INSTITUTO UNIVERSITÁRIO EGAS MONIZ

MESTRADO EM TECNOLOGIAS LABORATORIAIS EM CIÊNCIAS FORENSES

DETERMINAÇÃO DE BIOMARCADORES DE CONSUMO DE TABACO E CAFEÍNA EM ÁGUAS RESIDUAIS

Trabalho submetido por
Ana Catarina Ribeiro
para a obtenção do grau de Mestre em Tecnologias Laboratoriais em Ciências Forenses

outubro de 2022

INSTITUTO UNIVERSITÁRIO EGAS MONIZ

MESTRADO EM TECNOLOGIAS LABORATORIAIS EM CIÊNCIAS FORENSES

DETERMINAÇÃO DE BIOMARCADORES DE CONSUMO DE TABACO E CAFEÍNA EM ÁGUAS RESIDUAIS

Trabalho submetido por
Ana Catarina Ribeiro
para a obtenção do grau de **Mestre** em Tecnologias Laboratoriais em Ciências Forenses

Trabalho orientado por
Prof. Mestre Mário João Dias

e coorientado por
Prof. Doutor Samir Marcos Ahmad

outubro de 2022

Dedicatória

À minha mãe, por tudo o que faz por mim.

Agradecimentos

Em primeiro lugar, quero agradecer a oportunidade que me concederam de poder desenvolver o meu trabalho no Laboratório de Ciências Forenses e Psicológicas Egas Moniz, no qual me acolheram tão bem, e onde foi possível aprender, criar laços, desenvolver competências e crescer.

Quero agradecer em especial à Professora Carla Ferreira, por ter estado sempre disponível para me ajudar e por todo o conhecimento que me passou. Ao Professor Alexandre Quintas, por quem tenho uma enorme gratidão, obrigada por me ter motivado sempre e pelo seu apoio e sugestões quando as coisas pareciam menos boas.

Um obrigada aos meus colegas por terem sido tão fantásticos comigo, por todos os momentos vivenciados no laboratório e por serem quem são, são fenomenais.

Ao meu orientador Professor Mário Dias por ter demonstrado sempre disponibilidade para ajudar em qualquer contratempo, e pela sabedoria partilhada.

Ao meu coorientador, Professor Samir Ahmad, muito obrigada por ter sido tão paciente comigo independentemente da situação. Obrigada por tudo o que me ensinou, e por ter estado sempre disponível, cada vez que eu solicitava a sua ajuda, até ao último minuto da entrega deste trabalho.

Por último, à minha mãe, o maior agradecimento de todos, por ser uma mãe espetacular que me permitiu chegar onde cheguei. Por toda a sua luta para que eu pudesse alcançar os meus sonhos, Obrigada mãe.

Um muito obrigada a todos os que fizeram parte desta experiencia, que tanto me acrescentou, ficar-vos-ei eternamente grata.

Certificado de Originalidade

Certifico que sou responsável pelo trabalho submetido neste relatório e que o trabalho é original, não sendo copiado ou plagiado de outra fonte, excetuando o especificado nas referências. Adicionalmente, declaro que o trabalho em si contido não foi submetido anteriormente para qualquer outro propósito.

_____

Ana Catarina Ribeiro

Resumo

O tabaco é responsável por milhões de mortes em todo o mundo. O seu consumo provoca efeitos adversos não só a indivíduos fumadores como também a pessoas não fumadoras expostas ao fumo do tabaco. O impacto causado pelo tabagismo enfatiza a importância da monitorização do seu consumo para que possam ser desenvolvidas e aplicadas medidas que permitam a prevenção e cessação de hábitos tabágicos. A epidemiologia baseada em águas residuais é uma abordagem emergente, com elevada aplicabilidade e capaz de colmatar as limitações das abordagens tradicionais. As metodologias mais comummente empregues neste contexto envolvem um passo de preparação de amostra que envolve extração em fase sólida seguida de cromatografia líquida acoplada à espetrometria de massa. A preocupação com a execução de uma química mais verde levou, nos últimos anos, ao desenvolvimento de técnicas de extração miniaturizadas que permitam a extração de compostos de forma mais ecológica, sem descurar a performance analítica.

No presente estudo foi otimizada, validada e aplicada uma metodologia baseada em microextração adsortiva em barra para proceder à extração de nicotina e do seu biomarcador, cotinina, em águas residuais, seguido de dessorção líquida e análise por cromatografia gasosa acoplada a espetrometria de massa.

O método proposto apresentou uma boa linearidade ($r^2 \geq 0,995$) para ambos os compostos no intervalo de concentrações de 2,5 a 100,0 µg/L. A metodologia revelou também ser precisa (RSD ≤ 20%). Embora não tenha sido possível recuperar totalmente os analitos em estudo da matriz aquosa, a metodologia analítica demonstrou que a recuperação de nicotina e cotinina é reprodutível. A extração adsortiva em barra demonstrou capacidade de ser aplicada em contextos reais de WBE e, revelou ser mais "verde" que as técnicas clássicas de extração empregues e descritas na literatura.

A abordagem analítica proposta apresenta igualmente potencial de aplicabilidade para a monitorização destas e de outras substâncias prioritárias em matrizes complexas, em particular quando combinadas com cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massa em *tandem*.

Palavras-chave: Epidemiologia de águas residuais, Microextração adsortiva em barra, tabaco, cromatografia gasosa acoplada a espetrometria de massa.

Abstract

Tobacco is responsible for millions of deaths worldwide. Its consumption causes adverse effects not only to individual smokers but also to non-smokers exposed to tobacco smoke. The impact caused by smoking emphasizes the importance of monitoring tobacco consumption so that measures can be developed and implemented for the prevention and cessation of smoking. Wastewater-based epidemiology is an emerging approach, with high applicability and capable of overcoming the limitations of traditional approaches. The most employed methodologies in this context involve a sample preparation step involving solid phase extraction followed by liquid chromatography coupled to mass spectrometry. The concern with the implementation of greener chemistry has led, in recent years, to the development of miniaturized extraction techniques that allow the extraction of compounds in a more environmentally friendly manner, without neglecting analytical performance.

In the present study, a methodology based on bar microextraction was optimized, validated and applied to perform the extraction of nicotine and its biomarker, cotinine, in wastewater, followed by liquid desorption and analysis by gas chromatography coupled with mass spectrometry.

The proposed method showed good linearity ($r2 \geq 0.995$) for both compounds in the concentration range from 2.5 to 100.0 μg/L. The methodology also proved to be accurate (RSD ≤ 20%). Although it was not possible to fully recover the analytes under study from the aqueous matrix, the analytical methodology demonstrated that the recovery of nicotine and cotinine is reproducible. The adsorptive bar extraction showed ability to be applied in real WBE contexts and, revealed to be "greener" than the classical extraction techniques employed and described in the literature.

The proposed analytical approach also presents potential applicability for monitoring these and other priority substances in complex matrices, in particular when combined with liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry.

Keywords: Wastewater epidemiology, Bar adsorptive microextraction, tobacco, gas chromatography coupled to mass spectrometry

Índice geral

Resumo ... 1
Abstract ... 2
Índice geral ... 3
Índice de figuras ... 6
Índice de tabelas ... 8
Lista de abreviaturas ... 9
1. Introdução ... 11
1.1. Tabaco ... 12
1.1.1. Nicotina ... **14**
1.2. Estimativa de consumos ... 17
1.3. Epidemiologia baseada em águas residuais ... 17
1.3.1. Ciclo analítico ... 18
1.4. Técnicas de extração ... 20
1.5. Técnicas de microextração ... 22
1.5.1. Microextração Adsortiva em Barra ... **23**
1.6. Análise instrumental ... 27
1.6.1. Cromatografia gasosa acoplada a espetrometria de massa ... **28**
1.7. Objetivo do trabalho ... 33
2. Materiais e métodos ... 34
2.1. Padrões analíticos e reagentes químicos ... 34
2.2. Material corrente e equipamento de laboratório ... 34
2.3. Fases sorventes ... 35
2.4. Amostras ... 36
2.5. Procedimento experimental ... 37
2.5.1. Preparação das soluções de trabalho ... **37**
2.5.2. Condições de operação instrumental ... **37**
2.5.3. Preparação dos dispositivos de BAμE ... **39**
2.5.4. Desenvolvimento e otimização dos métodos analíticos ... **39**
2.5.4.1. Etapa de extração ... 40
2.5.4.2. Etapa de retroextração ... 41
2.5.5. Validação do método analítico ... **42**
2.5.5.1. Linearidade, sensibilidade e seletividade ... 42
2.5.5.2. Precisão e veracidade ... 42
2.5.6. Recuperação ... **43**

2.6. Aplicação a amostras reais 44
2.7. Classificação e comparação da metodologia desenvolvida 44
3. Resultados e discussão 45
3.1. Otimização instrumental 45
3.2. Otimização do método analítico 48
3.2.1. Etapa de extração **48**
3.2.1.1. Fases sorvente e tipo de agitação 48
3.2.1.1. Cinética e matriz 51
3.2.2. Etapa de retroextração **53**
3.3. Validação do método analítico 54
3.3.1. Linearidade, sensibilidade e seletividade **54**
3.3.2. Precisão e veracidade **56**
3.3.3. Recuperação **57**
3.4. Aplicação a amostras reais 58
3.5. Classificação e comparação da metodologia desenvolvida 59
4. Conclusão 62
5. Bibliografia 63
6. Anexos 76
Anexo I – Características dos compostos em estudo 76
Figura A.I.1. Gráfico da relação do pH com o LogS das moléculas de nicotina e cotinina. **76**
Figura A.I.2. Gráfico da relação do pH com o Log D das moléculas de nicotina e cotinina. **76**
Figura A.I.3. Gráfico da relação do pH e da carga das moléculas de nicotina e cotinina. **77**
Anexo II – Desenho experimental 77
Tabela A.II.1. Desenho experimental executado para otimização da etapa de extração da BAμE. **77**
Tabela A.II.2. Desenho experimental executado para otimização da etapa de retroextração da BAμE. **78**
Anexo III – Resultados de otimização da BAμE 79
Figura A.III.1. Gráficos de contorno da otimização dos parâmetros da etapa de extração da BAμE para a nicotina. 79
Figura A.III.2. Gráficos de contorno da otimização dos parâmetros da etapa de extração da BAμE para a cotinina. **80**
Equação A.III.1. Equação da relação entre as respostas e os fatores para a nicotina. **81**

Equação A.III.2. Equação da relação entre as respostas e os fatores para a cotinina. 81

Anexo IV – Amostras..... 81

Tabela A.IV.1. Resultados obtidos para cada uma das amostras analisadas.. 81

Índice de figuras

Figura 1: Planta do género *Nicotiana L*. Adaptado de (Brandt Wilhelm et al., 1887). 12

Figura 2: Medidas do programa MPOWER. 13

Figura 3: Estrutura química da molécula de nicotina. Figura elaborada em https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/ 15

Figura 4: Esquema do metabolismo da nicotina. Adaptado de (A. Taylor et al., 2021a). 16

Figura 5: Estrutura química da molécula de cotinina. Estrutura elaborada em https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/. 16

Figura 6: Esquematização da abordagem de WBE. Adaptado de (Choi et al., 2018b). 18

Figura 7: Esquematização do procedimento de SPE. Adotado de (Lucci et al., 2012). 21

Figura 8: Princípios da GAC. Adotado de (de Marco et al., 2019). 22

Figura 9: Exemplo de pictograma com a pontuação final. Adotado de (Pena-Pereira et al., 2020). 23

Figura 10: Dispositivo convencional de BAμE. Adaptado de (Nogueira, 2012). 24

Figura 11: Esquema da extração em BAμE. Elaborado em https://biorender.com/. 25

Figura 12: Esquematização do processo de retroextração em BAμE. Elaborado em https://biorender.com/. 27

Figura 13: Esquema geral de um cromatógrafo gasoso. Adaptado de (Dettmer-Wilde & Engewald, 2014). 29

Figura 14: Modos de injeção mais comuns em GC-MS. À esquerda modo *split* e à direito modo *splitless*. Adotado de (Harris, 2007). 30

Figura 15: Tipos de colunas. Adaptado de (Harris, 2007). 30

Figura 16: Representação esquemática de um quadrupolo. Adotado de (Harris, 2007). 32

Figura 17: Esquematização do processo de otimização de BAμE. 39

Figura 18: Tipos de agitação e fases sorventes estudados para a otimização da BAμE. 40

Figura 19: Condições de pH, tempo, temperatura e adição de sal estudadas para a otimização da BAμE. 41

Figura 20: Tempo de banho ultrassónico e solventes estudados para otimização da etapa de retroextração. 41

Figura 21: Cromatograma da mistura-padrão de nicotina, cotinina e difenilamina. O pico 1, 2 e 3 correspondem à nicotina, PI e cotinina. 45

Figura 22: Espetro de massa obtido, em modo SCAN, para a nicotina. 46

Figura 23: Espetro de massa obtido, em modo SCAN, para o PI. 46

Figura 24: Espetro de massa obtido, em modo SCAN, para a cotinina. 47

Figura 25: Curvas de regressão linear da nicotina e cotinina. 48

Figura 26: Resultados obtidos com as diferentes fases sorventes utilizando agitação orbital. 49

Figura 27: Resultados obtidos com as diferentes fases sorventes utilizando agitação magnética. 49

Figura 28: Estudo dos tipos de extração para a nicotina. 50

Figura 29: Estudo dos tipos de extração para a cotinina. 51

Figura 30: Gráficos de otimização das condições de extração para nicotina e cotinina. 52

Figura 31: Gráfico de contorno para otimização da retroextração de nicotina. 54

Figura 32: Gráfico de contorno para otimização da retroextração de cotinina. . 54

Figura 33: Curva de regressão linear para a nicotina. 55

Figura 34: Curva de regressão linear para a cotinina. 55

Figura 35: Sobreposição do cromatograma da amostra A3 com o calibrador de concentração 2,5µg/L. 59

Figura 36: Classificações obtidas pelas metodologias, com recurso ao *software AGREE: Analytical GREennEss Calculator*. 60

Índice de tabelas

Tabela 1: Características das fases poliméricas HLB e Strata-X. Adaptado de (S. M. E. Ahmad, 2020). 36

Tabela 2: Detalhes das amostras analisadas. 37

Tabela 3: Condições de operação instrumental do GC-MS. Os iões quantitativos são apresentados a negrito. 38

Tabela 4: Tempos de retenção e iões monitorizados em modo SIM para cada um dos compostos analisados. A negrito encontram-se destacados os iões quantificadores. 47

Tabela 5: Resultados obtidos para o RSD intradia e interdias da nicotina e cotinina. 56

Tabela 6: Resultados obtidos dos ensaios de veracidade, nos quais são incluídos os valores de precisão intradia e interdias para a nicotina e cotinina. 57

Tabela 7: Valores de recuperação e respetivos RSDs para a nicotina e cotinina para cada nível de concentração. 57

Tabela 8: Comparação da metodologia desenvolvida no presente estudo com metodologias previamente publicadas. 60

Lista de abreviaturas

A_{BET} – Área superficial aparente

ANOVA – Análise de variância

BAμE – Microextração adsortiva em barra (do inglês *Bar Adsorptive Microextraction*)

CA – Carvão ativado

CQCT/OMS – Convenção Quadro da Organização Mundial de Saúde para o Controlo do Tabaco

ETAR – Estação de Tratamento de Águas Residuais

FDA – do inglês *Food and Drug Administration*

GAC – Química analítica verde (do inglês *Green Analytical Chemistry*)

GC-MS – Cromatografia gasosa acoplada a espetrometria de massa (do inglês *Gas Chromatography-Mass Spectrometry*)

ICH – Conferência internacional sobre harmonização (inglês *International Conference on Harmonization*)

IUPAC - União Internacional de Química Pura e Aplicada (do inglês *International Union of Pure and Applied Chemistry*)

LC-MS – Cromatografia líquida acoplada a espetrometria de massa (do inglês *Liquid Chromatography-Mass Spectrometry*)

LC-MS/MS – Cromatografia líquida acoplada a espetrometria de massa em T*andem* (do inglês *Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometr*y)

LOD – Limite de deteção (do inglês *Limit of Detection*)

LOF – Teste de *Lack-of-Fit*

LOQ- Limite de quantificação (*Limit of Quantification*)

m/z – razão massa/carga

nAChRs – Recetores nicotínicos de acetilcolina (do inglês *Nicotinic Acetylcholine Receptors*)

OMS – Organização Mundial de Saúde

pH_{pzc} – pH do ponto de carga zero

PI – Padrão interno

pKa – Simétrico do logaritmo decimal da constante de acidez

r^2 – coeficiente de determinação

RSD – Desvio padrão relativo (do inglês *Relative Standard Deviation*)

S/N – razão sinal/ruído (do inglês, *Signal/Noise*)

SBSE – Extração sortiva em barra de agitação (do inglês *Stir Bar Adsorptive Extraction*)

SIM – Monitorização de iões selecionados (do inglês *Selected Ion Monitoring mode*)

SPE – Extração em fase sólida (do inglês *Solid Phase Extraction*)

SPME – Microextração em fase sólida (do inglês *Solid Phase Microextraction*)

WBE – Epidemiologia baseada em águas residuais (do inglês *Wastewater Based Epidemiology*)

1. Introdução

O tabaco e a cafeína estão entre as substâncias de abuso legais mais consumidas mundialmente (Senta et al., 2015b). O consumo de tabaco potencia aparecimento de doenças como o cancro e doenças respiratórias e cardiovasculares, nalguns casos, o tabagismo resulta na morte dos consumidores (Gracia-Lor et al., 2020a). Estudos indicam que a ingestão de cafeína em quantidades moderadas pode apresentar redução do risco de doenças crónicas (Reyes & Cornelis, 2018). Contudo, o consumo de cafeína em grandes quantidades pode acarretar consequências para os consumidores (Temple et al., 2017).

A monitorização de consumos é essencial para criar e aplicar medidas com o intuito de reduzir os impactos causados pelo consumo de substâncias. Diversas abordagens têm sido utilizadas ao longo dos anos para realizar a estimativa de consumo de tabaco por parte das populações/comunidades. Contudo, a sua aplicação revela a existência de discrepâncias consideráveis entre os dados obtidos e os valores reais (Mackie et al., 2019). A epidemiologia baseada em águas residuais (WBE, do inglês *Wastewater-based Epidemiology*), uma abordagem relativamente recente, tem demonstrado um forte potencial para colmatar as limitações provenientes das abordagens tradicionais e, assim obter uma estimativa mais aproximada da realidade (Lai et al., 2018).

A WBE passa pela colheita de amostras, seguida da extração dos compostos-alvo e consequente análise instrumental para que posteriormente seja possível estimar o consumo da população de acordo com as concentrações obtidas (Boogaerts et al., 2021). Por ser uma abordagem em desenvolvimento, é essencial estudar a aplicação de novas metodologias que sejam menos morosas, possuam um custo-benefício mais vantajoso e que assentem nos princípios da "Química Verde".

O objetivo da presente tese consistiu no desenvolvimento e validação de uma metodologia analítica mais amiga do ambiente e do utilizador, e com custo-benefício mais vantajoso, para a determinação de biomarcadores de consumo de tabaco e cafeína em águas de Estações de Tratamento de Águas Residuais (ETARs). Porém, foi feita uma adaptação ao objetivo inicial para melhor enquadrar ao trabalho realizado. Para determinar o consumo de cafeína seria necessário analisar a cafeína e paraxantina (biomarcador preferencial). No entanto, a análise de paraxantina, pelo método instrumental proposto, implica a sua derivatização.

Para tal foram realizados vários ensaios com recurso diferentes condições de derivatização. Contudo, não foi possível alcançar estabilidade na derivatização do composto. Por essa razão, optou-se por excluir a determinação do consumo de cafeína. Relativamente à determinação do consumo de tabaco, os padrões disponíveis eram apenas a nicotina e cotinina. A nicotina encontra-se presente na planta do tabaco e, também, noutros vegetais edíveis, em cigarros eletrónicos e em adesivos ou pastilhas de nicotina. Para discriminar entre o consumo/exposição ao tabaco e o consumo/exposição à nicotina seria necessário incluir a anabasina e anatabina que são biomarcadores específicos para o consumo de tabaco. Uma vez que não se encontravam disponíveis, determinou-se apenas o consumo/exposição à nicotina.

1.1. Tabaco

O tabaco é produzido através do processamento das folhas secas de plantas do género *Nicotiana L*. (Figura 1), nativas do continente americano (Musk & De Klerk, 2003). Acredita-se que a planta do tabaco é consumida desde o século IX por questões religiosas, espirituais, medicinais e recreacionais pelos indígenas americanos, que a fumavam, mascavam e utilizavam em enemas alucinogénios (Edwards et al., 2017). Durante a época dos descobrimentos, o tabaco foi trazido ao continente europeu, e proliferou pelo continente americano, tendo o seu consumo prevalecido até aos dias de hoje (Castaldelli-Maia et al., 2016; Edwards et al., 2017).

Figura 1: Planta do género *Nicotiana L*. Adaptado de (Brandt Wilhelm et al., 1887).

O tabaco possui efeitos estimulantes, depressores e aditivos, que promovem a dependência física e emocional dos seus utilizadores, para além de despoletarem o surgimento de doenças respiratórias, cardiovasculares, cancro e, nalguns casos, a morte (Benowitz, 2009; Valentine & Sofuoglu, 2018). Embora o tabaco cause problemas de saúde aos consumidores, provoca também mazelas a quem está exposto ao fumo proveniente da combustão dos cigarros, os denominados fumadores passivos. No tabaco e fumo de tabaco estão presentes mais de 4700 compostos químicos diferentes (F. R. Taylor, 2015). A *Food and Drug Administration* (FDA) elaborou uma listagem dos compostos prejudiciais e potencialmente prejudiciais nos produtos e fumo do tabaco. No total, contabilizam-se 93 compostos com efeitos desde aditivos, a cancerígenos, e tóxicos (Cheng et al., 2022).

As consequências provenientes do uso do tabaco, não somente pelos efeitos que provoca a nível da saúde como também pelo seu impacto a nível económico, social e ambiental suscitaram preocupação por parte das organizações governamentais. Em 2003, foi criado o programa MPOWER, no decorrer da Convenção-Quadro da Organização Mundial de Saúde para o Controlo do Tabaco (CQCT/OMS) desde então, a ratificação de adesão ao tratado foi efetuada por 182 países (World Health Organization, 2021). Assim sendo, foram criadas as medidas apresentadas na **Figura 2** como forma de tentar minimizar o número de população exposta ao tabaco.

Figura 2: Medidas do programa MPOWER

Apesar da adoção destas políticas pela maior parte dos países, de acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS), todos os anos o tabaco é responsável por mais de 8 milhões de mortes no mundo, sendo que, 1,2 milhões das referidas mortes são provocadas pela exposição ao fumo da combustão do tabaco (World Health Organization, 2021). Em Portugal, as políticas do programa MPOWER constam na Lei nº 37/2007 de 14 de agosto que estabelece as normas referentes à prevenção do tabagismo, incluindo as medidas aprovadas pela CQCT/OMS para o controlo do tabaco, a proteção contra a exposição ao fumo ambiental do tabaco, regras de rotulagem de produtos tabágicos, sensibilização das populações, entre outros (Assembleia da República, 2007). Contudo, de acordo com o Relatório do Programa Nacional para a Prevenção e Controlo do Tabagismo referente ao ano de 2019 verifica-se que o consumo de tabaco foi responsável pela morte de 13559 pessoas, representando um total de 11,7% de todas as mortes ocorridas nesse ano (Direção Geral de Saúde, 2020).

Embora o número de fumadores tenha vindo a decrescer ao longo dos tempos, o número de mortes provocadas pelo tabaco tem aumentado e a perspetiva é de que se mantenha o padrão, uma vez que os efeitos do tabagismo podem apenas aparecer vários anos depois do início do consumo e mesmo depois da sua cessação (World Health Organization, 2000).

Torna-se assim necessário ressaltar a importância do primeiro ponto das medidas do programa MPOWER, que se refere à monitorização como forma de desenvolver e avaliar políticas de prevenção e cessação de hábitos tabágicos para colmatar os impactos causados.

1.1.1. Nicotina

Isolada pela primeira vez em 1828 por Posselt e Reimann, a nicotina [1-metil-2-(3-piridil-pirrolidina), $C_{10}H_{14}N_2$] é o principal composto psicoativo naturalmente presente nas folhas de plantas de tabaco (Tiwari et al., 2020; Yildiz, 2004). Trata-se de uma substância alcaloide parassimpaticomimética, com propriedades inseticidas na natureza, e com elevada toxicidade para humanos (A. Taylor et al., 2021a; Wittenberg et al., 2020). Além de estar presente na planta do tabaco, pode ser encontrada também, em vegetais edíveis, como por exemplo em tomates e batata (Ortiz & Grando, 2012). A nicotina, **Figura 3**, é uma amina terciária, com um pK_a de 8,0, e massa molecular de 162,33, apresentando na sua estrutura um anel de piridina e um anel de pirrolidina (Benowitz et

al., 2009). A sua estrutura química permite a ocorrência de estéreoisómeros, sendo que, no tabaco, o isómero maioritariamente presente é o (S)-isómero (Benowitz et al., 2009).

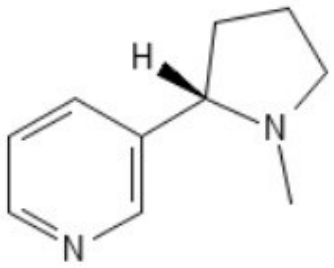


Figura 3: Estrutura química da molécula de nicotina. Figura elaborada em https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/

A absorção de nicotina pelo organismo pode ocorrer através da mucosa oral, trato gastrointestinal, bexiga e pelos pulmões. Quando o consumo de nicotina é realizado através da combustão de tabaco, a absorção é feita sobretudo pelos alvéolos pulmonares. Após a absorção pelos alvéolos, a nicotina entra na corrente sanguínea e rapidamente alcança o cérebro, onde se liga aos recetores nicotínicos de acetilcolina (nAChRs). A ligação a estes recetores provoca a libertação de vários neurotransmissores, incluindo a dopamina, responsável por provocar efeito de prazer e de recompensa contribuindo assim para a dependência dos utilizadores (Hukkanen et al., 2005).

Depois da absorção, a nicotina é biotransformada hepaticamente através do citocromo P450 2A6 que catalisa a reação de 5'-oxidação da nicotina para ião de nicotina$^{\Delta 1',5'}$-imínio (Murphy, 2021). A oxidação deste metabolito leva à formação de cotinina (**Figura 4**). Na urina 5% da nicotina é excretada sem sofrer metabolização e 10% é excretada como cotinina (A. Taylor et al., 2021b).

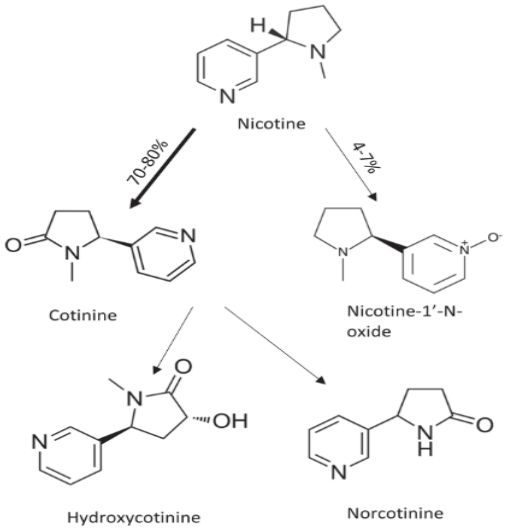


Figura 4: Esquema do metabolismo da nicotina. Adaptado de (A. Taylor et al., 2021a).

A cotinina [(5S) -1-metil-5-(3-piridil) -pirrolidina-2-ona], de massa molecular 176,22, tal como a nicotina, é um alcaloide presente nas folhas das plantas do género *Nicotiana*. Para além disso, é também o metabolito principal da nicotina, uma vez que, 70-80% da nicotina absorvida pelo organismo é biotransformada em cotinina (A. Taylor et al., 2021a). A sua estrutura química é bastante semelhante à da nicotina, possuindo também um anel de piridina e um anel de pirrolidina (**Figura 5**) e, apresenta um pKa de 4,8 (S. M. Ahmad & Nogueira, 2020). A absorção de cotinina pode ocorrer através do consumo de tabaco ou à exposição ao fumo do tabaco. Esta substância potencia a memória e concentração e diminui a ansiedade (Moran, 2012). Após a sua absorção, entra na corrente sanguínea e rapidamente alcança o tecido cerebral, ligando-se aos nAChRs (Grizzell & Echeverria, 2014). O tempo de semivida da cotinina no sérum/plasma humano é de 15-19h, ou seja, é superior ao da nicotina que apresenta um tempo de semivida de 2-3h (Terry et al., 2005). Devido às suas características, tem sido utilizada como biomarcador de consumo/exposição à nicotina ou a produtos de nicotina (Kim, 2016).

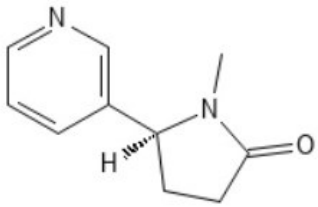


Figura 5: Estrutura química da molécula de cotinina. Estrutura elaborada em https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/

1.2. Estimativa de consumos

Como forma de avaliar o resultado da implementação de medidas de prevenção e cessação de hábitos tabágicos, é fundamental estimar a população fumadora, assim como a exposição da restante população ao fumo de tabaco. Tradicionalmente, a estimativa de consumo de substâncias é realizada recorrendo a dados de relatórios de vendas, inquéritos, relatórios médicos e censos (Baz-Lomba et al., 2016). Porém são amplamente conhecidas as limitações subjacentes à estimativa de consumos por estes meios.

De entre as desvantagens da utilização de dados provenientes destas fontes estão o facto de serem abordagens dispendiosas e morosas, sujeitas a viés e a conflitos éticos (Verovšek et al., 2020).

1.3. Epidemiologia baseada em águas residuais

A epidemiologia baseada em águas residuais é uma abordagem emergente com enorme potencial para realizar as estimativas de consumo e/ou exposição de uma dada população a uma substância em concreto (López-García et al., 2020). A WBE foi inicialmente proposta por Daughton et al. em 2001 com o intuito de entender quais os padrões de consumo de substâncias ilícitas. No entanto, a sua primeira aplicação foi apenas realizada por Zuccato et al. em 2005 (Vitale et al., 2021). Estes investigadores pretendiam monitorizar o consumo de cocaína e outras substâncias ilegais em várias populações de Itália. Contudo, a sua aplicabilidade rapidamente foi empregue noutro tipo de contextos, como monitorização de substâncias de abuso lícitas, pesticidas e indicadores sobre o estado de saúde de uma população tal como diabetes, vírus e bactérias (Chen et al., 2019a; Driver et al., 2020; Duan et al., 2022; Monteiro et al., 2022; Nguyen et al., 2018).

A WBE assenta no princípio de que tudo o que é consumido pelos indivíduos de uma dada população é sujeito a metabolização por parte do organismo e é posteriormente excretado (Castiglioni et al., 2014). Tendo em conta que o que é excretado é encaminhado para ETARs, é possível recolher amostras não tratadas para proceder à sua análise e estimar os padrões de consumo da população servida por determinada ETAR (**Figura 6**). Neste sentido, a WBE permite uma estimativa quase em tempo real dos consumos ou

exposição por uma população, permitindo obter resultados de forma ágil sobre os padrões de consumo a nível geográfico e temporal (European Monitoring Centre for Drugs and Drug Addiction, 2021).

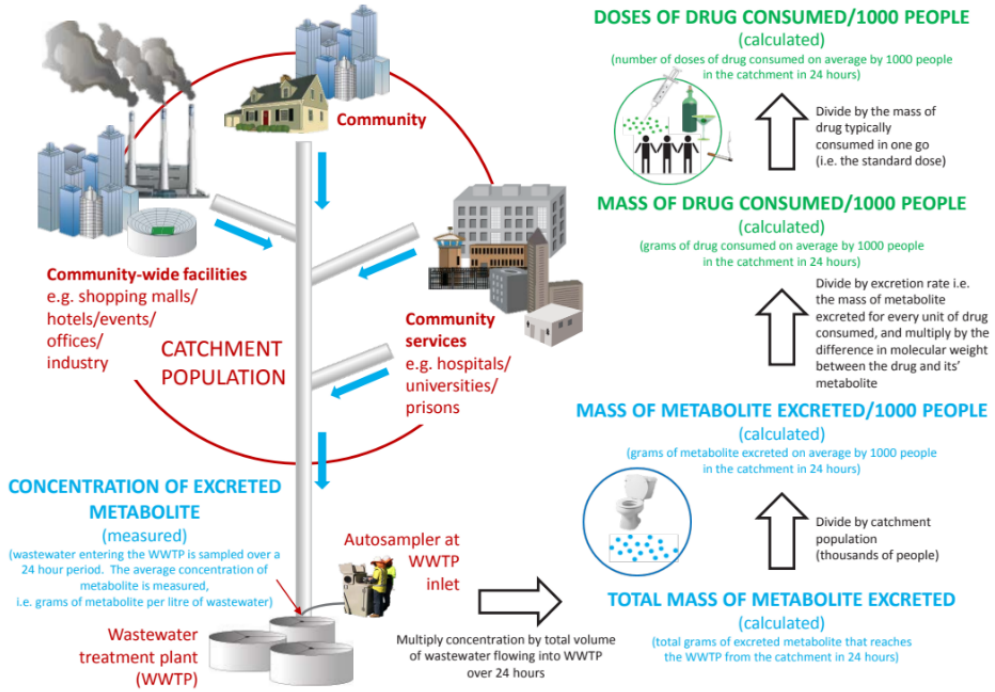


Figura 6: Esquematização da abordagem de WBE. Adaptado de (Choi et al., 2018b).

Um dos principais benefícios desta abordagem é a ausência de conflitos éticos individualizados, uma vez que o estudo é baseado no acesso a informação de uma população em geral e não individualmente (Prichard et al., 2014). Contudo, há alguns aspetos a ter em conta aquando da forma como o procedimento é desenvolvido e aplicado porque muito embora os conflitos éticos não sejam inerentes à WBE, é possível que estes se verifiquem, nomeadamente se as amostras forem colhidas de fontes demasiado específicas, como por exemplo, de zonas com população mais desfavorecida e de estabelecimentos prisionais, uma vez que podem potenciar estigmas, sentimento de vergonha e criação de rótulos (Hall et al., 2012).

1.3.1. Ciclo analítico

No que concerne às etapas da WBE, a abordagem é constituída por três pontos fundamentais: a recolha de amostras, a preparação e análise das mesmas e, a estimativa dos consumos.

Um dos fatores cruciais é a escolha dos biomarcadores de consumo, uma vez ser necessário eleger biomarcadores com uma boa estabilidade, quer em águas residuais, quer enquanto amostras, para além de outros requisitos subjacentes ao conceito de biomarcador (Senta et al., 2015a). A monitorização do consumo de tabaco foi efetuada, em diversos estudos, através da aplicação da WBE (Centazzo et al., 2019; Gracia-Lor et al., 2020b; Montes et al., 2020; Shao et al., 2021; Qiu Da Zheng et al., 2017; Qiuda Zheng, Eaglesham, et al., 2020a). Para estimar o consumo de nicotina, os principais biomarcadores utilizados são a própria nicotina e a cotinina e, alguns estudos incluem também a *trans*-3'-hidroxicotinina (Montes et al., 2020). A anabasina e anatabina, têm sido utilizadas para discriminar entre o consumo de nicotina proveniente do uso do tabaco, ou de outras fontes como cigarros eletrónicos e sistemas transdérmicos e pastilhas de nicotina, uma vez que estes compostos estão ausentes nestes produtos (Qiuda Zheng, Gartner, et al., 2020).

Para realizar efetivamente as estimativas, são realizadas *back-calculations*, que têm em conta os fatores de correção para os biomarcadores analisados e a população que contribuiu para a amostra em causa. A fórmula matemática base para proceder ao cálculo da estimativa é a seguinte:

$$Consumo = \frac{C \times F \times CF}{P} \quad (1)$$

Onde C corresponde à concentração de composto alvo, F é o fluxo da ETAR aquando da amostragem, CF o fator de correção para o composto alvo e P a população servida pela ETAR (Castiglioni et al., 2014). O cálculo do fator de correção é realizado de acordo com a Equação 2.

$$CF = \frac{\frac{MW_{composto-mãe}}{MW_{biomarcador}}}{\%\ excretada\ como\ biomarcador} \quad (2)$$

Em que MW refere-se à massa molecular do composto alvo e do seu biomarcador e "% excretada como biomarcador" é a percentagem de composto excretado como metabolito (Duan et al., 2022).

Relativamente à amostra, esta é geralmente uma amostra composta, constituída por várias subamostras colhidas durante 24h (Choi et al., 2018a; Lorenzo & Picó, 2019). A amostragem pode ser efetuada de forma proporcional ao fluxo, tempo ou ao volume, segundo Ort et al., 2010, o modo de amostragem mais apropriado é o proporcional de fluxo contínuo, pois tem em conta as variações de fluxo ao longo da amostragem. Após a colheita, o pH das amostras é ajustado para 2 como forma de minimizar a degradação dos compostos de interesse, seguido de armazenamento -20ºC (Qiuda Zheng et al., 2019).

Antes da análise instrumental, é normalmente realizada a etapa de preparação da amostra. Em primeiro lugar ocorre a uma filtração para eliminar os sólidos em suspensão. Depois procede-se etapa de extração dos analitos-alvo por forma a concentrá-los e incrementar a sensibilidade da metodologia, assim como da eliminação de interferentes (Lorenzo & Picó, 2019). Por fim, ocorre a análise instrumental.

1.4. Técnicas de extração

Um dos passos determinantes no desenvolvimento de uma metodologia analítica é a preparação da amostra, mais concretamente a etapa de extração. Tal como referido anteriormente, esta etapa permite isolar e concentrar os analitos-alvo bem como eliminar possíveis interferentes contidos na matriz da amostra (Mitra, 2003). De acordo com a literatura existente, a extração em fase sólida (SPE do inglês *Solid Phase Extraction*) é a técnica mais comumente utilizada para proceder à extração dos analitos de interesse em contexto de WBE (Fontanals et al., 2019). A SPE utiliza a diferença de afinidade química entre os analitos de interesse e os interferentes presentes numa matriz líquida, para uma fase sólida (sorvente). Esta afinidade permite a separação das substâncias de interesse dos interferentes. A fase sorvente encontra-se normalmente contida em cartuchos, seringas ou membranas/discos (Mitra, 2003). Sucintamente, a SPE é realizada de acordo com os seguintes passos (**Figura 7**):

- → Condicionamento da coluna
- → Retenção dos compostos
- → Eluição de interferentes
- → Recondicionamento da coluna
- → Eluição dos compostos

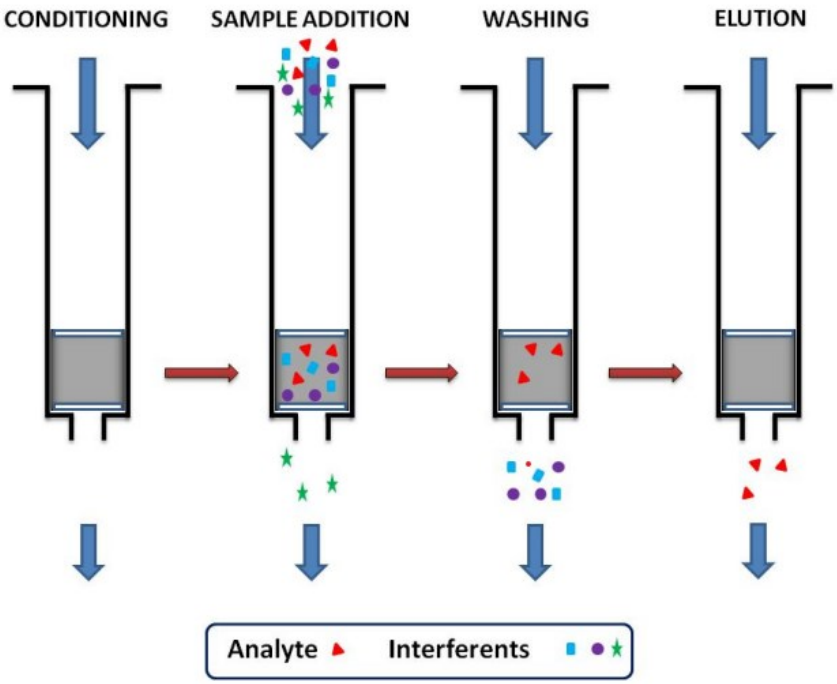


Figura 7: Esquematização do procedimento de SPE. Adotado de (Lucci et al., 2012).

As fases sorventes empregues são usualmente compostos orgânicos revestidos ou quimicamente ligados a sílica, podendo possuir propriedades polares, moderadamente polares ou não-polares. A extração pode ocorrer em fase normal ou em fase reversa. Na extração em fase normal é utilizada uma fase sorvente polar e solventes não polares. Por outro lado, na extração em fase reversa os solventes usados apresentam propriedades polares e uma fase sorvente não polar (Mitra, 2003). De forma sucinta, nesta técnica, a amostra é passada pela fase sorvente onde os compostos de interesse permanecerão retidos de acordo com a afinidade que têm pela fase estacionária, por norma, quando a extração é realizada com recurso a cartuchos é utilizado vácuo para facilitar a passagem da amostra pela fase móvel (Skoog et al., 2013). A necessidade de grandes volumes de amostra e de solventes orgânicos, potencialmente prejudiciais para o ambiente e para a saúde do operador, a baixa reprodutibilidade, a morosidade e o número de etapas da SPE, são limitações que tornaram imprescindível a implementação de técnicas que suprimam estas desvantagens e, simultaneamente, sejam mais ecológicas (Mitra, 2003).

1.5. Técnicas de microextração

As técnicas de extração convencionais são normalmente morosas e dispendiosas, para além de exigirem o uso de um grande volume de solventes, não assentando nos princípios da sustentabilidade da Química Verde (de Marco et al., 2019). O termo "Química verde" foi mencionado pela primeira vez por Cathcart em 1990. Porém foi no ano de 1996 que o conceito foi mencionado de acordo com o significado que tem atualmente tendo sido estabelecidos doze princípios, **Figura 8**, que visam a prática de uma química mais sustentável e ecológica (GAC, do inglês *Green Analytical Chemistry*).

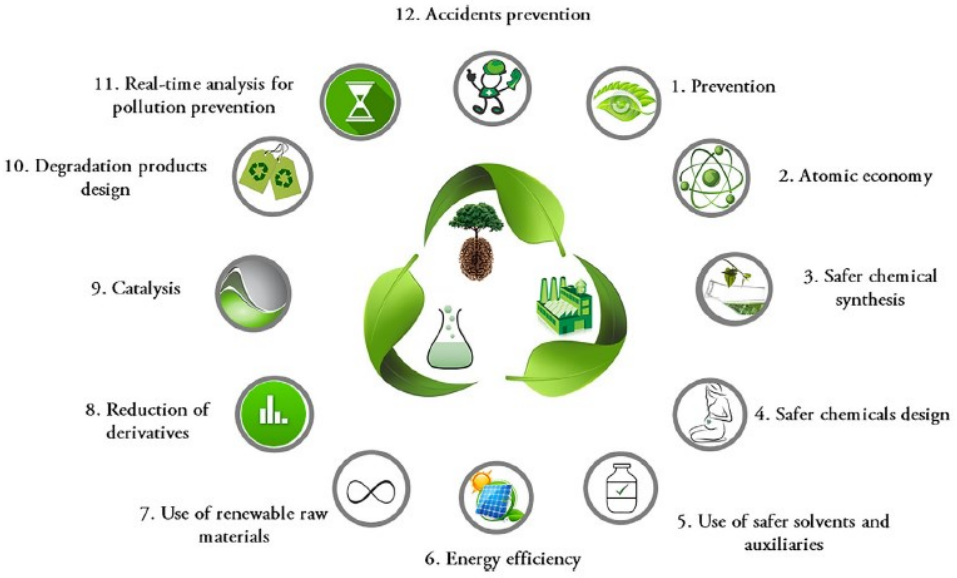


Figura 8: Princípios da GAC. Adotado de (de Marco et al., 2019).

A integração dos princípios da GAC numa metodologia é de extrema importância, contudo, torna-se necessário avaliar, de facto, quão ecológica é a metodologia desenvolvida (Pena-Pereira et al., 2020). Para tal, têm vindo a ser desenvolvidas abordagens baseadas em sistemas métricos como o *National Environmental Methods Index* (NEMI), o *Analytical Eco-Scale*, o *The Green Analytical Procedures Index* e, o *RGB Additive Color Model* (Gałuszka et al., 2012; Keith et al., 2007; Nowak & Kościelniak, 2019; Tobiszewski & Orłowski, 2015). As limitações subjacentes às abordagens mencionadas, levaram ao desenvolvimento de uma nova abordagem, a *Analytical GREEnness*, mais flexível, fácil de executar e interpretar e que tem em conta os 12 princípios da GAC. Nesta abordagem, é criada uma escala, de 0-1, que engloba os

12 princípios da GAC, sendo que a pontuação final é calculada com base nos princípios. Como resultado, obtém-se um pictograma (**Figura 9**) com a indicação da pontuação final bem como o desempenho do método em cada um dos critérios (Pena-Pereira et al., 2020).

Figura 9: Exemplo de pictograma com a pontuação final. Adotado de (Pena-Pereira et al., 2020).

Como forma de contornar as desvantagens das técnicas de extração tradicionais e corresponder aos princípios da GAC, ao longo das últimas décadas têm sido desenvolvidas técnicas de microextração que são baseadas em metodologias que empregam volumes reduzidos de solventes, necessitam de menos passos de preparação e utilização de menos equipamentos, e possuem um custo-benefício mais vantajoso. Bons exemplos são a microextração em fase sólida (SPME do inglês *Solid Phase Microextraction*), a extração sortiva em barra de agitação (SBSE, do inglês *Stir Bar Sorptibe Extraction*), microextração adsortiva em barra (BAμE do inglês *Bar Adsorptive Microextraction*), entre outros (S. M. E. Ahmad, 2020).

1.5.1. Microextração Adsortiva em Barra

A BAμE consiste na utilização de um dispositivo miniaturizado para extração seletiva de compostos de interesse em meio aquoso, operado por amostragem de flutuação (Almeida & Nogueira, 2015). Estes dispositivos (**Figura 10**) são estruturas cilíndricas ocas de polipropileno, às quais são fixados material sorvente por via de um adesivo adequado (Oenning et al., 2017).

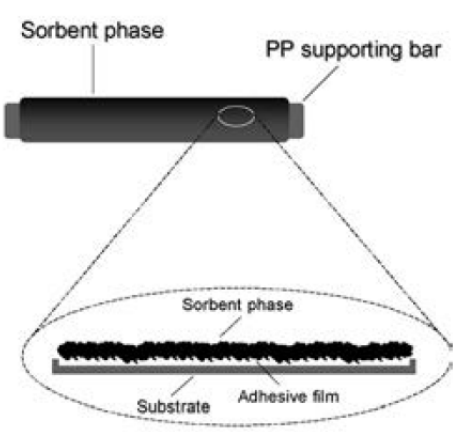


Figura 10: Dispositivo convencional de BAμE. Adaptado de (Nogueira, 2012).

A escolha da fase sorvente adequada para a extração dos analitos de interesse é de enorme importância, uma vez que influencia diretamente a eficiência de extração. Os polímeros e carvões ativados (CAs) têm sido as fases sorventes mais utilizadas. Os CAs são materiais nanoestruturados que permitem a adsorção de solutos por interações electroestáticas e/ou dispersivas (Neng et al., 2015). A adsorção de solutos pelos CAs é dependente do pH_{pzc} (pH do ponto de carga nula), uma vez que, a adsorção é alcançada por meio de interações electroestáticas e/ou dispersivas) bem como da área de superfície e dimensões dos poros e, das respetivas propriedades de adsorção (S. M. Ahmad et al., 2016).

Strata-X e HLB são sorventes poliméricos de fase reversa baseada em poliestireno e divenilbenzeno. Estes polímeros, também usados em SPE, apresentam elevada capacidade de retenção de compostos ácidos, neutros e básicos. A retenção dos solutos por este tipo de sorventes é influenciada pela sua área de superfície, tamanho de partícula e, pelos mecanismos de retenção (S. M. E. Ahmad, 2020).

O ciclo analítico da BAμE pode ser dividido em duas etapas: a etapa de extração e a etapa de retroextração. Na etapa de extração, **Figura 11**, ocorre sorção dos analitos alvo, usualmente auxiliado por agitação magnética.

Figura 11: Esquema da extração em BAμE. Elaborado em https://biorender.com/.

Este passo pode ser influenciado por vários fatores, incluindo a cinética de extração e as caraterísticas da matriz, nomeadamente a velocidade de agitação, o tempo de equilíbrio, o pH, a adição de sal e, a adição de um modificador orgânico como forma a maximizar a adsorção dos analitos ao dispositivo de extração. O parâmetro "tempo" é de extrema relevância para a otimização da técnica de extração, uma vez que, a BAμE é baseada no equilíbrio da interação entre a amostra e a fase sorvente (Abujaber et al., 2019).

Durante a etapa de adsorção, o processo de transferência dos compostos por difusão para a fase sorvente é afetado pela velocidade de agitação, pois afeta o equilíbrio das interações. Foi constatado por diferentes estudos, que a velocidade de agitação não deve exceder as 1000 rpms, tendo em conta que, pode acarretar instabilidades no movimento da barra magnética, comprometendo não só a eficiência de extração como também, a precisão (Almeida & Nogueira, 2012).

Em situações em que os compostos-alvo possuem características polares, a capacidade de extração pode ser promovida através da adição de um eletrólito, ação denominada de "*salting-out effect*". Esta modificação à matriz, possibilita a diminuição da solubilidade dos compostos, ou seja, confere-lhes hidrofobicidade, o que potencia a migração dos mesmos para a fase sorvente (Dias et al., 2015). Contudo, é necessário ter em consideração que o aumento da força iónica, pode dificultar o processo de transferência dos analitos da matriz para a fase sorvente (S. M. Ahmad et al., 2016). Relativamente ao pH da matriz, a sua influência na eficiência de extração prende-se com o facto de este parâmetro afetar a afinidade que os solutos têm para o sorvente, visto que,

dependendo do pH da matriz, as espécies dos analitos podem ionizar-se ou neutralizar-se. Sendo que, a presença de espécies neutras promovem uma melhor eficiência de extração (Ide et al., 2016).

. Aquando da utilização de CAs como fase sorvente, são obtidos melhores resultados quando o pH da matriz inibe a ionização dos compostos de interesse e, simultaneamente, confere uma carga superficial próxima de zero aos ACs (Neng & Nogueira, 2017). Já as fases sorventes poliméricas, apresentam melhor eficiência de extração quando os solutos e a fase sorvente se encontram na forma neutra. A adição de um modificador orgânico, por norma metanol, tem como finalidade alterar a polaridade dos compostos-alvo, tendo particular relevância nos casos em que os solutos apresentam características hidrofóbicas ou não polares. Estas características podem implicar uma adsorção dos analitos pelo vidro dos frascos onde são realizadas as extrações, fenómeno denominado de "*wall-effect*", que afeta consideravelmente a extração dos analitos uma vez que os mesmos ficam retidos no vidro (Oliveira et al., 2021). A adição de um modificador orgânico permite tornar os compostos mais polares e hidrofílicos, minimizando a sua interação com as paredes dos frascos e promovendo a sua integração na matriz aquosa. Porém, importa ter em conta que conferir demasiada polaridade às moléculas não é vantajoso para a extração, visto que, irá aumentar a sua afinidade para com a matriz e tornar mais difícil a sua adsorção pela fase sorvente (Neng et al., 2011; Nogueira, 2012).

A etapa de retroextração consiste na dessorção líquida dos analitos alvos para um solvente adequado. Para tal, o dispositivo de microextração é submerso no solvente e, posteriormente submetido a um banho ultrassónico por forma a promover a dessorção dos compostos extraídos pelo dispositivo para o solvente (S. M. E. Ahmad, 2020) (**Figura 12**).

Figura 12: Esquematização do processo de retroextração em BAμE. Elaborado em https://biorender.com/.

Nesta etapa, os parâmetros a otimizar são o solvente utilizado e o tempo de sonicação. Os solventes utilizados para proceder à dessorção líquida devem ter força suficiente para remover os compostos da fase sorvente para a fase líquida. Metanol, acetonitrilo ou uma mistura de metanol: acetonitrilo (50:50 v/v) são os mais comumente utilizados para este fim (S. M. Ahmad et al., 2016).

Finalizado o processo, as amostras são submetidas a análise instrumental.

1.6. Análise instrumental

A análise instrumental permite obter resultados qualitativos e/ou quantitativos acerca de uma determinada amostra. Na WBE, a análise instrumental é sobretudo realizada através de cromatografia líquida acoplada a espetrometria de massa (LC-MS, do inglês *Liquid Chromatography – Mass Spectrometry*) ou a espetrometria de massa em *tandem* (LC-MS/MS, do inglês *Liquid Chromatography-Mass Spectrometry*) (Langa et al., 2021). No entanto, outros sistemas instrumentais podem ser usados para a análise por WBE, como por exemplo a cromatografia gasosa acoplada a espetrometria de massa (GC-MS, do inglês *Gas Chromatography – Mass Spectrometry*). Esta técnica exige um menor gasto de solvente, obtém espetros de massa muito reprodutíveis, o processo de ionização não sofre influência significativa dos componentes da matriz e, é um equipamento que está presente de forma praticamente universal em laboratórios de química de todo o mundo.

1.6.1. Cromatografia gasosa acoplada a espetrometria de massa

A palavra cromatografia deriva da junção das palavras gregas *chromos* e *graphein* que significam cor e escrita, respetivamente. A cromatografia foi pela primeira vez assim designada pelo russo Mikhail Tswett, que conseguiu separar os pigmentos clorofilos e xantofilos de uma folha de planta através da passagem do extrato por uma coluna revestida por um material adsorvente (Vitha, 2017). Este feito foi alcançado no início do século XX, desde então, diversos têm sido os avanços dentro da área da cromatografia, sendo que, no ano de 1952, A.J.P. Martin e R.L.M. Synge foram galardoados com o premio Nobel da química devido ao seu contributo para o desenvolvimento das técnicas cromatográficas (Dettmer-Wilde & Engewald, 2014). Resumidamente, as técnicas cromatográficas permitem a separação dos compostos presentes numa mistura, de acordo com a sua afinidade entre duas fases. De forma mais elaborada, a definição de cromatografia apresentada pela União Internacional de Química Pura e Aplicada (IUPAC, do inglês International Union of Pure and Applied Chemistry) é a seguinte:

"*A cromatografia é um método físico de separação na qual os componentes a serem separados são distribuídos entre duas fases, uma das quais é estacionária (fase estacionária) enquanto a outra (fase móvel) move numa definida direção*."

A cromatografia gasosa é baseada na partição do analito entre uma fase móvel, gasosa, e uma fase estacionária presente no interior de uma coluna. O cromatógrafo gasoso, **Figura 13**, é o equipamento onde é realizada a separação dos compostos, sendo normalmente constituído por uma botija de gás, um sistema de injeção de amostras, seguido de uma coluna presente no interior de um forno e um detetor (Harris, 2007).

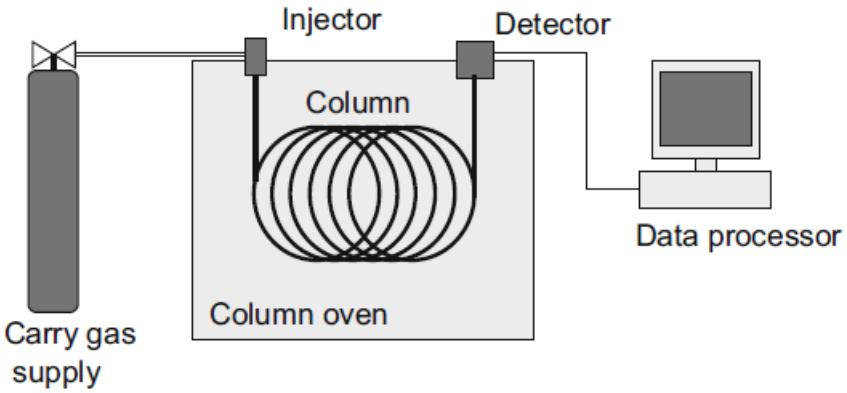


Figura 13: Esquema geral de um cromatógrafo gasoso. Adaptado de (Dettmer-Wilde & Engewald, 2014).

Os gases normalmente empregues em GC são o hélio, árgon, azoto/nitrogénio e hidrogénio. O gás utilizado como fase móvel é designado de gás de arraste. Este deve ser quimicamente inerte e não deve interagir com a fase estacionária. Dos gases supramencionados, o hélio é o mais comumente utilizado, embora possua um custo considerável devido à pureza indispensavelmente elevada do gás de arraste (Carlin & Dean, 2013).

O sistema de injeção permite a inserção das amostras na coluna, com recurso a uma seringa que pode ser operada manualmente ou por um injetor automático. No momento da injeção, nos modos mais comuns, o injetor está a uma temperatura alta, geralmente muito superior à temperatura de ebulição do solvente de injeção. Isto permite a vaporização da amostra para depois ser arrastada para a coluna (Chowrasia & Sharma, 2015). Os modos de injeção mais comuns em GC são, o modo *split* e o modo *splitless* (**Figura 14**). O modo *split* é utilizado quando os analitos de interesse estão presentes em concentrações elevadas, uma vez que permite que a porção de amostra que entra na coluna seja ajustada através do *split ratio* (Harris, 2007). Este modo tem como vantagem prevenir a sobrecarga da coluna e consequentes picos de formas pouco definidas e com pouca resolução, com amostras demasiado concentradas. Já o modo *splitless*, ao contrário do anterior, é ideal para análise vestigial, tendo em conta que a maior parte da amostra entra na coluna (Sparkman et al., 2011).

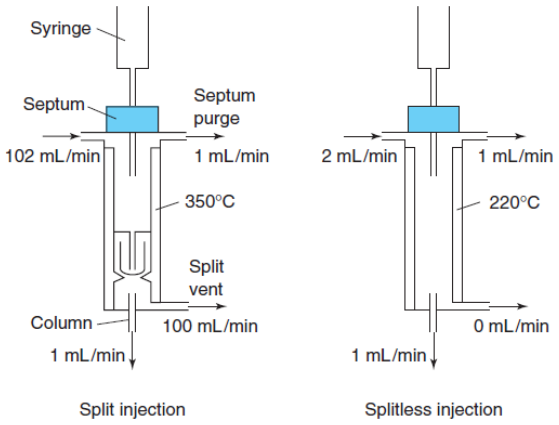


Figura 14: Modos de injeção mais comuns em GC-MS. À esquerda modo *split* e à direito modo *splitless*. Adotado de (Harris, 2007).

Em GC a fase estacionária está contida na coluna. Este é o local onde, de facto, ocorre a separação de compostos. Os tipos de colunas existentes podem ser divididos em dois: as colunas capilares e as colunas de empacotamento. Nas primeiras, as mais populares, as paredes interiores da coluna são revestidas por uma fina camada de fase estacionária, **Figura 15**. Enquanto as segundas são preenchidas por partículas revestidas pela fase estacionária. Como vantagens, as colunas capilares têm melhor resolução, permitem um menor tempo de análise e maior sensibilidade (Holcapek & Byrdwell, 2017).

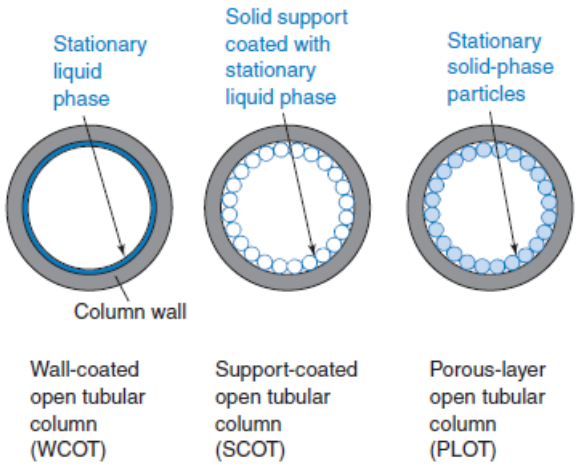


Figura 15: Tipos de colunas. Adaptado de (Harris, 2007).

A coluna está inserida num forno que permite a programação da temperatura. O funcionamento do forno pode ser programado no modo isotérmico, ou seja, com

temperatura constante no decorrer da corrida, ou com incremento de temperatura. (Vitha, 2017). A separação dos compostos e consequente deteção por um detetor apropriado dá origem a um sinal o qual permite obter informação sobre o tempo de retenção dos analitos. Regra geral, é adicionado um padrão interno (PI), com concentração conhecida, às amostras analisadas, preferencialmente com características idênticas às dos compostos-alvo e que não faça parte da composição da amostra. A função do PI é de normalizar os resultados obtidos, uma vez que, qualquer fator que influencie a análise dos compostos, vai ocorrer também no PI, ou seja, o PI é uma referência para interpretar os resultados (Chowrasia & Sharma, 2015).

No fim da separação cromatográfica existe um detetor por forma a permitir a análise qualitativa e quantitativa dos compostos presentes numa amostra. Existem diversos detetores que podem ser empregues em GC, como de ionização por chama, o de fósforo-azoto, entre muitos outros. O acoplamento à espetrometria de massa é uma das mais utilizadas, por ser sensível, para além de transmitir informação qualitativa e quantitativa sobre os compostos. Nesta abordagem, os compostos separados após a saída da coluna, passam pela interface até à fonte de ionização (Harris, 2007). Neste local é onde as moléculas anteriormente separadas são ionizadas, sendo a mais comum a ionização por impacto eletrónico, na qual as moléculas são sujeitas a um feixe de eletrões de alta energia. Este mecanismo dá origem a iões positivos, negativos e espécies neutras. Através de repulsão electroestática, os iões positivos são encaminhados para o espectrómetro de massa onde são separadas em concordância com a razão de massa/carga (*m/*z) (Vitha, 2017). Existem diversos tipos de analisadores de massa, um dos mais utilizados é o quadrupolo (**Figura 16**). O quadrupolo é composto por quatro elétrodos cilíndricos, a estes elétrodos é aplicada tanto uma voltagem constante como uma frequência de voltagem oscilante. As voltagens dão origem a um campo magnético que provoca o desvio de eletrões, esse desvio atua como uma espécie de filtro, permitindo apenas que apenas os eletrões relevantes alcancem o detetor (Harris, 2007).

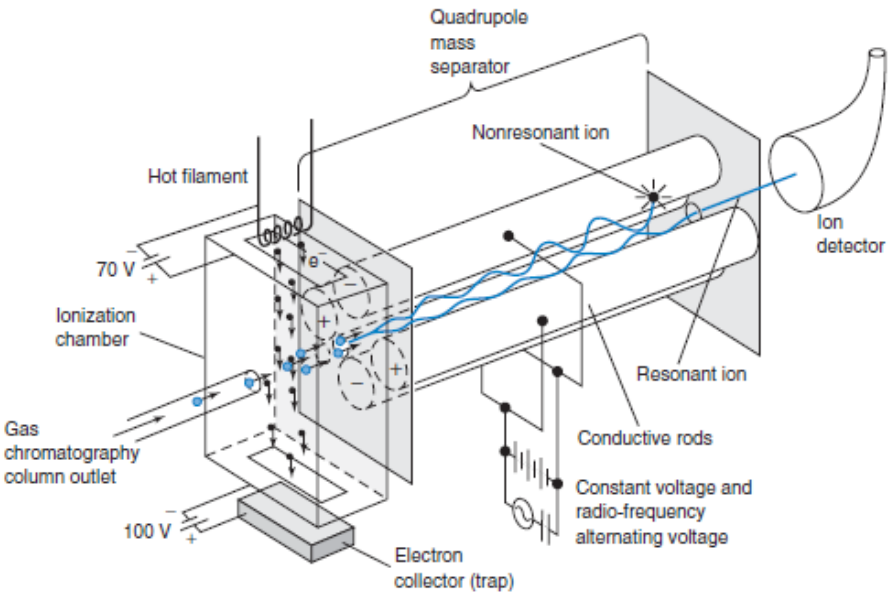


Figura 16: Representação esquemática de um quadrupolo. Adotado de (Harris, 2007).

Finalizada a análise por GC-MS, o *output* resulta num cromatograma, contendo os picos correspondentes aos diferentes compostos analisado. No cromatograma obtém-se informação acerca do tempo de retenção dos compostos, isto é, o tempo, em minutos, que os compostos levam desde o momento em que são injetados no sistema cromatográfico até ao momento em que são detetados. A área sob os picos é diretamente proporcional à concentração dos compostos na amostra (Harris, 2007). Para cada um dos picos constantes no cromatograma, é originado um espetro de massa que fornece informação sobre a massa molecular e a fragmentação da molécula. Por fim, o detetor converte a abundância de iões num sinal elétrico originando assim o espetro de massa (Gross, 2017).

1.7. Objetivo do trabalho

O objetivo da presente dissertação prende-se com o desenvolvimento, validação e aplicação de uma metodologia analítica baseada em BAμE e análise por GC-MS para a determinação de nicotina e cotinina em águas residuais que apresente melhor custo-benefício e seja mais amiga do ambiente que as correntemente usadas.

2. Materiais e métodos

2.1. Padrões analíticos e reagentes químicos

Os padrões analíticos de cotinina (≥ 98,5 %) e difenilamina (≥98%), foram adquiridos à Sigma-Aldrich (Alemanha). A nicotina (99,1 %) foi adquirida da Fluka (Suíça).

O metanol e o acetonitrilo (ambos ≥99,9%) de grau analítico, foram fornecidos pela Riedel-de-Haën (Alemanha).

O ácido clorídrico (37%) e o hidróxido de sódio (98,0%) utilizados para ajustar o pH da água e das amostras foi adquirido da Fisher Chemical (Reino Unido) e da labkem (Espanha), respetivamente.

O cloreto de sódio (99,5 %) foi fornecido pela PanReac AppliChem (Espanha).

2.2. Material corrente e equipamento de laboratório

No decorrer do presente trabalho, foi utilizado material de vidro e de plástico corrente de laboratório. Utilizaram-se micropipetas da marca Eppendorf (Alemanha) de volume regulável (0,5-10; 2-20; 10-100; 20-200 e 100-1000 µL), calibradas no mês de maio de 2022 pela Metrocal (Portugal), e as suas respetivas pontas de polipropileno da Labbox (Espanha). Para o desenvolvimento da metodologia de extração utilizaram-se frascos de vidro transparente de 100 mL com tampas de silicone de 20 mm de diâmetro e barras cilíndricas de agitação magnéticas de 20 mm de largura e 6 mm de diâmetro da labbox (Espanha). Para realizar a retroextração e a análise instrumental dos compostos-alvo, utilizaram-se frascos transparentes convencionais de 2,0 mL para sistemas cromatográficos, *inserts* de vidro transparente de base plana (6 x 31 mm) da labbox (Espanha), e tampas de 12 mm com revestimento politetrafluoretileno (PTFE). Para a análise instrumental utilizaram-se tampas de polipropileno com septo de PTFE, ambas da Agilent Technologies (Estados Unidos da América). Foram ainda utilizados microtubos de centrífuga de 1,5 mL e frascos de vidro âmbar, tubos *falcon* de PTFE de 15 mL e filtros de membrana MCE com poros de 0,22µm.

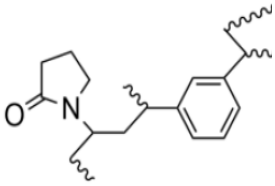
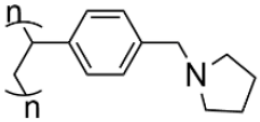
As pesagens foram efetuadas numa balança analítica da marca Sartorius (Alemanha), modelo M-power. A otimização das extrações foi realizada em placas de agitação magnética da marca J. P. Selecta (Espanha), modelo Anigmatic-N e um agitador orbital, da marca Agitorb, modelo 200IC. A retroextração foi executada num banho ultrassónico, modelo UC-1000, marca TPC, frequência 40kHz, voltagem 220V e potência 180 W. No decorrer do desenvolvimento do trabalho foi utilizado um vórtex da marca J. P. Selecta, modelo Vortex-vib, centrifugas da marca Eppendorf (modelos 5415 D e 5810 R) e uma estufa com agitação orbital da marca Memmert, modelo 600. A filtração de amostras foi executada com recurso a uma bomba de vácuo da marca Heidolph (Alemanha), modelo Rotavac valve control.

As análises cromatográficas foram executadas com recurso a um cromatógrafo gasoso Agilent Technologies, Estados Unidos da América, (modelo 6890N), acoplado a um detetor de espetrometria de massa da mesma marca e de modelo 5973Network. As amostras foram injetadas no sistema cromatográfico, por um injetor automático da Agilent (Estados Unidos da América), modelo G2613A, contendo um liner (Agilent, Estados Unidos da América) os dados foram obtidos através do *software* Chemstation versão G1701EA Revision E.02.00.

2.3. Fases sorventes

As fases sorventes usadas no presente estudo foram dois carvões ativados (AC). O primeiro (CA1) foi adquirido da Panreac Química SA (Espanha). O carvão 2 foi fornecido pela Biochem Chemopharma (França). Os polímeros Oasis HLB e Strata-X (**1**), foram obtidos, respetivamente, da Waters Corporation e da Phenomenex, ambas dos Estados Unidos da América.

Tabela 1: Características das fases poliméricas HLB e Strata-X. Adaptado de (S. M. E. Ahmad, 2020).

Nome comercial	Fase sorvente	Estrutura química	Área superficial (m^2/g)	Tamanho de partícula (µm)	Tamanho do poro (Å)
HLB	Etildivinilbenzenoco-*N*-vinilpirrolidona		810	30	80
Strata-X	Poliestirenodivinilbenzeno-co-*N*-vinilpirrolidona		800	33	85

Os carvões ativados foram submetidos a uma lavagem para limpar possíveis interferentes antes da sua fixação nos dispositivos de microextração (J.S.R. Cerqueira, 2021). Foi pesado 1 g de carvão ativado e adicionou-se 10 mL de acetonitrilo, a suspensão foi sujeita a um banho ultrassónico por 30 minutos e de seguida foi centrifugada a 4000 rpm durante 10 minutos. Por último, descartou-se o solvente e colocou-se o carvão a secar na estufa a 50ºC.

2.4. Amostras

As amostras foram obtidas de ETARs localizadas na região de Lisboa e de Almada (**Tabela 2**). A amostragem foi realizada em modo proporcional ao tempo, de hora a hora, durante 24h tratando-se por isso de amostras compostas. As amostras foram colhidas de terça a segunda, cobrindo assim todos os dias da semana.

Tabela 2: Detalhes das amostras analisadas.

Região	Almada						
Ano	2019						
Amostra	MA1	MA2	MA3	MA4	MA5	MA6	MA7
Dia da semana	Terça	Quarta	Quinta	Sexta	Sábado	Domingo	Segunda

Região	Almada					
Ano	2020		2021			
Amostra	M1	M2	A2	A3	A4	A7
Dia da semana	Segunda	Terça	Quarta	Quinta	Sexta	Segunda

Região	Lisboa						
Ano	2019						
Amostra	AL1	AL2	AL3	AL4	AL5	AL6	AL7
Dia da semana	Terça	Quarta	Quinta	Sexta	Sábado	Domingo	Segunda

2.5. Procedimento experimental

2.5.1. Preparação das soluções de trabalho

As soluções-padrão de nicotina, cotinina e difenilamina foram preparadas para frascos de vidro âmbar de 4,0 mL a partir da pesagem rigorosa de 3,0 mg de composto para 3,0 mL de metanol, obtendo uma concentração final de 1,0 mg/mL.

As soluções de mistura padrão foram preparadas a partir das soluções-padrão. As soluções de trabalho e de calibração instrumental foram preparadas a partir das soluções de mistura padrão. Todas as soluções foram armazenadas em frascos de vidro âmbar e posteriormente conservadas a -20ºC.

2.5.2. Condições de operação instrumental

Relativamente às condições de operação instrumental do GC-MS, procedeu-se à injeção das soluções-padrão de cada um dos analitos no GC-MS, efetuando a análise no

modo SCAN (45 e 450 *m/z*) para obtenção dos espetros de massa, tempos de retenção de cada um dos analitos, nicotina, e cotinina, e do PI (difenilamina) e definição dos fragmentos iónicos (*m/z*) a monitorizar. Tendo em conta os dados obtidos, foram preparadas soluções mistura contendo os analitos nicotina, cotinina e, o padrão interno e procedeu-se à sua análise por GC-MS por forma a garantir que não ocorria sobreposição de picos. Para otimizar a resolução, seletividade e sensibilidade, foram testados diversos parâmetros, nomeadamente, do solvente e volume de injeção, assim como do modo de injeção. As condições instrumentais otimizadas e utilizadas no decorrer deste trabalho encontram-se descritas na **Tabela 3**.

Tabela 3: Condições de operação instrumental do GC-MS. Os iões quantitativos são apresentados a negrito.

Condições instrumentais		
Parâmetros de injeção	Volume de injeção	2,0 µL
	Fluxo	5,1 mL/min
	Pressão	4,83 psi
	Modo de injeção	Split (2:1)
	Temperatura do injetor	280ºC
Parâmetros de separação	Fase móvel	Hélio (> 99,999 %)
	Coluna	Mega 5MS 14970 (30,0 m x 250µm x 0,25 µm)
	Programa do forno	45 ºC (1 min); 20 ºC/min até aos 200ºC (5 min)
Parâmetros do detetor	Modo de aquisição	SIM
	Atraso de solvente	5 minutos
	Modo do eletromultiplicador	Absoluto (1200 V)
	Linha de transferência	280 ºC
	Quadrupolo	150 º C
	Iões monitorizados (*m/z*)	Nicotina – **84**, 133, 162 Difenilamina – **169**, 168, 51 Cotinina – **98**, 176, 118

A partir das soluções padrão de nicotina, cotinina e difenilamina (PI) procedeu-se à preparação de 6 calibradores com concentrações entre 1 e 100 µg/mL e PI a 20µg/mL visando elaborar uma curva de regressão linear com a finalidade de verificar a linearidade e limites de deteção (LOD, do inglês *Limit of Detection*) e de quantificação (LOD, do inglês *Limit of Quantification*).

2.5.3. Preparação dos dispositivos de BAµE

Para a extração dos compostos-alvo utilizaram-se dispositivos de BAµE preparados em laboratório. Os dispositivos consistem numa estrutura cilíndrica oca de polipropileno (19 x 3 mm) revestida por um material adesivo ao qual era fixado o material sorvente.

Previamente à sua utilização, os dispositivos de BAµE eram lavados com água desionizada e, após o seu uso, não se procedeu à reutilização dos mesmos como forma de evitar possíveis contaminações.

2.5.4. Desenvolvimento e otimização dos métodos analíticos

No desenvolvimento da presente dissertação, procedeu-se à realização da otimização da metodologia de extração como forma de maximizar a sua eficiência. A otimização da BAµE foi executada em duas etapas. Primeiramente otimizou-se a etapa de extração e de seguida a etapa de retroextração. Na **Figura 17** encontra-se esquematizado o processo de otimização adotado, na qual se incluem os parâmetros otimizados.

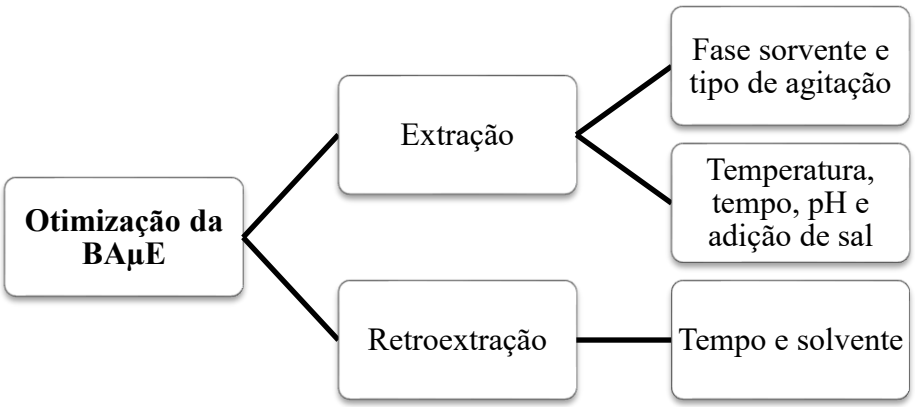


Figura 17: Esquematização do processo de otimização de BAµE.

2.5.4.1. Etapa de extração

Todos os ensaios de otimização da etapa de extração foram realizados em frascos de vidro com capacidade para 100 mL. Cada frasco era preenchido com 100 mL de água desionizada, sendo depois fortificada com 250 µL de uma solução de trabalho a 100 µg/mL. De seguida, era adicionado o dispositivo BAµE, sendo depois o frasco colocado sob agitação.

Os ensaios para seleção da fase sorvente e do tipo de agitação mais adequados foram realizados simultaneamente (**Figura 18**). As fases sorventes estudadas foram dois tipos de carvão ativado (CA1 e CA2) e dois polímeros (Oasis HLB e Strata-X). Relativamente ao estudo do tipo de agitação, recorreu-se à agitação orbital e à agitação magnética. Cada fase sorvente foi estudada nos dois tipos de agitação, durante 16h, a pH 12 sendo que os ensaios foram realizados em triplicado para cada tipo de agitação. A velocidade de agitação foi de aproximadamente 500 rpm nas placas de agitação magnética e 250 rpm no agitador orbital.

Tipo de agitação	Fase sorvente
• Orbital • Magnética	• Carvão ativado 1 • Carvão ativado 2 • Oasis HLB • Strata-X

Figura 18: Tipos de agitação e fases sorventes estudados para a otimização da BAµE.

Após a determinação da fase sorvente e tipo de agitação mais propícias à extração dos compostos de interesse, procedeu-se à otimização de parâmetros relacionados com a cinética (tempo de equilíbrio) e características da matriz (pH e força iónica). Neste ponto, recorreu-se ao *software* Minitab versão 17.1.0 (2013) para realizar uma estratégia de otimização multivariada com recurso a um desenho experimental do tipo Box-Behnken com 4 fatores e 3 níveis por fator. Na **Figura 19** encontram-se as diferentes variáveis estudadas para cada um dos parâmetros otimizados. Os ensaios foram realizados utilizando 100 mL de água desionizada com o pH ajustado para 2, 7 ou 12, à qual se adicionou a quantidade de NaCl referente ao ensaio. De seguida, fortificou-se a água e colocou-se a extrair às diferentes temperaturas e durante diferentes horas. Replicados para

o ponto central foram também executados por forma a avaliar o erro experimental. Os ensaios foram realizados em duplicado e de forma aleatória. No total, foram realizados 54 ensaios, podendo a tabela ser consultada em anexo (**Tabela A.II.1.**).

pH	Tempo	Temperatura	Adição de sal
• 2 • 7 • 12	• 3 h • 9,5 h • 16 h	• 25 ºC • 32,5 ºC • 40 ºC	• 0 g • 10 g • 20 g

Figura 19: Condições de pH, tempo, temperatura e adição de sal estudadas para a otimização da BAμE.

2.5.4.2. Etapa de retroextração

Depois da etapa de microextração prosseguiu-se para a otimização da etapa de retroextração com enfoque no tempo e no solvente ideal para proceder à dessorção líquida dos compostos alvo (**Figura 20**). Os ensaios foram realizados utilizando dispositivos BAμE previamente submetidos à extração dos analitos-alvo atendendo às condições que se revelaram mais eficientes para a extração. Os dispositivos de BAμE foram removidos dos frascos de vidro transparente de 100 mL, e transferidos para vials contendo um *insert* de vidro transparente e base plana. De seguida adicionou-se 240μL de solvente e colocaram-se os *vials* no banho ultrassónico. Terminado o tempo de retroextração, adicionou-se 10μL de padrão a 500 μg/mL e homogeneizou-se com recurso ao vórtex.

Tempo	Solvente
• 5 min • 32,5 min • 60 min	• Metanol • Acetonitrilo • Metanol:acetonitrilo (50:50 v/v)

Figura 20: Tempo de banho ultrassónico e solventes estudados para otimização da etapa de retroextração.

2.5.5. Validação do método analítico

Para realizar a validação do método analítico, realizaram-se ensaios utilizando água da torneira. Os parâmetros incluídos na validação foram a linearidade, sensibilidade, seletividade, precisão e veracidade, tendo sido seguidas as recomendações da Conferência Internacional sobre Harmonização (ICH, do inglês *International Conference on Harmonization*), frequentemente utilizadas em metodologias de WBE, bem como artigos científicos publicados na área de WBE. (Asicioglu et al., 2021; Chen et al., 2019b; Harmonization, 2022; Senta et al., 2015; Song et al., 2020; Wang et al., 2021).

2.5.5.1. Linearidade, sensibilidade e seletividade

Para avaliar linearidade foram fortificadas amostras de água da torneira contendo concentrações de nicotina e cotinina entre 2,5 e 100 µg/L, cada uma com PI a 400 µg/L, num total de sete pontos de calibração. A curva de regressão linear foi construída com sete valores de concentração, cada um deles realizado em quadruplicado. Foram considerados os pontos com desvio inferior a 15,0% da sua concentração nominal (resíduos relativos) e coeficiente de determinação (r^2) superior a 0,995. Para além dos critérios de aceitação mencionados, foi ainda realizado o teste de *Lack-of-Fit* (LOF) por forma a estimar a linearidade do método, para a nicotina e cotinina, com um intervalo de confiança de 95%.

A sensibilidade foi avaliada com recurso ao LOD e, tendo a sua determinação sido efetuada com uma razão de sinal/ruído (S/N, do inglês *signal/noise*) de 3/1 e 10/1, respetivamente.

Para avaliar a seletividade, foram realizados ensaios, com amostras fortificadas apenas com PI tendo como objetivo verificar a presença ou ausência de sinais cromatográficos nos tempos de retenção da nicotina e/ou da cotinina.

2.5.5.2. Precisão e veracidade

Os parâmetros de precisão intermédia e veracidade interdias foram avaliados com recurso a controlos preparados com a concentração de 2,5, 50,0 e 100,0 µg/L,

correspondendo à concentração baixa, média e alta, respetivamente. Todos os controlos, fortificados com a respetiva solução-mistura e, padrão interno para uma concentração final de 400 µg/L. Para cada concentração realizaram-se seis replicados, sendo que para a veracidade, os ensaios foram realizados em três dias consecutivos.

A precisão intermédia foi determinada através do cálculo do desvio padrão relativo (RSD, do inglês *Relative Standard Deviation*) pela a seguinte equação:

$$RSD = \frac{Desvio-padrão}{Média} \times 100 \quad (3)$$

Relativamente ao cálculo da veracidade, o mesmo foi efetuado pelo percentual relativo do erro, empregando a equação 4.

$$Veracidade = \frac{Valor\ medido - Valor\ teórico}{Valor\ teórico} \times 100 \quad (4)$$

2.5.6. Recuperação

A determinação da recuperação foi realizada com amostras com concentrações de soluções-mistura de nicotina e cotinina de 2,5 a 100 µg/mL, sendo que para cada concentração foram realizados cinco replicados.

A retroextração foi realizada utilizando 140 µL de metanol. Decorrido o tempo de extração e de retroextração, adicionou-se a cada replicado, 10 µL de solução-padrão de difenilamina para uma concentração final de 400 µg/mL, seguido de homogeneização com recurso a um vórtex. Por fim, foi retirado o dispositivo de extração e submetido o extrato a análise instrumental. Foram ainda preparadas soluções padrão a 1,0, 20,0 e 40,0 µg/mL de cotinina e nicotina, com padrão interno a 400,0 µg/mL. As soluções mencionadas, foram injetadas no sistema cromatográfico sem extração prévia.

O cálculo da recuperação foi efetuado de acordo com a equação apresentada abaixo:

$$Recuperação = \frac{Sinal\ obtido\ após\ extração}{Sinal\ obtido\ sem\ extração} * 100 \quad (5)$$

2.6. Aplicação a amostras reais

As amostras, depois de descongeladas e atingida a temperatura ambiente, foram homogeneizadas por agitação orbital e posteriormente submetidas a uma filtração a vácuo como forma de eliminar partículas sólidas em suspensão. A cada amostra foram adicionados 250 µL de solução de PI por forma a obter uma concentração de 400 µg/L.

2.7. Classificação e comparação da metodologia desenvolvida

A metodologia desenvolvida na presente dissertação, foi classificada através da aplicação do *software AGREE: Analytical GREennEss Calculator*. Para além da classificação da metodologia desenvolvida, procedeu-se à classificação dos estudos que serviram de base à validação do método analítico (ver ponto 2.6.). Os resultados obtidos pelas diferentes metodologias foram comparados com vista a analisar quão ecológicas são.

3. Resultados e discussão

3.1. Otimização instrumental

A otimização instrumental foi desenvolvida com recurso à injeção de soluções a diferentes concentrações por forma a avaliar preliminarmente a sensibilidade, seletividade e linearidade do instrumento. A análise de soluções-padrão de nicotina, cotinina e PI em modo SCAN, permitiu obter os tempos de retenção, assim como os iões qualitativos e ião quantificador usado em modo SIM. Da análise efetuada, de uma mistura-padrão resultou o cromatograma apresentado na **Figura 21**.

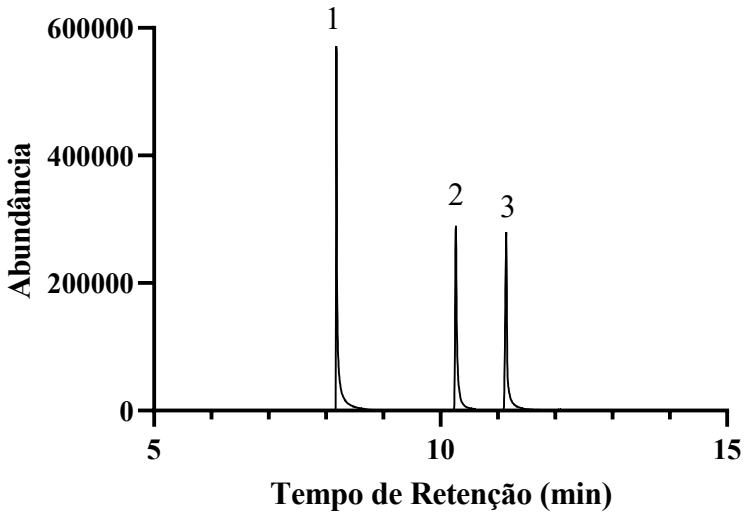


Figura 21: Cromatograma da mistura-padrão de nicotina, cotinina e difenilamina. O pico 1, 2 e 3 correspondem à nicotina, PI e cotinina, respetivamente.

Para cada um dos compostos analisados, obteve-se um espetro de massa (**Figura 22-24**) do qual foi retirada informação acerca dos iões qualitativos e quantificadores para a nicotina, cotinina e difenilamina.

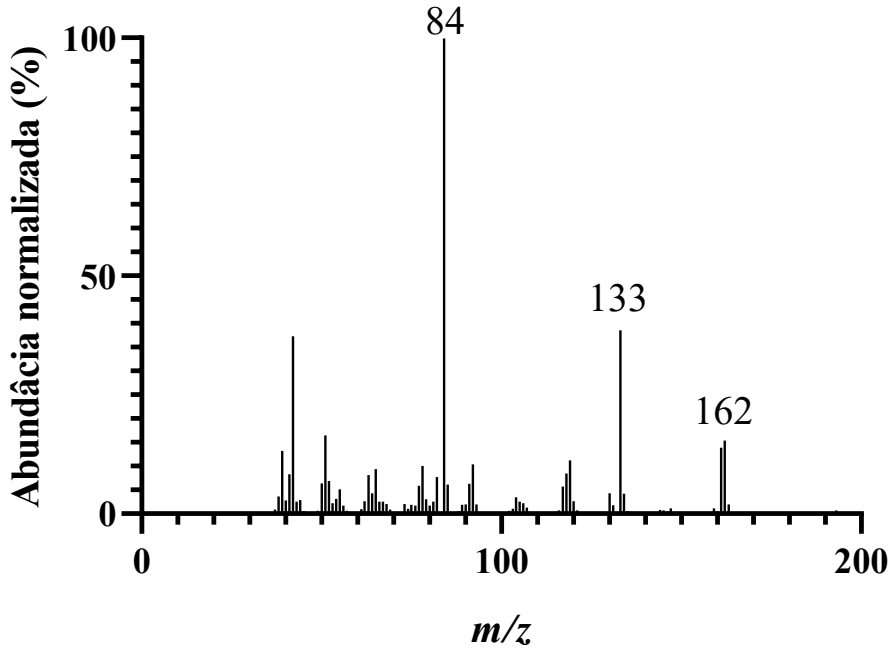


Figura 22: Espetro de massa obtido, em modo SCAN, para a nicotina.

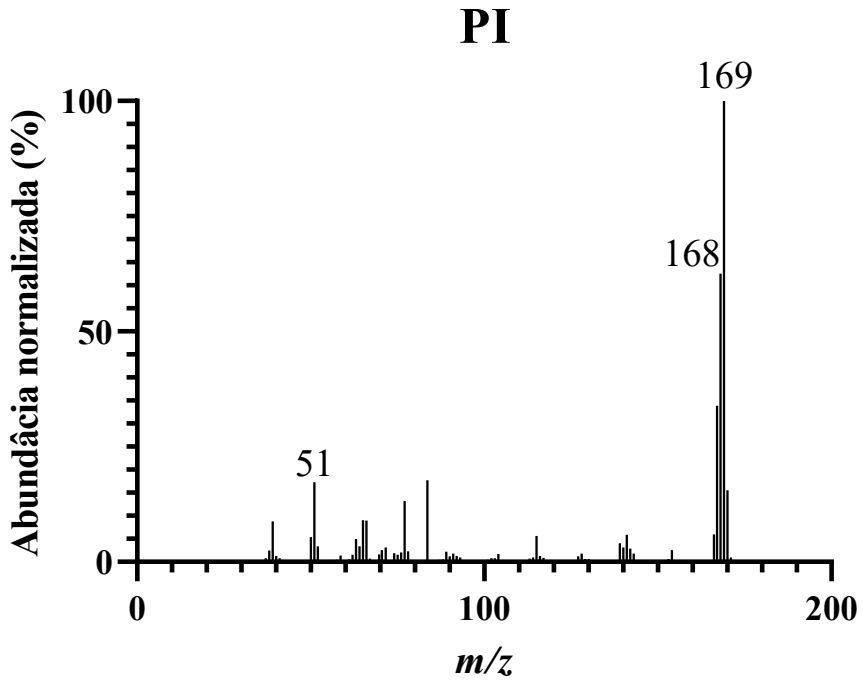


Figura 23: Espetro de massa obtido, em modo SCAN, para o PI.

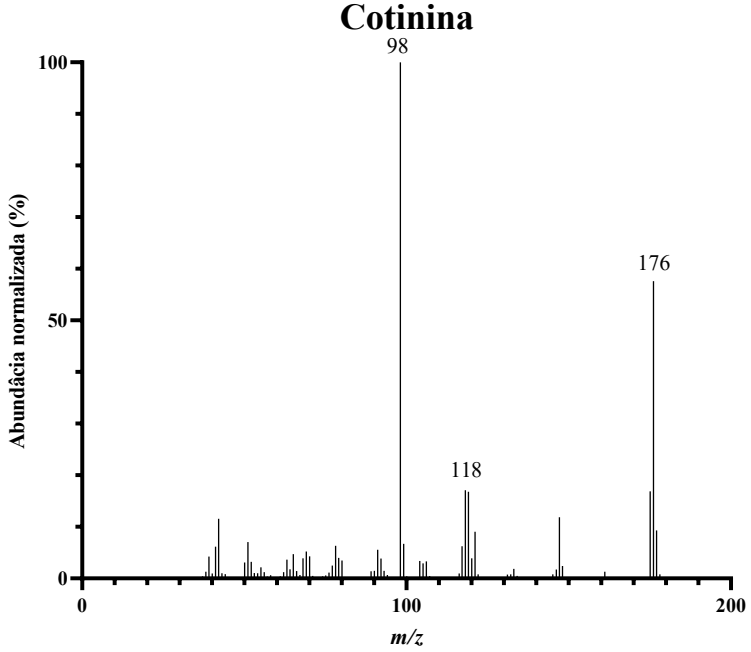


Figura 24: Espetro de massa obtido, em modo SCAN, para a cotinina.

Pela análise do cromatograma e dos espetros de massa dos compostos, foram obtidos os valores de TR e os iões quantificadores e qualitativos presentes na **Tabela 4**, que foram utilizados no modo SIM.

Tabela 4: Tempos de retenção e iões monitorizados em modo SIM para cada um dos compostos analisados. A negrito encontram-se destacados os iões quantificadores.

Composto	TR (min)	Iões selecionados para SIM (*m/z*)
(Nicotina	8,184	**84**, 133, 162
PI	10,267	**169**, 168, 51
Cotinina	11,146	**98**, 176, 118

O sinal obtido pelo equipamento, para os compostos alvo, foi normalizado pelo sinal do PI. Através dos valores de área normalizados, elaboraram-se curvas de regressão linear, apresentadas na **Figura 25**, sendo que para a nicotina obteve-se um R^2 de 0,994 e, para a cotinina obteve-se um R^2 de 0,9961.

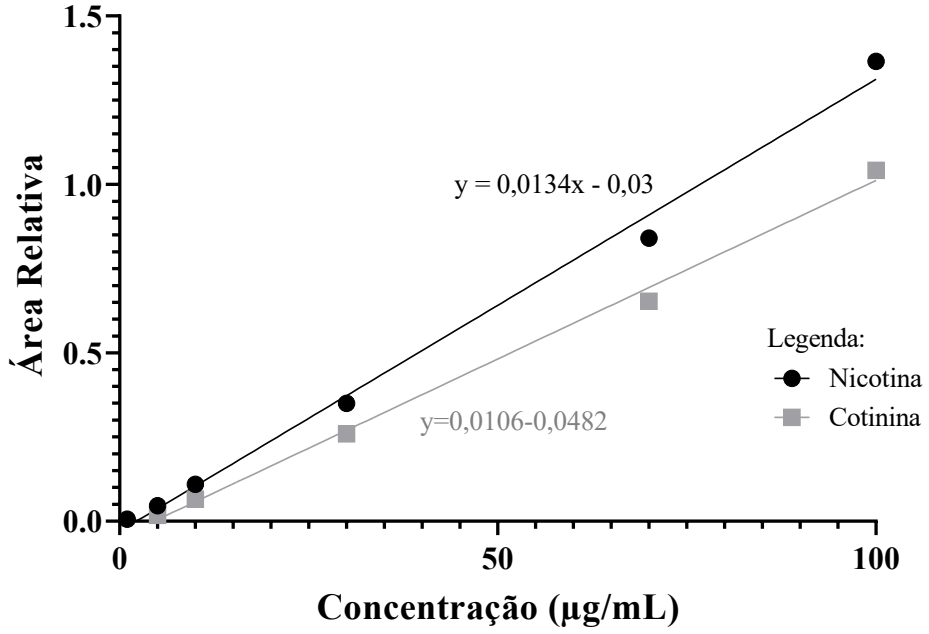


Figura 25: Curvas de regressão linear da nicotina e cotinina.

3.2. Otimização do método analítico

3.2.1. Etapa de extração

3.2.1.1. Fases sorvente e tipo de agitação

Para selecionar a fase sorvente mais adequada para extração de nicotina em meio aquoso, dispositivos BAµE revestidos com dois tipos de CA e dois polímeros (HLB e Strata-X) foram usados para enriquecer os analitos alvo com recurso a agitador orbital ou placa de agitação magnética. Os dados mostram que as fases poliméricas apresentaram uma fraca capacidade sortiva para os analitos de interesse (**Figura 26** e **Figura 27**). Estes resultados podem ser explicados pelas propriedades físico-químicas dos mesmos. Estas fases sorventes usualmente retêm os compostos por interações do tipo fase reversa, como interações hidrofóbicas e ligações π-π, sendo mais apropriadas para compostos com baixa polaridade. Uma vez que a nicotina e a cotinina apresentam elevada polaridade e solubilidade em água, apresentando um log P de 1,2 e 0,2, respetivamente, justifica a fraca performance destas fases sorventes. Por outro lado, os CAs mostraram melhor capacidade microextrativa. CA1 e CA2 mostraram ser mais apropriados para a extração de nicotina e cotinina, respetivamente. Embora os resultados indiquem que o CA1 era

mais indicado para a extração de nicotina e o CA2 para cotinina, optou-se pelo CA1 por ter uma menor granulometria e, por isso, mais adaptada ao dispositivo de microextração. Após a seleção do CA1 como fase sorvente, foi determinado o seu pH_{pzc}, tendo sido obtido o valor de aproximadamente 7,8. Procedeu-se ainda à caracterização das propriedades isotérmicas, que revelaram que o CA1 é um material micro mesoporos, relativamente à área superficial aparente (A_{BET}) foi obtido o valor de 900 m^2/g. Estes resultados enfatizam a elevada capacidade de adsorção da fase sorvente.

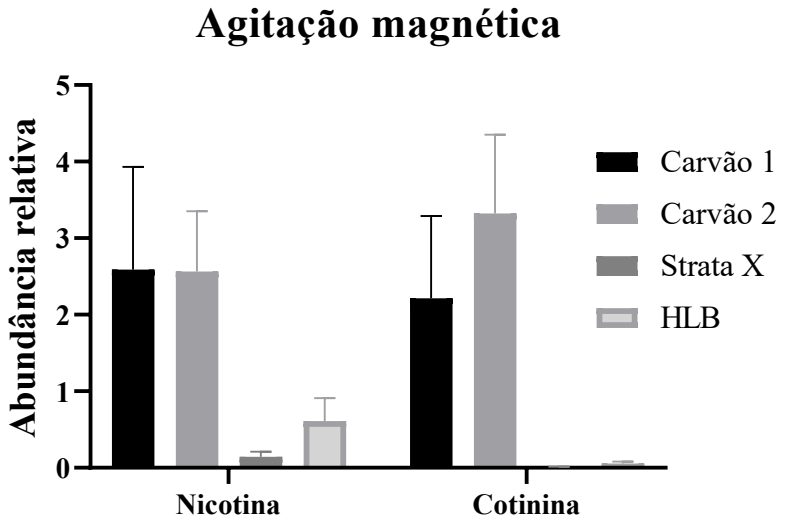


Figura 26: Resultados obtidos com as diferentes fases sorventes utilizando agitação orbital.

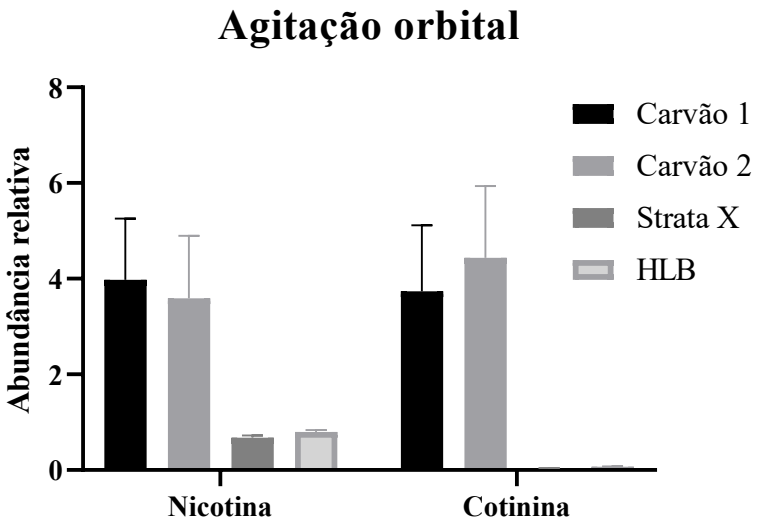


Figura 27: Resultados obtidos com as diferentes fases sorventes utilizando agitação magnética.

De acordo com a literatura, o procedimento habitual para os ensaios de extração empregando dispositivos de BAμE é realizado com recurso a equipamentos de agitação magnética dedicados, uma vez que apresentam melhor consistência na agitação. No entanto, este equipamento estava indisponível e, por essa razão, vários ensaios foram realizados com recurso a placas de agitação magnética convencionais.

Foram realizados vários ensaios com recurso a dispositivos de BAμE contendo diferentes fases sorventes e sujeitas a agitação magnética e a agitação orbital. Os resultados obtidos, apresentados nas **Figura 28** e **Figura 29**, demonstram que tanto para a nicotina como para a cotinina, o tipo de agitação mais favorável é a orbital, independentemente da fase sorvente utilizada. Verificou-se que a agitação magnética era instável em cada placa comprometendo a reprodutibilidade do procedimento experimental ao contrário da agitação orbital, mais reprodutível e que para além disso permitia a realização de até 24 amostras em simultâneo bem como o controlo rigoroso da temperatura.

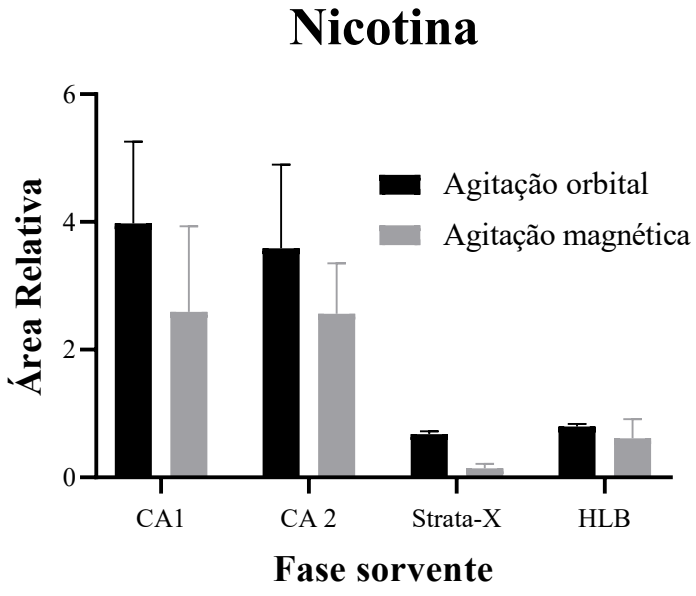


Figura 28: Estudo dos tipos de extração para a nicotina.

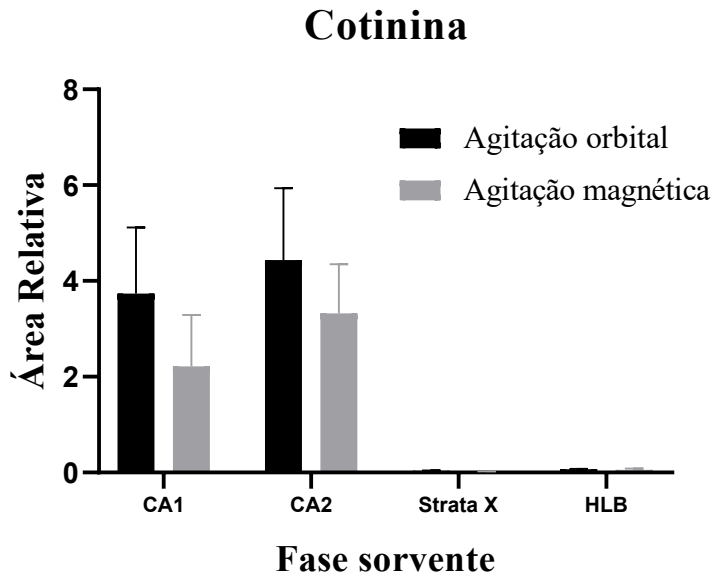


Figura 29: Estudo dos tipos de extração para a cotinina.

3.2.1.1.Cinética e matriz

Após a escolha do sorvente e tipo de agitação mais adequado para o enriquecimento de nicotina e cotinina em meio aquoso, procedeu-se à otimização de outros parâmetros que, segundo a literatura, maior influência poderão ter na performance analítica. Tendo em consideração que o agitador orbital empregue nestes ensaios permitia o controlo rigoroso da temperatura durante o processo de enriquecimento, esta foi também considerada como um dos parâmetros a ter em conta nos ensaios de otimização. Para estes ensaios, foi executado um desenho experimental do tipo Box-Behnken com 4 fatores e 3 níveis por fator (**Figura 19** – ver secção 2.5.4.). Este tipo de desenho experimental é muito utilizado neste tipo de otimização porque permite compreender a influência de todos os parâmetros ensaiados na resposta analítica. Os resultados obtidos foram tratados no *software* MiniTab tendo sido obtida análise de variância do modelo, a relação matemática entre os fatores ensaiados e a resposta analítica e os gráficos de contorno que mostram a resposta analítica em função de dois fatores.

Foi aplicada uma análise da variação (ANOVA) para estimar a importância estatística do método proposto. Um valor de *p* inferior a 0,05 no quadro ANOVA demonstra a importância estatística de um efeito para um nível de confiança de 95%. O

ajuste da equação do modelo polinomial foi expresso pelos coeficientes de determinação r^2 e r^2 ajustado. O coeficiente de determinação, r^2, foi igual a 71,90 % para a nicotina e 66,50 % para a cotinina. Isto significa que o modelo proposto para a nicotina e cotinina é capaz de explicar 71,90 % e 66,50 %, respetivamente, a variabilidade da resposta. O r^2 ajustado foi igual a 61,81 % e 54,48 % para a nicotina e cotinina, respetivamente. Este valor r^2 ajustado elevado mostra uma boa relação entre as respostas e o modelo proposto. O teste de LOF mostra a variação em torno do modelo proposto. O valor *p* para o teste LOF para a nicotina foi de 0,343 e para a cotinina foi de 0,475, o que demonstra um bom ajuste do modelo às respostas obtidas. A relação entre a resposta e os fatores, para a nicotina e cotinina, foi expressa de acordo com as equações A.III.1. e A.III.2. (consultar Anexos).

Os resultados obtidos para a nicotina e para a cotinina de forma independente (figuras A.III.1. e A.III.2. dos anexos), foram combinados de forma a otimizar a extração dos dois compostos, verificando-se que as melhores condições para a extração de ambos os compostos são um tempo de extração de 16 horas a 40ºC a um pH de 10 e sem adição de NaCl (**Figura 30**).

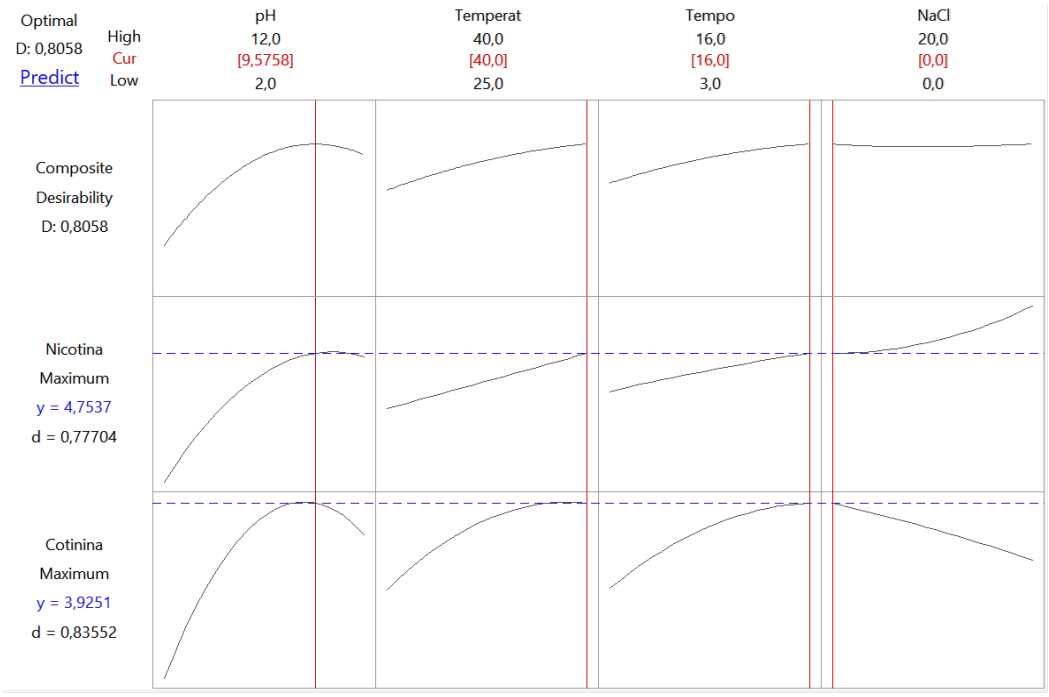


Figura 30: Gráficos de otimização das condições de extração para nicotina e cotinina.

Nas extrações em que são utilizados CAs como fase sorvente, observam-se melhores recuperações quando os compostos-alvo se encontram na forma não ionizada. A nicotina e cotinina apresentam um pKa de 8,0 e 4,7, respetivamente, o que indica que a pH 10 as moléculas apresentam-se com carga neutra, favorecendo assim o processo de extração.

De acordo com o gráfico apresentado nos anexos (**Figura A.I.1**.), a pH 10, a solubilidade em água da nicotina e cotinina decresce, o que promove a sua adsorção pela fase sorvente, razão pela qual a adição de NaCl, não revelou uma influência significativa na extração de ambos os compostos.

Relativamente ao tempo, observou-se que 16h é o intervalo de tempo ideal para que seja atingido o equilíbrio, enquanto para temperatura se observou ser diretamente proporcional à recuperação dos compostos e, por isso, a que foi aplicada para extração dos compostos.

3.2.2. Etapa de retroextração

Para a etapa de retroextração, os fatores estudados foram o tipo de solvente e o tempo de banho ultrassónico. O solvente escolhido deve permitir a completa dessorção dos analitos alvo no mais curto tempo. Para otimizar esta etapa foi realizado um desenho experimental do tipo fatorial, com 2 fatores e 3 níveis por fator. Tal como na etapa de extração, os dados foram tratados recorrendo ao *software* Minitab. Procedeu-se à realização de gráficos de contorno para verificar qual o tipo de solvente e tempo de banho ultrassónico mais adequados (

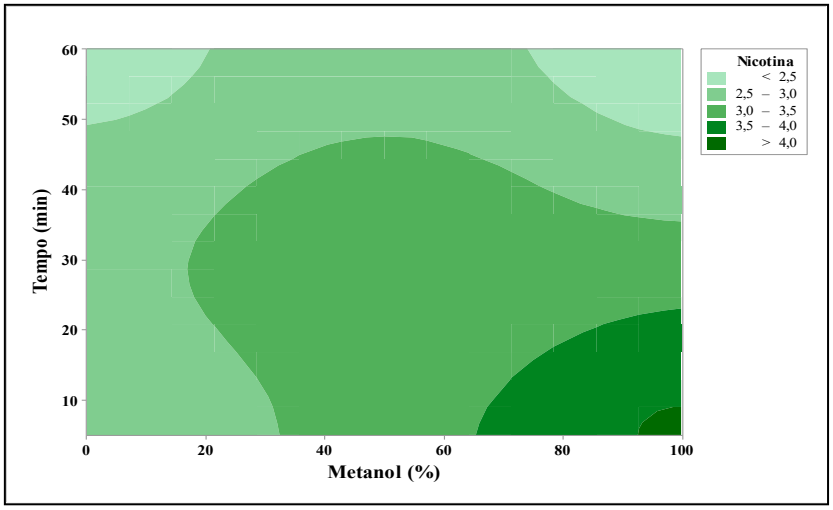


Figura 31 e 32).

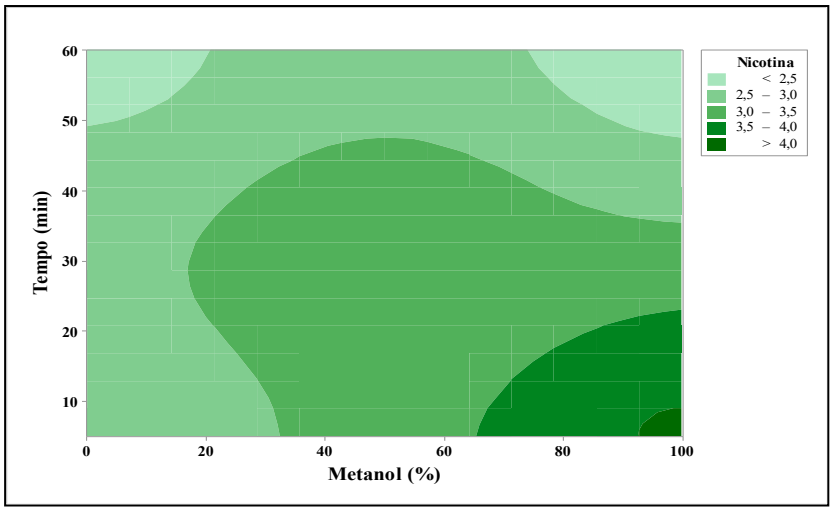


Figura 31: Gráfico de contorno para otimização da retroextração de nicotina

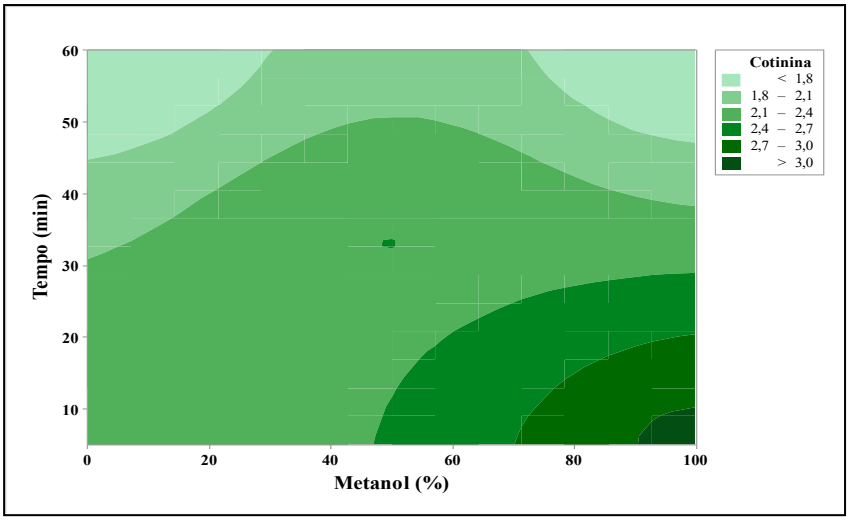


Figura 32: Gráfico de contorno para otimização da retroextração de cotinina.

A análise de resultados permitiu concluir que o metanol é o solvente mais adequado e o tempo de banho ultrassónico deve ser de 1 hora para que a etapa de retroextração seja completa.

3.3. Validação do método analítico

3.3.1. Linearidade, sensibilidade e seletividade

Aplicada a metodologia proposta e determinadas as retas de regressão linear e aplicado o teste de LOF, os valores das áreas obtidos para a nicotina e cotinina foram normalizados pelo valor da área do PI para o respetivo replicado. As retas de regressão

linear com sete pontos de concentração de 2,5 µg/L a 100 µg/L, registaram para ambos os compostos um r^2 superior a 0,995, revelando uma boa adequação da metodologia analítica implementada. Para a nicotina obteve-se um r^2 0,9955 e, relativamente à cotinina o r^2 obtido foi de 0,9954. As equações de reta para ambos os compostos estão apresentadas nas **Figura 33** e **Figura 34**.

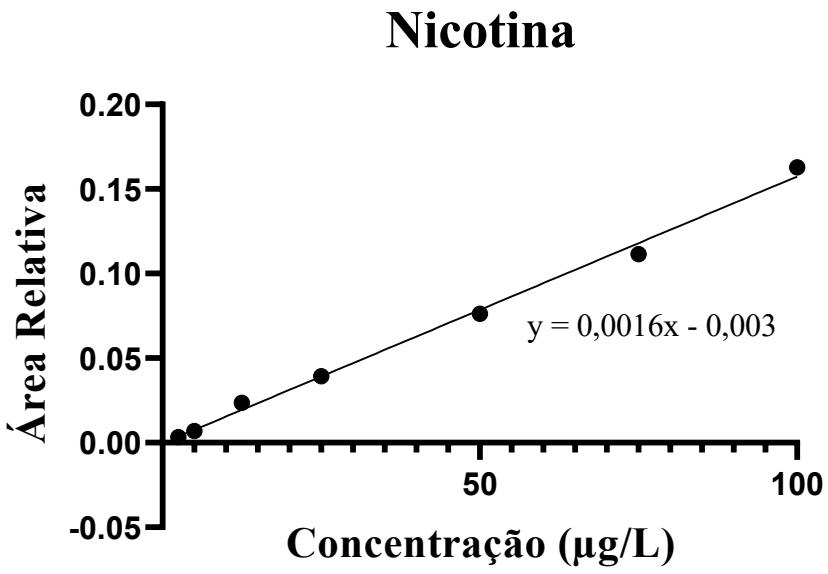


Figura 33: Curva de regressão linear para a nicotina.

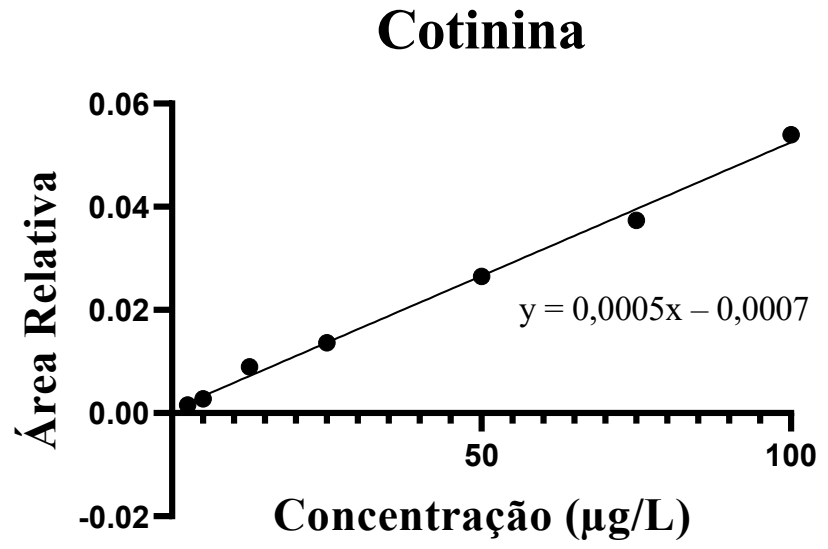


Figura 34: Curva de regressão linear para a cotinina.

Na aplicação do teste de LOF foi obtido um valor de F_{tab} de 0,22 e, F_{cal} de 0,02 para a nicotina e 0,004 para a cotinina, os valores de F_{cal} encontram-se abaixo do valor de F_{tab}, o que indica que o modelo linear adotado se adequa aos pontos da curva.

A sensibilidade do método foi avaliada através do LOD e LOQs calculados com base na razão sinal/ruído (S/N) de 3/1 e de 10/1, respetivamente. Para tal, foram analisadas amostras fortificadas com concentrações decrescentes dos analitos alvo, tendo-se registado para ambos os analitos um LOD e um LOQ de 1,75 e 2,5 µg/L, respetivamente.

Relativamente à seletividade, as amostras analisadas revelaram apenas a presença de PI, indicando não haver qualquer interferente que afete a deteção dos analitos.

3.3.2. Precisão e veracidade

Os parâmetros de precisão e veracidade foram determinados de acordo as equações e critérios mencionados no ponto 1.12.5.2. Os ensaios para avaliar a precisão e veracidade foram realizados em três dias consecutivos, tendo sido determinada a precisão e veracidade quer interdias quer intradia. Para cada parâmetro foram realizados ensaios usando seis replicados, de amostras com concentração final de nicotina e cotinina de 2,5, 50,0 e 100,0 µg/L, correspondendo a valores de concentração baixa, média e alta da curva de regressão linear. Os resultados obtidos para o RSD, e que são apresentados na **Tabela 5**, mostram para todas as concentrações valores < 20 %, o que indica que o método é preciso quer intradia quer interdias.

Tabela 5: Resultados obtidos para o RSD intradia e interdias da nicotina e cotinina.

	Nicotina				**Cotinina**			
Concentração (µg/L)	**Dia 1**	**Dia 2**	**Dia 3**	**Interdias**	**Dia 1**	**Dia 2**	**Dia 3**	**Interdias**
2,5	14,9	9,6	6,6	10,4	15,2	14,8	17,4	15,8
50	5,0	9,3	16,7	10,4	9,0	13,0	15,8	12,6
100	8,6	9,9	12,5	10,4	12,3	15,9	14,4	14,2

Os valores obtidos pelos ensaios de veracidade encontram-se apresentados na **Tabela 6**. Para a nicotina, observa-se uma melhor congruência dos valores obtidos com a concentração teórica do que para a cotinina. A utilização de um PI de características idênticas às dos compostos-alvo, por exemplo, nicotina e cotinina deuteradas, poderá contribuir para melhores valores de veracidade. No entanto, no presente trabalho, esses compostos não se encontravam disponíveis, assim sendo, a sua inclusão, será considerada para aplicações futuras.

Tabela 6: Resultados obtidos dos ensaios de veracidade, nos quais são incluídos os valores de precisão intradia e interdias para a nicotina e cotinina.

	Valor obtido (µg/L)							
	Nicotina				**Cotinina**			
Concentração (µg/L)	**Dia 1**	**Dia 2**	**Dia 3**	**Interdias**	**Dia 1**	**Dia 2**	**Dia 3**	**Interdias**
2,5	2,1	2,3	1,9	2,1	0,8	2,2	2,6	1,9
50	47,5	40,5	45,5	44,5	42,0	43,3	43,6	43,3
100	73,4	67,5	82,4	74,4	66,9	73,2	70,9	70,3

3.3.3. Recuperação

Os ensaios de recuperação foram realizados, para as concentrações de 2,5 e 100 de nicotina e cotinina, ou seja, para a concentração mais baixa e mais elevada da curva. Os ensaios revelaram eficiências de extração (**Tabela 7**) para a nicotina de 32,55% e 46,06% para as concentrações de 2,5 e 100 µg/L, respetivamente. Para a cotinina, obteve-se uma eficiência de extração de 57,60% para a concentração de 2,5 µg/L e 64,58 para a concentração de 100 µg/L.

Tabela 7: Valores de recuperação e respetivos RSDs para a nicotina e cotinina para cada nível de concentração.

	Nicotina		**Cotinina**	
Concentração (µg/L)	**Recuperação (%)**	**RSD (%)**	**Recuperação (%)**	**RSD (%)**
2,5	32,6	12,4	57,6	12,8
100	46,1	9,5	64,6	7,2

De acordo com a literatura, a BAμE costuma apresentar melhores valores de recuperação que aqueles que se obtiveram no presente trabalho. Porém, embora a BAμE tenha vindo a ser utilizada em diferentes matrizes, como amostras ambientais, de urina e outro tipo de amostras biológicas. Nos ensaios para avaliar a recuperação de extração foi utilizada água da torneira, matriz que contém características, como por exemplo, a adição de cloro ou as condições da canalização, que podem influenciar a recuperação dos compostos. Contudo, a metodologia demonstrou ter valores de RSD de recuperação reduzidos, o que indica que a existência de precisão.

3.4. Aplicação a amostras reais

As amostras foram colhidas de ETARs da região de Lisboa e Almada, Todas as amostras foram analisadas considerando as condições otimizadas anteriormente. Após a análise das amostras, procedeu-se à identificação dos picos presentes nos cromatogramas com recurso ao rácio de iões e ao tempo de retenção relativo, posteriormente normalizaram-se das áreas dos picos de nicotina e cotinina pela área do PI.

Todas as amostras revelaram a presença de nicotina, no entanto, apenas foi possível detetar a presença de cotinina em seis das vinte amostras analisadas. Em todas as amostras, as concentrações de nicotina e de cotinina encontravam-se abaixo do LOQ, isto é, eram detetáveis e identificáveis, porém, não eram passíveis de quantificação (**Figura 35**). Por conseguinte, as concentrações de nicotina e cotinina, em todas as amostras, são inferiores a 2,5 μg/L, uma vez que, esse valor é o ponto mais baixo das curvas de regressão linear elaboradas para a nicotina e cotinina. Estes resultados demonstram a sensibilidade do método está aquém do necessário para quantificar as concentrações presentes nas amostras analisadas. A utilização de outro tipo de detetor como, por exemplo, de espetrometria de massa em tandem (MS/MS), permitiria aumentar a sensibilidade do método e, assim, quantificar os compostos. Ainda assim, a extração de compostos revelou ser eficaz tendo em conta que foi possível detetar nicotina e cotinina nas amostras.

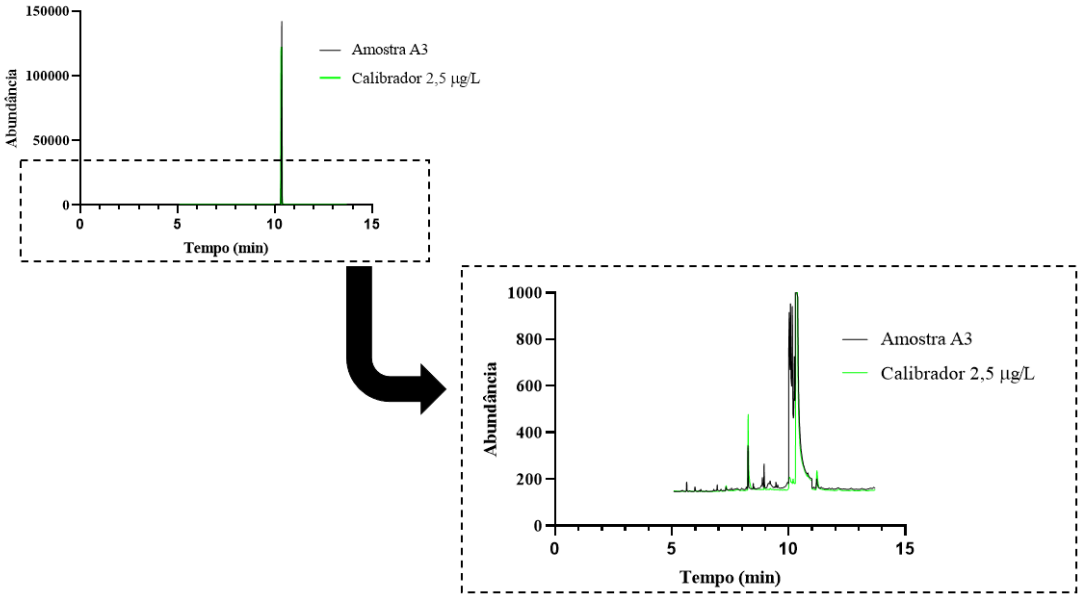


Figura 35: Sobreposição do cromatograma da amostra A3 com o calibrador de concentração 2,5µg/L.

3.5. Classificação e comparação da metodologia desenvolvida

Uma vez que o trabalho proposto tinha como finalidade o desenvolvimento de uma metodologia baseada em BAµE para aplicação em contexto de WBE, por forma a ser uma abordagem mais "verde", foi realizada uma comparação do presente trabalho com estudos publicados (**Tabela 8**). A comparação foi realizada com os estudos mencionados na secção 2.6., os parâmetros comparados foram o volume de amostra e de solvente utilizado, o LOD e LOQ e a recuperação.

Tabela 8: Comparação da metodologia desenvolvida no presente estudo com metodologias previamente publicadas.

			Nicotina			Cotinina		
	Volume de amostra (mL)	**Volume de solvente (mL)**	**LOD (µg/L)**	**LOQ**	**Recuperação (%)**	**LOD**	**LOQ**	**Recuperação (%)**
Presente estudo	100	0,250	1,75	2,5	46,1	1,75	2,5	64,6
(Asicioglu et al., 2021)	50	17,9	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0,1	96,54
(Wang et al., 2021)	1	5,55	0,002	0,05	n.a.	0,03	0,1	n.a.
(Song et al., 2020)	50	27	0,038	0,125	109	0,027	0,09	96
(Chen et al., 2019b)	200	27	0,21	0,69	93	0,2	0,8	73
(Senta et al., 2015b)	3	13,06	n.d.	0,115	70	n.d.	0,043	89

n.d. não disponível
n.a. = não aplicável

Todas as metodologias foram avaliadas com recurso ao *software AGREE: Analytical GREennEss Calculator*. Os resultados obtidos para cada uma das metodologias, encontram-se apresentados sob a forma de pictogramas na **Figura 36**.

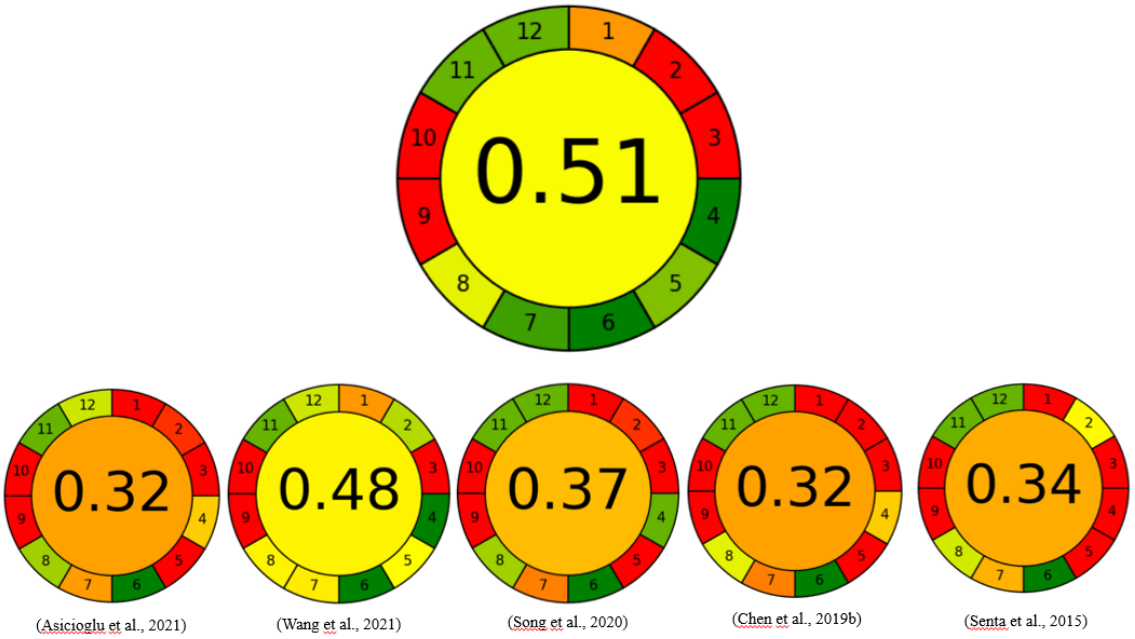


Figura 36: Classificações obtidas pelas metodologias, com recurso ao *software AGREE: Analytical GREennEss Calculator*.(Em cima a classificação da metodologia desenvolvida no presente trabalho, e em baixo a classificação das metodologias presentes na literatura).

De entre as metodologias avaliadas, a metodologia desenvolvida no presente trabalho, foi a que obteve melhor classificação, isto é, é a mais ecológica quando comparada com as restantes. Esta classificação traduz a mais-valia da aplicação da BAμE que permite um menor uso de solventes e, consequentemente, menos desperdício, bem como um número reduzido de passos e, uma semi-automatização do processo.

4. Conclusão

A metodologia desenvolvida demonstrou a aplicabilidade da BAμE em amostras de águas residuais. Das fases sorventes estudadas, os carvões revelaram maior eficácia na extração de nicotina e cotinina. a extração por BAμE obteve bons resultados de linearidade, precisão e recuperação, tendo potencial para ser explorada e aplicada na análise de outros compostos como, por exemplo, cafeína, fármacos e etanol. A otimização da técnica pode, futuramente, ser aplicada noutros tipos analise instrumental, nomeadamente LC-MS ou LC-MS/MS. Em suma, foi desenvolvida e validada uma metodologia mais simples, mais ecológica e com um custo-benefício mais vantajoso do que as metodologias comumente utilizadas em WBE.

5. Bibliografia

Abujaber, F., Ahmad, S. M., Neng, N. R., Rodríguez Martín-Doimeadios, R. C., Guzmán Bernardo, F. J., & Nogueira, J. M. F. (2019). Bar adsorptive microextraction coated with multi-walled carbon nanotube phases - Application for trace analysis of pharmaceuticals in environmental waters. *Journal of Chromatography A*, *1600*, 17–22. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.chroma.2019.04.035

Ahmad, S. M., Almeida, C., Neng, N. R., & Nogueira, J. M. F. (2016). Bar adsorptive microextraction (BAμE) coated with mixed sorbent phases—Enhanced selectivity for the determination of non-steroidal anti-inflammatory drugs in real matrices in combination with capillary electrophoresis. *Journal of Chromatography B*, *1008*, 115–124. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2015.11.018

Ahmad, S. M. E. (2020). Metodologias Analíticas Inovadoras Baseadas em Microextração Adsortiva em Barra para a Monitorização de Contaminantes e Substâncias de Abuso Emergentes em Matrizes Ambientais e Biológicas. In *Journal of Chemical Information and Modeling* (Vol. 53, Issue 9).

Ahmad, S. M., & Nogueira, J. M. F. (2020). High throughput bar adsorptive microextraction: A simple and effective analytical approach for the determination of nicotine and cotinine in urine samples. *Journal of Chromatography. A*, *1615*, 460750. https://doi.org/10.1016/j.chroma.2019.460750

Almeida, C., & Nogueira, J. M. F. (2012). Comparison of the selectivity of different sorbent phases for bar adsorptive microextraction—Application to trace level analysis of fungicides in real matrices. *Journal of Chromatography A*, *1265*, 7–16. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.chroma.2012.09.047

Almeida, C., & Nogueira, J. M. F. (2015). Determination of steroid sex hormones in real matrices by bar adsorptive microextraction (BAμE). *Talanta*, *136*, 145–154. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.talanta.2014.11.013

Asicioglu, F., Kuloglu Genc, M., Tekin Bulbul, T., Yayla, M., Simsek, S. Z., Adioren, C., & Mercan, S. (2021). Investigation of temporal illicit drugs, alcohol and tobacco trends in Istanbul city: Wastewater analysis of 14 treatment plants. *Water Research*,

190, 116729. https://doi.org/10.1016/j.watres.2020.116729

Assembleia da República. (2007). Lei n° 37/2007, 14 de agosto: Normas para a proteção dos cidadãos da exposição involuntária ao fumo do tabaco e medidas de redução da procura relacionadas com a dependência e cessação do seu consumo. *Diário Da República, 1ª Série*, 5277–5285. https://dre.pt/application/conteudo/636938

Baz-Lomba, J. A., Salvatore, S., Gracia-Lor, E., Bade, R., Castiglioni, S., Castrignanò, E., Causanilles, A., Hernandez, F., Kasprzyk-Hordern, B., Kinyua, J., McCall, A. K., Van Nuijs, A., Ort, C., Plósz, B. G., Ramin, P., Reid, M., Rousis, N. I., Ryu, Y., De Voogt, P., … Thomas, K. (2016). Comparison of pharmaceutical, illicit drug, alcohol, nicotine and caffeine levels in wastewater with sale, seizure and consumption data for 8 European cities. *BMC Public Health*, *16*(1), 1–11. https://doi.org/10.1186/s12889-016-3686-5

Benowitz, N. L. (2009). Pharmacology of nicotine: addiction, smoking-induced disease, and therapeutics. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, *49*, 57–71. https://doi.org/10.1146/annurev.pharmtox.48.113006.094742

Benowitz, N. L., Hukkanen, J., & Jacob, P. 3rd. (2009). Nicotine chemistry, metabolism, kinetics and biomarkers. *Handbook of Experimental Pharmacology*, *192*, 29–60. https://doi.org/10.1007/978-3-540-69248-5_2

Boogaerts, T., Jurgelaitiene, L., Dumitrascu, C., Kasprzyk-Hordern, B., Kannan, A., Been, F., Emke, E., de Voogt, P., Covaci, A., & van Nuijs, A. L. N. (2021). Application of wastewater-based epidemiology to investigate stimulant drug, alcohol and tobacco use in Lithuanian communities. *Science of the Total Environment*, *777*, 145914. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.145914

Brandt Wilhelm, Gürke, M. (Max), Köhler, F. E. (Franz E., Pabst G. (Gustav), Schellenberg G. (Gustav), & Vogtherr Max (Adelbert Theodor Eugen). (1887). *Köhler's Medizinal-Pflanzen: Vol. v.1*. Gera-Untermhaus, Fr. Eugen Köhler, [1883-1914]. https://www.biodiversitylibrary.org/item/10836

Carlin, M. G., & Dean, J. R. (2013). *Forensic Applications of Gas Chromatography*. CRC

Press.

Castaldelli-Maia, J. M., Ventriglio, A., & Bhugra, D. (2016). Tobacco smoking: From "glamour" to "stigma". A comprehensive review. *Psychiatry and Clinical Neurosciences*, *70*(1), 24–33. https://doi.org/10.1111/pcn.12365

Castiglioni, S., Thomas, K. V., Kasprzyk-Hordern, B., Vandam, L., & Griffiths, P. (2014). Testing wastewater to detect illicit drugs: State of the art, potential and research needs. *Science of the Total Environment*, *487*(1), 613–620. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2013.10.034

Centazzo, N., Frederick, B. M., Jacox, A., Cheng, S. Y., & Concheiro-Guisan, M. (2019). Wastewater analysis for nicotine, cocaine, amphetamines, opioids and cannabis in New York City. *Forensic Sciences Research*, *4*(2), 152–167. https://doi.org/10.1080/20961790.2019.1609388

Chen, J., Venkatesan, A. K., & Halden, R. U. (2019a). Alcohol and nicotine consumption trends in three U.S. communities determined by wastewater-based epidemiology. *Science of the Total Environment*, *656*, 174–183. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.11.350

Chen, J., Venkatesan, A. K., & Halden, R. U. (2019b). Alcohol and nicotine consumption trends in three U.S. communities determined by wastewater-based epidemiology. *Science of The Total Environment*, *656*, 174–183. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.11.350

Cheng, T., Reilly, S. M., Feng, C., Walters, M. J., & Holman, M. R. (2022). Harmful and Potentially Harmful Constituents in the Filler and Smoke of Tobacco-Containing Tobacco Products. *ACS Omega*, *7*(29), 25537–25554. https://doi.org/10.1021/acsomega.2c02646

Choi, P. M., Tscharke, B. J., Donner, E., O'Brien, J. W., Grant, S. C., Kaserzon, S. L., Mackie, R., O'Malley, E., Crosbie, N. D., Thomas, K. V., & Mueller, J. F. (2018a). Wastewater-based epidemiology biomarkers: Past, present and future. *TrAC - Trends in Analytical Chemistry*, *105*, 453–469. https://doi.org/10.1016/j.trac.2018.06.004

Choi, P. M., Tscharke, B. J., Donner, E., O'Brien, J. W., Grant, S. C., Kaserzon, S. L., Mackie, R., O'Malley, E., Crosbie, N. D., Thomas, K. V, & Mueller, J. F. (2018b). Wastewater-based epidemiology biomarkers: Past, present and future. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, *105*, 453–469. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.trac.2018.06.004

Chowrasia, D., & Sharma, N. (2015). *Analytical Chemistry-A Qualitative and Quantitative Approach*. Deepak Chowrasia. https://books.google.pt/books?id=o41KDwAAQBAJ

de Marco, B. A., Rechelo, B. S., Tótoli, E. G., Kogawa, A. C., & Salgado, H. R. N. (2019). Evolution of green chemistry and its multidimensional impacts: A review. *Saudi Pharmaceutical Journal*, *27*(1), 1–8. https://doi.org/10.1016/j.jsps.2018.07.011

Dettmer-Wilde, K., & Engewald, W. (2014). *Practical Gas Chromatography*. https://doi.org/10.1007/978-3-642-54640-2

Dias, A. N., da Silva, A. C., Simão, V., Merib, J., & Carasek, E. (2015). A novel approach to bar adsorptive microextraction: Cork as extractor phase for determination of benzophenone, triclocarban and parabens in aqueous samples. *Analytica Chimica Acta*, *888*, 59–66. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.aca.2015.07.011

Direção Geral de Saúde. (2020). Para a Prevenção E. *Programa Nacional Para a Prevenção E Controlo Do Tabagismo 2017*, 21.

Driver, E. M., Gushgari, A., Chen, J., & Halden, R. U. (2020). Alcohol, nicotine, and caffeine consumption on a public U.S. university campus determined by wastewater-based epidemiology. *Science of the Total Environment*, *727*, 138492. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.138492

Duan, L., Zhang, Y., Wang, B., Yu, G., Gao, J., Cagnetta, G., Huang, C., & Zhai, N. (2022). Wastewater surveillance for 168 pharmaceuticals and metabolites in a WWTP: occurrence, temporal variations and feasibility of metabolic biomarkers for intake estimation. *Water Research*, *216*(November 2021), 118321. https://doi.org/10.1016/j.watres.2022.118321

Edwards, S. H., Rossiter, L. M., Taylor, K. M., Holman, M. R., Zhang, L., Ding, Y. S., & Watson, C. H. (2017). Tobacco-Specific Nitrosamines in the Tobacco and Mainstream Smoke of U.S. Commercial Cigarettes. *Chemical Research in Toxicology*, *30*(2), 540–551. https://doi.org/10.1021/acs.chemrestox.6b00268

European Monitoring Centre for Drugs and Drug Addiction. (2021). Wastewater analysis and drugs — a European multi-city study. *Publications Office of the European Union*.

Fontanals, N., Pocurull, E., Borrull, F., & Marcé, R. M. (2019). Role of solid-phase extraction in wastewater-based epidemiology. *Current Opinion in Environmental Science and Health*, *9*, 26–33. https://doi.org/10.1016/j.coesh.2019.03.006

Gałuszka, A., Migaszewski, Z. M., Konieczka, P., & Namieśnik, J. (2012). Analytical Eco-Scale for assessing the greenness of analytical procedures. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, *37*, 61–72. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.trac.2012.03.013

Gracia-Lor, E., Rousis, N. I., Zuccato, E., & Castiglioni, S. (2020a). Monitoring caffeine and nicotine use in a nationwide study in Italy using wastewater-based epidemiology. *Science of The Total Environment*, *747*, 141331. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.141331

Gracia-Lor, E., Rousis, N. I., Zuccato, E., & Castiglioni, S. (2020b). Monitoring caffeine and nicotine use in a nationwide study in Italy using wastewater-based epidemiology. *Science of the Total Environment*, *747*, 141331. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.141331

Grizzell, J. A., & Echeverria, V. (2014). New Insights into the Mechanisms of Action of Cotinine and its Distinctive Effects from Nicotine. *Neurochemical Research*, *40*(10), 2032–2046. https://doi.org/10.1007/s11064-014-1359-2

Gross, J. H. (2017). *Mass Spectrometry* (Third). Springer International Publishing.

Hall, W., Prichard, J., Kirkbride, P., Bruno, R., Thai, P. K., Gartner, C., Lai, F. Y., Ort, C., & Mueller, J. F. (2012). An analysis of ethical issues in using wastewater analysis

to monitor illicit drug use. *Addiction (Abingdon, England)*, *107*(10), 1767–1773. https://doi.org/10.1111/j.1360-0443.2012.03887.x

Harmonization, I. C. on. (2022). Validation of Analytical Procedures Q2 (R1). *International Conference of Harmonization. Geneva, Switzerland*.

Harris, D. C. (2007). *Quantitative Chemical Analysis* (Seventh). Craig Bleyer.

Holcapek, M., & Byrdwell, W. C. (2017). *Handbook of Advanced Chromatography Mass Spectrometry Techniques*. Elsevier Inc.

Hukkanen, J., Jacob, P. 3rd, & Benowitz, N. L. (2005). Metabolism and disposition kinetics of nicotine. *Pharmacological Reviews*, *57*(1), 79–115. https://doi.org/10.1124/pr.57.1.3

Ide, A. H., Ahmad, S. M., Neng, N. R., & Nogueira, J. M. F. (2016). Enhancement for trace analysis of sulfonamide antibiotics in water matrices using bar adsorptive microextraction (BAμE). *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, *129*, 593–599. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jpba.2016.07.022

Keith, L. H., Gron, L. U., & Young, J. L. (2007). Green Analytical Methodologies. *Chemical Reviews*, *107*(6), 2695–2708. https://doi.org/10.1021/cr068359e

Kim, S. (2016). Overview of cotinine cutoff values for smoking status classification. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, *13*(12). https://doi.org/10.3390/ijerph13121236

Lai, F. Y., Gartner, C., Hall, W., Carter, S., O'Brien, J., Tscharke, B. J., Been, F., Gerber, C., White, J., Thai, P., Bruno, R., Prichard, J., Kirkbride, K. P., & Mueller, J. F. (2018). Measuring spatial and temporal trends of nicotine and alcohol consumption in Australia using wastewater-based epidemiology. *Addiction*, *113*(6), 1127–1136. https://doi.org/10.1111/add.14157

Langa, I., Gonçalves, R., Tiritan, M. E., & Ribeiro, C. (2021). Wastewater analysis of psychoactive drugs: Non-enantioselective vs enantioselective methods for estimation of consumption. *Forensic Science International*, *325*, 110873. https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2021.110873

López-García, E., Pérez-López, C., Postigo, C., Andreu, V., Bijlsma, L., González-Mariño, I., Hernández, F., Marcé, R. M., Montes, R., Picó, Y., Pocurull, E., Rico, A., Rodil, R., Rosende, M., Valcárcel, Y., Zuloaga, O., Quintana, J. B., & López de Alda, M. (2020). Assessing alcohol consumption through wastewater-based epidemiology: Spain as a case study. *Drug and Alcohol Dependence*, *215*(July), 108241. https://doi.org/10.1016/j.drugalcdep.2020.108241

Lorenzo, M., & Picó, Y. (2019). Wastewater-based epidemiology: current status and future prospects. *Current Opinion in Environmental Science and Health*, *9*, 77–84. https://doi.org/10.1016/j.coesh.2019.05.007

Lucci, P., Pacetti, D., Núñez, O., & Frega, N. G. (2012). *Current Trends in Sample Treatment Techniques for Environmental and Food Analysis* (pp. 127–164). https://doi.org/10.5772/47736

Mackie, R. S., Tscharke, B. J., O'Brien, J. W., Choi, P. M., Gartner, C. E., Thomas, K. V., & Mueller, J. F. (2019). Trends in nicotine consumption between 2010 and 2017 in an Australian city using the wastewater-based epidemiology approach. *Environment International*, *125*(February), 184–190. https://doi.org/10.1016/j.envint.2019.01.053

Mitra, S. (2003). *Sample Preparation Techniques in Analytical Chemistry*. Wiley.

Monteiro, S., Rente, D., Cunha, M. V., Gomes, M. C., Marques, T. A., Lourenço, A. B., Cardoso, E., Álvaro, P., Silva, M., Coelho, N., Vilaça, J., Meireles, F., Brôco, N., Carvalho, M., & Santos, R. (2022). A wastewater-based epidemiology tool for COVID-19 surveillance in Portugal. *Science of the Total Environment*, *804*, 150264. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.150264

Montes, R., Rodil, R., Rico, A., Cela, R., González-Mariño, I., Hernández, F., Bijlsma, L., Celma, A., Picó, Y., Andreu, V., de Alda, M. L., López-García, E., Postigo, C., Pocurull, E., Marcé, R. M., Rosende, M., Olivares, M., Valcárcel, Y., & Quintana, J. B. (2020). First nation-wide estimation of tobacco consumption in Spain using wastewater-based epidemiology. *Science of the Total Environment*, *741*(June). https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.140384

Moran, V. E. (2012). Cotinine: Beyond that expected, more than a biomarker of tobacco consumption. *Frontiers in Pharmacology*, *3 OCT*(October), 1–9. https://doi.org/10.3389/fphar.2012.00173

Murphy, S. E. (2021). Biochemistry of nicotine metabolism and its relevance to lung cancer. *Journal of Biological Chemistry*, *296*. https://doi.org/10.1016/j.jbc.2021.100722

Musk, A. W., & De Klerk, N. H. (2003). History of tobacco and health. *Respirology*, *8*(3), 286–290. https://doi.org/10.1046/j.1440-1843.2003.00483.x

Neng, N. R., Ahmad, S. M., Gaspar, H., & Nogueira, J. M. F. (2015). Determination of mitragynine in urine matrices by bar adsorptive microextraction and HPLC analysis. *Talanta*, *144*, 105–109. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.talanta.2015.05.038

Neng, N. R., Mestre, A. S., Carvalho, A. P., & Nogueira, J. M. F. (2011). Cork-based activated carbons as supported adsorbent materials for trace level analysis of ibuprofen and clofibric acid in environmental and biological matrices. *Journal of Chromatography. A*, *1218*(37), 6263–6270. https://doi.org/10.1016/j.chroma.2011.07.025

Neng, N. R., & Nogueira, J. M. F. (2017). Monitoring trace levels of hydroxy aromatic compounds in urine matrices by bar adsorptive microextraction (BAμE). *Anal. Methods*, *9*(36), 5260–5265. https://doi.org/10.1039/C7AY01410D

Nguyen, H. T., Thai, P. K., Kaserzon, S. L., O'Brien, J. W., Eaglesham, G., & Mueller, J. F. (2018). Assessment of drugs and personal care products biomarkers in the influent and effluent of two wastewater treatment plants in Ho Chi Minh City, Vietnam. *Science of the Total Environment*, *631–632*, 469–475. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.02.309

Nogueira, J. M. F. (2012). Novel sorption-based methodologies for static microextraction analysis: A review on SBSE and related techniques. *Analytica Chimica Acta*, *757*, 1–10. https://doi.org/10.1016/j.aca.2012.10.033

Nowak, P. M., & Kościelniak, P. (2019). What Color Is Your Method? Adaptation of the

RGB Additive Color Model to Analytical Method Evaluation. *Analytical Chemistry*, *91*(16), 10343–10352. https://doi.org/10.1021/acs.analchem.9b01872

Oenning, A. L., Morés, L., Dias, A. N., & Carasek, E. (2017). A new configuration for bar adsorptive microextraction (BAμE) for the quantification of biomarkers (hexanal and heptanal) in human urine by HPLC providing an alternative for early lung cancer diagnosis. *Analytica Chimica Acta*, *965*, 54–62. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.aca.2017.02.034

Oliveira, M. N., Gonçalves, O. C., Ahmad, S. M., Schneider, J. K., Krause, L. C., Neng, N. R., Caramão, E. B., & Nogueira, J. M. F. (2021). Application of Bar Adsorptive Microextraction for the Determination of Levels of Tricyclic Antidepressants in Urine Samples. *Molecules (Basel, Switzerland)*, *26*(11). https://doi.org/10.3390/molecules26113101

Ort, C., Lawrence, M. G., Rieckermann, J., & Joss, A. (2010). Sampling for Pharmaceuticals and Personal Care Products (PPCPs) and Illicit Drugs in Wastewater Systems: Are Your Conclusions Valid? A Critical Review. *Environmental Science & Technology*, *44*(16), 6024–6035. https://doi.org/10.1021/es100779n

Ortiz, A., & Grando, S. A. (2012). Smoking and the skin. *International Journal of Dermatology*, *51*(3), 250–262. https://doi.org/https://doi.org/10.1111/j.1365-4632.2011.05205.x

Pena-Pereira, F., Wojnowski, W., & Tobiszewski, M. (2020). AGREE—Analytical GREEnness Metric Approach and Software. *Analytical Chemistry*, *92*(14), 10076–10082. https://doi.org/10.1021/acs.analchem.0c01887

Prichard, J., Hall, W., de Voogt, P., & Zuccato, E. (2014). Sewage epidemiology and illicit drug research: The development of ethical research guidelines. *Science of the Total Environment*, *472*, 550–555. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2013.11.039

Reyes, C. M., & Cornelis, M. C. (2018). Caffeine in the Diet: Country-Level Consumption and Guidelines. *Nutrients*, *10*(11). https://doi.org/10.3390/nu10111772

Senta, I., Gracia-Lor, E., Borsotti, A., Zuccato, E., & Castiglioni, S. (2015a). Wastewater analysis to monitor use of caffeine and nicotine and evaluation of their metabolites as biomarkers for population size assessment. *Water Research*, *74*, 23–33. https://doi.org/10.1016/j.watres.2015.02.002

Senta, I., Gracia-Lor, E., Borsotti, A., Zuccato, E., & Castiglioni, S. (2015b). Wastewater analysis to monitor use of caffeine and nicotine and evaluation of their metabolites as biomarkers for population size assessment. *Water Research*, *74*, 23–33. https://doi.org/10.1016/j.watres.2015.02.002

Shao, X. T., Cong, Z. X., Liu, S. Y., Wang, Z., Zheng, X. Y., & Wang, D. G. (2021). Spatial analysis of metformin use compared with nicotine and caffeine consumption through wastewater-based epidemiology in China. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, *208*, 111623. https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2020.111623

Skoog, D. A., West, D. M., Holler, F. J., & Crouch, S. R. (2013). *Fundamentals of Analytical Chemistry* (Ninth).

Song, X.-B., Shao, X.-T., Liu, S.-Y., Tan, D.-Q., Wang, Z., & Wang, D.-G. (2020). Assessment of metformin, nicotine, caffeine, and methamphetamine use during Chinese public holidays. *Chemosphere*, *258*, 127354. https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2020.127354

Sparkman, O. D., Penton, Z., & Kitson, F. (2011). *Gas Chromatography and Mass Spectrometry: A Practical Guide*. Academic Press.

Taylor, A., Dunn, K., & Turfus, S. (2021a). A review of nicotine-containing electronic cigarettes—Trends in use, effects, contents, labelling accuracy and detection methods. *Drug Testing and Analysis*, *13*(2), 242–260. https://doi.org/https://doi.org/10.1002/dta.2998

Taylor, A., Dunn, K., & Turfus, S. (2021b). A review of nicotine-containing electronic cigarettes—Trends in use, effects, contents, labelling accuracy and detection methods. *Drug Testing and Analysis*, *13*(2), 242–260. https://doi.org/10.1002/dta.2998

Taylor, F. R. (2015). Tobacco, Nicotine, and Headache. *Headache*, *55*(7), 1028–1044. https://doi.org/10.1111/head.12620

Temple, J. L., Bernard, C., Lipshultz, S. E., Czachor, J. D., Westphal, J. A., & Mestre, M. A. (2017). The Safety of Ingested Caffeine: A Comprehensive Review. *Frontiers in Psychiatry*, *8*, 80. https://doi.org/10.3389/fpsyt.2017.00080

Terry, A. V., Hernandez, C. M., Hohnadel, E. J., Bouchard, K. P., & Buccafusco, J. J. (2005). Cotinine, a neuroactive metabolite of nicotine: Potential for treating disorders of impaired cognition. *CNS Drug Reviews*, *11*(3), 229–252. https://doi.org/10.1111/j.1527-3458.2005.tb00045.x

Tiwari, R. K., Sharma, V., Pandey, R. K., & Shukla, S. S. (2020). Nicotine Addiction: Neurobiology and Mechanism. *Journal of Pharmacopuncture*, *23*(1), 1–7. https://doi.org/10.3831/KPI.2020.23.001

Tobiszewski, M., & Orłowski, A. (2015). Multicriteria decision analysis in ranking of analytical procedures for aldrin determination in water. *Journal of Chromatography A*, *1387*, 116–122. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.chroma.2015.02.009

Valentine, G., & Sofuoglu, M. (2018). Cognitive Effects of Nicotine: Recent Progress. *Current Neuropharmacology*, *16*(4), 403–414. https://doi.org/10.2174/1570159X15666171103152136

Verovšek, T., Krizman-Matasic, I., Heath, D., & Heath, E. (2020). Site- and event-specific wastewater-based epidemiology: Current status and future perspectives. *Trends in Environmental Analytical Chemistry*, *28*. https://doi.org/10.1016/j.teac.2020.e00105

Vitale, D., Morales Suárez-Varela, M., & Picó, Y. (2021). Wastewater-based epidemiology, a tool to bridge biomarkers of exposure, contaminants, and human health. *Current Opinion in Environmental Science and Health*, *20*, 100229. https://doi.org/10.1016/j.coesh.2021.100229

Vitha, M. F. (2017). *Chromatography Principals and Instrumentation*. JohnWiley & Sons, Inc.

Wang, Z., Zheng, Q., Gartner, C., Chan, G. C. K., Ren, Y., Wang, D., & Thai, P. K. (2021). Comparison of tobacco use in a university town and a nearby urban area in China by intensive analysis of wastewater over one year period. *Water Research*, *206*, 117733. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.watres.2021.117733

Wittenberg, R. E., Wolfman, S. L., De Biasi, M., & Dani, J. A. (2020). Nicotinic acetylcholine receptors and nicotine addiction: A brief introduction. *Neuropharmacology*, *177*, 108256. https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2020.108256

World Health Organization. (2000). *WHO global report on trends in prevalence of tobacco use Fourth edition*.

World Health Organization. (2021). WHO report on the global tobacco epidemic 2021: addressing new and emerging products. *Health Promotion*. https://www.who.int/teams/health-promotion/tobacco-control/global-tobacco-report-2021

Yildiz, D. (2004). Nicotine, its metabolism and an overview of its biological effects. *Toxicon : Official Journal of the International Society on Toxinology*, *43*(6), 619–632. https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2004.01.017

Zheng, Qiu Da, Lin, J. G., Pei, W., Guo, M. X., Wang, Z., & Wang, D. G. (2017). Estimating nicotine consumption in eight cities using sewage epidemiology based on ammonia nitrogen equivalent population. *Science of the Total Environment*, *590–591*, 226–232. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.02.214

Zheng, Qiuda, Eaglesham, G., Tscharke, B. J., O'Brien, J. W., Li, J., Thompson, J., Shimko, K. M., Reeks, T., Gerber, C., Thomas, K. V., & Thai, P. K. (2020a). Determination of anabasine, anatabine, and nicotine biomarkers in wastewater by enhanced direct injection LC-MS/MS and evaluation of their in-sewer stability. *Science of the Total Environment*, *743*, 140551. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.140551

Zheng, Qiuda, Eaglesham, G., Tscharke, B. J., O'Brien, J. W., Li, J., Thompson, J., Shimko, K. M., Reeks, T., Gerber, C., Thomas, K. V, & Thai, P. K. (2020b).

Determination of anabasine, anatabine, and nicotine biomarkers in wastewater by enhanced direct injection LC-MS/MS and evaluation of their in-sewer stability. *Science of The Total Environment*, *743*, 140551. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.140551

Zheng, Qiuda, Gartner, C., Tscharke, B. J., O'Brien, J. W., Gao, J., Ahmed, F., Thomas, K. V., Mueller, J. F., & Thai, P. K. (2020). Long-term trends in tobacco use assessed by wastewater-based epidemiology and its relationship with consumption of nicotine containing products. *Environment International*, *145*(August), 106088. https://doi.org/10.1016/j.envint.2020.106088

Zheng, Qiuda, Tscharke, B., O'Brien, J., Gerber, C., Mackie, R., Gao, J., & Thai, P. (2019). Uncertainties in estimating alcohol and tobacco consumption by wastewater-based epidemiology. *Current Opinion in Environmental Science and Health*, *9*, 13–18. https://doi.org/10.1016/j.coesh.2019.03.004

6. Anexos

Anexo I – Características dos compostos em estudo

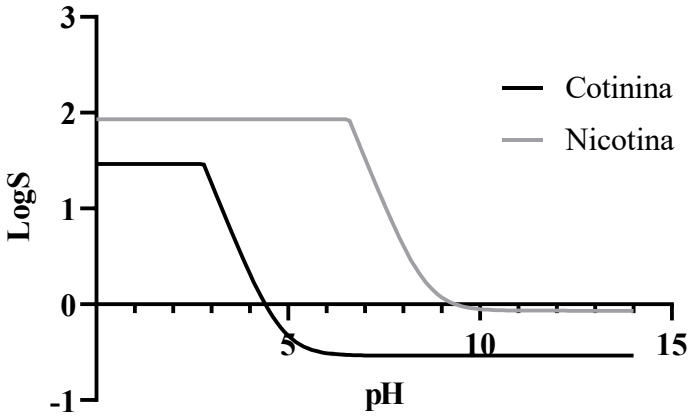


Figura A.I.1. Gráfico da relação do pH com o LogS das moléculas de nicotina e cotinina.

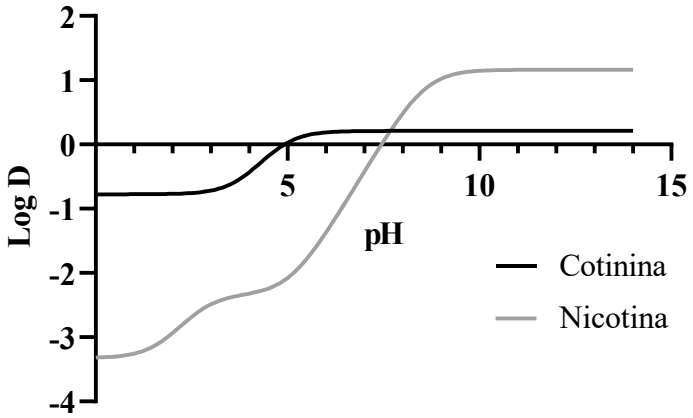


Figura A.I.2. Gráfico da relação do pH com o Log D das moléculas de nicotina e cotinina.

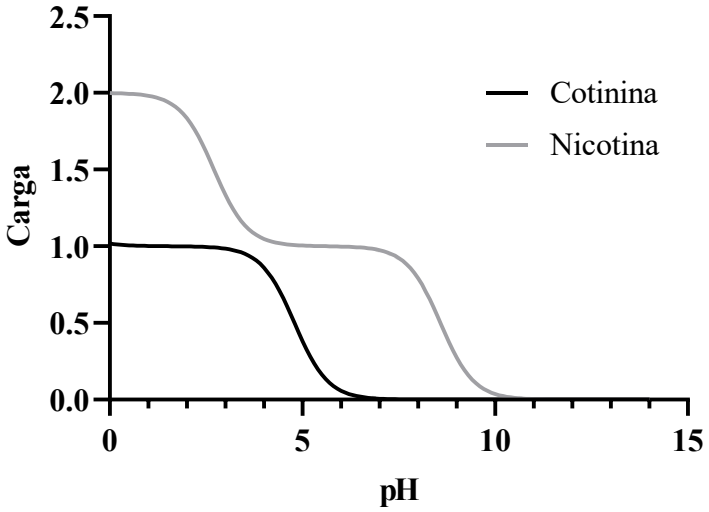


Figura A.I.3. Gráfico da relação do pH e da carga das moléculas de nicotina e cotinina.

Anexo II – Desenho experimental

Tabela A.II.1. Desenho experimental executado para otimização da etapa de extração da BAμE.

Ordem de ensaio	pH	Temperatura (°C)	Tempo (h)	NaCl (g)
1	12	32,5	9,5	20
2	7	32,5	16	20
3	12	32,5	9,5	20
4	2	32,5	16	10
5	2	40	9,5	10
6	7	25	9,5	0
7	2	32,5	3	10
8	7	32,5	3	0
9	7	32,5	3	20
10	7	40	9,5	20
11	2	32,5	3	10
12	7	32,5	9,5	10
13	7	25	9,5	0
14	7	40	3	10
15	12	32,5	9,5	0
16	12	32,5	16	10
17	2	32,5	9,5	20
18	2	25	9,5	10
19	2	32,5	9,5	0
20	7	25	9,5	20
21	12	40	9,5	10
22	12	25	9,5	10
23	12	32,5	9,5	0
24	12	40	9,5	10
25	7	32,5	16	0
26	7	40	9,5	20

27¤	7¤	25¤	16¤	10¤	¤
28¤	12¤	32,5¤	16¤	10¤	¤
29¤	12¤	32,5¤	3¤	10¤	¤
30¤	7¤	40¤	9,5¤	0¤	¤
31¤	7¤	32,5¤	9,5¤	10¤	¤
32¤	7¤	32,5¤	9,5¤	10¤	¤
33¤	7¤	32,5¤	16¤	0¤	¤
34¤	7¤	25¤	3¤	10¤	¤
35¤	7¤	40¤	16¤	10¤	¤
36¤	12¤	25¤	9,5¤	10¤	¤
37¤	2¤	32,5¤	16¤	10¤	¤
38¤	7¤	32,5¤	9,5¤	10¤	¤
39¤	7¤	40¤	9,5¤	0¤	¤
40¤	12¤	32,5¤	3¤	10¤	¤
41¤	2¤	32,5¤	9,5¤	0¤	¤
42¤	7¤	25¤	9,5¤	20¤	¤
43¤	7¤	32,5¤	3¤	0¤	¤
44¤	7¤	32,5¤	16¤	20¤	¤
45¤	7¤	25¤	3¤	10¤	¤
46¤	7¤	25¤	16¤	10¤	¤
47¤	7¤	32,5¤	3¤	20¤	¤
48¤	7¤	40¤	3¤	10¤	¤
49¤	2¤	32,5¤	9,5¤	20¤	¤
50¤	2¤	25¤	9,5¤	10¤	¤
51¤	7¤	40¤	16¤	10¤	¤
52¤	7¤	32,5¤	9,5¤	10¤	¤
53¤	2¤	40¤	9,5¤	10¤	¤
54¤	7¤	32,5¤	9,5¤	10¤	¤

Tabela A.II.2. Desenho experimental executado para otimização da etapa de retroextração da BAμE.

Ordem de ensaio	Metanol (%)	Tempo (min)
1	0	60
2	50	32,5
3	0	5
4	100	60
5	100	5
6	100	5
7	50	32,5
8	0	5
9	100	60
10	0	60

Anexo III – Resultados de otimização da BAμE

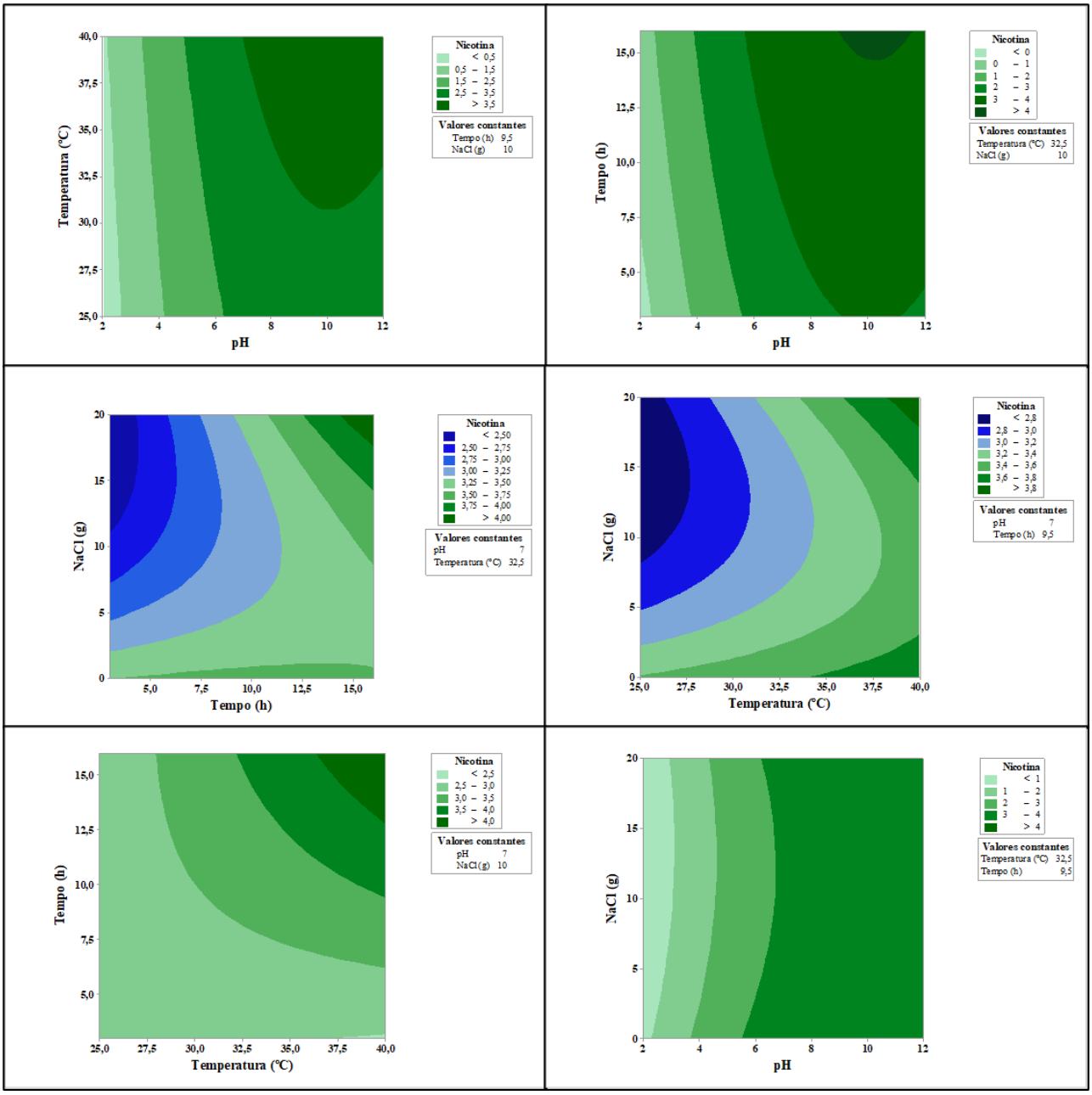


Figura A.III.1. Gráficos de contorno da otimização dos parâmetros da etapa de extração da BAμE para a nicotina.

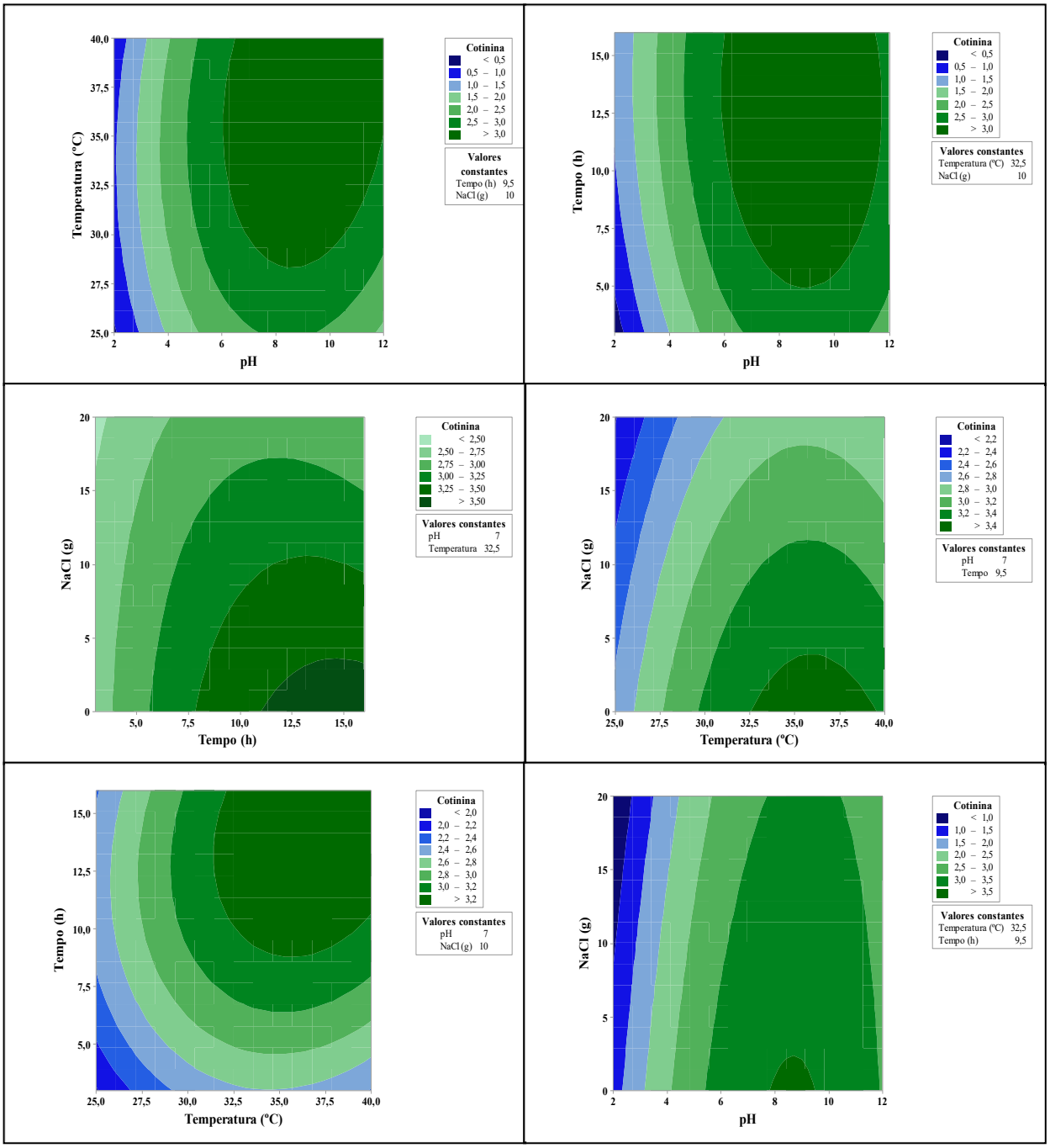


Figura A.III.2. Gráficos de contorno da otimização dos parâmetros da etapa de extração da BAμE para a cotinina.

Nicotina = 2,79 + 0,829 pH - 0,127 Temperatura - 0,312 Tempo - 0,269 NaCl 0,0515 pH*pH + 0,00020 Temperatura*Temperatura - 0,00133 Tempo*Tempo + 0,00334 NaCl*NaCl + 0,00555 pH*Temperatura + 0,0011 pH*Tempo + 0,00282 pH*NaCl + 0,01022 Temperatura*Tempo + 0,00310 Temperatura*NaCl + 0,00733 Tempo*NaCl

Equação A.III.1. Equação da relação entre as respostas e os fatores para a nicotina.

Cotinina = -8,29 + 0,711 pH + 0,422 Temperatura + 0,124 Tempo + 0,004 NaCl - 0,05130 pH*pH - 0,00678 Temperatura*Temperatura - 0,00651 Tempo*Tempo - 0,00038 NaCl*NaCl + 0,00596 pH*Temperatura - 0,00171 pH*Tempo + 0,00221 pH*NaCl+ 0,00273 Temperatura*Tempo - 0,00038 Temperatura*NaCl - 0,00267 Tempo*NaCl

Equação A.III.2. Equação da relação entre as respostas e os fatores para a cotinina.

Anexo IV – Amostras

Tabela A.IV.1. Resultados obtidos para cada uma das amostras analisadas.

Região	Almada						
Ano	2019						
Amostra	MA1	MA2	MA3	MA4	MA5	MA6	MA7
Nicotina	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ
Cotinina	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD

Região	Almada					
Ano	2020		2021			
Amostra	M1	M2	A2	A3	A4	A7
Nicotina	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ
Cotinina	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ

Região	Lisboa						
Ano	2019						
Amostra	AL1	AL2	AL3	AL4	AL5	AL6	AL7
Nicotina	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ
Cotinina	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD