À medida que a temperatura aumenta, a viscosidade da fase móvel diminui:

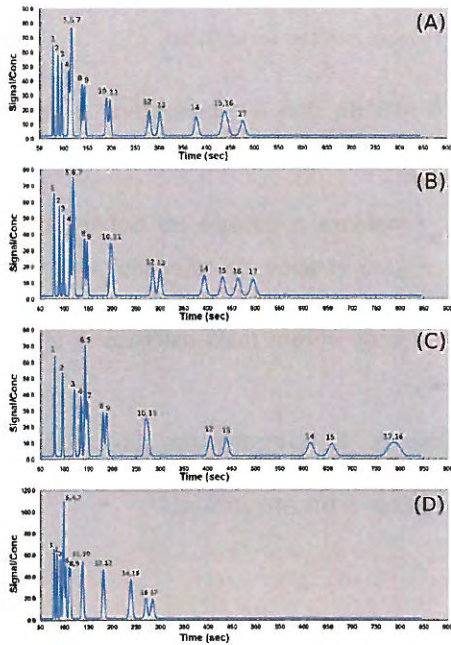
- melhora a difusão no sistema cromatográfico
- gera tempos de retenção mais curtos
- geralmente estes dois factores contribuem para os picos serem mais estreitos e altos (melhor definidos)

Quando a temperatura da coluna aumenta o t_r diminui - oscilações da temperatura ambiente podem influenciar a análise cromatográfica



mesmo método cromatográfico

colunas diferentes



Volume de injeção

Volume de injeção da amostra condiciona os resultados obtidos

- Volume muito grande – a coluna pode ficar sobrecarregada (overload) o que leva ao alargamento dos picos
Pode originar-se “peak fronting” e “peak tailing”



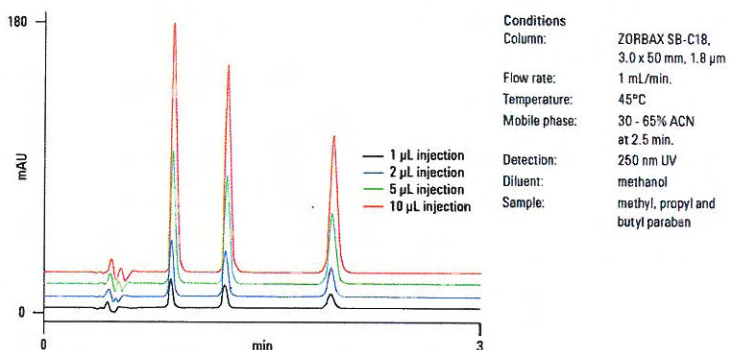
Tailing



Fronting

- Volume muito pequeno – não é suficiente para detectar / quantificar a amostra

Escolha do volume de injeção apropriado



Escolher a fase móvel apropriada

- Composição química

Maioritariamente utilizam-se:

- solvente de base aquosa
- solvente orgânico
- mistura de ambos
- solventes com solução tampão (buffer)

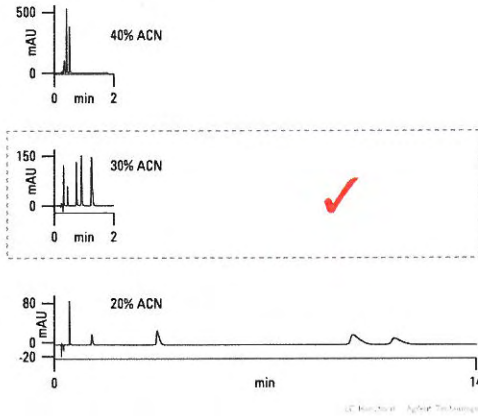
Solventes orgânicos mais usados:

- acetonitrilo
- metanol

Outros solventes orgânicos:

- tetrahidrofurano
- isopropanol

Concentração variável de água : solvente orgânico



- imiscível
- miscível

	Acetone	Acetonitrile (ACN)	n-Butyl Alcohol	Chloroform	Cyclohexane	Dichloromethane (DCM)	N,N-Dimethylformamide (DMF)	N,N-Dimethylacetamide (DMAc)	1,4-Dioxane	Ethyl Acetate	Ethyl Alcohol	Ethyl Ether	Ethylene Dichloride	Heptane	Iso-Octane	Isopropanol (IPA)	Methanol	Methyl n-Butyl Ether	Methyl Ethyl Ketone	Pentane	Tetrahydrofuran (THF)	Toluene	Water	p-Xylene		
Acetone																										
Acetonitrile (ACN)																										
n-Butyl Alcohol																										
Chloroform																										
Cyclohexane																										
Dichloromethane (DCM)																										
N,N-Dimethylformamide (DMF)																										
N,N-Dimethylacetamide (DMAc)																										
1,4-Dioxane																										
Ethyl Acetate																										
Ethyl Alcohol																										
Ethyl Ether																										
Ethylene Dichloride																										
Heptane																										
Hexane																										
Iso-Octane																										
Isopropanol (IPA)																										
Methanol																										
Methyl n-Butyl Ether																										
Methyl Ethyl Ketone																										
Pentane																										
Tetrahydrofuran (THF)																										
Toluene																										
Water																										
p-Xylene																										

Soluções tampão (Buffers)

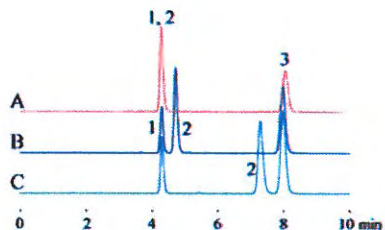
pH

- importante para o controlo da separação cromatográfica
- importante para manter a fase móvel nas mesmas condições

Soluções tampão mantém o pH constante

Importante especificar a composição do tampão e o pH desejado

10 mM de tampão de ácido fosfórico (pH 2.5)



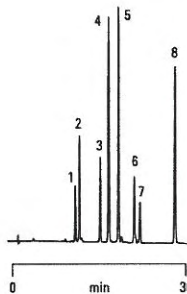
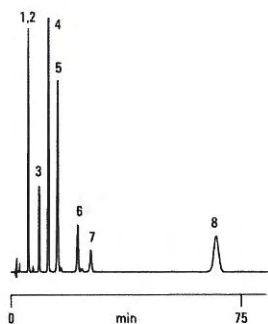
Método isocrático – a composição da fase móvel não varia ao longo da corrida cromatográfica

Método com gradiente – a composição da fase móvel varia ao longo da corrida cromatográfica

Quanto mais complexa for a amostra a analisar mais provável se torna que seja necessário utilizar um método com gradiente

Para além disso, quando na corrida isocrática se detectam picos muito largos ou t_r muito elevados, é possível que numa corrida com gradiente esses problemas sejam resolvidos

Também ajuda a diminuir a contaminação da coluna, uma vez que os métodos de gradiente terminam com a fase móvel de maior poder de eluição para a coluna



Peak Identification

1. Tebutiuron
2. Prometon
3. Prometryne
4. Atrazine
5. Bentazon
6. Propazine
7. Propanil
8. Metolachlor

Conditions

Column: ZORBAX SB-C8
 4.6 x 150 mm, 5 µm
 Mobile phase: A: H₂O with 0.1% TFA, pH 2
 B: Acetonitrile
 Flow rate: 1.0 mL/min
 Temperature: 35 °C

© 2011 Agilent Technologies

Os gradientes mais comuns utilizam duas fases móveis, comumente designadas por

- solvente A
- solvente B

um deles é água (ou uma solução tampão em água)
 o outro é um solvente orgânico, miscível com a água (e com o tampão)

Muitas vezes acidificam-se os solventes da fase móvel com 0.1 – 1% de ácido:

- maior preservação dos eluentes
- em alguns casos, melhor definição dos limites do pico
- em alguns casos, melhor desempenho da coluna cromatográfica

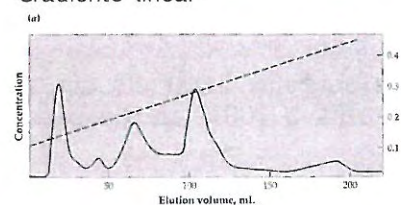
Passos para a escolha do gradiente apropriado:

1. Fazer um programa com um gradiente linear em que o solvente orgânico passa de 10% a 100% ao longo da corrida cromatográfica
2. Manter os 100% no final para garantir que todos os componentes de interesse eluam
3. Optimizar o tempo de corrida em função do t_r e da resolução dos picos obtidos

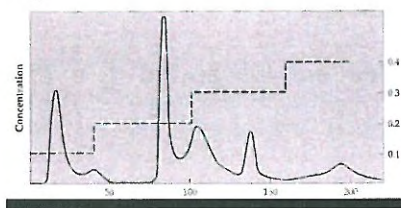
Geralmente um gradiente linear funciona para a maioria das separações - há um declive constante da composição orgânica da fase móvel ao longo do tempo

No entanto poder-se-á tentar corridas cromatográficas com declives diferentes, ou diferenças súbitas na concentração dos componentes da fase móvel, dependendo da resolução dos picos e do t_r que melhor servirem

Gradiente linear



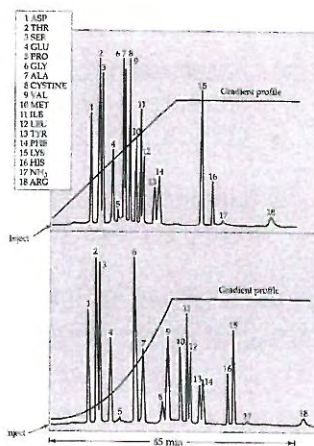
(a)



(b)

Gradiente "stepwise"

Gradiente não linear



Solvent	Viscosity (cP at 20 °C)	Boiling Point (°C)	UV Cutoff (nm)	Polarity Index (P')	Miscibility Number (M)
Acetone	0.36	56.29	330	5.1	15.17
Acetonitrile	0.38*	81.60	190	5.8	11, 17
n-Butyl Acetate	0.74	126.11	254	4.0	22
n-Butyl Alcohol	2.98	117.50	215	3.9	15
n-Butyl Chloride	0.45	78.44	220	1.0	
Chlorobenzene	0.80	131.69	287	2.7	21
Chloroform	0.57	61.15	245	4.1	19
Cyclohexane	1.00	80.72	200	0.2	28
Cyclopentane	0.44	49.26	198	0.1	
o-Dichlorobenzene	1.32**	180.48	295	2.7	
Dichloromethane	0.44	39.75	233	3.1	20
Dimethyl Acetamide	2.14	166.10	268	6.5	
N,N Dimethylformamide	0.92	153.00	268	6.4	12
Dimethyl Sulfoxide	2.24	189.00	268	7.2	9
1,4 Dioxane	1.37	101.32	215	4.8	17
Ethyl Acetate	0.45	77.11	256	4.4	19
Ethyl Alcohol	1.10	78.32	210		
Ethyl Ether	0.24	34.55	215	2.8	23
Ethylene Dichloride	0.79	83.48	228	3.5	
Heptane	0.42	98.43	200	0.1	29

Solvent	Viscosity (cP at 20 °C)	Boiling Point (°C)	UV Cutoff (nm)	Polarity Index (P')	Miscibility Number (M)
Hexane	0.31	68.70	195	0.1	29
Iso-Octane	0.60	89.24	215	0.1	29
Isobutyl Alcohol		107.70	220	4.0	15
Isopropyl Alcohol	2.40	82.26	205	3.9	15
Isopropyl Myristate		192.60			
Methanol	0.59	64.70	205	5.1	12
Methyl t-Butyl Ether	0.27	55.20	210	2.5	
Methyl Ethyl Ketone	0.43	79.64	329	4.7	17
Methyl Isobutyl Ketone	0.58	117.40	334	4.2	
N-Methylpyrrolidone	1.67**	202.00	265	6.7	
Pentane	0.23	36.07	190	0.0	
Petroleum Ether				0.1	
n-Propyl Alcohol	2.30	97.20	210	4.0	
Propylene Carbonate		241.70	220	6.1	
Pyridine	0.95	115.25		5.3	16
Tetrahydrofuran	0.55	66.00	212	4.0	17
Toluene	0.59	110.62	284	2.4	23
1,2,4-Trichlorobenzene		213.50	308		
Triethylamine	0.36**	89.50			
Trifluoroacetic Acid	0.93	71.80	210		
Water	1.00	100.00	190	10.2	
o-Xylene	0.81	144.41	288	2.5	

22 de Setembro de 2015 - manhã

Dr. Rogério - Instituto Tecnológico
09

Aumento da resolução

Optimização do método cromatográfico

1. Alteração do comprimento da coluna
2. Alteração do diâmetro da coluna
3. Escolha da fase estacionária apropriada
4. Volume de amostra e fluxo
5. Escolher a fase móvel apropriada
 - Fluxo
 - Composição química
7. Modo de eluição (isocrática ou por gradiente)
8. Pressão adequada
9. Temperatura adequada



Imagens sem indicação de fonte scanarizadas dos seguintes livros:

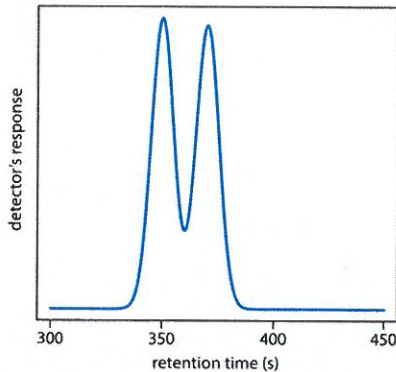
Practical High-Performance Liquid Chromatography, Veronika R. Meyer, 4th Edition; John Wiley & Sons Inc; 2004, ISBN: 0470093751

Analytical Chemistry, R. Kellner, J.-M. Mermet, M. Otto, H. M. Widmen,, Weinheim, Wiley-VCH, 1998. ISBN: 3-527-26881-3

Contemporary Instrumental Analysis, K. A. Rubinson, J. F. Rubinson, Prentice Hall, 1999, ISBN: 0-13-790726-5

Principles of instrumental analysis, SKOOG, Douglas A. ; HOLLER, F. James ; NIEMAN, Timothy, - 5 ed. South Melbourn, Brooks/Cole, 1998, ISBN: 0-03-002078-6

Apresenta-se de seguida um cromatograma obtido por HPLC de fase normal, para a separação de dois compostos.



1. Como proceder para otimizar a separação dos dois picos?
2. Uma coluna mais longa poderia melhorar a separação dos picos?

Em HPLC de fase normal a água é considerada um eluente "forte" e solventes orgânicos, tais como o metanol, são considerados eluentes "fracos".

Na tabela abaixo estão os tempos de retenção de 3 compostos eluídos em 100% água.

Composto	t_r (min)
A	8.04
B	8.26
C	8.43

3. Se o gradiente cromatográfico fosse alterado para 50% água: 50% metanol, esperaria que cada um destes compostos tivesse tempo de retenção maior ou menor?
4. E nestas condições ainda seria possível distinguir os 3 compostos como picos individuais?

Num sistema equipado com uma coluna de fase reversa e onde a eluição é realizada com uma mistura de metanol e água (60:40), temos os seguintes tempos de retenção:

Composto	t_r (min)
A	10.03
B	11.26
C	35.73

5. O que poderá fazer para que a duração da análise diminua ou seja, como diminuir o tempo de retenção da espécie C?
6. O que sugere para conseguir uma separação efectiva entre os picos dos compostos A e B, e simultaneamente manter um t_r baixo para a espécie C?



Aprender a conhecer o ambiente marinho de Portugal

Técnicas analíticas em LC-MS/MS

22 a 25 de Setembro de 2015

CIIMAR & IPMA



Técnicas analíticas em LC-MS/MS

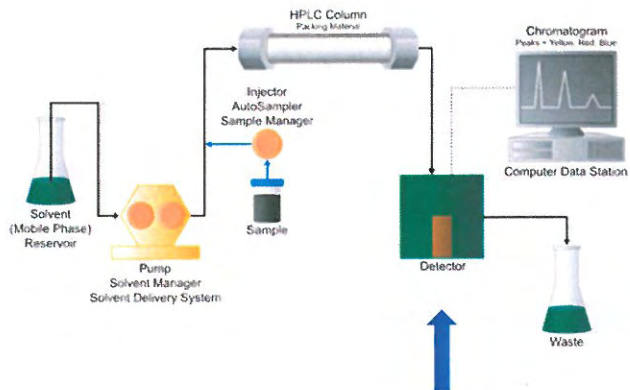
23 Setembro

Espectrometria de massa

- Técnicas de ionização
- Tipos de analisadores de massas
- Interpretação de espectros de massa

Espectrometria de massa em tandem

- Interpretação de espectros de massa em tandem



Mass Spectroscopy: A Historical Perspective

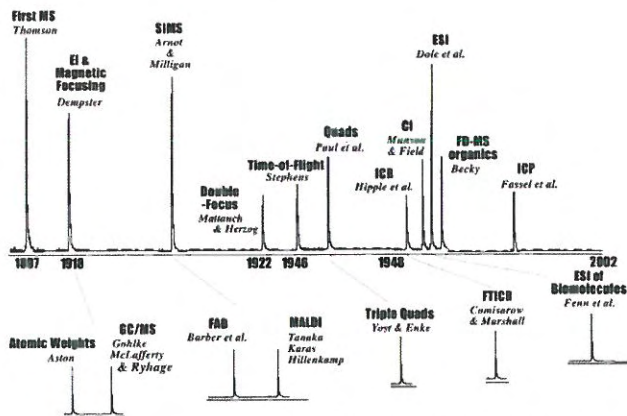


Fig. 1. Chronological list of key events in the history of mass spectrometry.

A espectrometria de massa (MS) é um método analítico que permite a conversão de moléculas neutras em iões, a sua separação e detecção

É um método conveniente para determinar pesos moleculares (MW)

Fornece informação acerca da estrutura (mas não permite a determinação)

Requer volumes de amostra muito pequenos (ex. $< 10 \mu\text{L}$)

O resultado que se obtém com o método é um espectro de massas

Os MS compreendem:

- uma **fonte de iões** que converte as moléculas neutras em partículas carregadas (ionização)
- um **analisador de massas** que separa os iões da amostra de acordo com a relação entre a sua massa e a sua carga
- um **detector**, no qual os iões separados são recolhidos e caracterizados

Importante para o funcionamento do MS:

- sistema de introdução da amostra (vinda do LC, por ex.)
- bombas de vácuo (o analisador de massas opera em vácuo ca. 10^{-3} e 10^{-5} Pa)
- parte óptica, para focar e acelerar os iões
- sistema de processamento e armazenamento de dados

O analisador de massas utiliza o movimento dos iões para os separar

O movimento dos iões vai ser dependente da sua:

- massa
- carga

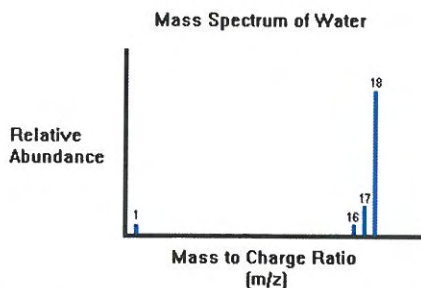
Razão massa - carga m/z
(mass-to-charge ratio)

Um espectro de massas é uma representação gráfica do sinal dos iões em função da m/z

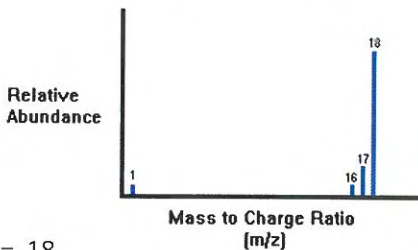
m/z

Natureza da informação obtida:

- Qualitativa
presença de determinada m/z
- Quantitativa
abundância relativa de determinada m/z



Mass Spectrum of Water



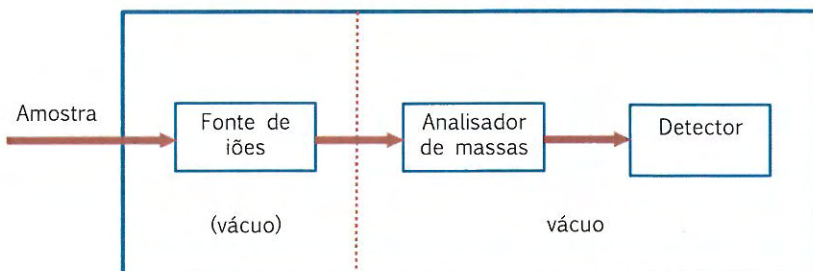
$$m/z = 18 \text{ (H}_2\text{O)}$$
$$\text{O} + \text{H} + \text{H} = 16 + 1 + 1 = 18$$

$$m/z = 17 \text{ (HO)}$$
$$\text{O} + \text{H} = 16 + 1 = 17$$

$$m/z = 16 \text{ (O)}$$
$$\text{O} = 16$$

$$m/z = 1 \text{ (H)}$$
$$\text{H} = 1$$

Espectrómetro de massas



Técnicas de ionização mais comuns

- EI – Electron ionization (ionização por electrões)
- API – Atmospheric pressure ionization (ionização à pressão atmosférica)

Ionização por electrões

Um filamento aquecido de W ou Re emite electrões que são capturados no ânodo oposto

A energia dos electrões é dada pela diferença potencial entre cátodo e ânodo

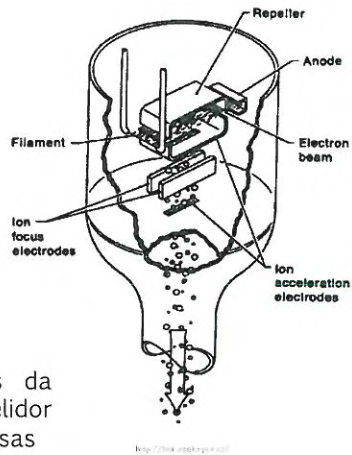
Os analitos de interesse são volatilizados para serem medidos

- condições típicas:
- vacúo ca. 10^{-3} a 10^{-5} Pa
 - temperatura ca. 150 a 400°C



A interacção dos electrões emitidos com os electrões de valência da molécula resulta na perda de um electrão

Os iões formados são expelidos da fonte de iões pelo eléctrodo repelidor em direcção ao analisador de massas



Possíveis desvantagens:

- é uma técnica “dura” – emprega uma grande quantidade de energia
- é possível que ocorra fragmentação excessiva devido à grande quantidade de energia empregue
- é possível que ocorra ausência do ião M^+

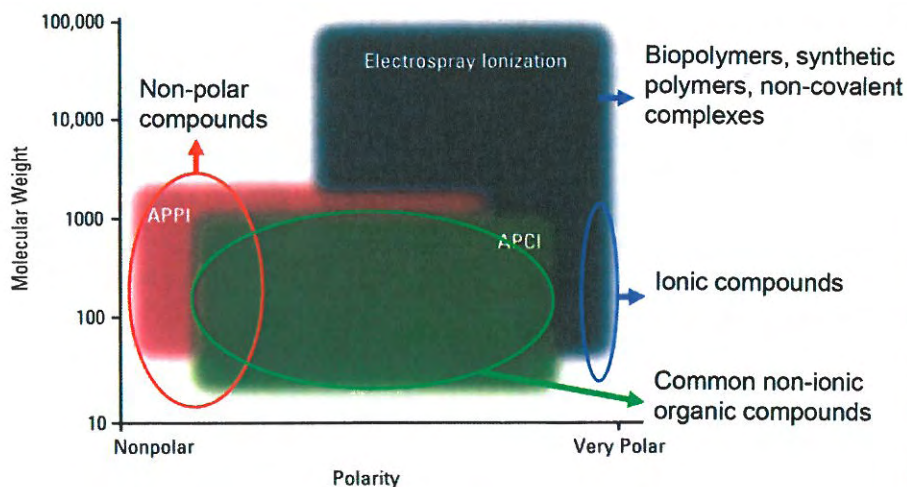
Ionização à pressão atmosférica

3 técnicas base:

- ESI - Electrospray Ionization
(ionização por electrospray)
- APCI - Atmospheric Pressure Chemical Ionization
(ionização química à pressão atmosférica)
- APPI - Atmospheric Pressure Photoionization
(Fotoionização à pressão atmosférica)

(numerosas variantes com outros acrónimos)

ESI e APCI são as técnicas mais usadas em LC
APPI é usada para certos compostos não polares



Polaridade

As técnicas de API podem operar no modo:

- Positivo – para a maioria dos compostos
- Negativo – principalmente compostos que contenham grupos sulfúricos, carboxílicos, halogénicos, nitro ou organo-metálicos

Electrospray Ionization (ESI)

O analito (e o eluente) são nebulizados na ponta de um capilar através da aplicação de uma voltagem elevada (3 – 5 kV)

Formação de gotículas com carga à superfície

Polaridade das cargas superficiais depende da polaridade da voltagem

Evaporação dos solventes das gotículas aumenta a densidade de cargas superficiais

“Coulombic explosion”

Formação de gotículas cada vez mais pequenas e cargas distribuídas pelas novas gotículas

Figure 1:

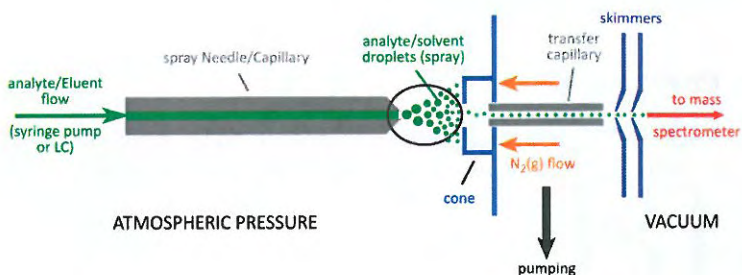
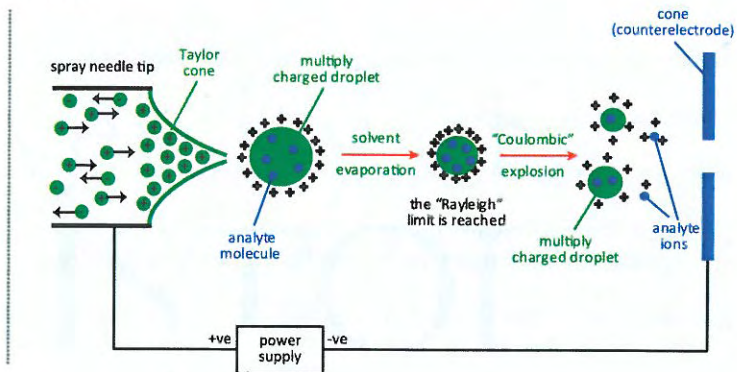


Figure 2:



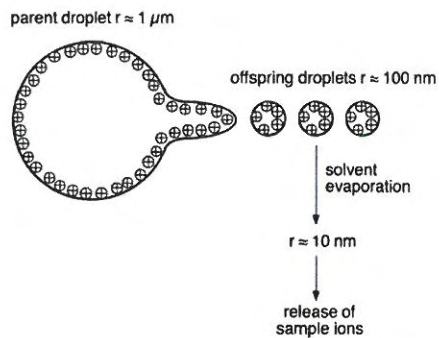
ESI

1. Nebulização da solução e obtenção de gotículas carregadas
2. Libertação dos iões das gotículas
3. Transporte dos iões da zona à pressão atmosférica para a zona em vácuo

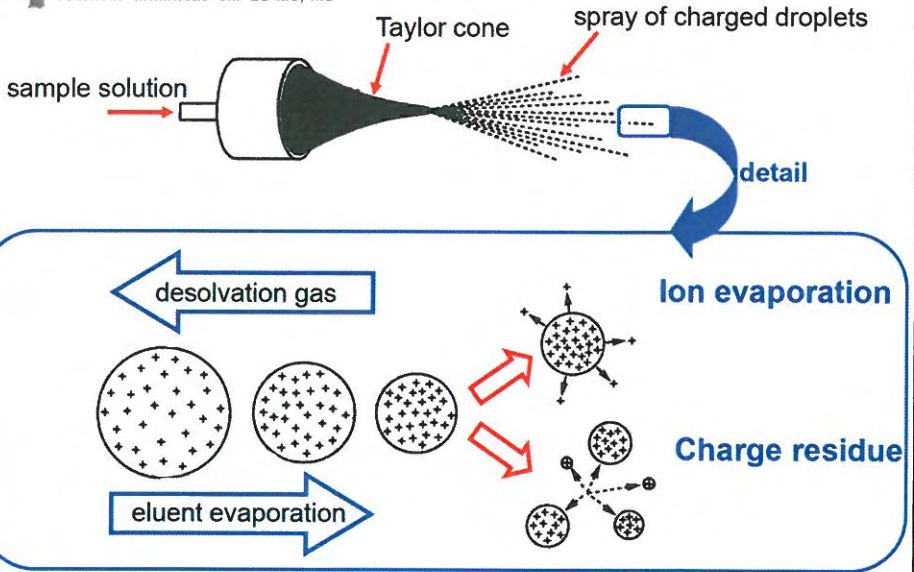
1. A formação de gotículas carregadas após nebulização depende de:
 - analito de interesse – estrutura química e concentração
 - composição do eluente
 - fluxo do eluente
 - presença (concentração) de aditivos (ex. agentes de activação de superfície ou compostos iónicos)
 - gas nebulizador (geralmente He ou N₂)
 - fluxo e temperatura do gas nebulizador
 - diâmetro e geometria do capilar

2. Libertação dos iões das gotículas

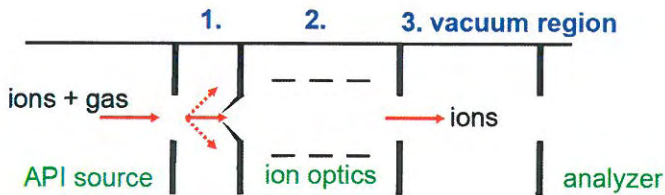
- a. Evaporação dos iões
- b. Resíduo carregado



<http://www.oxford-journals.org/>

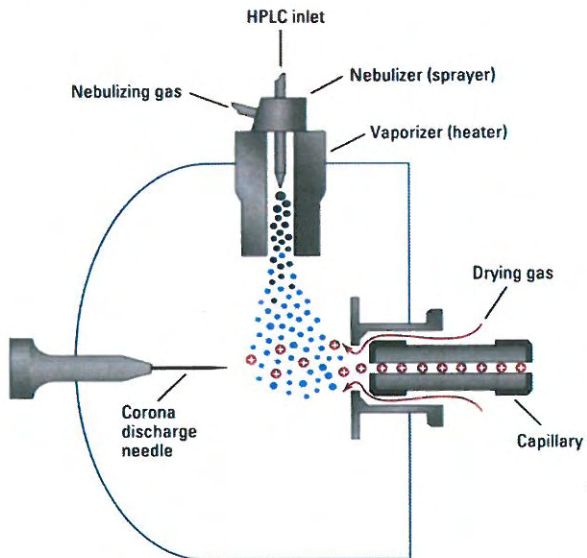


3. Transporte dos iões da zona à pressão atmosférica para a zona em vácuo através de bomba de vácuo



Atmospheric Pressure Chemical Ionization (APCI)

- elevada voltagem (3-4 kV) é aplicada através de uma agulha
- primeiro é ionizado o eluente, uma vez que está em excesso comparado com o analito
- o analito é ionizado por reacção com o gas formado pela evaporação do eluente
- os iões resultantes são encaminhados para o analisador de massas



Mecanismo de formação de iões positivos

1. Iões primários formados pelo gás nebulizador
2. Gás de reacção formado pela fase móvel
3. Ionização do analito

1. Iões primários formados pelo gás nebulizador



2. Gás de reacção formado pela fase móvel



R - eluente (= gás de reacção) ex. metanol, acetonitrilo

3. Ionização do analito

Protonação



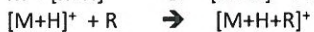
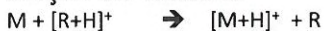
Troca de carga



Formação de aductos



Adição de solvente



R - eluente; M - analito; Cat - catião: ex. Na^+ , K^+ , NH_4^+ , etc.

Mecanismo de formação de iões negativos

Desprotonação



Captura electrónica



Troca de carga



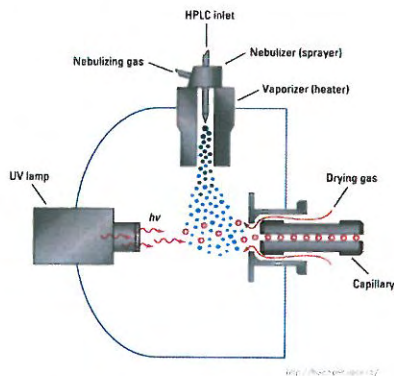
Formação de aductos



R – eluente; M – analito; X – anião: ex. Cl⁻, etc.

Atmospheric Pressure Photoionization (APPI)

- lâmpadas UV emitem fotões
- podem usar-se dopantes (ex. tolueno, benzeno) que ionizam o analito (melhoria da sensibilidade e selectividade)



Matrix Assisted Laser Desorption Ionization (MALDI)

Técnica de ionização em que a amostra é bombardeada com um laser

A matriz que contém a amostra absorve a radiação laser e transfere prótons para a amostra

Tipicamente a radiação laser é pulsada

É um processo que ocorre em vácuo

Supressão de íão (Ion Suppression)

É o nome dado ao processo adverso responsável pela pouca eficiência da ionização do analito de interesse

Usando APCI este efeito adverso ocorre menos frequentemente do que usando ESI devido aos mecanismos de ionização

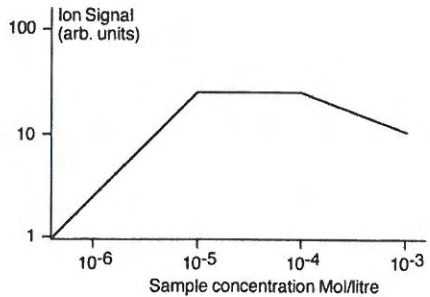
Em ESI este efeito foi observado para muitos analitos

Há perda de linearidade, possivelmente causada por saturação do analito a grandes concentrações – inibição da saída de íões do interior das gotículas carregadas

A competição por espaço pode ser considerada uma causa da supressão de íão

Dependência da resposta em função da concentração

- a dependência da resposta em função da concentração altera-se com a massa
- saturação da superfície da gotícula
- aumento da massa pode causar ainda maior depressão da resposta em função da concentração



Outra explicação para a supressão de ião considera as propriedades físicas das gotículas como o factor primordial, e não as características do analito

Elevadas concentrações podem originar aumento da tensão superficial e da viscosidade, reduzindo a evaporação do solvente, e conseqüentemente da eficiência da ionização

Outra explicação sugere que a presença de componentes não voláteis na amostra pode contribuir para a co-precipitação do analito na gotícula, inibindo a ionização, ou pode contribuir para que a redução do tamanho da partícula para o tamanho apropriado não aconteça

Métodos de LC desenvolvidos sem detectores de massas – para usar em LC/MS verificar se na composição da fase móvel não há solventes não voláteis, tais como sais inorgânicos

Quando trabalhamos com detectores MS é muito importante que a fase móvel não seja composta por solventes não voláteis - pode acontecer que ao chegarem ao nebulizador estes sais sequem, o que pode provocar a corrosão da fonte de ionização

ex.

- ácido fosfórico
- sais de fosfatos

Modificadores voláteis que causam supressão de iões

ex.

- TFA
- TEA

Formato ou acetato, ou os seus sais de amónio, acetato de amónio ou formato de amónio

Modificadores de iões mais usados

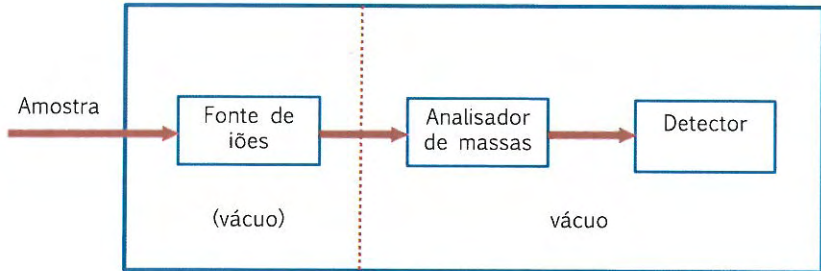
Indicados para detectores de massas

Solúveis em solventes orgânicos (que constituem a fase móvel) e voláteis

pH e modificadores de fases móveis:

- quando possível evitar trabalhar a pHs extremos
- trabalhar sempre na gama de pH recomendada para a coluna
- a maioria das separações cromatográficas ocorrerá a pH entre 2 e 8
- o tempo de retenção de analitos ácidos ou básicos (ionizáveis) variará com o pH e pode alterar-se radicalmente

Espectrómetro de massas



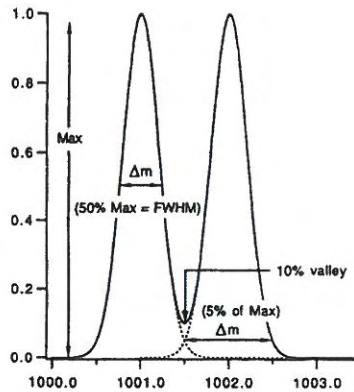
Diferentes analisadores de massas

Diferentes princípios físicos podem ser utilizados na separação de íons, com base na sua m/z

- diferentes trajetórias dos íons em campos magnéticos ou eléctricos (**analisadores magnéticos**)
- diferente estabilidade das oscilações em campos bi ou tridimensionais em correntes alternadas de alta frequência (**quadropoles**)
- diferente tempo de voo (time of flight) na região livre do campo (**TOF**)
- diferente frequência de oscilação na “**Orbitrap**”

Poder de resolução

razão entre valor de m/z do ião e a largura a meio da altura máxima do pico
 - full width at half maximum (FWHM)



$$R = \frac{m}{\Delta m}$$

Exactidão da massa medida

$$\text{exactidão} = \frac{(m/z)_{\text{exp}} - (m/z)_{\text{teórico}}}{(m/z)_{\text{teórico}}} \times 10^6 \quad [\text{ppm}]$$

Ex. valor experimental é $m/z=300.0463$ e valor teórico é $m/z=300.0473$

$$\frac{300.0463 - 300.0473}{300.0473} \times 10^6 = -3.3 \quad \text{ppm}$$

O analisador deve ser estável e robusto para eliminar o risco de alterações de massa

Analisadores de massas com maior exactidão:

- TOF (e analisadores afins)
- Orbitrap

Analizador magnético

Analizador de massas utiliza o movimento dos iões num campo magnético / electromagnético para os separar

Quando os iões entram no campo magnético seguem trajectórias que são dependentes da sua m/z

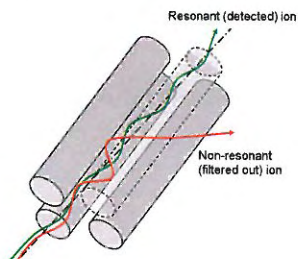
Iões com m/z menor são mais afectados pelo campo magnético na sua trajectória do que iões com m/z maior

Analizador de massas quadropole

Deve o seu nome ao facto de ter quatro cilindros de metal dispostos paralelamente

Os iões que percorrem a linha central irão até ao detector

Outros iões irão afastar-se da linha central e nesse afastamento atingir o cilindro de metal, ou as paredes, não chegando ao detector



Analizador de massas quadropole com armadilha de iões

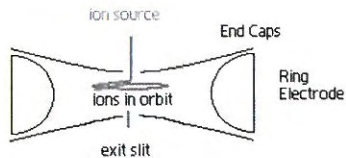
Semelhante ao quadropole no princípio de funcionamento

Usa um campo eléctrico para a separação dos iões

O analisador tem um eléctrodo de uma voltagem específica

Os iões entram no analisador e o campo eléctrico dentro deste origina que orbitem no espaço

iões mais estáveis saem em direcção ao detector e iões mais instáveis colidem com a parede, eliminando a possibilidade de atingirem o detector



23 de Setembro de 2015 - manhã

47

Animações do funcionamento dos analisadores de massa

Quadrupole

<https://www.youtube.com/watch?v=WbX27Gg5ziU>

ESI com armadilha de iões

<https://www.youtube.com/watch?v=3uUwa1DDoHQ>

23 de Setembro de 2015 - manhã

48

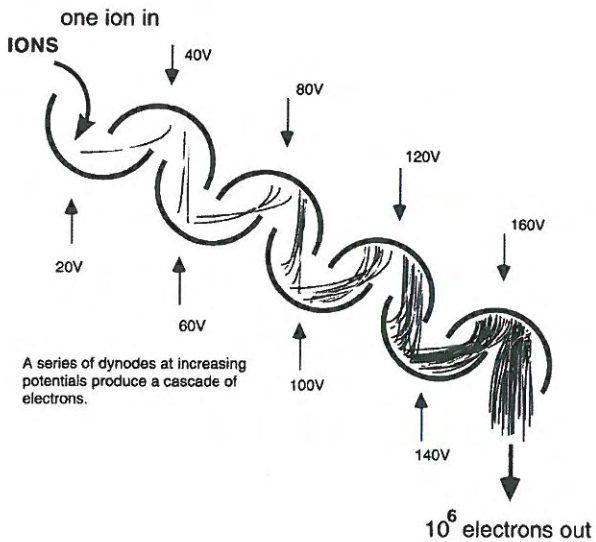
Detectores

Detector gera uma corrente de sinal para os iões que o atingem

Detector mais comum é o multiplicador de electrões

O ião atinge o primeiro dínodo, resultando daí a emissão de vários electrões

Esses electrões são por sua vez atraídos para o segundo dínodo onde cada electrão origina mais electrões e assim sucessivamente



http://www.wiley.com/go/analyticalchemistry

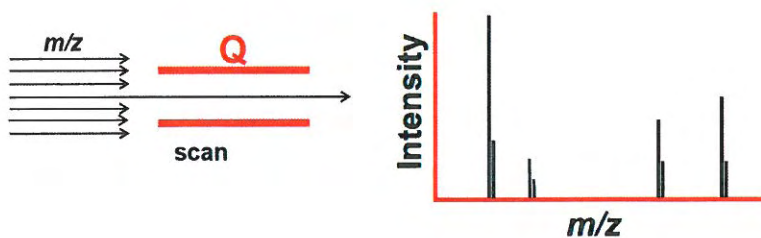
Propriedades desejáveis num detector

- elevada amplificação
- tempo de resposta rápido
- baixo ruído
- a mesma resposta para todas as massas
- estabilidade ao longo do tempo
- tempo de vida longo

Espectros de massas

“Full Scan”

Toda a informação recolhida no detector é apresentada

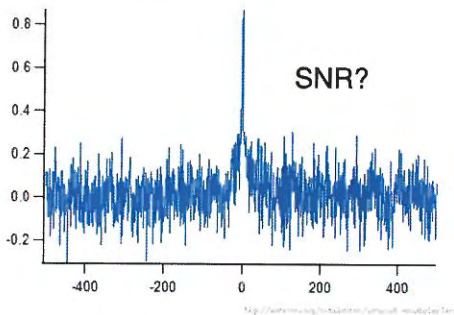


<http://www.elsevier.com>

Razão Sinal - Ruído

Signal-to-Noise Ratio (s/n ou SNR)

- $s/n = \text{amplitude do sinal} / \sigma \text{ ruído}$
- $s/n = 3$ limite de detecção (LOD)
- $s/n = 10$ limite de quantificação (LOQ)



23 de Setembro de 2015 - manhã

53

Cromatograma de iões totais

Total Ion Current (TIC)

É a soma de todas as intensidades de todos os iões (incluindo o ruído)

Cromatograma de Pico Base

Base Peak Chromatogram (BPC)

Semelhante ao TIC mas com melhor razão s/n

Mostra essencialmente o "pico base"

Cromatograma de ião extraído

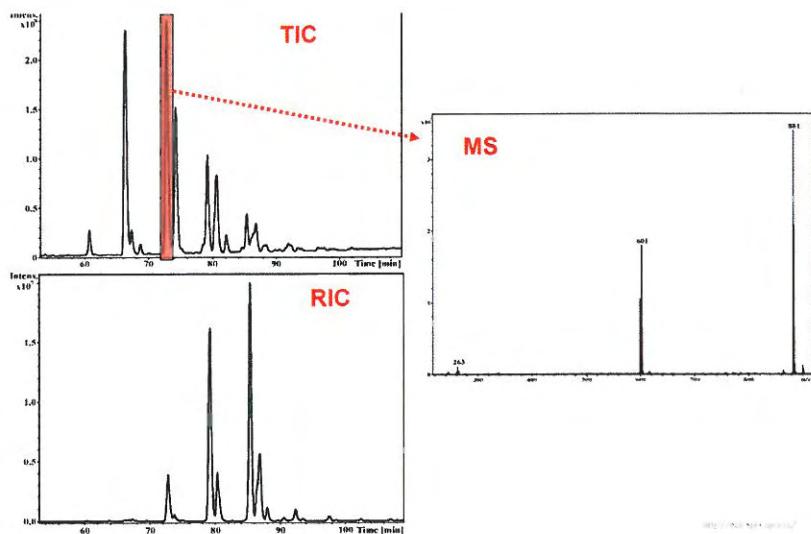
Extracted Ion Current (EIC) (ou também Reconstructed Ion Current (RIC))

É a soma de todas as intensidades para uma determinada m/z

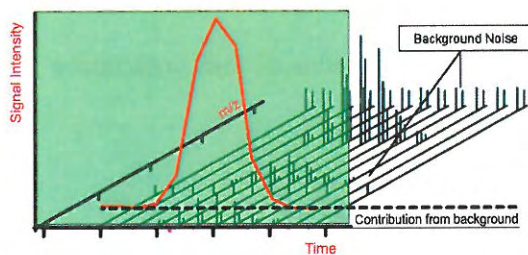
Útil na identificação de picos co-eluídos e picos vestigiais

23 de Setembro de 2015 - manhã

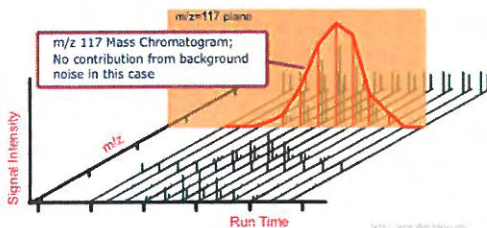
54



TIC

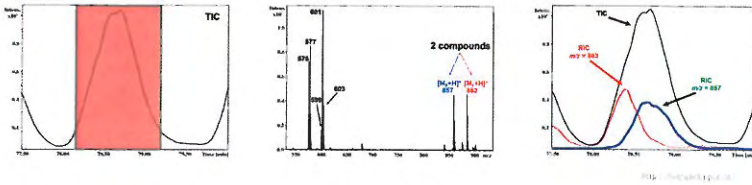


RIC



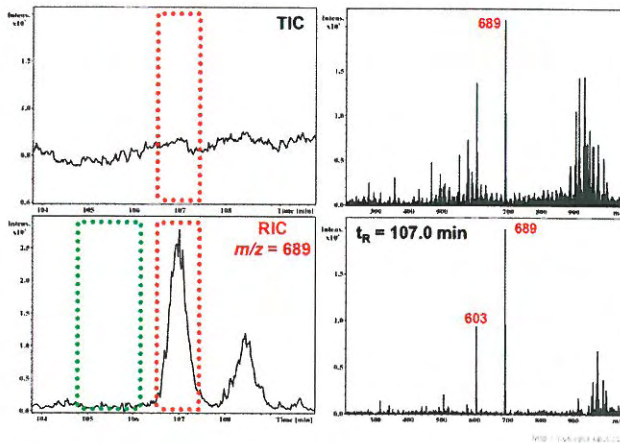
Co-eluição de analitos

Possibilidade de identificação de analitos que apresentam o mesmo t_r , comparando os cromatogramas TIC e RIC e os respectivos espectros de massas



Sinal vestigiário

Possibilidade de detectar sinais selectivamente

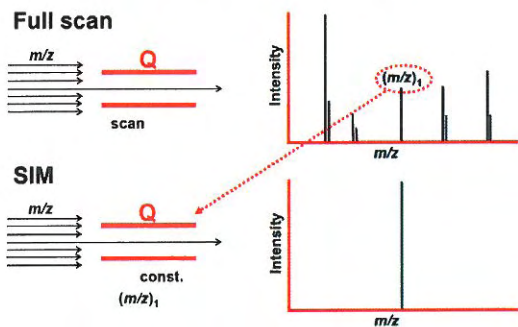


Espectros de massas

“Selected Ion Monitoring” (SIM)

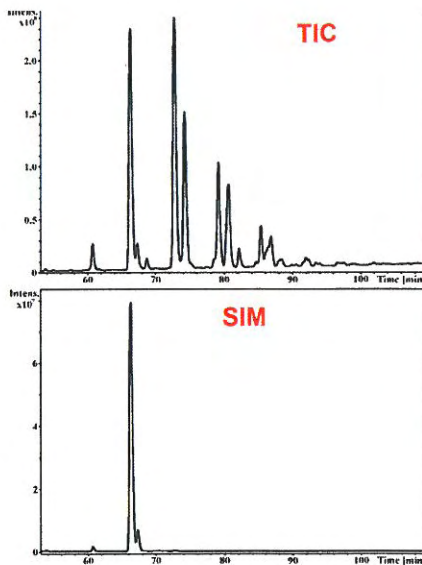
Monitorização de iões seleccionados

Informação recolhida no detector é seleccionada

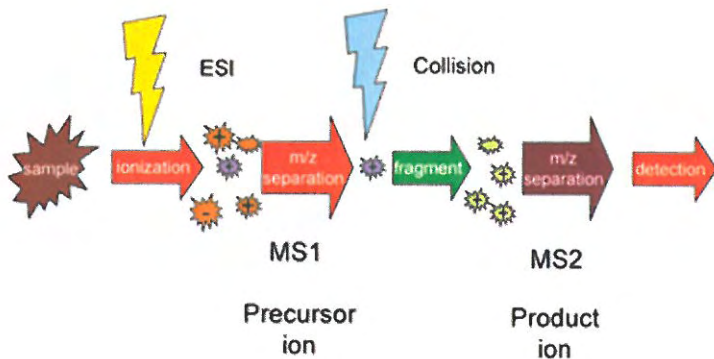


Seleção de apenas um ião

Apenas um valor de m/z é detectado e não todo o espectro de massas



Espectrometria de massa em tandem

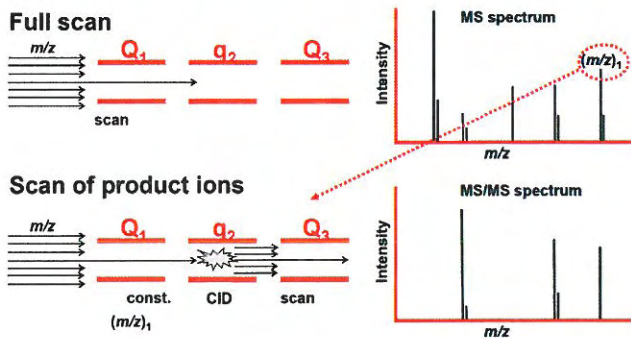
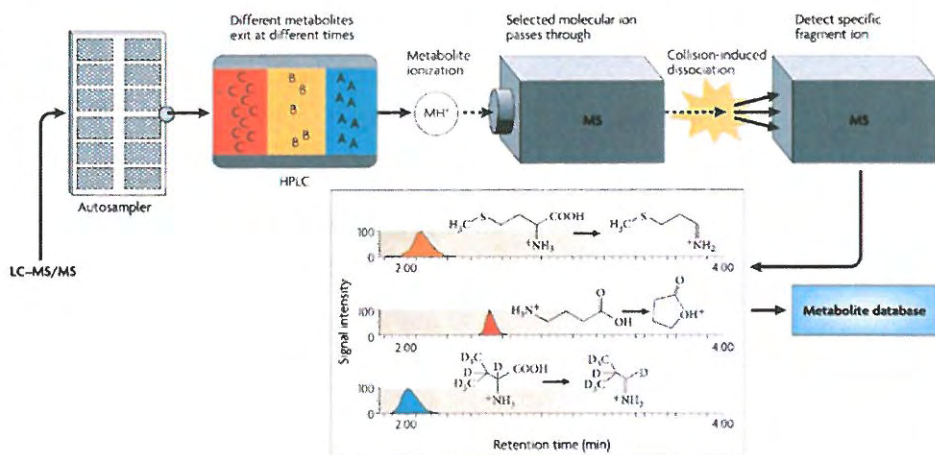


Collision-induced dissociation (CID) (Dissociação induzida por colisão)

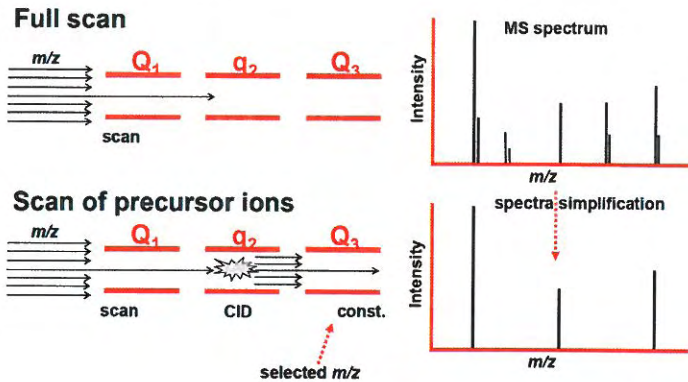
Técnica de espectrometria de massa para induzir a fragmentação de íões

Os íões geralmente são acelerados para poderem colidir com moléculas neutras – a maior parte das vezes moléculas de gases como hélio, nitrogénio ou árgon

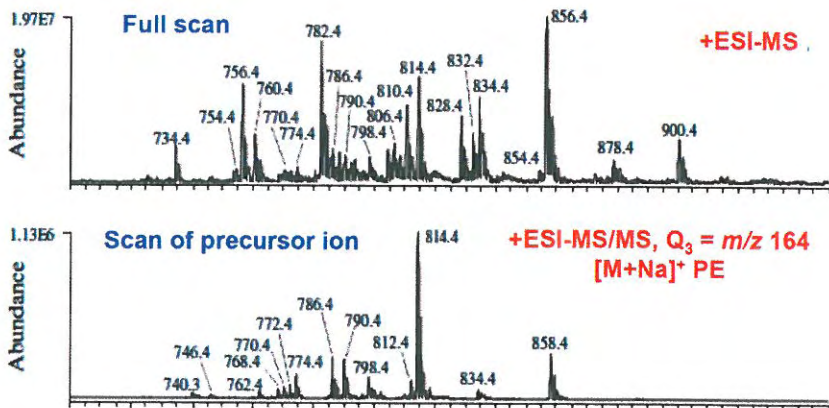
Da colisão resulta a fragmentação do íão em íões menores que serão detectados da mesma forma que o íão não fragmentado



- Detecção de iões produto
- Informação estrutural pode ser obtida estudando os fragmentos obtidos



- Detecção de iões precusores
- Informação acerca de grupos funcionais ou classes de compostos



Efeito de grupos funcionais na fragmentação

Mecanismos de fragmentação complexos e competitivos

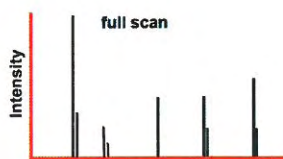
Dificuldade de predição dos constituintes da amostra e dificuldade de interpretação dos espectros

Experiência com amostras que contêm compostos similares é muito importante

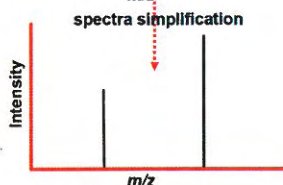
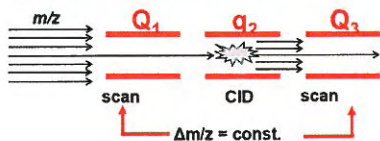
De forma genérica o efeito de grupos funcionais na fragmentação segue a ordem:

nitrito > fosfato ~ sulfato >> ácido sulfónico > ácido carboxílico > hidroxil > nitro > halogéneos

Full scan

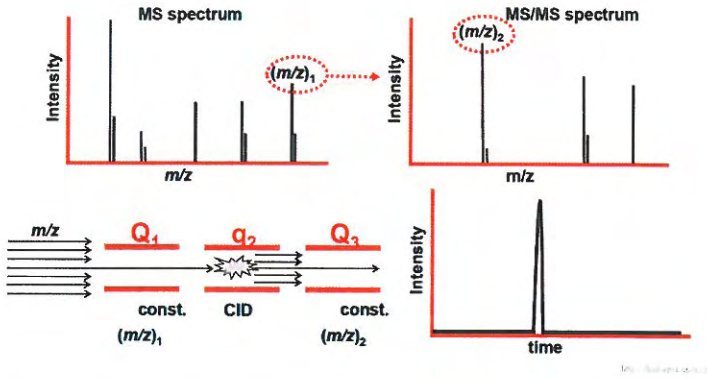


Neutral loss scan



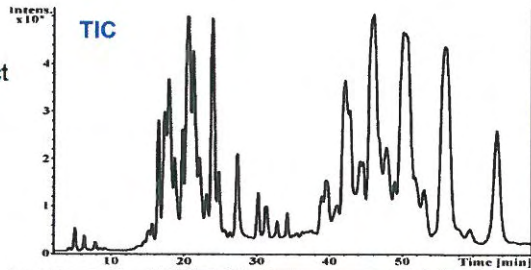
- Detecção de todos os iões que tenham perdido uma massa constante
- Informação acerca de grupos funcionais ou classes de compostos

“Selected Ion Monitoring” (SRM)

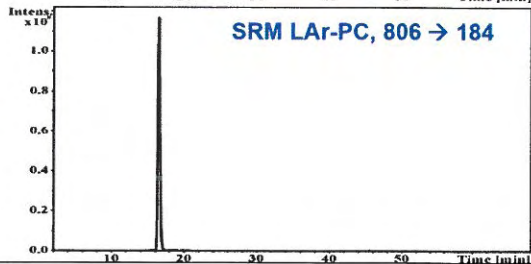


Apenas os iões precusores e iões produto são seleccionados
Específico
Usado para quantificação

Full scan
LC/MS of total lipid extract
from egg yolk



SRM
LAR-phosphocholine
 $Q_1 = \text{const.} = m/z 806$
 $Q_3 = \text{const.} = m/z 184$



Product scan

O primeiro quadrupole Q1 selecciona um ião de massa conhecida, que é posteriormente fragmentado no q2

O terceiro quadrupole Q3 scanariza toda a gama de m/z , dando informação acerca dos tamanhos dos fragmentos obtidos

A estrutura do ião original pode, por vezes, ser deduzida a partir dos fragmentos

Precursor scan

O primeiro quadrupole Q1 scanariza toda a gama de m/z

O terceiro quadrupole selecciona um ião de massa conhecida

Este método é selectivo para iões que tenham um grupo funcional característico que será fragmentado no q2

Neutral loss scan

Ambos Q1 e Q3 scanarizam, neste caso com uma diferença de massa constante

Isto permite identificar os iões que, por fragmentação em q2, perderam um mesmo fragmento (ex. um grupo CH_3)

Semelhante ao “precursor scan” este método é selectivo para iões que tenham um grupo funcional característico

SRM

Ambos Q1 e Q3 seleccionam uma massa específica

Quando mais do que uma massa específica está seleccionada por vezes recebe o nome de Multiple Reaction Monitoring (MRM) mas este termo é desencorajado pela IUPAC

	Q1	q2	Q3
Full scan	scan	-	-
SIM	const	-	-
Product scan	const	CID	scan
Precursor scan	scan	CID	const
Neutral loss scan	scan	CID	scan (const $\Delta m/z$)
SRM	const	CID	const

Quantificação em LC-MS/MS

Padrão interno (internal standard – IS) é essencial para excluir os efeitos de supressão de íão, efeitos de matriz, contaminações, etc.)

Padrões deuterados são os mais indicados

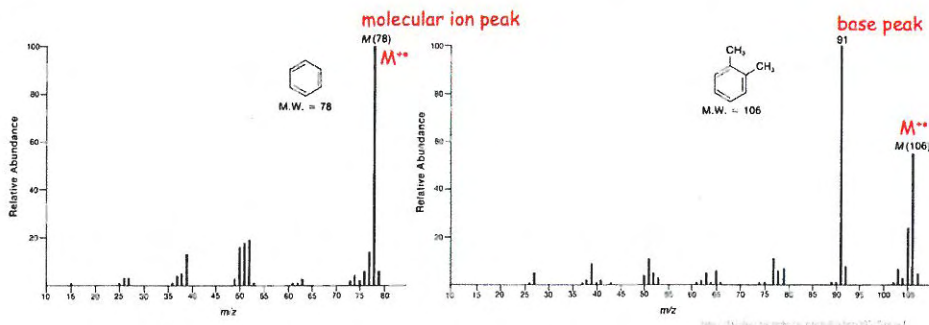
- Recuperação idêntica
- Espectro de massas idêntico (excepto pela mudança de massa)
- Retenção idêntica

Em alternativa um composto análogo poderá ser utilizado, se não houver possibilidade de usar o padrão deuterado

Uso de SRM – maior selectividade e sensibilidade

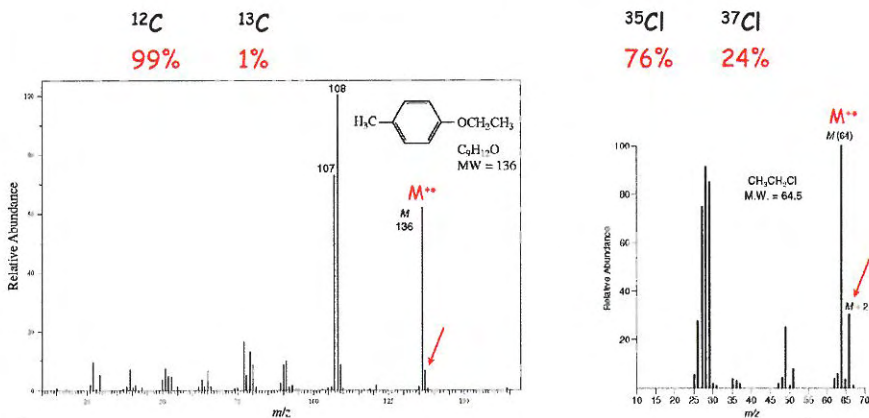
Interpretação de um espectro de massas

Geralmente o último pico do espectro (maior m/z), mas nem sempre



Interpretação de um espectro de massas

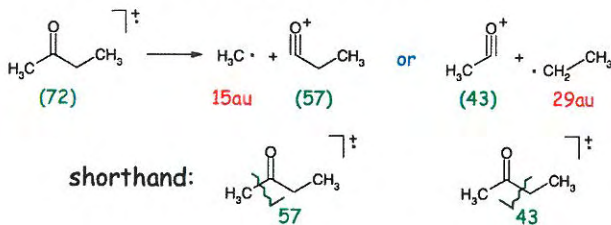
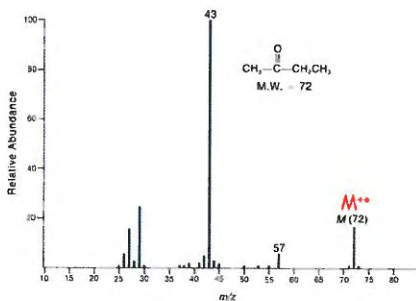
Isótopos de massa maior estão presentes



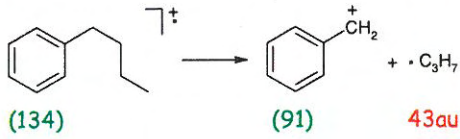
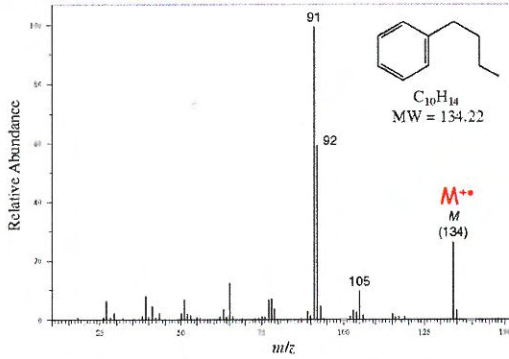
Natural Isotopic Abundances for Common Elements

Element	"M"		"M+1"		"M+2"		Type
	m/z	%	m/z	%	m/z	%	
H	1	100	2	0.015	-	-	"M"
C	12	100	13	1.1	-	-	"M+1"
N	14	100	15	0.37	-	-	"M+1"
O	16	100	17	0.04	18	0.2	"M+2"
F	19	100	-	-	-	-	"M"
Si	28	100	29	5.1	30	3.4	"M+2"
P	31	100	-	-	-	-	"M"
S	32	100	33	0.79	34	4.4	"M+2"
Cl	35	100	-	-	37	32	"M+2"
Br	79	100	-	-	81	97.3	"M+2"
I	127	100	-	-	-	-	"M"

http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov



http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov



http://pubs.acs.org/doi/10.1021/acs.analchem.5b01001

23 Setembro

Estudo de casos - Investigação aplicada: Exemplos de monitorização de contaminantes na costa atlântica

- Colheita de amostras
- Preparação das amostras para análise
- Pré-tratamento, limpeza e pré-concentração

DIRECTIVA 2008/56/CE DO PARLAMENTO EUROPEU E DO CONSELHO
de 17 de Junho de 2008

que estabelece um quadro de acção comunitária no domínio da política
para o meio marinho

(Directiva-Quadro «Estratégia Marinha»)

Artigo 1º

Objecto

1. A presente directiva estabelece um quadro no âmbito do qual os Estados-Membros devem tomar as medidas necessárias para obter ou manter um bom estado ambiental no meio marinho até 2020.

Artigo 5º

Estratégias marinhas

1. Cada Estado-Membro deve elaborar, em relação a cada região ou sub-região marinha em causa, uma estratégia marinha a aplicar às suas águas marinhas (...)

2. (...)

a) Preparação:

i. avaliação inicial (...) do estado ambiental actual das águas em causa e do impacto ambiental das actividades humanas nessas águas (...)

ii. definição (...) do bom estado ambiental das águas em causa (...)

iii. estabelecimento (...) de um conjunto de metas ambientais e indicadores associados (...)

iv. estabelecimento e aplicação (...) de um programa de monitorização para a avaliação constante e a actualização periódica das metas (...)

ANEXO I

Descritores qualitativos para a definição do bom estado ambiental

(...)

8. Os níveis das concentrações dos contaminantes não dão origem a efeitos de poluição.

9. Os contaminantes nos peixes e mariscos para consumo humano não excedem os níveis estabelecidos pela legislação comunitária ou outras normas relevantes.

(...)

Pressões na Zona Costeira resultantes da actividade humana

Facto:

- O estado do **ambiente** costeiro **modificou-se** significativamente nos últimos séculos

Explicação plausível:

- Combinação das variações **naturais** e dos impactes cumulativos das **pressões** resultantes das actividades do homem

Zona costeira:

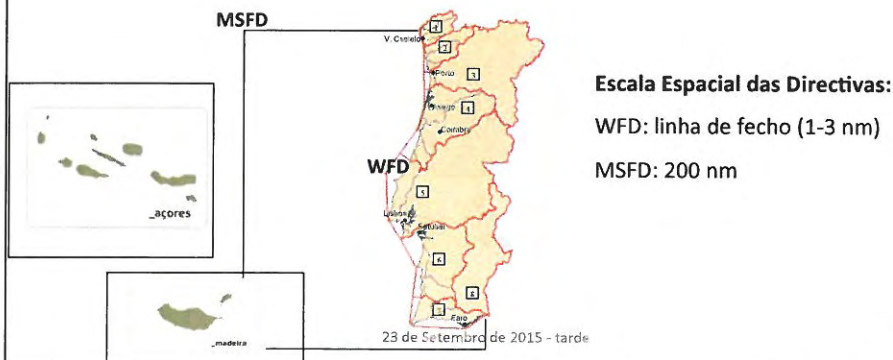
- Ocorrem as maiores **pressões** dos sectores de actividade
- Existem maiores **conflitos** da ocupação espacial e Planos de **Ordenamento** Espacial
- Em vigor **Directivas** conducentes a **reduzir** as **pressões** antropogénicas relevantes

23 de Setembro de 2015 - tarde

5

Directivas sobre Qualidade Ambiental e Pressões

- Directiva-Quadro da Água (WFD)
- Directiva-Quadro da Estratégia Marinha (MSFD)
- **Objectivo genérico:** Protecção da Qualidade Ambiental
- **Instrumento:** Classificação do Estado Ambiental
- **Medidas:** Redução das **Pressões Antropogénicas** significativas quando não é atingido um Bom Estado Ambiental



6

DQ-Água e DQ-Estratégia Marinha

Diferentes elementos para a avaliação do Estado

DQ-Água



Avaliação do Estado baseado em:

- Elementos Biológicos (comunidades fitoplâncton, bentos, macroalgas e plantas)
- Características ambientais
- Contaminantes

Observação dos mesmos factos?

Concordância na interpretação dos factos?

DQ-Estratégia Marinha



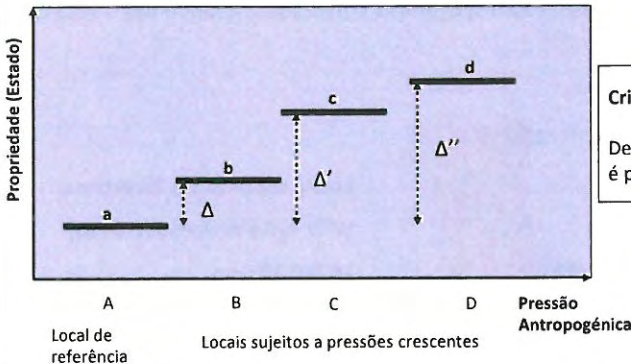
Avaliação do Estado baseado em 11 descritores:

- Biodiversidade
- Espécies não indigenas
- Pescas
- Teias tróficas
- Eutrofização
- Integridade dos fundos marinhos
- Condições hidrográficas
- Contaminantes no meio
- Contaminantes em produtos marinhos
- Lixo marinho
- Ruído/Energia

Indicadores

Relação com condições de referência e pressões

Indicador = relação quantitativa entre o Estado e a Pressão

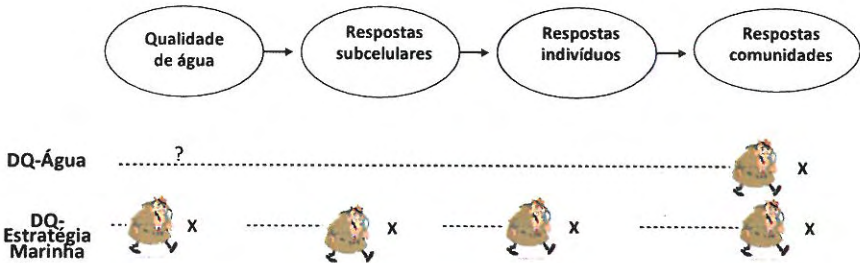


Critério para Indicador Adequado:

Desvio às condições de referência (Δ) é proporcional à pressão, $\Delta = f(P)$

Diferenças entre Directivas

Avaliar comunidades biológicas *versus* indivíduos e células



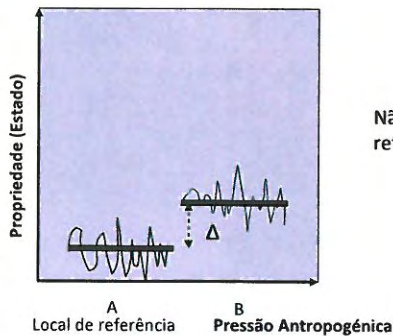
23 de Setembro de 2015 - tarde

9

Desafios para a Comunidade Científica

Implementação da DQ-Estratégia Marinha

- Estimar **condições de referência**, ou *benchmark*
- Diferenciar **Pressões** das **Variações Naturais**
- Seleccionar os melhores **Indicadores** para avaliar a qualidade ambiental
- **Combinar** descritores para determinar o Estado Ambiental



Não há valores de referência, há intervalos!

23 de Setembro de 2015 - tarde

10

Observações nos ecossistemas costeiros:

Resultado de Pressões ou de Variações Naturais?

- Processos e fluxos dificultam **diferenciar Pressões e Variações Naturais** na zona costeira
- **Maior dificuldade** com os descritores baseados na **biologia** (eg., biodiversidade, cadeias tróficas, integridade dos fundos, pesca)
- **Exemplos** de casos simples: concentração de contaminantes na água



Água



Sedimentos



Organismos



Ética na recolha de animais para fins científicos:

Tratado de Amesterdão (1997)

- Animais são seres sentientes

A utilização de animais para fins científicos é aceitável se:

- não há métodos alternativos que permitam atingir os mesmos objectivos
- dano causado aos animais é sempre o mínimo possível
- os ganhos obtidos com o estudo são maiores do que o dano causado

O sacrifício de animais deve obedecer ao critério de ser no menor número possível

Os 3Rs dos princípios éticos:

- **Substituição (Replacement)** – de animais por métodos alternativos (ex. *in silico*)
- **Redução (Reduction)** – do número de animais usados
- **Aperfeiçoamento (Refinement)** – dos métodos que minimizem o sofrimento animal

Contaminação Antropogénica

- derivada de actividades humanas

Compostos xenobióticos

- compostos estranhos a um organismo

Toxinas naturais (biotoxinas)

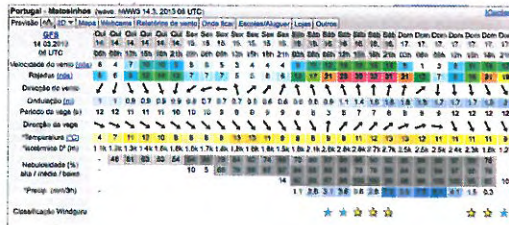
- composto produzido por um organismo que provoca danos a outro organismo

Microorganismos patogénicos

- organismo que provoca danos a outro organismo

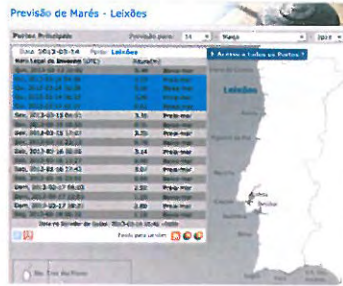
Reconhecimento do terreno





Condições meteorológicas

Marés



23 de Setembro de 2015 - tarde

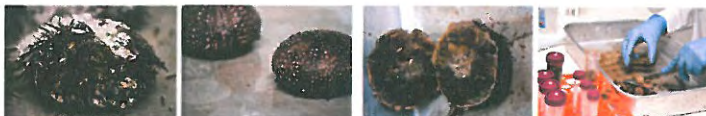
17

Preparação das amostras

Recolha

Congelamento

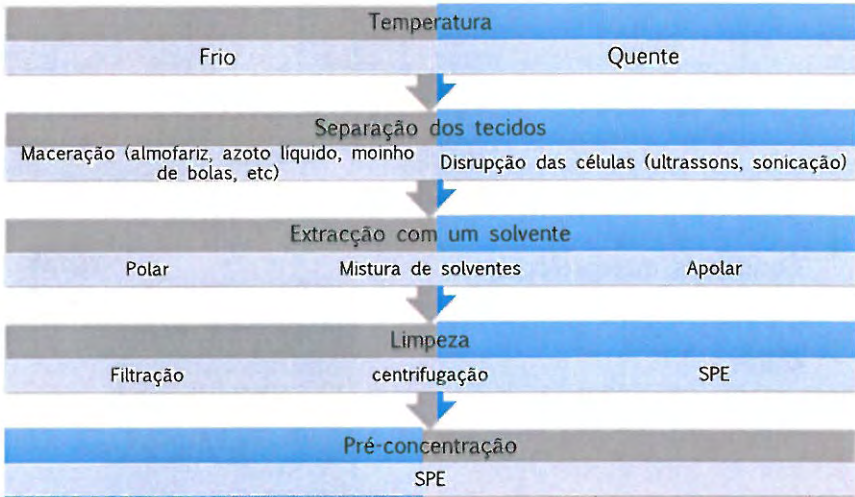
Dissecação



Extracção dos compostos de interesse

23 de Setembro de 2015 - tarde

18



Solvent Polarity Chart

Relative Polarity	Compound Formula	Group	Representative Solvent Compounds
Nonpolar	R - H	Alkanes	Petroleum ethers, ligroin, hexanes
↑ <i>Increasing Polarity</i> ↓	Ar - H	Aromatics	Toluene, benzene
	R - O - R	Ethers	Diethyl ether
	R - X	Alkyl halides	Tetrachloromethane, chloroform
	R - COOR	Esters	Ethyl acetate
	R - CO - R	Aldehydes and ketones	Acetone, methyl ethyl ketone
	R - NH ₂	Amines	Pyridine, triethylamine
	R - OH	Alcohols	Methanol, ethanol, isopropanol, butanol
	R - COHN ₂	Amides	Dimethylformamide
	R - COOH	Carboxylic acids	Ethanoic acid
	Polar	H - OH	Water

Filtração da amostra

Previne o entupimento do sistema de cromatografia (válvulas, pistões, componentes das bombas, tubos de conexão)

Aumenta o tempo de vida do equipamento

Reduz o risco de contaminações

Aumenta o tempo de vida da coluna

Ajuda a reduzir contaminações no detector – por exemplo em MS em que o solvente é evaporado e partículas e constituintes não voláteis podem ser depositados

Colunas guarda

Coluna que se insere antes da coluna onde irá decorrer a separação – coluna analítica

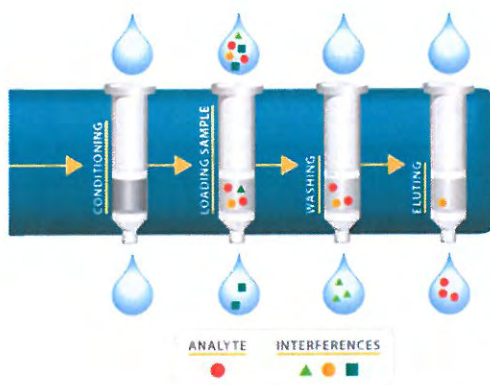
A coluna guarda previne possíveis danos causados por matéria particulada (e material fortemente adsorvido)

Deve ter o mesmo diâmetro interno da coluna analítica e a mesma fase estacionária

Quando se detectam variações no método cromatográfico (ex. pressão ou número de pratos teóricos) a coluna guarda deverá ser substituída

Extracção para fase sólida

Solid Phase Extraction (SPE)



1. Condicionamento da fase estacionária
2. Aplicação da amostra no topo do cartucho SPE
3. Eluição com misturas de polaridade diferenciada
4. Eluição das espécies químicas de interesse

Vantagens da utilização SPE:

1. Simplificação de amostras complexas
2. Redução de efeitos de matriz em aplicações MS (supressão de iões)
3. Fraccionamento da amostra, possibilitando a análise da sua composição por classe de compostos
4. Concentração de espécies químicas presentes na amostra em quantidades residuais
5. Oferece grande selectividade

Características da coluna de SPE:

Emprega uma coluna (ou “cartridge”) descartável de plástico, empacotada com um sorvente apropriado

O sorvente pode ser qualquer uma das fases estacionários usualmente empregues

Deve-se escolher aquele que tem características mais próximas com a coluna de cromatografia utilizada

Procedimento preparativo de amostras para quantificação da toxina natural microcistina:

Partindo de uma amostra ambiental pré-macerada e liofilizada:

1. Adicionar metanol/água (50%) a 100 mg de material liofilizado, volume suficiente para assegurar homogeneização completa (2-10 mL);
2. Submeter a ultrasons durante 5 min., 60Hz, num banho de gelo;
3. Deixar durante a noite a 4°C;
4. Centrifugar (4995 g, 5 min.);
5. Recolher o sobrenadante e aplicar num cartucho SPE C18, previamente condicionado;

Passo	Solvente	SPE 1 Volume (mL)	SPE 2 Volume (mL)
Pré-condicionamento 1	MeOH 100%	20	60
Pré-condicionamento 2	H ₂ O	20	60
Pré-condicionamento 3	MeOH 20%	20	60
Amostra	H ₂ O ou MeOH 50%	< 15	1000
Limpeza	MeOH 20%	20	60
Eluição	MeOH 80%	10	60

SPE1: Sep-Pack Cartridges Vac C18-500 mg, 6 mL para aplicação analítica

SPE2: Sep-Pack Cartridges Vac C18-10 g, 60 mL para fins preparativos

A fracção recolhida (MeOH 80%) contém o analito

Extracção Líquido-Líquido

Utilizada para separar os analitos de interferências através de um processo de equilíbrio químico

Partição da amostra entre dois líquidos (ou fases) imiscíveis

- geralmente uma fase é uma solução aquosa e outra fase é solvente orgânico
- compostos mais hidrofílicos preferem a fase aquosa e compostos mais hidrofóbicos preferem o solvente orgânico

Os analitos extraídos no solvente orgânico são recuperados após evaporação do solvente

Analitos recuperados na fase aquosa geralmente podem ser injectados directamente na coluna de cromatografia

Pelo facto de a extracção ser um processo de eficiência limitada pode acontecer que parte do analito permaneça em ambas as fases - baixa recuperação

Mudança de pH, complexação e emparelhamento de iões afectam o equilíbrio químico e podem ser estratégias usadas para melhorar a recuperação do analito ou a eliminação de interferências

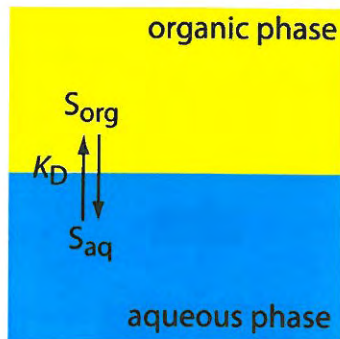
Extracção Líquido-Líquido

Exemplo mais simples:
extracção liq.-liq. sem reacções
laterais

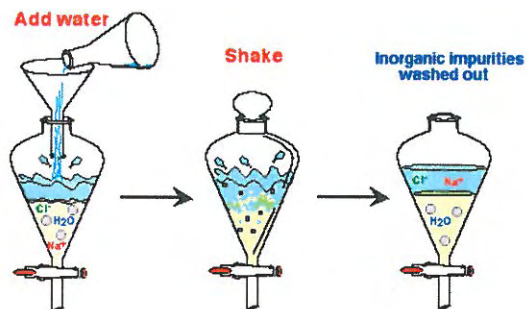
$$K_D = [S_{org}] / [S_{aq}]$$

Remoção de espécies
inorgânicas.

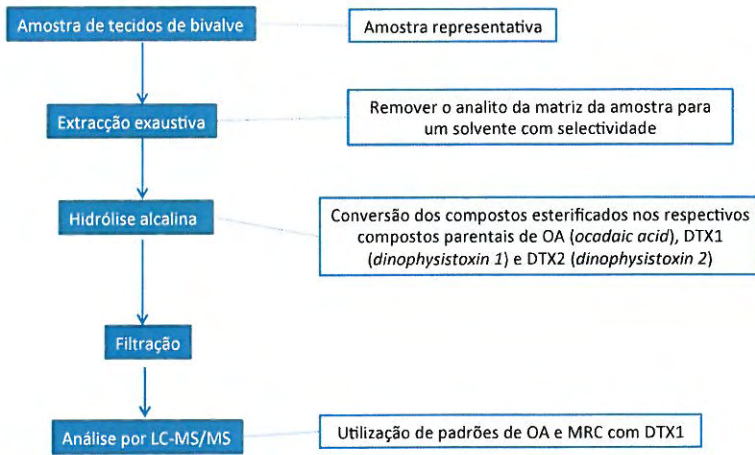
Remoção de contaminantes
cujo K_D seja muito diferente do
 K_D do analito



Extracção Líquido-Líquido



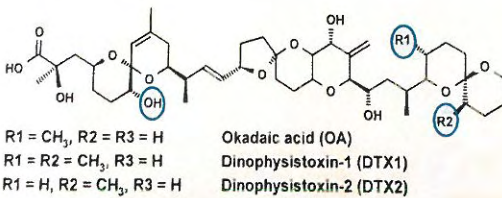
Preparação de amostras para determinação de toxinas lipofílicas por LC-MS/MS



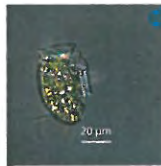
23 de Setembro de 2015 - tarde

31

Toxinas lipofílicas em microalgas - Okadaic acid, DTX1 e DTX2



Dinophysis acuta



Dinophysis acuminata

Perfil de toxinas varia entre as espécies e estirpes de microalgas

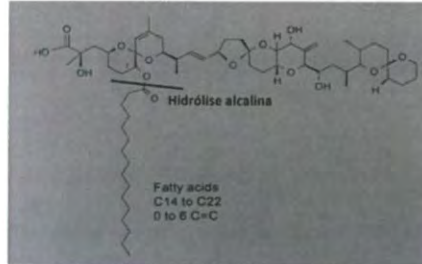
23 de Setembro de 2015 - tarde

32

Metabolização de toxinas em bivalves



Fatty acids acyl esters of okadaic acid



Conversão dos compostos esterificados em OA por hidrólise alcalina

(Yasomoto et al.(1989) Agric. Biol. Chem. 53, 525

Grau de metabolização varia entre as espécies de bivalves

Preparação de amostras para determinação das toxinas OA, DTX1 e DTX2

Amostra de tecidos de bivalve

Pesar $2 \text{ g} \pm 0.05 \text{ g}$ de homogeneizado de parte edível de bivalves

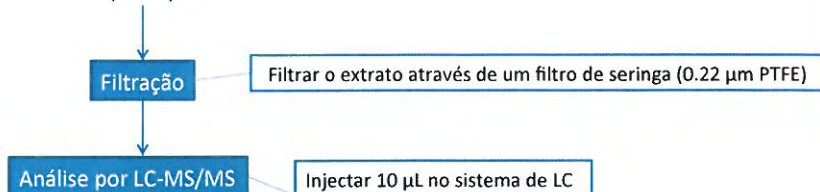
Extracção exhaustiva

- Adicionar 9 mL de metanol 100% (p.a.)
- Agitar em vortex cerca de 3 min no máx velocidade
- Centrifugar 10 min a 2000 g ($T= 20^{\circ}\text{C}$)
- Transferir o sobrenadante para um novo tubo de 30 mL
- Repetir a extração do pellet com mais 9 mL de metanol
- Homogeneizar durante 1 min em *Polytron*
- Centrifugar 10 min a 2000 g ($T= 20^{\circ}\text{C}$)
- Transferir e combinar o sobrenadante com o primeiro extrato no tubo de 30 mL
- Completar o volume a 20 mL com 100% (p.a.)

Hidrólise alcalina

- Tomar 2.5 mL de extrato para um tubo de pirex (10 mL)
- Adicionar 313 μL de NaOH (aq.) 2.5 M
- Homogeneizar em vortex 0.5 min
- Hidrolisar durante 40 min a 76°C (protegido da luz)
- Neutralizar com 313 μL de HCl (aq.) 2.5 M
- Homogeneizar em vortex 0.5 min

(Cont.)

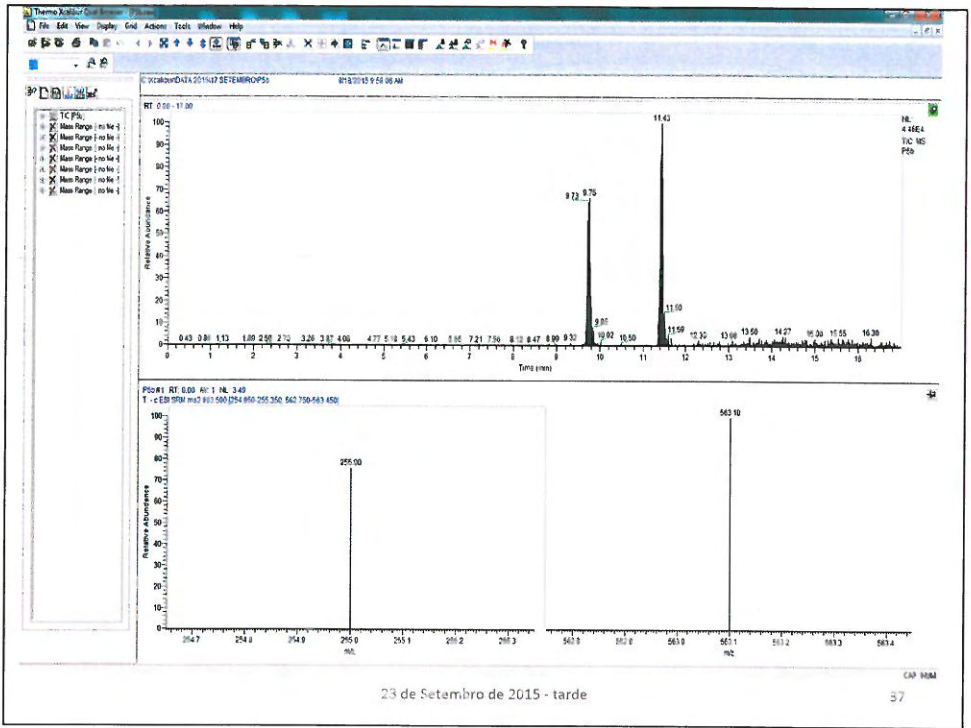


Condições de separação de OA e DTXs por LC

- Coluna RP-MS (150 x 2.1 mm, 2.6 µm) protegida por pré-coluna
- Caudal
- Sistema em gradiente com:
 - Fase móvel A = 95% Acetonitrilo:5% água MQ com 2 mM de formato de amónio + 50 mM de ácido fórmico
 - Fase móvel B = 100% água MQ com 2mM de formato de amónio + 50 mM de ácido fórmico

Condições de detecção de OA por MS/MS

Parâmetro MS/MS	OA
Polaridade	neg
Q1 (m/z)	803.5
Q3 quantificação (m/z)	255.0
Q3 confirmação (m/z)	563.1
Energia de colisão (eV)	48





Aprender a conhecer o ambiente marinho de Portugal

Técnicas analíticas em LC-MS/MS

22 a 25 de Setembro de 2015

CIIMAR & IPMA



Técnicas ana

1. Validação de métodos
2. Identificação dos parâmetros mais correntes

1. Validação de métodos analíticos

Porque se faz?

- Suspeita que os resultados não são corretos
- Os resultados não são reprodutíveis

Validação de métodos ou sistemas analíticos ?

É melhor utilizar a expressão “Validação de métodos ou sistemas analíticos”

- o sistema analítico corresponde ao método quando for o caso, as etapas de validação são as mesmas
- à matriz à qual o método será aplicado

O que é a Validação ?

Implementação de um conjunto de métodos analíticos

Valid Analytical Measurement (

Definição de Validação

- Não existe consenso quanto à definição associada
- No mais recente guia da EU para métodos analíticos ("The Fitness for Purpose Guide to Method Validation and Performance of Validation", apresentadas em

Valid Analytical Measurement (VAM):

- As medições analíticas deverão ser realizadas de acordo com o método estabelecido;
- As medições analíticas deverão ser realizadas e verificadas (i.e. cumprem os requisitos estabelecidos);
- O pessoal responsável pela realização de medições analíticas deverá ser treinado para a execução da tarefa.

Verificação ou Validação:

Verificação:

- Fornecimento de evidência objetiva de que os requisitos especificados;

Validação:

- Verificação de que os requisitos

Processos de Validação:

Abordagem interlaboratorial

- Estudos de comparação entre sistemas analíticos para validar o sistema analítico a validar
- Frequentemente adotada pelo ICH

Abordagem intralaboratorial

- Validação de um sistema analítico em um único laboratório

- Aplicação de métodos estatísticos

- Validação de métodos analíticos

Ferramentas de Validação:

- Padrões de medição – normas, materiais

- Brancos - soluções em que o analito não é detectado pelo método analítico atribuível ao analito e a que é atenuado

- Materiais/soluções reforçados (as) ou sp

- Soluções de referência

- Soluções de controle de qualidade

- Soluções de controle de qualidade

- Soluções de controle de qualidade

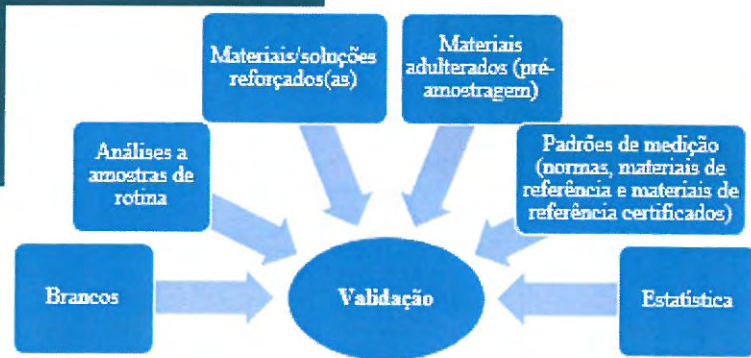
- Soluções de controle de qualidade

- Soluções de controle de qualidade

- Soluções de controle de qualidade

- Soluções de controle de qualidade

Ferramentas usadas tipicamente nos processos de validação de sistemas analíticos (Eurachem 2014):



Parâmetros de Validação:

- Curvas de calibração
- Limiares analíticos
- Sensibilidade
- Selectividade
- Exactidão

-
-
-

Curvas de calibração

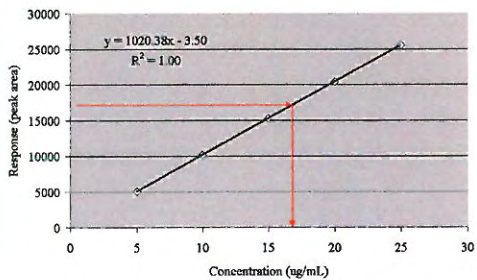
Em análises quantitativas, a **calibração** é o processo de relacionar a resposta de medida se relaciona com uma concentração conhecida.

Passos para a calibração analítica externa

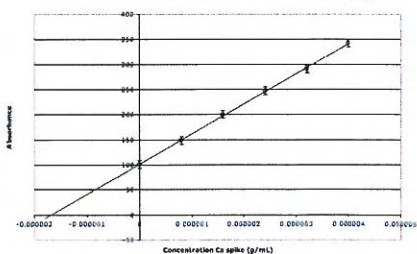
- Preparação de uma série de soluções de concentração conhecida.
- Medida da resposta de cada solução.
- Construção da curva de calibração.

Calibração externa

Calibration Curve for Compound X



Run 8 Standard Addition Plot (plot 5)



Considerações sobre curvas de calibração

- É desejável que a calibração analítica seja realizada por técnicos experientes e que sejam realizados testes **internos para aceitação de curvas** relativos à
- Quando não é efectuada a curva de calibração

•

Considerações sobre curvas de calibração (cont.)

- O **branco da calibração** (solução com todos os reagentes e condições de análise, mas sem o analito) deve ser diferente de zero e deve ser incluído no conjunto de pontos de calibração.
- Recomenda-se o uso da norma ISO 8466-1 para efectuar regressões lineares pelo método dos mínimos quadrados.

Análise da gama de trabalho e linearidade

Estudo que deve ser realizado durante a avaliação da gama de trabalho, mas, se a gama de trabalho estiver avaliada, apenas deve ser avaliada a linearidade.

A. Gama de trabalho

A gama de trabalho pode ser avaliada

B. Linearidade

A **linearidade** pode ser avaliada através da obtenção de uma função de calibração a partir de um conjunto de pares ordenados. Se a função de calibração é não linear, bem como

No caso de obtenção de função não

Limites analíticos - Limite de detecção e de quantificação

Limite de detecção (LD) - A concentração mínima de um analito que pode ser detectada por um determinado método considerado, com um determinado nível de confiança.

Os **LD** e **LQ instrumentais** podem ser determinados a partir de análises de amostras **brancas**, à **razão sinal-ruído** instrumental.

Algumas técnicas analíticas estão **dependentes** da sensibilidade instrumental.

- Um exemplo disso é a **cromatografia**, em que será necessário calcular os **LD** e **LQ**.

Sensibilidade

A **sensibilidade** pode ser definida como a variação do sinal (ΔL) e a variação da concentração (ΔC)

Sensibilidade

Avalia a capacidade de um método (ou equipamento) de detectar a menor concentração de um analito

-

-

Selectividade

É a **capacidade** de um método identificar um analito em uma mistura ou matriz, simples ou complexa, sem interferência de outros componentes.

Para a avaliação da selectividade é necessário analisar amostras contendo substâncias eventualmente presentes no sistema.

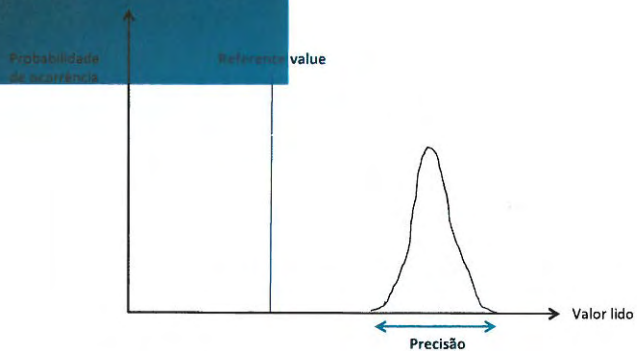
Habitualmente analisam-se diferentes amostras contendo o analito de interesse e

Exactidão e precisão

Exactidão – é a **concordância** entre o resultado obtido e o valor real, considerado como convencionalmente verdadeiro. O erro médio (desvio).

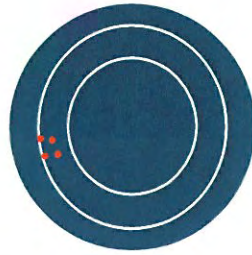
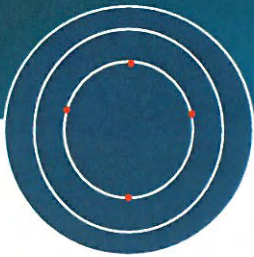
Nota: o valor de referência é geralmente determinado a partir de um material de referência certificado (MRC).

O termo **precisão intermédia** refere-se a resultados obtidos utilizando o mesmo método, no mesmo laboratório, utilizando os mesmos equipamentos; definindo exactamente as condições e em diferentes épocas.



Exactidão e precisão

Elevada exactidão, precisão mediana



- Existem duas medidas para avaliar a precisão:

Repetibilidade RSD_r – dispersão que surge quando se usam os mesmos reagentes, instrumentos e condições, num período de tempo curto.

Reprodutibilidade RSD_R – variação que surge quando se usam diferentes reagentes, instrumentos e condições.

- Como podemos medir a **precisão**

Através de análises em replicado de amostras com diferentes níveis de concentração em concentrações nos intervalos esperados.

Usando: a) amostras naturais
b) amostras brancas reforçadas
c) materiais de referência certificados

- Como podemos medir a **exactidão**

É a diferença entre o valor encontrado e o valor verdadeiro.

O que são materiais de referência

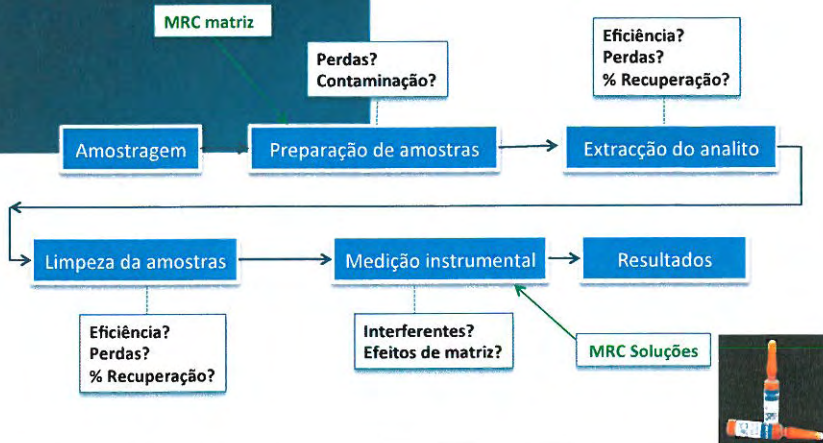
Material de referência (MR)

- Material que é suficientemente homogêneo e estável para ser usado em processos de calibração e validação de métodos analíticos específicos;
- É desenvolvido para uso em processos de calibração e validação de métodos analíticos.

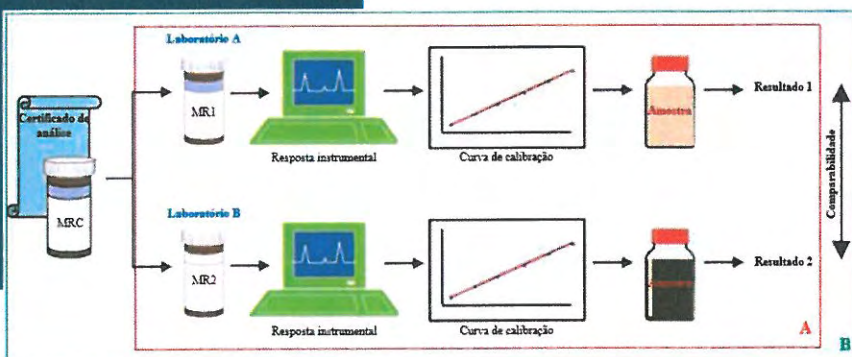
Material de referência certificado (MRC)

Estado líquido e sólidos dos MRCs

- Soluções ou materiais puros
- Materiais em matriz – usados para a amostra até a medição final



Rastreabilidade e comparabilidade



Avaliação do desempenho do

- O valor obtido na análise de um MRC deve ser acompanhado pelo erro da análise. Em geral utiliza-se o erro relativo.

- Quando o valor obtido não se encontrar no intervalo certificado, o laboratório deve procurar as causas.

Avaliação do desempenho do l

A avaliação do desempenho do laboratório é feita através de ensaios interlaboratoriais, em que cada laboratório participa de um ensaio organizado pela organizadora do ensaio. Em geral utiliza-se o erro relativo.

- Ensaios interlaboratoriais ou estudos colaborativos são realizados analisando a mesma amostra pelo mesmo método.

Incerteza

- Incerteza (uncertainty measurement) é um conjunto de valores atribuídos a uma mensuranda, com o objetivo de caracterizar a dispersão dos valores que poderiam ser atribuídos a essa mensuranda, com base em conhecimentos disponíveis no momento da medição.

Precisão intermédia
(reprodutibilidade intra-laboratorial)

São determinadas
e de controle

Exactidão

Incerteza padrão
combinada (u_c)

$$u_c = \sqrt{u_{\text{prec}}^2 + u_{\text{exa}}^2} \quad U = k u_c(y)$$

Robustez

- A robustez de um método de ensaio mede a sua capacidade de resistir a variações. Quanto maior a robustez do método, maior a sua precisão.
- É essencial conhecer os parâmetros críticos de um método de ensaio para garantir a sua robustez.

Ex., pH

Signal

6.3

Validação de métodos analíticos – Considerações finais

Tipo de método

Testar:

Método padrão já existente

- Exatidão

Modificação de um método padrão

Método novo

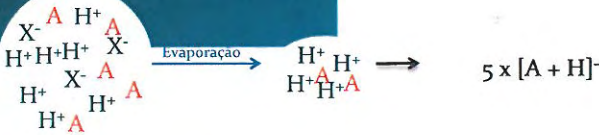
2. Identificação dos problemas analíticos mais correntes

Efeitos de matriz

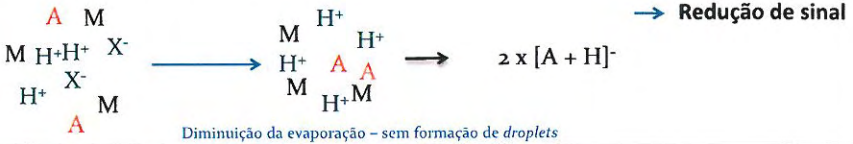
Supressão da ionização pela matriz em

- Amostras com matriz complexa
- *Over-* ou *under-estimation* do sinal em matrizes complexas

Padrão em solvente

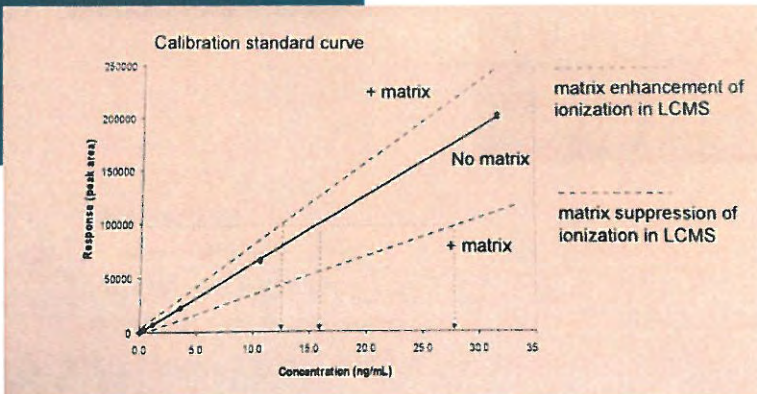


Extrato com componentes da matriz que co-eluem: + 3 x M



Efeitos de matriz

Aumento ou supressão da ionização p



Efeitos de matriz

Possíveis soluções:

- **Limpeza da amostra**
 - Difícil para variedade de compostos
 - Nem sempre eficaz
 - Procedimentos extensos para a limpeza
- Uso de **marcadores com isótopos e**
 - Nem sempre disponível

Drift – sequência de análise

O estabelecimento de uma sequência de amostras devido a *drift* do equipamento, por exemplo:

- Analisar uma solução padrão de concentração conhecida (se a *drift* é possível a correção)

-
-

Precauções

- **Perda de analitos vestigiais em superfícies**
 - superfície de vidro (*sites activos*)
 - Plásticos (pontas de pipetas, etc.)
- **Contaminação cruzada**
 - limpeza de material de vidro, desinfectante
 - utilização de um branco para teste

Bibliografia

- Eurachem (2014). Eurachem Guide: The Laboratory Guide to Method Validation and Quality Assurance. Eurachem.
- Guia Relacre 13, Validação de métodos instrumentais. 2000
- Miller, J. N. and J. C. Miller (2010). Statistics in Analytical Chemistry. 2nd ed. John Wiley & Sons.

1. A tabela 1 apresenta três conjuntos (A, B e C) de pares ordenados das concentrações de saxitoxina (μM) e correspondente área de pico cromatográfico.

Tabela 1. Concentrações de soluções padrão de saxitoxina (μM) e respectivas áreas obtidas em LC-FLD.

A		B		C	
Conc. (μM)	Área	Conc. (μM)	Área	Conc. (μM)	Área
0.091	20	0.091	20	0.091	20
0.183	38	0.365	70	0.129	24
0.365	70	0.730	144	0.183	35
0.511	101			0.195	42
0.730	144			0.730	144

- Represente os gráficos de calibração.
- Qual a curva de calibração mais adequada para a quantificação da saxitoxina?
- Identifique os pontos fracos de cada uma das outras curvas.

2. A tabela 2 apresenta dois conjuntos ($n=5$) de valores de concentração de ácido ocadáico (OA) obtidos nos Laboratórios A e B para o material de referência certificado DSP-MUS, cujo valor certificado é de $10.1 \pm 0.8 \mu\text{g OA/g}$.

Tabela 2. Concentrações de OA ($\mu\text{g/g}$) obtidas para o MRC DSP-MUS.

Ensaio	Lab A	Lab B
	Conc. OA ($\mu\text{g/g}$)	Conc. OA ($\mu\text{g/g}$)
1	9.5	6.5
2	12.1	7.5
3	11.9	10.3
4	10.2	8.1
5	9.2	9.0

- Avalie os desempenhos dos Laboratórios quanto ao parâmetro exactidão calculando o erro relativo, teste de hipótese (teste t) e factor de desempenho Z.
- O que conclui dos desempenhos?

Erro relativo (Er, %), valor inferior ou igual a 5% é satisfatório

$$Er = \frac{X_{lab} - X_{\gamma}}{X_{\gamma}} \cdot 100$$

em que X_{lab} é o valor obtido experimentalmente (ou a média aritmética dos valores obtidos) e X_{γ} é o valor aceite como verdadeiro, ou seja, o valor certificado do MRC.

Factor de desempenho Z (Z-score),

$|Z| \leq 2$: satisfatório; $2 < |Z| \leq 3$: Questionável; $|Z| > 3$: incorrecto

$$Z = \frac{(X_{lab} - X_{\gamma})}{S}$$

Em que S é a unidade de desvio, que pode ser a incerteza do MRC ou ainda outra unidade de desvio interna.

Teste de hipótese (teste t)

$$t = \frac{(X_{lab} - X_{\gamma}) \cdot \sqrt{N}}{S \cdot \sqrt{X_{lab}}}$$

em que N é o número de amostras ensaiadas e $S_{X_{lab}}$ é o desvio padrão associado à média dos valores do laboratório (X_{lab}).

O valor t (em módulo) é comparado com o valor crítico t_{tab} (tabelado para determinado grau de confiança e $N-1$ graus de liberdade) e o critério de selecção é:

Se $|t| \leq t_{tab}$, não ficou estatisticamente evidenciada a existência de erros sistemáticos e logo o ensaio é satisfatório.

Se $|t| > t_{tab}$, ficou estatisticamente evidenciada a existência de erros sistemáticos e logo o ensaio é não satisfatório.

$t_{tab} = 2.776$ para graus de liberdade =4 e $P=0.05$

3. Um Laboratório implementou um método padrão para a determinação de toxinas lipofílicas em bivalves por LC-MS/MS. A metodologia envolve um processo de extração seguido de limpeza de amostra por SPE. A quantificação dos compostos é realizada recorrendo a curva de calibração externa e a gama de trabalho da calibração é referida no método padrão.

- a) Quais os parâmetros de validação que devem ser avaliados?
- b) Sugira as ferramentas de validação a utilizar para avaliar o desempenho do método.

4. Um método de LC-MS/MS para a determinação de um anticoagulante em hemolinfa de um molusco foi desenvolvido e validado.

Durante o desenvolvimento do método as amostras foram fortificadas para se obter uma concentração final de 1 ng/mL e foram congeladas a -20°C , sendo posteriormente descongeladas para a análise.

Apresentam-se de seguida os resultados obtidos para amostras que sofreram 1, 3 e 6 ciclos de congelação/descongelação, respectivamente.

ng/mL	x1	x3	x6
#1	1.00	1.00	0.906
#2	0.853	0.840	0.784
#3	0.871	0.886	0.830

Verifique se o número de ciclos de congelação/descongelação tem influência na quantificação do anticoagulante

5. Apresentam-se os resultados obtidos por um método de LC-MS/MS para determinação de uma biotoxina em músculo de peixe

A extracção da proteína da amostra foi feita recorrendo à precipitação com metanol ou à precipitação com metanol + EDTA ou + TCA (ácido tricloroacético).

Area	Precipitação prt MeOH	Precipitação prt MeOH + EDTA	Precipitação prt MeOH+ TCA
#1	1161440	256911	1196435
#2	1085956	296718	1226431
#3	1123698	266695	1223119

Compare a a recuperação obtida pelas diferentes formas de extracção

6. O cromatograma seguinte apresenta marcado o tempo de retenção para um dado composto de interesse e para o respectivo padrão interno, obtidos durante o processo de validação. Este resultado é aceitável?

