

IV-013 AVALIAÇÃO E DETERMINAÇÃO DA INCERTEZA EXPANDIDA NO MÉTODO DE CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA (CLAE) PARA A IDENTIFICAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE 17 β ESTRADIOL.

Sidnei Gomes dos S. Junior,

Químico com atribuições tecnológicas pelo Instituto de química UFRJ. Mestrando em química pelo Programa de pós graduação em química (PGQu)UFRJ

Paula F. de Aguiar

Professor associado UFRJ, Químico com atribuições tecnológicas (IQ/UFRJ), MSc Química Orgânica (IQ/UFRJ), DSc Farmácia pela Vrije Universiteit Brussel (VUB)

Endereço: Instituto de Química- UFRJ, Av. Athos da Silveira Ramos, nº 149, Bloco A, Rio de Janeiro - Brasil
Telefone: 55 21 3938-7877 – sid.sgsj@gmail.com

Resumo

Os desreguladores endócrinos (DE) são substâncias que causam alterações no funcionamento do sistema endócrino dos seres vivos. Tais compostos têm seu efeito comprovado mesmo em baixas concentrações nas matrizes ambientais. Identificar e quantificar tais compostos é uma tarefa desafiadora. Para além das dificuldades experimentais inerentes as amostras de matrizes ambientais a correta expressão dos resultados obtidos é parte crucial para a credibilidade e confiabilidade ao trabalho desenvolvido. A correta expressão dos resultados se dá considerando-se as fontes de incerteza presentes na metodologia escolhida e não apenas usando o desvio padrão relativo aos resultados obtidos pelo método de análise escolhido.

Utilizar a incerteza expandida é a forma mais eficiente para relatar um resultado de análise, visto que ela leva em consideração as fontes de incerteza presentes na análise.

Assim sendo o presente trabalho se propõe a investigar as fontes de incerteza na cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), usada para identificar e quantificar 17 β estradiol (E2), expressando seu resultado com a incerteza expandida do método.

O resultado obtido mostrou que a incerteza expandida calculada (concentração de E2 = 358 ± 17 $\mu\text{g/L}$) é maior que a reportada usando o desvio padrão (concentração de E2 = 358 ± 7 $\mu\text{g/L}$). Mostrando assim que utilizar a incerteza expandida é uma ferramenta que indica a real precisão do método de análise utilizado.

Introdução

O sistema endócrino controla diversas funções no corpo humano através da produção e excreção de hormônios. Contudo ele pode ser afetado pela ação de uma substância externa que entrou em contato com o corpo. Elas podem atuar no sistema endócrino aumentando ou diminuindo o efeito do hormônio natural (Birkett e Lester, 2003). A essas substâncias chamamos de desreguladores endócrinos (DE) que, por definição, é uma “substância exógena (ou mistura) que altera as funções do sistema endócrino, causando efeitos prejudiciais à saúde de um organismo, ou a sua descendência, ou (sub) população” (*European workshop on the Impact of Endocrine Disruptors on Human Health and Wildlife, Weybridge 2-4/12/1996*).

Dentre os efeitos em animais podemos citar: aumento da taxa de mortalidade, distúrbios reprodutivos, feminilização, distúrbios na síntese de hormônios etc. Em seres humanos podemos citar: diminuição no nível dos hormônios sexuais, baixa qualidade do esperma, alterações nas funções do fígado, diminuição do peso de recém-nascidos etc (Canesi & Fabbri, 2015a; Canesi & Fabbri, 2015b; Chikae et al., 2004; Lee, Lin, & Chen, 2014; Thorpe et al., 2003; Meeker, 2012).

Dentro do grupo de DE conhecidos podemos citar diferentes classes de substâncias químicas como, por exemplo, ftalatos (usados na fabricação de cosméticos, detergentes e etc), aditivos fenólicos (aplicados à fabricação de plásticos), pesticidas (usados na produção de alimentos para o controle de pragas) e esteróides estrogênicos (hormônios sexuais) (Lafleur & Schug, 2011).

A classe dos esteróides estrogênicos é a que mais tem atraído a atenção da comunidade científica devido aos seguintes fatores: apresenta efeito desregulador em baixas concentrações (na ordem de ng L^{-1}), seu efeito desregulador pode ser observado poucas horas depois da exposição, além de ser classes de compostos presentes em muitas prescrições médicas (Lafleur & Schug, 2011).

Nas últimas décadas muitas agências reguladoras de saúde e agências de proteção ambiental têm dado atenção aos Poluentes Orgânicos Persistentes (POP). Eles são poluentes que não são totalmente eliminados nos processos de tratamento de efluentes, incluindo o tratamento de água para o consumo humano, e são

59 descartados nas matrizes ambientais (Dias, Gomes, Bila, Sant'Anna, & Dezotti, 2015). Dentro dessa grande
60 classe de poluentes estão os DE que causam, dentre muito efeitos, distúrbios hormonais nos animais que
61 entram em contato com eles (Canesi & Fabbri, 2015; Thorpe et al., 2003).

62 Devido ao fato de estarem presentes em baixas concentrações nas matrizes ambientais a etapa de
63 concentração é uma das mais importantes para a detecção e quantificação de um DE (Lafleur & Schug, 2011).
64 Comumente usa-se extração em fase sólida (EFS) como etapa de concentração devido a necessidade de um
65 volume menor de solvente, em comparação com a extração líquido-líquido (ELL) (Tournier et al., 2015).

66 Diversas técnicas experimentais podem ser utilizadas, como técnicas in vivo, in vitro e técnicas
67 analíticas. A técnica in vitro que mais se destaca é o ensaio de atividade estrogênica (EAS) devido a sua
68 robustez, rapidez e sensibilidade (Dias et al., 2015). Entretanto, como o ensaio EAS não identifica a substância
69 que está causando o efeito desregulador, a técnica tem uso limitado. A Cromatografia Líquida de Alta
70 Eficiência (CLAE) é a técnica mais usada, então. Para os DE da classe dos esteróides estrogênicos o detector
71 mais empregado é o de fluorescência.

72 A baixa concentração encontrada dos DE nos move a expressar os resultados dessas análises com
73 maior nível de confiança e de maneira mais adequada possível, pois somente assim garantiremos a
74 confiabilidade metrológica dos mesmos (Matthiessen & Johnson, 2007, GUM BIPM 2008).

75 Segundo o Vocabulário Internacional de Metrologia (VIM), por definição, incerteza é o parâmetro
76 que caracteriza a dispersão dos valores atribuídos a um mensurado que pode estar associada com outros fatores
77 presentes durante a medição (VIM, 2012).

78 A incerteza de medição pode ser expressa de diversas formas como por exemplo desvio padrão,
79 intervalo de confiança, estimativas sobre o erro na medição da substância de interesse.

80 Entretanto de acordo com o ISO/IEC 17025 para que um laboratório possua uma melhor confiança
81 em seus resultados, a melhor maneira de expressar a desconfiança existente em uma medição, é usando a
82 incerteza expandida, que leva em consideração todas as possíveis fontes de erro que podem influenciar a
83 medição da substância de interesse.

84 De acordo com a sugestão do ISO GUM, a incerteza de uma medida (incerteza expandida) é uma
85 combinação das incertezas de diversas fontes (incertezas combinadas). A forma de combinar as incertezas
86 combinadas para se estimar a incerteza expandida é através da expansão da série de Taylor (ISO GUM, 2008).

87 Cada metodologia analítica possui diversas fontes de incerteza, que variam devido ao método usado
88 e, cada fonte de incerteza irá contribuir para a incerteza da medição. Embora muitos trabalhos expressem a
89 incerteza de suas análises com base no desvio padrão de seus resultados, a maneira mais completa é expressá-
90 la através da incerteza expandida (U). A determinação das fontes de incerteza que têm maior impacto na
91 incerteza expandida, não é trivial.

92 O diagrama de Ishikawa, também conhecido como diagrama de causa-efeito ou ainda de espinha de
93 peixe, é a ferramenta mais simples para mapear as fontes de incerteza de um método analítico e definir a
94 influência de cada uma delas na incerteza expandida.

96 **Objetivo**

97
98 Identificar as fontes de incerteza na determinação de 17 β estradiol (E2) via CLAE e calcular sua
99 incerteza padrão combinada.

101 **Metodologia**

102
103 As fontes de incertezas nas análises cromatográficas são bem conhecidas, e podem ser enumeradas
104 como sendo relativas a quantidade de amostra usada na análise, grau de recuperação, repetibilidade, incerteza
105 associada a concentração determinada da substância analisada e incerteza associada a calibração (Konieczka &
106 Namieśnik, 2010). O diagrama de Ishikawa, presente na figura 1, representa as fontes de incerteza da
107 metodologia escolhida.

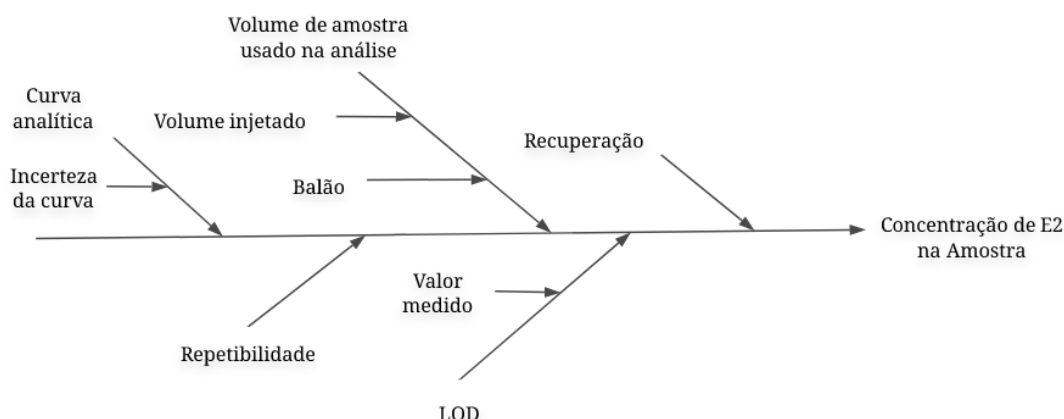


Figura 1: Diagrama de Ishikawa para a determinação de 17 β estradiol via cromatografia líquida de alta eficiência

O critério usado, para a seleção da amostra, foi baseado na frequência em que tal matriz aparece nos trabalhos da área ambiental.

A amostra selecionada foi coletada no rio Maracanã localizado na cidade do Rio de Janeiro, no cruzamento da Rua São Francisco Xavier com a Avenida Maracanã. O DE escolhido para ser analisado foi o 17 β estradiol (E2) que é um dos esteroides estrogênicos com maior efeito no sistema endócrino (Jaro, Giesy, & Hilscherová, 2014).

Para a determinação da concentração de E2 na amostra foram medidos 500mL da amostra, em balão volumétrico, que foi acidificada até pH 3 e filtrada em membrana de fibra de vidro com tamanho médio de poros de 0,7 μ m. Após, a amostra foi filtrada em membrana de Nylon® com poros de 0,45 μ m para a remoção total dos sólidos suspensos. Terminada as etapas de filtração, a amostra foi percolada através de um cartucho de extração em fase sólida (EFS) de fase reversa (C18) da marca Strata-X(Phenomenex®) de 500 mg / 6 mL previamente acondicionados conforme as recomendações do fabricante: 6 mL de *n*-hexano, 2 mL de acetona, 6 mL de metanol e 10 mL de água Milli-Q em pH 3. A extração foi realizada em Manifold (Agilent (VacElut 12)) acoplado em uma bomba de vácuo. Para a remoção dos interferentes foi realizada uma etapa de limpeza do cartucho com 10 mL de uma solução de metanol em água ultrapura (1:9). Seguida da etapa de limpeza, a amostra foi eluída com 4 mL de acetona, evaporada e redissolvida em acetonitrila.

As análises por CLAE foram realizadas em um cromatógrafo da marca Waters, modelo 15 25, composto por uma bomba binária, um detector de fluorescência, modelo 2475 e um auto injetor modelo 2707. Foi utilizada uma coluna C18 da marca Waters, com 250mm de comprimento e 4,6 mm de diâmetro interno, de 5 μ m de tamanho de partícula. As análises foram realizadas na temperatura de 30°C. Foram injetados 20 μ L de amostra a um fluxo de 1 mL/min. O fluxo de fase móvel foi feito em um gradiente de concentração (acetonitrila água) de acordo com a tabela 1. A detecção e quantificação do E2 foi realizada com o detector de fluorescência, o comprimento de onda de excitação usado foi de 280 nm e comprimento de onda de emissão usado foi de 306 nm (PATROLECCO, 2013).

Tabela 1. Composição da fase móvel

| Tempo da corrida* (min) | Acetonitrila (%) | Água (%) |
|-------------------------|------------------|----------|
| 0 | 40 | 60 |
| 6 | 50 | 50 |
| 9 | 30 | 70 |
| 13 | 40 | 60 |
| 15 | 40 | 60 |

*tempo onde a fase móvel mudou de composição

Foi construída uma curva analítica na faixa de 2040 a 5100 μ g/L com sete níveis de concentração, igualmente espaçados, a partir de uma solução mãe de 17 β estradiol a 10 mg/L em acetonitrila.

Aos dados obtidos foram aplicados os teste de Grubbs, para a identificação de valores aberrantes e o teste de Cochran, para avaliar o comportamento da curva analítica (homocedástico ou heterocedástico). A partir dos resultados desses testes o comportamento da curva analítica foi modelado usando o método dos

143 mínimos quadrados (regressão linear). Ambos testes foram realizados seguindo-se o documento de orientação
144 sobre validação de métodos analíticos do CGCRE (DOQ-CGCRE, 2011).

145 146 **Incerteza atribuída à recuperação**

147
148 A recuperação (ou fator de recuperação), R(%), é definida como a proporção da quantidade da
149 substância de interesse, presente na porção analítica do material teste, que é passível de ser quantificada
150 (RIBANI et al, 2004). Ela foi determinada usando o nível de concentração central da curva analítica (3570
151 µg/L) de acordo com a equação 1.

$$152 \quad R(\%) = \frac{\text{Valor observado}}{\text{Valor atribuído}} \cdot 100 \quad \text{(Equação 1)}$$

153 154 155 **Incerteza atribuída à repetibilidade**

156
157 A repetibilidade é expressa pelo desvio padrão relativo ou coeficiente de variação (CV), ela foi
158 determinada pela variação dos resultados obtidos na amostra de acordo com a equação 2.

$$159 \quad CV(\%) = \frac{s}{\bar{x}} \cdot 100 \quad \text{(Equação 2)}$$

160 Onde:

161 s é o desvio padrão

162 \bar{x} é a média dos valores obtidos na determinação da amostra.

163 A incerteza atribuída ao parâmetro de repetibilidade foi calculada de acordo com a equação 3

$$164 \quad u_{rep} = k \frac{s}{\sqrt{n}} \quad \text{(Equação 3)}$$

165
166
167 Onde:

168 s é o desvio padrão das medições repetidas

169 n o número de determinações

170 k é o fator de abrangência de valor igual a 2.

171 172 **Incerteza atribuída ao limite de detecção e ao valor determinado**

173 O limite de detecção (LD) da curva foi estimado a partir do ponto de menor concentração da curva
174 analítica de acordo com a equação 4.

$$175 \quad LD = 3,3 \frac{s}{b} \quad \text{(Equação 4)}$$

176
177 Onde:

178 s é o desvio padrão do nível de menor concentração

179 b é a inclinação da curva analítica

180

181 A incerteza atribuída ao LD foi calculada usando-se a equação 5.

$$182 \quad u_{LD} = \frac{LD}{C_{det}} \quad \text{(Equação 5)}$$

183
184 Onde:

185 u_{LD} é a incerteza atribuída ao limite de detecção (LD)

186 C_{det} é a concentração de 17 β estradiol na amostra.

187

188 **Incerteza associada à quantidade de amostra**

189

190 Para determinar a incerteza associada ao valor determinado na amostra utilizou-se a equação 6.

191



$$u_{amostra} = \frac{S_{y/x}}{b} \sqrt{\frac{1}{p} + \frac{1}{n} + \frac{(x_{amostra} - x_m)^2}{Q_{xx}}}$$

(Equação 6)

192
193

194 Onde:

195 $S_{y/x}$ é o desvio padrão residual

196 b é o coeficiente angular da curva analítica

197 n é o número de replicatas

198 p número de níveis de concentração da curva analítica

199 $x_{amostra}$ é a concentração de 17 β estradiol reportado

200 x_m é a média dos níveis de concentração usados para a construção da curva analítica

201 Q_{xx} é um parâmetro calculado segundo a equação 7

202

$$Q_{xx} = \sum_{i=1}^n (x_i - x_m)^2$$

(Equação 7)

203
204

205 Onde:

206 x_i é o valor calculado de 17 β estradiol em cada replica.

207

208 O desvio padrão residual pode ser calculado usando-se a equação 8

$$S_{y/x} = \sqrt{\frac{\sum_i (y_i - \hat{y}_i)^2}{n - 2}}$$

(Equação 8)

209

210 Onde:

211 $S_{y/x}$ é o desvio padrão residual

212 y_i é a resposta obtida pelo equipamento

213 \hat{y}_i é a resposta esperada

214 n é o número de determinações.

215

216 Incerteza atribuída à curva analítica

217

218 A incerteza atribuída a curva analítica foi calculada usando a equação 9

219

$$u_{cal} = \frac{s}{\sqrt{n}}$$

(Equação 9)

220

221

222 Onde:

223 u_{cal} é a incerteza da curva analítica

224 s é o desvio padrão das medições repetidas

225 n o número de determinações

226

227 De acordo com o diagrama de Ishikawa proposto podemos expressar a incerteza padrão combinada

228 usando equação 10.

$$u_{pc} = \sqrt{(u_{cal})^2 + (u_{rep})^2 + (u_{rec})^2 + (u_{amostra})^2 + (u_{LD})^2}$$

(Equação 10)

229

230

231

232 Onde:

233 u_{pc} é a incerteza padrão combinada para a determinação de E2 via CLAE

234 μ_{Ccalc} é a incerteza padrão atribuída a curva analítica
 235 μ_{rec} é a incerteza padrão atribuída a recuperação
 236 μ_{REP} é a incerteza padrão atribuída a repetibilidade
 237 μ_{amostra} é a incerteza padrão atribuída ao valor medido pelo equipamento
 238 μ_{LD} é a incerteza padrão atribuída ao limite de detecção
 239

240 Planilha de cálculo de incerteza padrão combinada e expandida

241
 242 A partir das equações aqui descritas e baseando-se no diagrama de Ishikawa foi construída uma
 243 planilha para o cálculo da incerteza padrão combinada e incerteza expandida que, foi calculada segundo a
 244 equação 11.

245
$$u_{\text{exp}} = k u_{\text{PC}} \quad \text{(Equação 11)}$$

247 Resultados

249 O teste de Grubbs foi aplicado aos dados da curva analítica e não foi encontrado nenhum valor
 250 aberrante.

251 O comportamento da curva analítica foi avaliado pelo teste de Cochran e pode-se observar que a
 252 curva analítica apresenta comportamento homocedástico.

253 A partir dos resultados obtidos realizou-se a regressão linear pelo método dos mínimos quadrados e
 254 os coeficientes da curva analítica estão apresentados no Tabela 2.

255
 256

| Coeficiente | Valor |
|---|--------------|
| Inclinação | 20460,08 |
| Interseção | -1650595,2 |
| Coeficiente de determinação (R ²) | 0,9994 |

257
 258 As tabelas 3 e 4 reúnem os valores dos parâmetros estimados e as fontes de incerteza padrão
 259 calculadas.

260
 261

| Parâmetro | Valor |
|---------------------------|--------------|
| Concentração de E2 (µg/L) | 358 |
| LD (µg/L) | 14 |
| Repetibilidade (%) | 0,034 |
| Recuperação (%) | 99 ± 4 |

262
 263

| Fonte de incerteza | Valor |
|---------------------------|--------------|
| Quantidade de amostra | 0,00025 |
| Calibração | 1,515 |
| LD | 0,04 |
| Repetibilidade | 8,58 |
| Recuperação | 0,9997 |

264 Foi construída uma planilha de cálculo para facilitar a utilização das formulas aqui descritas. As
 265 fontes de incerteza foram separadas por abas e em cada aba o operador pode alterar os valores das fontes de
 266 incerteza de acordo com as condições de análise.
 267

268 Após informar os valores necessários para o cálculo da incerteza expandida obteve-se o seguinte
 269 resultado:

270
$$\text{Concentração de E2 (µg/L)} = 358 \pm 17$$

271 O valor da incerteza calculada mostrou-se maior do que quando se utiliza apenas o desvio padrão das
 272 concentrações lidas pelo equipamento:

273
$$\text{Concentração de E2 (µg/L)} = 358 \pm 7$$

274
 275

276 6. Conclusões

277

278

279

O valor da incerteza expandida é a melhor forma de reportar um resultado analítico, visto que no seu cálculo todas as fontes de incerteza são levadas em consideração.

280

281

Utilizar as recomendações presentes no guia para a expressão de incerteza de medição .é a forma mais eficiente de relatar os resultados do método de análise.

282

283

Com o presente trabalho pode-se calcular a incerteza expandida do método analisado e, a utilização da planilha de cálculo facilitou o trabalho de determinar dos valores dos parâmetros estudados.

284

285

Variando-se as informações da planilha construída pode-se avaliar o impacto que cada fonte de incerteza tem sobre a incerteza expandida.

286

287

288

289

290

291

292

293

294

295

296

297

298

299

300

301

302

303

304

305

306

307

308

309

310

311

312

313

314

315

316

317

318

319

320

321

322

323

324

325

326

327

328

329

330

331

332

333

334 **Bibliografia**

335
336
337
338
339
340
341
342
343
344
345
346
347
348
349
350
351
352
353
354
355
356
357
358
359
360
361
362
363
364
365
366
367
368
369
370
371
372
373
374
375
376
377
378
379
380
381

Canesi, L., & Fabbri, E. (2015). Environmental Effects of BPA: Focus on Aquatic Species. <https://doi.org/10.1177/1559325815598304>

Dias, A. C. V., Gomes, F. W., Bila, D. M., Sant'Anna, G. L., & Dezotti, M. (2015). Analysis of estrogenic activity in environmental waters in Rio de Janeiro state (Brazil) using the yeast estrogen screen. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, *120*, 41–47. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2015.05.013>

Jaro, B., Giesy, J. P., & Hilscherová, K. (2014). What level of estrogenic activity determined by in vitro assays in municipal waste waters can be considered as safe?, *64*, 98–109. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2013.12.009>

Konieczka, P., & Namieśnik, J. (2010). Estimating uncertainty in analytical procedures based on chromatographic techniques. *Journal of Chromatography A*, *1217*(6), 882–891. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2009.03.078>

Matthiessen, P., & Johnson, I. (2007). Implications of research on endocrine disruption for the environmental risk assessment, regulation and monitoring of chemicals in the European Union. *Environmental Pollution*, *146*(1), 9–18. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2006.05.036>

Mei, X. Y., Hong, Y. Q., & Chen, G. H. (2016). Review on Analysis Methodology of Phenoxy Acid Herbicide Residues. *Food Analytical Methods*, *9*(6), 1532–1561. <https://doi.org/10.1007/s12161-015-0327-z>

Thorpe, K. L., Cummings, R. I., Hutchinson, T. H., Scholze, M., Brighty, G., Sumpter, J. P., & Tyler, C. R. (2003). Relative potencies and combination effects of steroidal estrogens in fish. *Environmental Science and Technology*, *37*(6), 1142–1149. <https://doi.org/10.1021/es0201348>

- DIAS, A. C. V., Gomes, F. W., Bila, D. M., Sant'Anna, G. L., & Dezotti, M. (2015). Analysis of estrogenic activity in environmental waters in Rio de Janeiro state (Brazil) using the yeast estrogen screen. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, *120*, 41–47. <http://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2015.05.013>
- LOCATELLI, M., Sciascia, F., Cifelli, R., Malatesta, L., Bruni, P., & Croce, F. (2016). Analytical methods for the endocrine disruptor compounds determination in environmental water samples. *Journal of Chromatography A*. <http://doi.org/10.1016/j.chroma.2016.01.034>
- MATTHIESSEN, P., Arnold, D., Johnson, A. C., Pepper, T. J., Pottinger, T. G., & Pulman, K. G. T. (2006). Contamination of headwater streams in the United Kingdom by oestrogenic hormones from livestock farms. *Science of the Total Environment*, *367*(2–3), 616–630. <http://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2006.02.007>
- OĞUZ, A. R., & Kankaya, E. (2013). Determination of selected endocrine disrupting chemicals in Lake Van, Turkey. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, *91*(3), 283–286. <http://doi.org/10.1007/s00128-013-1036-1>
- RAMAKRISHNAN, A., Blaney, L., Kao, J., Tyagi, R. D., Zhang, T. C., & Surampalli, R. Y. (2014). Emerging contaminants in landfill leachate and their sustainable management. *Environmental Earth Sciences*, *73*(3), 1357–1368. <http://doi.org/10.1007/s12665-014-3489-x>
- TOURNIER, M., Pouech, C., Quignot, N., Lafay, F., Wiest, L., Lemazurier, E., ... Vulliet, E. (2015). Determination of endocrine disruptors and endogenous androgens and estrogens in rat serum by high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Steroids*, *104*, 252–262. <http://doi.org/10.1016/j.steroids.2015.10.011>
- PATROLECCO, L.; ADEMOLLO, N.; GRENNI, P.; TOLOMEI, A.; CARACCIOLO, A.; CAPRI, S. Simultaneous determination of human pharmaceuticals in water samples by solid phase extraction and HPLC with UV-fluorescence detection, *Microchemical Journal*, Volume 107, 2013, Pages 165-171, ISSN 0026-265X, <https://doi.org/10.1016/j.microc.2012.05.035>.
- Requisitos gerais de competência de laboratórios de ensaios e calibração - ISO/IEC 17025: 2011