

**PARTE A: MÉTODOS BIOANALÍTICOS**  
**PART A: BIOANALYTICAL METHODS**

**UNIDADES de CONCENTRAÇÃO de SOLUÇÕES**  
**SOLUTIONS CONCENTRATION UNITS**

**1. Faz as seguintes conversões:**

**1. Do the following conversions:**

a) 16  $\mu\text{M}$  em  $\text{nmol/mL}$ .

*a) 16  $\mu\text{M}$  in  $\text{nmol/mL}$ .*

b) 8,5  $\text{mM}$  em  $\text{M}$ .

*b) 8.5  $\text{mM}$  in  $\text{M}$ .*

c) 577  $\text{mg/mL}$  em  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ .

*c) 577  $\text{mg/mL}$  in  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ .*

d) 577  $\text{mg/mL}$  em  $\text{g/mL}$ .

*d) 577  $\text{mg/mL}$  in  $\text{g/mL}$ .*

e) 577  $\text{mg/mL}$  em  $\text{mg}/\mu\text{L}$ .

*e) 577  $\text{mg/mL}$  in  $\text{mg}/\mu\text{L}$ .*

f) 577  $\text{mg/mL}$  em  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ .

*f) 577  $\text{mg/mL}$  in  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ .*

**2. A proteína ABC tem uma massa molecular de 43718 Da.**

**2. Protein ABC has a molecular mass of 43718 Da.**

a) Calcule a concentração molar (em micromolar,  $\mu\text{M}$ ) de uma solução 1  $\text{mg/mL}$  de proteína ABC.

*a) Calculate the molar concentration (in micromolar,  $\mu\text{M}$ ) of a 1  $\text{mg/mL}$  protein ABC solution.*

b) Como proceder para preparar 15 mL de uma solução de proteína ABC 10  $\mu\text{M}$  a partir da solução referida na alínea a)?

*b) How to proceed to prepare 15 mL of a protein ABC solution at 10  $\mu\text{M}$ , from the solution mentioned in a)?*

c) Qual a concentração em  $\mu\text{g/mL}$  da solução obtida em b)?

*c) What is the concentration in  $\mu\text{g/mL}$  of the solution obtained in b)?*

3. A partir de uma solução *stock* do composto A a 50 mM, pretende-se preparar uma diluição seriada em passos de 1:3.

*3. It is required to make a serial dilution in 1:3 steps from a solution of compound A at 50 mM.*

a) Que concentração (em  $\mu\text{M}$ ) tem a solução mais diluída após 7 passos de diluição?

*a) What is the concentration (in  $\mu\text{M}$ ) of the most diluted solution after 7 dilution steps?*

b) Se o composto A tiver uma massa molar de 1831 g/mol, qual a concentração da solução *stock* em mg/mL?

*b) If compound A has a molar mass of 1831 g/mol, what is the concentration of the stock solution in mg/mL?*

c) Qual a concentração (em  $\mu\text{g/mL}$ ) da solução diluída referida em a)?

*c) What is the concentration (in  $\mu\text{g/mL}$ ) of the solution mentioned in a)?*

## ESPECTROFOTOMETRIA

### SPECTROPHOTOMETRY

1. Considere os seguintes valores de absorvância obtidos (usando uma *cuvette* de 1 cm de percurso óptico) para soluções a diferentes concentrações de uma substância com máximo de absorvância a 495 nm.

*1. Consider the following absorbance values obtained (using a 1 cm optical path cuvette) for solutions at different concentrations of a given substance with the absorbance maximum at 495 nm.*

[Subst] (mM)	Abs <sub>495nm</sub>		
0	0,321	0,318	0,325
1	0,355	0,350	0,362
2	0,391	0,378	0,397
5	0,498	0,511	0,492
10	0,664	0,645	0,678
15	0,881	0,869	0,855
20	1,023	1,088	1,067

[Subst] (mM)	Abs <sub>495nm</sub>		
0	0.321	0.318	0.325
1	0.355	0.350	0.362
2	0.391	0.378	0.397
5	0.498	0.511	0.492
10	0.664	0.645	0.678
15	0.881	0.869	0.855
20	1.023	1.088	1.067

a) Construa uma curva de calibração e calcule o coeficiente de extinção molar (em  $\text{mM}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ ) desta substância a 495 nm.

*a) Generate a calibration curve and determine the molar extinction coefficient (in  $\text{mM}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ ) of this substance at 495 nm.*

b) Sabendo que a substância tem uma massa molar de 186 g/mol, calcule a concentração em mg/mL de uma solução com absorvância (a 495 nm) de 0,629.

*b) Knowing that this substance has a molar mass of 186 g/mol, calculate the concentration in mg/mL of a solution with absorbance (at 495 nm) 0.629.*

**2. Para determinar a concentração de uma solução de proteína P (M = 40,2 kDa), empregou-se o método de Bradford, usando como proteína padrão a albumina sérica bovina (BSA; M = 66,5 kDa). Obtiveram-se os seguintes valores de absorvância a 593 nm para a curva de calibração usando o padrão BSA, e para uma diluição de 1:5 da solução de proteína P.**

*2. To determine the concentration of protein P solution (M= 40.2 kDa), the Bradford method was employed, using bovine serum albumin as the protein standard (BSA; M= 66.5 kDa). The absorbance values measured at 593 nm were determined for the calibration curve (using the BSA standard) and for a 1:5 dilution of the protein P solution.*

[BSA] (mg/mL)	Abs593nm		
0	0,268	0,286	
0,1	0,354	0,365	
0,2	0,570	0,586	
0,4	0,578	0,568	
0,6	0,748	0,733	
0,8	0,865	0,858	
1,0	1,049	1,014	
Proteína P (1:5)	0,680	0,690	0,672

[BSA] (mg/mL)	Abs593nm		
0	0.268	0.286	
0.1	0.354	0.365	
0.2	0.570	0.586	
0.4	0.578	0.568	
0.6	0.748	0.733	
0.8	0.865	0.858	
1.0	1.049	1.014	
Protein P (1:5)	0.680	0.690	0.672

a) Construa a curva de calibração, o gráfico de residuais correspondente e identifique *outliers*. Após a remoção dos mesmos, recalcule os parâmetros da curva de calibração.

*a) Generate the calibration curve, the corresponding residuals plot and identify outliers. After removing the outliers, recalculate the calibration curve parameters.*

b) Calcule a concentração da solução de proteína P em mg/mL.

*b) Calculate the P protein solution concentration in mg/mL.*

c) Converta a concentração da solução de proteína P para  $\mu\text{M}$ .

*c) Convert the P protein solution concentration to  $\mu\text{M}$ .*

**3. Ao produzir uma proteína recombinante com o objectivo de a utilizar como um biofármaco, foi utilizado o Nanodrop para a quantificar. Em vez de um máximo de absorção a 280 nm, a solução de proteína tem um máximo a 260 nm.**

*3. While producing a recombinant protein to be employed as a biopharmaceutical, the Nanodrop was used to quantitate it. Instead of an absorbance maximum at 280 nm, the protein solution has its maximum at 260 nm.*

a) A concentração estimada para esta solução de proteína com base na absorvância a 280 nm será exacta? O que pode significar esta banda de absorção com máximo a 260 nm?

*a) Is the estimated protein concentration of this solution based on the 280 nm absorbance accurate? What can imply this band with a maximum at 260 nm?*

b) Após remoção de contaminantes, o máximo de absorvância da solução passou a ser a 280 nm. Porque razão tem a solução de proteína um espectro de absorção com o máximo neste comprimento de onda?

*b) After contaminants removal, the protein solution absorbance maximum changed to 280 nm. Why does the protein solution have an absorption spectrum with the absorbance maximum at this wavelength?*

## **ELECTROFORESE ELECTROPHORESIS**

**1. A electroforese em gel de poliacrilamida é um dos métodos mais usados na análise de proteínas.**

***1. Electrophoresis in polyacrylamide gel is one of the most commonly used methods for protein analysis.***

a) Refira duas aplicações desta metodologia.

*a) Mention two applications for this methodology.*

b) As suas aplicações poderiam ser estendidas a pequenas moléculas? Justifique.

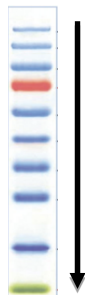
*b) Could its applications be extended to small molecules? Justify.*

c) A preparação das amostras submetidas a este método implica sempre o uso de dodecilsulfato de sódio (SDS) e de um agente redutor. Comente a afirmação.

*c) The preparation of samples submitted to this method always involves the use of sodium dodecylsulfate and of a reducing agent. Comment this sentence.*

d) A figura abaixo representa a separação de uma mistura de marcadores de massa molecular onde a seta indica o sentido de migração. Qual das bandas corresponde à proteína com maior massa molecular, a verde ou a vermelha? E ponto isoeléctrico? Justifique.

*d) The figure below represents the separation of a mixture of molecular mass markers where the arrow indicates the direction of protein migration. Which of the bands corresponds to the protein with higher molecular mass, the green or the red? And isoelectric point? Justify.*



e) Que processos de detecção podem ser acoplados a electroforese em gel?

*e) Which detection methods can be coupled with gel electrophoresis?*

**2. Em electroforese capilar os analitos são separados de acordo com a sua mobilidade iónica.**

***2. By capillary electrophoresis, the analytes are separated according to their ionic mobility.***

a) Comente a frase.

*a) Comment the sentence.*

b) Refira 3 factores que condicionam a mobilidade electroforética. Descreva como cada um dos factores interfere neste processo.

*b) Mention 3 factors that constraint the electrophoretic mobility. Describe how they interfere with this process.*

c) “As partículas neutras têm mobilidade electroforética zero”. Como classifica esta afirmação?

Justifique.

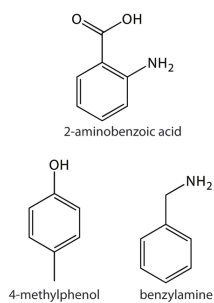
*c) "The electrophoretic mobility of neutral particles is zero." How do you classify this statement? Justify.*

d) Represente esquematicamente um sistema de electroforese capilar.

*d) Draw a schematic representation of a capillary electrophoresis system.*

e) Sugira as condições de pH para a separação de uma mistura de ácido 2-aminobenzoico ( $pK_{a1}=2,08$ ,  $pK_{a2}=4,96$ ), 4-metilfenol ( $pK_a=10,26$ ) e benzilamina ( $pK_a=9,35$ ).

*e) Suggest the pH conditions for the separation of a mixture of 2-aminobenzoic acid ( $pK_{a1}=2.08$ ,  $pK_{a2}=4.96$ ), 4-methylphenol ( $pK_a=10.26$ ) and benzylamine ( $pK_a=9.35$ ).*



## ENSAIOS DE LIGAÇÃO LIGAND-BIDING ASSAYS

**1. “Os ensaios ELISA permitem testar pequenas quantidades de analito em amostras complexas.”**

**1. “ELISA assays allow to test small amounts of analyte in complex samples.”**

a) O método ELISA pode ser usado em ensaios quantitativos e qualitativos? Justifique.

*a) Can ELISA method be used in quantitative and qualitative assays? Justify.*

b) Como aumentar um baixo sinal/ruído num ensaio ELISA?

*b) How can a low signal/noise be incremented in an ELISA assay?*

c) Qual a diferença entre anticorpos primários e anticorpos secundários? Exemplifique.

*c) What is the difference between primary and secondary antibodies? Exemplify.*

c) Delineie um protocolo para caracterizar a presença no soro sanguíneo de um antígeno associado a uma doença infecciosa. Refira a preparação de controlos positivos e negativos, as suas composições e utilidade.

*c) Prepare a protocol to characterize the presence of an antigen associated with an infectious disease in blood serum. Refer the preparation of positive and negative controls, their compositions and utility.*

d) Como poderia ultrapassar neste ensaio os problemas associados ao efeito de matriz?

*d) How could problems related with the matrix interference be overcome in that situation?*

## CROMATOGRAFIA CHROMATOGRAPHY

Selecione a resposta correcta:

Select the correct answer:

**1. Compostos incolores numa placa de TLC podem ser detectados através da utilização de**

a) vapor de iodo

b) luz UV

c) reagentes de coloração

d) todos os três métodos

*1. Colorless compounds on a TLC plate can be detected by using*

*a) iodine vapor*

*b) UV light*

*c) coloring reagents*

*d) all three methods*

**2. Em HPLC em fase reversa a fase estacionária é:**

a) não-polar

b) polar

- c) quiral
- d) a coluna é colocada ao contrário

*2. In reverse phase HPLC the stationary phase is:*

- a) non-polar*
- b) polar*
- c) chiral*
- d) the column is used upside down*

**3. Tipos de detectores de HPLC são (possíveis várias opções):**

- a) ECD
- b) UV
- c) RI
- d) FID

*3. Types of HPLC detectors are (several options possible):*

- a) ECD*
- b) UV*
- c) RI*
- d) FID*

**4. Qual/Quais dos seguintes gases **não é/não são adequado(s)** para utilização como um gás de arraste em GC?**

- a) Azoto
- b) Hélio
- c) Oxigénio
- d) Hidrogénio

*4. Which of the following gases **is not / are not suitable** for use as a GC vector gas?*

- a) Nitrogen*
- b) Helium*
- c) Oxygen*
- d) Hydrogen*

**5. Qual das seguintes afirmações sobre cromatografia **está correcta**?**

- a) cromatografia em papel e a cromatografia de gás são ambas utilizadas rotineiramente apenas para análise quantitativa.
- b) cromatografia em papel e cromatografia gasosa são ambas de rotina, usadas apenas para análise qualitativa.
- c) cromatografia em papel é geralmente considerada como sendo apenas qualitativa, enquanto cromatografia em fase gasosa pode ser qualitativa ou quantitativa.
- d) cromatografia de papel é geralmente considerada como sendo apenas quantitativa, enquanto cromatografia em fase gasosa pode ser qualitativa ou quantitativa.

*5. Which of the following statements about chromatography **is correct**?*

- a) paper chromatography and gas chromatography are both routinely used only for quantitative analysis.*
- b) paper chromatography and gas chromatography are both routinely used only for qualitative analysis.*

*c) paper chromatography is generally considered to be only qualitative, whereas gas chromatography may be qualitative or quantitative.*

*d) paper chromatography is generally considered to be only quantitative, whereas gas chromatography may be qualitative or quantitative.*

**6.** Uma nova bebida contém açúcar, sal, álcool e vitamina C. **GC** pode ser utilizado para determinar em natureza ou após derivatização ...

- a) a concentração de todos os ingredientes da bebida.
- b) somente álcool e teor de açúcar
- c) somente álcool, açúcar e teor de vitamina C
- d) somente teor de álcool

*6. A new drink contains sugar, salt, alcohol and vitamin C. GC can be used to determine in nature or after derivatization ...*

*(a) the concentration of all the ingredients of the beverage.*

*b) only the alcohol and sugar content*

*c) only the alcohol, sugar and vitamin C content*

*d) only the alcohol content*

**7.** O que descreve o factor de retenção,  $k'$ ?

- a) A distribuição de uma substância a analisar entre as fases estacionária e móvel
- b) A taxa de migração de um analito através de uma coluna
- c) A velocidade da fase móvel
- d) Nenhuma das anteriores

*7. What does the retention factor,  $k'$ , describe?*

*a) the distribution of a test substance between the stationary and the mobile phases*

*b) The rate of migration of an analyte through a column*

*c) The speed of the mobile phase*

*d) None of the above*

**8.** Qual/quais é/são a(s) informação/informações útil/úteis que pode(m) ser encontrada(s) a partir da curva de Van Deemter?

- a) O factor de selectividade
- b) Taxa de fluxo óptima da fase móvel
- c) Temperatura óptima da coluna
- d) Nenhuma das anteriores

*8. What is/are useful information/informations that can be found from the Van Deemter curve?*

*a) The selectivity factor*

*b) Optimal flow rate of the mobile phase*

*c) Optimal column temperature*

*d) None of the above*

**9.** Após efectuar uma placa de TLC determinou-se que o  $R_f$  de um componente era 2. Foi também verificado que a distância percorrida pelo eluente na placa foi de 4 cm. O que se pode concluir da experiência?

- a) O solvente não é volátil



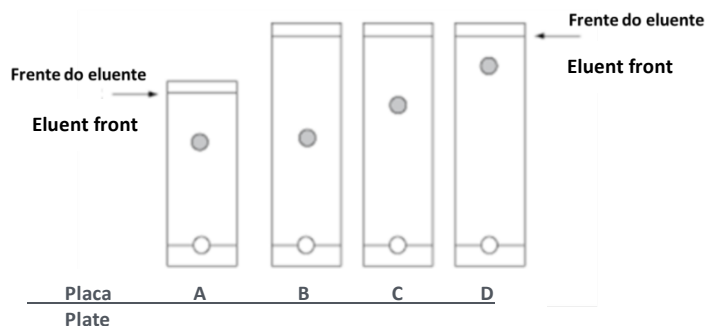
- b) Existem vários componentes na mistura
- c) O componente percorreu 8 cm na placa
- d) O resultado não é válido

9. After running a TLC plate, the  $R_f$  of a component was determined to be 2. It was also found that the distance traveled by the eluent on the plate was 4 cm. What can you conclude from the experience?

- a) The solvent is not volatile
- b) There are several components in the mixture
- c) The component traveled 8 cm on the plate
- d) The result is not valid

10. A placa A em baixo representa o resultado da eluição de um composto em hexano como solvente em placa de sílica-gel. O mesmo composto foi então aplicado noutra placa de TLC, de maior comprimento e eluído com hexano.

10. Plate A below represents the result of elution of a compound in hexane as a solvent on a silica gel plate. The same compound was then applied to another, longer length TLC plate and eluted with hexane.



- a) a placa B representa correctamente a distância percorrida na placa que tem um comprimento maior.
- b) a placa C representa correctamente a distância percorrida na placa que tem um comprimento maior.
- c) a placa D representa correctamente a distância percorrida na placa que tem um comprimento maior.
- d) Nenhuma das placas B, C e D representam correctamente a distância percorrida na placa que tem um comprimento maior.

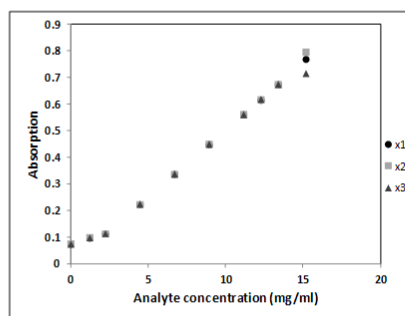
- a) plate B correctly represents the distance traveled on the plate that has a greater length.
- b) plate C correctly represents the distance traveled on the plate that has a greater length.
- c) plate D correctly represents the distance traveled on the plate that is longer.
- d) None of the plates B, C and D correctly represents the distance traveled on the plate that is longer.

**PARTE B: IMPLEMENTAÇÃO; DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODOS BIOANALÍTICOS**  
**PART B: IMPLEMENTATION; DEVELOPMENT AND VALIDATION OF BIOANALYTICAL METHODS**

1. Considere os dados e o gráfico abaixo obtidos para a validação de um método espectrofotométrico quantitativo.

*1. Consider the data and the graphic below obtained for the validation of a quantitative spectrophotometric method.*

Concentration mg/ml	Absorption			RSD %
	Replicate 1	Replicate 2	Replicate 3	
0	0.072	0.073	0.073	0.79
1.223	0.095	0.097	0.096	1.04
2.234	0.111	0.111	0.112	0.52
4.468	0.221	0.221	0.223	0.52
6.702	0.335	0.335	0.336	0.17
8.936	0.447	0.448	0.449	0.22
11.170	0.560	0.560	0.560	0
12.287	0.614	0.616	0.618	0.32
13.404	0.673	0.673	0.674	0.09
15.196	0.768	0.795	0.715	5.36



a) Qual é a gama de trabalho deste método? Justifique.

*a) What is the working range of this method? Justify.*

b) Com os dados que temos que tipos de precisão é que podemos calcular? Justifique.

*b) With the available data, what is the precision types that we can calculate? Justify.*

2. Desenvolveu-se um método para quantificar por HPLC em simultâneo taurina e cafeína em bebidas energéticas. O método usa uma coluna Astec apHera NH2, uma mistura de metanol/água (30:70 v/v) como fase móvel, detectores de ultravioleta (UV) a 227 nm e evaporativo com espalhamento de luz (ELSD), respectivamente para a determinação da cafeína e da taurina.

*2. A method was developed to quantify by HPLC taurine and caffeine in energy drinks. The method uses an Astec apHera NH2 column, a mixture of methanol/water (30:70 v/v) as the mobile phase, an ultraviolet (UV) detector at 227 nm and an evaporative detector with light scattering (ELSD), respectively, for the determination of caffeine and taurine.*

a) Quais são a matriz e o analito? Justifique.

*a) Indicate the matrix and the analyte. Justify.*

b) Como faria para determinar a robustez do método?

*b) Propose a procedure to determine the robustness of this method.*

3. Para quantificar mercúrio em atum, foi utilizado o método de calibração por adição padrão. Amostras de fígado de atum (500 mg) foram maceradas e homogeneizadas em 2 mL de tampão de lise. Após a centrifugação, o sobrenadante foi recolhido. A 0,9 mL de sobrenadante da suspensão de fígado, 0,1 mL de mercúrio (em concentrações variáveis) foi adicionado e o conteúdo total de mercúrio foi determinado.

*3. To quantify mercury in tuna fish, the method of standard addition calibration was employed. Samples of tuna fish liver (500 mg) were macerated and homogenized in 2 mL of lysis buffer. After centrifugation, the supernatant was collected. To 0.9 mL of liver suspension supernatant, 0.1 mL of mercury (at variable concentrations) was added and the total mercury content was determined.*

a) Quais são a matriz e o analito? Justifique.

*A) What are the matrix and the analyte? Justify.*

b) Descreva o método de calibração por adição padrão e em que condições deve ser utilizado.

*b) Describe the standard addition calibration method and in what conditions it is employed*

c) Utilize os dados da tabela para quantificar o mercúrio no fígado de atum (em mg Hg<sup>2+</sup>/grama de fígado).

*C) Use the data below to quantify the mercury in a tuna fish liver sample (in mg Hg<sup>2+</sup>/gram of liver).*

<b>Hg<sup>2+</sup> adicionado</b> <i>Added Hg<sup>2+</sup></i> <b>(mg/mL; concentração final após adição)</b> <i>(mg/mL final concentration after addition)</i>	<b>Sinal do analito</b> <i>Analyte signal</i> <b>(unidade arbitrárias)</b> <i>(arbitrary units)</i>
0	29.0
5	35.3
10	43.8
15	52.5
20	59.7
25	67.3

4. Para quantificar diacetilo foi desenvolvido um método de análise por cromatografia gasosa. Os padrões e amostras de cerveja são aquecidos a 60 °C em *vials* especiais durante 45 min. São recolhidos 500 µL do *vial headspace* e injetados no cromatógrafo gasoso. Neste método a 2,3-hexanodiona é usada como padrão interno. Na tabela são apresentados os valores obtidos para traçar a curva de calibração.

*4. To quantify diacetyl, a gas chromatography method was developed. Standards and beer samples are heated in special vials at 60 °C for 45 min. 500 µL of the vial headspace is collected and injected into the gas chromatographer. In this method 2,3-hexanedione is used as an internal standard. The table shows the values obtained for the calibration curve.*

<b>Diacetyl (ppm)</b>	<b>2,3-hexanedione (ppm)</b>	<b>Area Diacetil</b>	<b>Area 2,3-hexadione</b>	<b>Racio</b>
0	0.05	0	58	0
0.05	0.05	13	26	1
0.15	0.05	330	70	5
0.25	0.05	330	59	6
0.5	0.05	956	82	12
1	0.05	1720	74	23
1.5	0.05	1523	61	25
2	0.05	1352	28	48
2.5	0.05	2745	48	57
3	0.05	3762	55	68
4	0.05	5002	67	75
5	0.05	3890	45	86

a) Quais são a matriz e o analito? Justifique.

*a) What are the matrix and the analyte? Justify.*

b) Justifique a razão de ser utilizado um padrão interno nesta determinação.

*b) Justify the utilization of an internal standard for this determination.*

c) Qual é a gama de trabalho em que o método pode ser usado para a determinação do conteúdo de diacetilo na cerveja? Verifique se existem outliers. Justifique.

*c) What is the working range for what the method can be used for the determination of diacetyl content in beer? Are there outliers? Justify.*

d) Fez-se a amostragem duma cerveja e obtiveram-se áreas de 451 e 53, respectivamente, para os picos do diacetilo e da 2,3-hexanodiona. Qual a quantidade total de diacetilo, em mg, numa cerveja média (33 cL)? Apresente os cálculos. (Nota: 1 ppm de diacetilo corresponde a 1 mg/L)

*d) One beer was sampled and areas of 451 and 53 were obtained for the diacetyl and 2,3-hexanedione peak, respectively. What is the total amount of diacetyl, in mg, in an average beer (33 cL)? Present the calculations. (Note: 1 ppm of diacetyl corresponds to 1 mg/L)*

**5. No ITQB foi desenvolvido um método para detetar o vírus SARS-COV2 em amostras de saliva usando uma técnica de LAMP (Loop-mediated isothermal AMPlification). Esta técnica permite a amplificação isotérmica de material genético do vírus, sendo o resultado apresentado sob a forma de alteração da cor da solução.**

*5. At ITQB, a method was developed to detect the presence of SARS-COV2 virus in saliva samples using LAMP (Loop-mediated isothermal AMPlification) technique. This technique allows the isothermal amplification of the virus's genetic material, the result being presented by the colour change of the solution.*

a) Quais são a matriz e o analito? Justifique.

*a) What are the matrix and the analyte? Justify.*

b) Que parâmetros foi preciso validar para este método? Explique, sucintamente, como é realizada a validação desses parâmetros.

*b) What parameters needed to be validated for this method? Explain briefly how the validation of these parameters is performed.*

**6. Foi desenvolvido um método para a determinação de canabinóides sintéticos em amostras de urina. Este método implica uma extração dos canabinóides da urina usando uma técnica de salting-out consistindo, neste caso, numa extração sucessiva com acetonitrilo e sulfato de amónia; e posterior análise da fase orgânica por LC-MS.**

*6. A method for synthetic cannabinoids determination in urine samples was developed. This method involves an extraction of cannabinoids from urine using a salting-out technique, in this case includes a successive extraction with acetonitrile and ammonium sulfate; and subsequent analysis by LC-MS of the organic phase.*

a) Quais são matriz e o analito? Justifique.

*a) What are the matrix and the analyte? Justify.*

b) Como faria para determinar a exactidão do método?

*b) Propose a procedure to determine the accuracy of this method.*

7. Para detectar a infecção por SARS-COV-2, têm sido utilizados testes rápidos por imunoensaio qualitativo de fluxo lateral (LFA – Lateral Flow Assay) em que se detecta a presença de antígenos para a nucleocápside do SARS-CoV-2.

*7. To detect SARS-COV-2 infection, rapid tests using Lateral Flow qualitative immunoAssay (LFA) have been used, in which the presence of antigens against SARS-CoV-2 nucleocapsid are detected.*

a) Como avaliaria a especificidade e o limite de detecção deste método? Justifique, indicando possíveis interferentes.

*a) How would you evaluate the specificity and the limit of detection of this method? Justify, indicating possible interferers.*

b) Neste tipo de métodos existe uma linha controlo. Qual é a sua função? Justifique a necessidade da sua utilização.

*b) In these methods a control line exists. What is its function? Justify its need.*

8. Um método para quantificar o inseticida Tiametoxam em amostras de águas superficiais está a ser validado. As diretivas indicam que o valor máximo de Tiametoxam presente em águas superficiais é de 0.01 ng/L. Obtiveram-se os seguintes valores de Tiametoxam em amostras diárias de água.

*8. A method to quantify the insecticide Thiomethoxam in shallow water samples is being validated. The maximum value of Thiomethoxam that can be present in shallow waters is 0.01 ng/L. In the table are the results determined for daily samples.*

N replicates	C <sub>thiomethoxam</sub> (ng/L)			
	16/10/2016	6/11/2016	26/11/2016	27/11/2016
1	7.6	11	9.5	11.3
2	8.2	11.2	8.8	10.2
3	14.9	10.7	8.6	11.3
4	9.5	11.1	9.1	
5	11.4		9.1	

a) Quais são matriz e o analito? Justifique.

*a) Which are the matrix and the analyte? Justify.*

b) É importante saber-se a concentração exata de Tiametoxam na amostra para se determinar a precisão do método?

*b) Is it important to know the exact concentration of Thiomethoxam in the sample to calculate the method's precision?*

c) Com este desenho experimental que tipo de precisão é possível calcular?

*c) With this experimental setup what kind of precision can be calculate?*

d) Calcule a repetibilidade do método para os diferentes dias e verifique se cumpre os critérios de aceitação.

*d) Determine the method's Repeatability for the different days and if matches the acceptance criteria.*

e) Considerando que o LoQ deste método é de 0.015 ng/L, o mesmo pode ser usado para determinar a concentração de Tiametoxam em águas superficiais?

*e) Considering that this method has a LoQ of 0.015 ng/L, can it be used to determine Thiamethoxam concentrations in shallow waters?*

9. Na tabela seguinte são apresentados os valores obtidos para a determinação da gama de trabalho de um método de quantificação de isoprothiolano em amostras de arroz por GC-MS/MS. O isoprothiolano é extraído com a adição duma solução de acetonitrilo 80% (incubação de 30 min com agitação a 30°C). Após centrifugação (10 000 x g, 10 min, 4°C) o sobrenadante é transferido para um tubo com PSA (500 mg) e MgSO<sub>4</sub> (1 M) e sujeito a uma nova centrifugação (10 000 x g, 10 min, 4°C). O extracto final, 4 µL, é analisado por GC-MS/MS, numa coluna Ptx-5MS (0,32 mm X 30 m; 260°C) e seleccionada a ionização no modo positivo.

*9. In the table below are presented the values obtained for working range determination of a method for quantification of Isoprothiolane in rice. The compound is extracted by addition of acetonitrile 80% to rice (30-min incubation at 30°C, with shaking); after centrifugation (10 000 x g, 10 min, 4°C) the supernatant is transferred to a tube with PSA (500 mg) and MgSO<sub>4</sub> (1 M) followed by a new centrifugation (10 000 g, 10 min, 4°C). The final extract, 4 µL, is analysed by GC-MS/MS, in a Ptx-5MS column (0.32 mm X 30 m; 260°C) in positive ionization mode.*

[Isoprothiolane] (µg/mL)	Average (a.u.) N=5	CV (%)
0.003	570	18
0.010	600	10
0.033	1000	8
0.066	1400	7
0.100	1800	8
0.250	4023	8
0.400	5600	5
0.600	6123	6

a) Quais são a matriz e o analito? Justifique.

*a) What are the matrix and the analyte? Justify.*

b) Qual é a gama de trabalho para este método?

*b) What is the working range of this method?*

c) Como faria para determinar a robustez do método?

*c) How would you determine the method's robustness?*

10. Para a quantificação do analito A em amostras de águas de piscinas, desenvolveu-se um método espectrofotométrico.

*10. For the quantification of analyte A in swimming pool water a spectrophotometric method was developed.*

a) A avaliação da estabilidade das soluções usadas na execução de ensaios é muito relevante. Delineie um procedimento experimental para avaliar a estabilidade das amostras.

*a) The evaluation of the stability of the solutions to be used to perform the assays is relevant. Establish an experimental procedure to evaluate the stability of the samples.*

b) Como poderia avaliar a adequação do espectrofotómetro para o ensaio a realizar?

*b) How would you evaluate if the spectrophotometer to be used in the assays is in adequate conditions?*

Considere as seguintes *guidelines* para os parâmetros de validação dos métodos.

Consider the following *guidelines* for method validation parameters.

<b>Parâmetro / <i>Parameter</i></b>	<b>Critério de aceitação / <i>Acceptance criteria</i></b>
Especificidade / <i>Specificity</i>	Resposta de interferentes inferior a 20% da resposta do analito ao LLoD / <i>interfering components should not be more than 20% the analyte response at LLoD</i>
Exactidão / <i>Accuracy</i>	Média das medidas com desvio < 15% do valor real (20% no LoQ) / <i>mean value &lt; 15% deviation from true value (20% on LoQ)</i>
Precisão / <i>Precision</i>	Coefficiente de variação (CV) < 15% / <i>Coefficient of variation (CV) &lt; 15%</i>
Linearidade / <i>Linearity</i>	Residuais relativos ±20% / <i>Relative residuals ±20%</i>
Gama de trabalho / <i>Working Range</i>	Zona linear da curva de calibração que cumpra critérios de precisão e exactidão / <i>Linear zone of calibration curve that meets the accuracy and precision criteria</i>
LoD	$C_{LoD} = 3SY \div b$ ou/or $S/N > 3$
LoQ	$C_{LoQ} = 10SY \div b$ ou/or $S/N > 20$
Robustez / <i>Robustness</i>	Diferença na determinação do valor < 10% / <i>Differences in value determination &lt; 10%</i>

SY: Desvio padrão das resposta *SD of responses*; B: declive da curva de calibração *slope of the calibration curve*; S/N: Razão sinal ruído *Signal to Noise ratio*

## Soluções/Solutions

### Unidades de Concentração de Soluções/*Solutions Concentration Units*

1.

- a) 16 nmol/mL.
- b) 0,0085 M.
- c) 577 µg/µL
- d) 0,577 g/mL.
- e) 0,577 mg/µL.
- f) 577 µg/µL

2.

- a) 22,87 µM.
- b) 6,56 mL de a) e perfazer com tampão ou água até 15 mL. **b) 6.56 mL of a) and add up to 15 mL with buffer or water.**
- c) 437 µg/mL.

3.

- a) 22,9 µM.
- b) 91,55 mg/mL.
- c) 41,86 µg/mL.

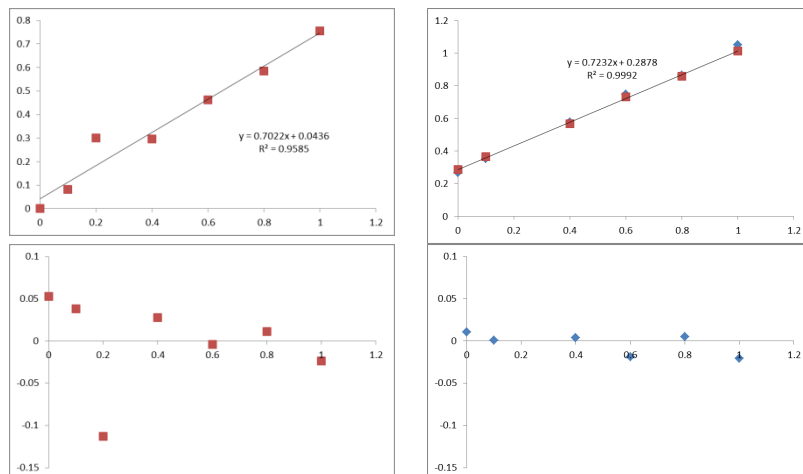
### Espectrofotometria de UV-visível / UV-visible spectrophotometry

1.

- a) 0,0368 mM<sup>-1</sup>.cm<sup>-1</sup>.
- b) 1,585 mg/mL.

2.

a)





- b) 2,69 mg/mL.
- c) 66,8 µM.

3.

- a) Não. Contaminação com ácidos nucleicos. a) No. Contamination with nucleic acids.
- b) Contém amino ácidos aromáticos na sua composição, nomeadamente triptofano, tirosina e fenilalanina. b) It contains aromatic amino acids in its composition, namely tryptophan, tyrosine and phenylalanine.

### Electroforese/*Electrophoresis*

- 1d) A proteína representada pela banda vermelha tem a maior massa molecular. 1d) The protein represented by the red band has the higher molecular mass.
- 2e) Intervalo de pH 4,96-9,35. 2e) pH range 4.96-9.35

### Cromatografia/*Chromatography*

As respostas correctas são/*The correct answers are: 1d), 2), 3b)/c), 4c), 5c), 6c), 7b), 8b), 9d), 10b).*

1a) A zona da curva linear, em que as medidas sejam precisas e exactas. Neste caso, de 2,234 a 13,404 mg/ml.

1a) Linear zone of the calibration curve, where the measurements are precise and accurate. In this case from 2.234 to 13.404 mg/ml.

1b) A precisão que se poderá calcular é a repetibilidade, visto que apenas um operador mede. A resposta 'nenhuma' também é aceite pois, para calcular a repetibilidade é necessário mais do que 3 medições. 1b) Repeatability, since a single operator does the measurements. The answer 'none' is also accepted, since to calculate the repeatability, more than 3 replicates are needed.

2a) Matriz: bebidas energéticas. Analitos: taurina e cafeína. 2a) Matrix: energy drinks. Analytes: taurine and caffeine.

2b) Mudar algumas das condições do ensaio para observar se o método continua a ser válido, tais como pequenas alterações na composição dos solventes, comprimento de onda do detetor, temperatura de ensaio... 2b) Change some assay conditions to check if the method is still valid. Namely, small alterations on solvent composition, detector wavelength, assay temperature.

3a) Matriz: fígado de atum. Analito: Mercúrio. 3a) Matrix: tuna liver. Analyte: Mercury.

3b) O analito é adicionado à amostra em concentrações conhecidas, sendo que o valor determinado pela reta de adição, equivale ao valor de x quando y = 0 da reta. Usa-se quando existe um forte efeito da matriz nas medições. 3b) The analyte is added to the sample at known concentrations, the value of the analyte in the samples is obtained by the addition line, corresponding to the x value when y = 0. It is utilized when the matrix has a strong effect on the analyte measurements.

3c) 80.8 mg Hg<sup>2+</sup> / grama de fígado. 3c) 80.8 mg Hg<sup>2+</sup>/gram of liver

4a) Matriz: Cerveja. Analito: Diacetil. 4a) Matrix: beer. Analyte: diacetyl.

4b) O valor medido depende de factores não controláveis que variam de medição para medição. 4b) The measured value depends on non-controllable factors that change from measurement for measurement.

4c) De 0,05 a 3 ppm. O valor de 1,5 ppm é outlier. 4c) Working range from 0.05 to 3 ppm; the value at 1.5 ppm is an outlier.

4d) 0,12 mg. 4d) 0.12 mg.

5a) Matriz: saliva. Analito: Material genético do vírus. 5a) Matrix: saliva. Analyte: virus's genetic material.

5b) Limite de deteção, especificidade e robustez. 5b) Detection limit, specificity and robustness.

6a) Matriz: urina. Analito: canabinóides sintéticos. 6a) Matrix: urine. Analyte: synthetic cannabinoids

6b) Uma hipótese: adição de diferentes concentrações canabinóides padrão a amostras de urina sem canabinóides. Executar o método e determinar os valores obtidos. Ver quanto se afastam dos valores reais. 6b) One possibility: add different concentrations of cannabinoids to cannabinoids-free urine. Perform the method, measure the values and determine how far are from the reals one's.

7a) Limite de deteção: Determinar qual a quantidade mínima antigénios para a nucleocápside do SARS-CoV-2 que origina um resultado positivo, adicionando concentrações de antigénio cada vez menores. Especificidade: adicionar outros antigénios e observar se levam a um resultado positivo. Possíveis interferentes serão antigénios de outras doenças respiratórias. 7a) Detection limit: determine the minimum of antigens against SARS-CoV-2 nucleocapsid that results in a positive result, adding increasingly smaller antigen concentrations. Specificity: adding other antigens and seeing if they lead to a positive result. Possible interferers will be antigens from other respiratory diseases.

7b) É um controlo positivo. Se essa linha não aparecer indica que o teste é inconclusivo, pois a ausência de linha contra o antigénio pode ser derivado de outros fatores. 7b) It is a positive control. If the line does not appear it indicates that the test is inconclusive, as the absence of a line against the antigen may be due to other factors.

8a) Matriz: água. Analito: tiametoxan. 8a) Matrix: water. Analyte: tiametoxam.

8b) Não, a precisão indica se diferentes medições dão valores próximos. Não precisam de ser exatos. 8b) No, precision indicates whether different measurements give close values. They don't need to be exact.

8c) Somente a repetibilidade diária. Não se pode comparar entre os diferentes dias, pois as amostras são diferentes. 8c) Only the daily repeatability. It is not possible compare between different days, as the samples are different.

8d) CV (%) para os diferentes dias: 28,5; 2,0; 3,8 e 5,8. Não cumpre no dia 16/10/2016. 8c) CV (%) for each day: 28.5; 2.0; 3.8 e 5.8. In the day 2016/10/16 the acceptance criteria are not matched.

8e) Não, porque o LoQ tem de ser inferior ou igual ao valor máximo que é aceite. Neste caso, o LoQ é 0.015 ng/L e o valor máximo é 0.01 ng/L. 8e) No, the LoQ needs to be lower than the maximum accepted value. In this case the LoQ is 0.015 ng/L and the maximum value is 0.01 ng/L.

9a) Matriz: arroz. Analito: isoprothiolano. 9a) Matrix: rice. Analyte: Isoprothiolane.

9b) Entre 0,010 e 0,400 µg/ml. Na concentração 0,003 µg/ml a medição não cumpre os critérios de repetibilidade e na concentração 0,600 µg/ml não é linear. 9b) Between 0.010 and 0.400 µg/mL. The 0.003 µg/ml concentration doesn't met the acceptance criteria for precision and the 0.600 µg/ml isn't linear.

9c) Mudar algumas das condições do ensaio para observar se o método continuaria a ser válido. Exemplos: pequenas alterações na composição dos solventes de extração, comprimento da coluna, velocidade de centrifugação. 9c) Change some assays conditions to observe that the method is still valid. Examples: small alterations on extraction solvent composition, column length, centrifugation velocity.