



Bruno Miguel Caldeira António
Licenciado em Química Aplicada

Desenvolvimento de métodos de GC/TOFMS, GC/MS/MS
e GC-FID para a monitorização de PAHs

MESTRADO EM QUÍMICA BIOORGÂNICA
Universidade NOVA de Lisboa
Dezembro 2021



Desenvolvimento de métodos de GC/TOFMS, GC/MS/MS e GC-FID para a monitorização de PAHs

BRUNO MIGUEL CALDEIRA ANTÓNIO

Licenciado em Química Aplicada

Orientador: Marco Diogo Richter Gomes da Silva, Professor Associado com Agregação, NOVA University Lisbon

Coorientador: Eduardo Manuel Hipólito Pires Mateus, Investigador CENSE, NOVA University Lisbon

Júri:

Presidente: António Jorge Dias Parola, Professor Associado com Agregação, NOVA University Lisbon

Arguente: Maria Margarida Boavida Pontes Gonçalves, Professora Auxiliar, NOVA University Lisbon

Vogal: Marco Diogo Richter Gomes da Silva, Professor Associado com Agregação, NOVA University Lisbon

MESTRADO EM QUÍMICA BIOORGÂNICA

Universidade NOVA de Lisboa

Dezembro, 2021

Desenvolvimento de métodos de GC/TOFMS, GC/MS/MS e GC-FID para a monitorização de PAHs

Copyright © Bruno Miguel Caldeira António, Faculdade de Ciências e Tecnologia, Universidade Nova de Lisboa.

A Faculdade de Ciências e Tecnologia e a Universidade Nova de Lisboa têm o direito, perpétuo e sem limites geográficos, de arquivar e publicar esta dissertação através de exemplares impressos reproduzidos em papel ou de forma digital, ou por qualquer outro meio conhecido ou que venha a ser inventado, e de a divulgar através de repositórios científicos e de admitir a sua cópia e distribuição com objetivos educacionais ou de investigação, não comerciais, desde que seja dado crédito ao autor e editor.

Agradecimentos

Em primeiro lugar, quero agradecer aos meus orientadores: Professor Marco Gomes da Silva e ao Doutor Eduardo Mateus por tudo o que me ensinaram ao longo deste ano e por todo o apoio prestado.

Estou profundamente grato pela ajuda do Mestre João Brinco e da Mestre Flávia Freitas e por me terem guiado durante a realização desta dissertação.

Gostaria de agradecer às minhas colegas de laboratório, Sara Pinheiro e Beatriz Rodrigues por todo apoio prestado e pela motivação que me deram ao longo deste ano. Sem vocês não seria o mesmo. Não podia deixar de agradecer a todos os integrantes do *Resolution Lab* por todo o auxílio prestado.

Aos meus colegas de curso que estiveram comigo ao longo desta jornada.

Aos meus amigos que me acompanharam grande parte da minha vida e que sei que continuarão a estar presentes.

À minha família que esteve sempre presente. Aos meus pais por me terem apoiado incondicionalmente ao longo de toda a minha vida.

A pandemia condicionou bastantes as nossas vidas, mas apesar de todos os inconvenientes acredito que a força de vontade é a chave para ultrapassar tudo.

Este trabalho foi suportado pelo RESOLUTION LAB, uma infraestrutura localizada na NOVA School of Science and Technology.

*“People will forget what you said, forget what you did, but they will never forget how you
made them feel”*
(Maya Angelou)

Resumo

Os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (PAHs) são compostos orgânicos considerados poluentes uma vez que as suas propriedades físico-químicas favorecem a toxicidade, e persistência no ambiente. A sua presença nas águas deve-se à libertação de águas residuais que contêm contaminantes orgânicos para o ambiente. Também é possível detetá-los em águas para consumo. A exposição humana a estes compostos é feita principalmente pela ingestão de alimentos e água.

A IARC (*International Agency for Research on Cancer*) classificou alguns PAHs como potenciais compostos carcinogénicos e confirmou o benzo[*a*]pireno como carcinogénico. Em dezembro de 2020, a Comissão Europeia instituiu a Diretiva 2020/2184 onde estabeleceu valores limites de 0,01 ppb para a concentração de benzo[*a*]pireno e de em 0,1 ppb para soma das concentrações de benzo[*b*]fluoranteno, benzo[*k*]fluoranteno, benzo[*g,h,i*]perileno e indeno[1,2,3-*c,d*]pireno em águas para consumo humano, o que torna importante a sua monitorização.

As metodologias atuais recorrem a espectrometria de massa (MS) que é bastante dispendiosa, pelo que há a necessidade de desenvolver métodos alternativos mais económicos. O objetivo desta dissertação centrou-se no estudo e desenvolvimento de um método para a monitorização de PAHs em águas próprias para consumo por GC/TOFMS, GC/MS/MS e GC-FID.

Foram realizados vários estudos nomeadamente, o screening dos parâmetros das condições operacionais de LVI-PTV-GC/TOFMS e o desenvolvimento de um método de GC/MS/MS. Os resultados do estudo de otimização operacional da injeção e da separação cromatográfica serão transpostos para o GC-FID.

No *screening*, a temperatura da fonte de ionização, injetor e o tempo de splitless foram otimizados. No entanto, a pressão e o tempo da purga necessitam de ser otimizados.

O modo de MRM teve um desempenho deficiente devido a uma avaria no equipamento. Foram conseguidos limites de deteção e de quantificação entre 20 e 200 ppb. Os testes de recuperação demonstraram a necessidade de otimizar o procedimento de preparação de amostra.

Concluindo, a técnica de injeção de LVI-PTV demonstrou ser promissora e a otimização do procedimento de preparação de amostra é crucial para alcançar aos limites pretendidos.

Palavras-chave: Cromatografia gasosa, Hidrocarbonetos poliaromáticos, Águas para consumo, Extração em fase sólida, Injeção de grande volume

Abstract

The polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) are organic compound considered pollutant since their physicochemical properties favor toxicity and persistence in the environment. Its presence in water is due to the release of wastewater that contains organic contaminants to the environment. It is also possible to detect them in drinking water. Human exposure to these compounds is mainly caused by ingestion of food and water.

IARC (International Agency for Research on Cancer) has classified some PAHs as possible and likely carcinogenic compounds stating benzo[*a*]pyrene as a carcinogen. In December 2020, the European Commission instituted Directive 2020/2184 established limit values for the concentration of benzo[*a*]pyrene at 0.01 ppb and the sum of the concentrations of benzo[*b*]fluoranthene, benzo[*k*]fluoranthene, benzo[*g,h,i*]perylene and indeno[1,2,3-*c,d*]pyrene at 0.1 ppb in drinking water, which makes their monitoring important.

Current methodologies use mass spectrometry (MS) are quite expensive, so there is a need to develop alternative methods that are more economical. The aim of this dissertation is focused on the development of a method for monitoring PAHs in drinking water by GC/TOFMS, GC/MS/MS and GC-FID.

Several studies were carried out, namely, the screening of the parameters of the operating conditions of LVI-PTV-GC/TOFMS and the development of a GC/MS/MS method. These results will be transferred to the GC-FID system.

In the screening process the temperature of the ion source, inlet and the splitless time were optimized. However, the vent pressure and time need further optimization.

The MRM method performed poorly due to equipment malfunction. Limits of detection and quantification between 20 and 200 ppb were achieved. Recovery tests demonstrated the need to optimize the SPE procedure.

In sum, the LVI-PTV injection technique proved to be promising and the optimization of the SPE procedure is crucial to reach the intended limits.

Keywords: Gas chromatography, Polycyclic aromatic hydrocarbons, Drinking water; Solid phase extraction, Large volume injection

Índice

Agradecimentos	V
Resumo	IX
Abstract	XI
Índice	XIII
Índice de figuras	XV
Índice de Tabelas	XVII
Lista de abreviaturas	XIX
1 Hidrocarbonetos poliaromáticos	1
1.1 Características	1
1.2 Legislação sobre os PAHs.....	3
2 Cromatografia	7
2.1 Generalidades	7
2.2 Cromatografia gasosa.....	8
2.2.1 Sistemas de injeção.....	9
3 Detetores em cromatografia gasosa	11
3.1 Detetor de ionização de chama.....	11
3.2 Espectrometria de massa	12
3.2.1 Tempo de voo	12
3.2.2 Quadrupolo	13
3.2.2.1 Modos de aquisição.....	13
4 Preparação de amostra	15
4.1 Extração em fase sólida.....	15
5 Validação de método	17
5.1 Curvas de calibração	17
5.1.1 Gama de trabalho	17
5.1.2 Limite de deteção.....	17
5.1.3 Limite de quantificação.....	18
5.2 Testes de recuperação.....	18
6 Design experimental	19
7 Estado de arte	20
8 Objetivos	23
9 Parte experimental	25

9.1	Reagentes	25
9.2	Preparação de soluções.....	25
9.3	Parâmetros cromatográficos de GC-FID	26
9.4	Otimização de parâmetros de injeção para GC/TOFMS	26
9.5	Extração de PAHs por SPE	27
9.6	Preparação de amostras de lamas e águas residuais	28
9.7	Otimização de parâmetros LVI-PTV-GC/TOFMS	28
9.8	Análise por GC/MS/MS	30
9.9	Amostras dopadas	31
9.10	Amostras reais de água.....	31
10	Resultados e discussão.....	35
10.1	Ordem de eluição da mistura de PAHs.....	35
10.2	Diferenças na geometria do <i>liner</i> e otimização dos parâmetros de injeção no modo <i>splitless</i>	35
10.3	Presença de PAHs em diferentes tipos de matrizes.....	37
10.4	Otimização de parâmetros LVI-PTV-GC/TOFMS	39
10.5	Análise por GC/MS/MS	41
10.6	Desempenho do modo de MRM	44
10.6.1	Testes de recuperação	46
10.6.2	Amostras reais.....	48
10.7	Retrospectiva.....	48
11	Conclusões e trabalho futuro.....	51
12	Bibliografia	53
13	Anexos	59

Índice de figuras

Figura 1.1- Estruturas moleculares do a) naftaleno e b) benzo[<i>a</i>]pireno.	1
Figura 1.2- Fontes responsáveis pela libertação de PAHs para o meio ambiente.	2
Figura 1.3- Efeitos nocivos da exposição pontual e prolongada aos PAHs.	3
Figura 1.4- Representação das estruturas moleculares dos 16 PAHs considerados como prioritários pela USEPA, com as abreviaturas e classificações da IARC.	4
Figura 2.1- Tempos de eluição medidos no cromatograma. ¹⁴	7
Figura 2.2- Esquema de um cromatógrafo gasoso. ²⁰	8
Figura 2.3- Gráfico da temperatura do forno e do injetor durante a técnica LVI-PTV <i>solvent split</i> . ²¹	10
Figura 3.1- Corte transversal de um FID adaptado de ²⁶	11
Figura 3.2- Diagrama com os principais componentes de um espectrómetro de massa. ²⁶	12
Figura 3.3- Esquema de um TOF equipado com um refletor. ²⁸	13
Figura 3.4- Esquema de um triplo quadrupolo. ³¹	14
Figura 4.1- Esquema geral para o procedimento de SPE. ³⁴	16
Figura 9.1- Fluxograma seguido durante a preparação das soluções-padrão.	26
Figura 9.2-a) <i>Liner</i> de precisão com lã de vidro de diâmetro interno de 4,0 mm, de comprimento de 78,5 mm e de diâmetro exterior de 6,3 mm. b) <i>Liner</i> de cone único com lã de vidro de diâmetro interno de 4,0 mm, de comprimento de 78,5 mm e de diâmetro exterior de 6,5 mm.	27
Figura 9.3- Rampas de temperatura utilizadas no forno e no injetor.	29
Figura 9.4- Rampa de temperatura utilizada no forno.	30
Figura 9.5- Mapa com as origens das amostras de água canalizada.	31
Figura 9.6- Sumário do procedimento e resultados desta dissertação.	33
Figura 10.1-a) Cromatograma da injeção da amostra padrão da mistura de PAHs de 10 ppm. b) Cromatograma da injeção da amostra padrão de BaP de 10 ppm. As abreviaturas utilizadas na legenda estão na Figura 1.4. Os dois cromatogramas foram obtidos no sistema GC-FID.	35
Figura 10.2- Áreas dos picos da amostra-padrão da mistura de PAHs com 2 ppm de concentração. As análises foram efetuadas em duas semanas diferentes e em que na injeção da 2ª semana foi utilizado um septo novo. Os parâmetros cromatográficos foram os indicados na condição 1 da Tabela 9.1. As barras azuis correspondem aos PAHs de	

baixa massa molecular (LPAHs) e as de cor de laranja correspondem aos PAHs com elevada massa molecular (HPAHs).....	36
Figura 10.3- Áreas dos picos da amostra-padrão da mistura de PAHs com 2 ppm de concentração. Os parâmetros cromatográficos estão mencionados na Tabela 9.1. As barras azuis correspondem aos PAHs de baixa massa molecular (LPAHs) e as de cor de laranja correspondem aos PAHs com elevada massa molecular (HPAHs).....	37
Figura 10.4- Cromatograma em FS da solução-padrão da mistura de PAHs a 10 ppm. As abreviaturas utilizadas na legenda estão na Figura 1.4.....	41
Figura 10.5- Espectro de massa do composto BaP obtido a partir do FS da solução padrão da mistura de PAHs a 10 ppm.....	42
Figura 10.6- Esquema triplo quadrupolo, com a indicação da localização do Q0. ³¹	46
Figura 10.7- Cromatograma da transição 128 → 127 na janela temporal do Nap (Tabela 10.4) das amostras spike. 1. Amostra <i>spike 1</i> (20 µL); 2. Amostra <i>spike 2</i> (20 µL); 3. Amostra <i>spike 3</i> (100 µL); 4. Amostra <i>spike 4</i> (100 µL).....	47
Figura 10.8- Cromatograma da transição 252 → 251 na janela temporal do BaP (Tabela 10.4) da amostra real de Almada.	48
Figura A. 1- Cromatograma de ião extraído (XIC) para o ião 252 com a comparação dos picos de BaP entre as Semana 1 (azul) e 2 (verde).	59
Figura A. 2- <i>Liner</i> de precisão trocado. Este <i>liner</i> possuía bastante sujidade durante o momento da troca.	59
Figura A. 3 Cromatograma de ião extraído (XIC) para o ião 252 com a comparação dos picos de BaP entre as Condições 1 (azul) e 2 (verde).....	60
Figura A. 4- Cromatograma de ião extraído (XIC) para o ião 252 com a comparação dos picos de BaP entre as Condições 3 (azul) e 4 (verde).....	60
Figura A. 5- Cromatograma da transição 252 → 251 na janela temporal do BaP (Tabela 9.3) da amostra padrão 200 ppb.	62
Figura A. 6- Cromatograma total da amostra <i>spike 1</i> com os picos dos padrões interno C ₂₁ e C ₃₃ realçados.....	62

Índice de Tabelas

Tabela 1.1- Valores paramétrico dos PAHs, em águas próprias para consumo. ¹¹	5
Tabela 6.1 Exemplo de um diagrama de Plackett-Burman.	19
Tabela 7.1- Métodos aprovadas pela EPA para a determinação de PAHs em águas para consumo. ³⁹ .	20
Tabela 9.1- Condições de injeção utilizadas.	27
Tabela 9.2- Diagrama de Packett-Burman com os parâmetros utilizados em cada experiência.	30
Tabela 10.1- PAHs detetados nas matrizes testadas.....	38
Tabela 10.2- Parâmetros mais adequados para cada composto. O sinal indica se o valor de alto ou baixo nível é o mais adequado para um determinado parâmetro.....	40
Tabela 10.3- Resultados do <i>screening</i> para os parâmetros estudados de LVI-PTV.....	41
Tabela 10.4- Parâmetros otimizados para MRM para os analitos.....	43
Tabela 10.5- Parâmetros de MRM para os padrões internos.....	44
Tabela 10.6- Número de pontos, LODs, LOQs obtidos a partir da tentativa de construção de uma reta de calibração para os iões quantificadores e qualificadores.	45

Lista de abreviaturas

Abreviatura	Significado
Ace	Acenafteno
Acy	Acenaftileno
ADN	Ácido desoxirribonucleico
Ant	Antraceno
BaA	Benzo[<i>a</i>]antraceno
BaP	Benzo[<i>a</i>]pireno
BbF	Benzo[<i>b</i>]fluoranteno
BghiP	Benzo[<i>g,h,i</i>]perileno
BkF	Benzo[<i>k</i>]fluoranteno
C ₂₁	Heneicosano
C ₃₃	Tritriacontano
CEN	Comité Europeu de Estandarização
Chr	Criseno
CID	Camara de colisão
DBahA	Dibenz[<i>a,h</i>]antraceno
DoE	<i>Design</i> experimental
E _{colisão}	Energia de colisão
EI	Impacto eletrónico
E _{kin}	Energia cinética
FID	Detetor de ionização de chama
FL	Fluorescência
Fla	Fluoranteno
Flu	Fluoreno
Fosfato	Fosfato de tri- <i>p</i> -cresilo
FS	<i>Full scan</i>
GC	Cromatografia gás-líquido
HPAHs	PAHs de elevada massa molecular
HPLC	Cromatografia líquida de alta pressão
IARC	<i>International Agency for Research on Cancer</i>
IcdP	Indeno[1,2,3- <i>c,d</i>]pireno
ISO	<i>International Organization for Standardization</i>
LC	Cromatografia líquida
LLE	Extração líquido-líquido
LOD	Limite de deteção
LOQ	Limite de quantificação
LPAHs	PAHs de baixa massa molecular
LSE	Extração sólido-líquido
LVI	Injeção de grande volume
<i>m/z</i>	Relação massa-carga
MMI	Injetor de múltiplos modos
MRM	Monitorização de reações múltiplas

MS	Espectrometria de massa
Nap	Naftaleno
NIOSH	<i>National Institute for Occupational Safety and Health</i>
PAHs	Hidrocarbonetos poliaromáticos
Phe	Fenantreno
pMRM	Pseudo MRM
p_{purga}	Pressão da purga
PTV	Vaporização a temperatura programada
Pyr	Pireno
QqQ	Triplo quadrupolo
r^2	Coefficiente de determinação
S/N	Razão sinal-ruído
SIM	Monitorização de íão selecionado
SPE	Extração em fase sólida
SRM	Monitorização de reação selecionada
t'_R	Tempo de retenção ajustado
T_{fonte}	Temperatura da fonte de ionização
$T_{i \text{ inlet}}$	Temperatura inicial do injetor
t_M	Tempo morto
TOF	Tempo de voo
t_{purga}	Tempo de purga
t_R	Tempo de retenção total
$t_{\text{splitless}}$	Tempo de <i>splitless</i>
USEPA	<i>US Environmental Protection Agency</i>
UV	Ultravioleta
v	Velocidade
XIC	Cromatograma de íão extraído

1 Hidrocarbonetos poliaromáticos

1.1 Características

Os hidrocarbonetos poliaromáticos (PAHs) são compostos orgânicos constituídos, no mínimo, por dois anéis aromáticos entreligados sob diversas configurações estruturais, não possuindo qualquer substituinte e heteroátomo. Consoante o número de anéis benzênicos presentes na estrutura, estes podem classificar-se como PAHs de baixa massa molecular (dois a três anéis, LPAHs) (Figura 1.1 a) e PAHs de elevada massa molecular (no mínimo quatro anéis, HPAHs) (Figura 1.1 b).

Estes compostos orgânicos caracterizam-se pelas baixas pressões de vapor e alta hidrofobicidade. Com o aumento da massa molecular e a respetiva diminuição da pressão de vapor e solubilidade em água, maior será a resistência à sua biodegradação e conseqüente bioacumulação.¹ Adicionalmente, estes analitos são sensíveis à luz, resistentes ao calor e à corrosão. São compostos que possuem condutividade e capacidade de emissão de fluorescência.²⁻⁴

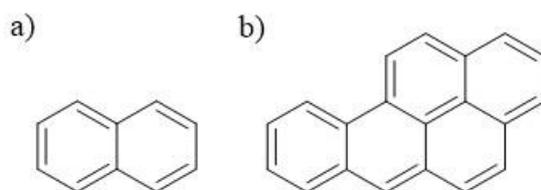


Figura 1.1- Estruturas moleculares do a) naftaleno e b) benzo[a]pireno.

Os PAHs são considerados poluentes uma vez que as suas propriedades físico-químicas favorecem a toxicidade, bioacumulação e persistência no meio ambiente. São também compostos transportados facilmente na atmosfera, redes de água e cadeias alimentares. A presença destes poluentes no ar pode estar relacionada com a adsorção pelas partículas que os transportam, dependendo das condições atmosféricas, características das partículas e de cada PAH. Os PAHs de baixa massa molecular são mais voláteis, o que contribui para a sua presença maioritária na fase de vapor. Estes compostos podem também reagir com outros poluentes, aumentando a toxicidade dos derivados resultantes. Os PAHs são introduzidos na atmosfera como produtos secundários de processos de combustão tais como, incêndios florestais, processos industriais e emissões provenientes de veículos motorizados a combustão, entre outros. (Figura 1.2).²

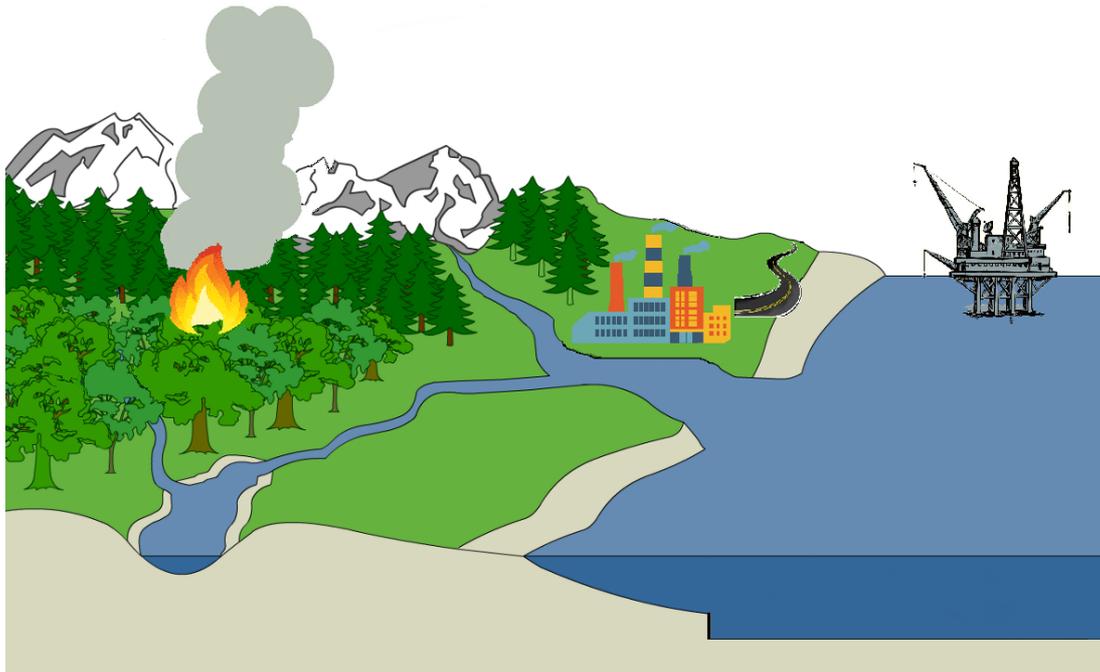


Figura 1.2- Fontes responsáveis pela libertação de PAHs para o meio ambiente.

A presença de PAHs nas águas de rios deve-se à libertação de águas residuais municipais e industriais que contêm diversos tipos de contaminantes orgânicos, para o ambiente.⁵ Por outro lado, os PAHs de elevada massa molecular são menos solúveis em água, tendo como consequência a sua agregação a solos e sedimentos.⁶ Também é possível detetá-los em águas para consumo, sendo estes compostos também provenientes do revestimento dos canos de distribuição, que, até recentemente, era feito com alcatrão.⁷ Ao longo dos anos, a sua deterioração promoveu a presença de níveis elevados de benzo[*a*]pireno (BaP). É de salientar que hoje em dia, este tipo de revestimento é proibido.⁷

A exposição humana a estes compostos decorre pela inalação de partículas ou ingestão de alimentos e água, sendo esta a principal via de exposição. Normalmente, as contaminações nos vegetais ocorrem durante a sua produção, em terrenos agrícolas, onde são usados lamas e efluentes de estações de tratamentos de água residuais para fertilização e irrigação. Se as lamas e efluentes contiverem PAHs, contaminar-se-á o terreno e as culturas agrícolas.¹

A contaminação dos alimentos de origem marinha é feita por intermédio de águas contaminadas. A sua presença pode ter origem na preparação dos alimentos, principalmente quando cozinhados sobre uma chama. O contacto entre a chama e o alimento promove a reação de pirólise, formando PAHs, que ficam depositados.¹ Durante a ingestão dos alimentos contaminados, os PAHs serão absorvidos pelos consumidores.

Os PAHs podem ser classificados em três categorias de acordo com o seu processo de formação:⁸

- Petrogénicos: subprodutos da formação de petróleo;
- Pirogénicos: combustão incompleta de matéria orgânica, a altas temperaturas;
- Biogénicos: transformação de matéria orgânica realizada por plantas, algas e microrganismos.

Os efeitos da exposição dos PAHs na saúde dependem do período e via de exposição, concentração e toxicidade de cada contaminante. A exposição pontual (Figura 1.3, a laranja) a altos níveis de diferentes PAHs pode provocar irritação ocular e cutânea, vômitos, diarreia e tonturas. No entanto, a exposição prolongada (Figura 1.3, a azul) pode provocar falhas no sistema imunológico, cataratas, danos renais e hepáticos, problemas respiratórios e mutações que podem levar ao aparecimento de cancro. Estes compostos ocorrem em misturas complexas que contêm centenas de diferentes PAHs, pelo que se desconhece ainda em rigor quais os componentes responsáveis pelos problemas causados. Os metabólitos reativos destes contaminantes podem ligar-se a proteínas e ao ADN (ácido desoxirribonucleico) provocando danos celulares e/ou mutações que podem formar tumores.⁴

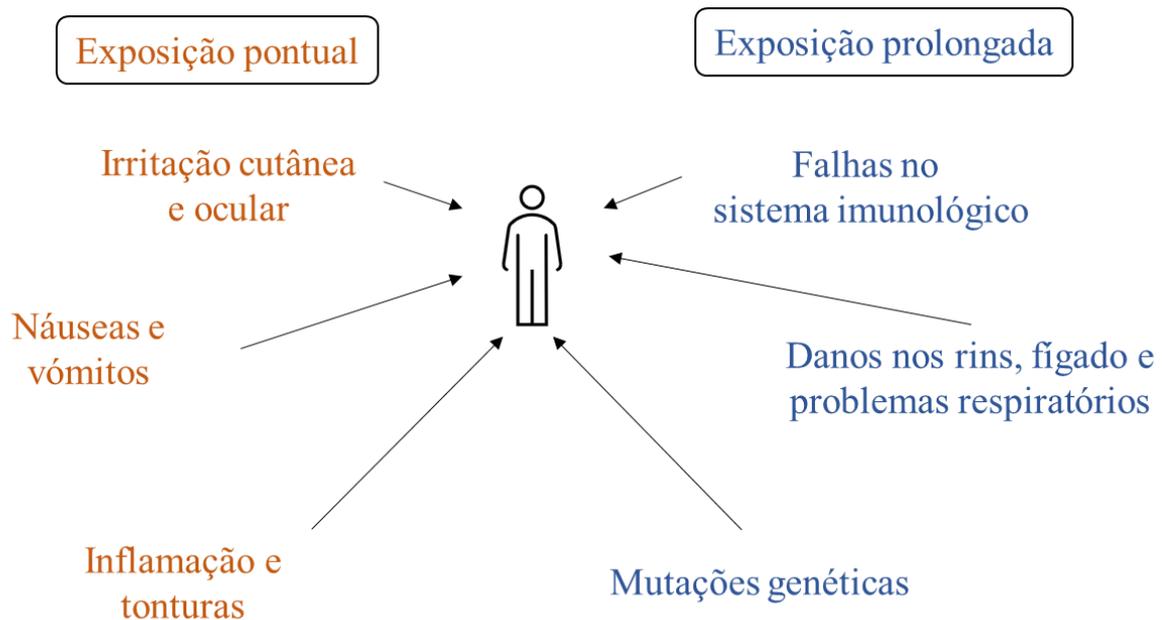


Figura 1.3- Efeitos nocivos da exposição pontual e prolongada aos PAHs.

1.2 Legislação sobre os PAHs

Organizações e agências governamentais recomendam a vigilância dos PAHs, devido aos seus efeitos nocivos para a população. Em 1976, a *US Environmental Protection Agency* (USEPA) sinalizou 16 compostos presentes na Figura 1.4, como PAHs prioritários para vigilância. Estes compostos foram aceites como representantes de todos os PAHs.⁹ A IARC (do inglês, *International Agency for Research on Cancer*) classificou alguns PAHs como sendo possível e provavelmente compostos carcinogénicos e afirmou o BaP como um composto carcinogénico (Figura 1.4).¹⁰

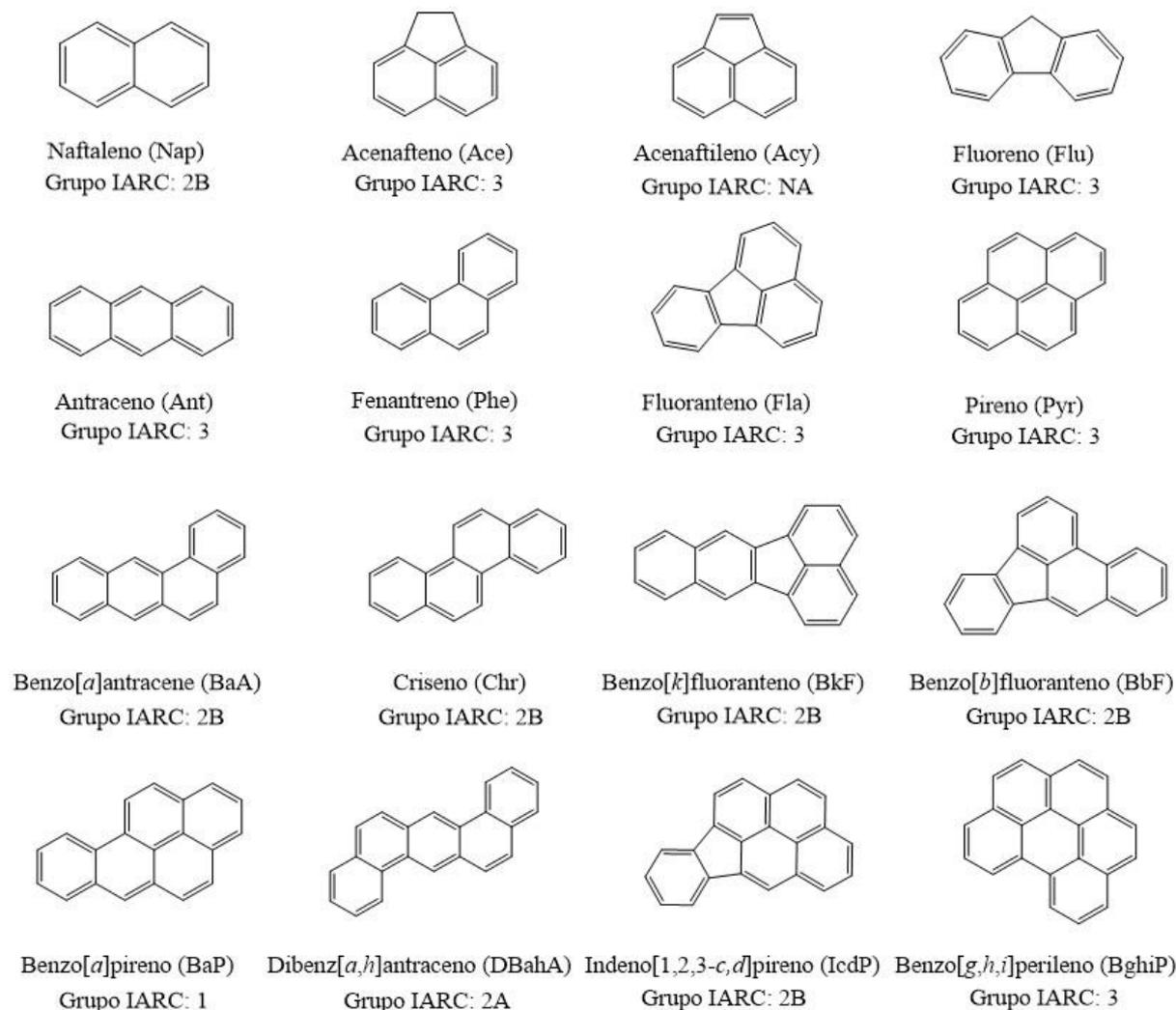


Figura 1.4- Representação das estruturas moleculares dos 16 PAHs considerados como prioritários pela USEPA, com as abreviaturas e classificações da IARC*.

Em dezembro de 2020 foram publicadas novas diretivas que estabelecem valores paramétricos para compostos relevantes, com intuito de proteger a saúde pública dos efeitos nocivos, causados pela contaminação de água destinada ao consumo. Adicionalmente foram estipulados limites para a concentração de BaP e para a soma das concentrações de BbF, BkF, BghiP e IcdP, assim como a necessidade de incerteza de medição (Tabela 1.1). É de frisar que esta diretiva ainda não se encontra transporta para a lei portuguesa, sendo que se encontra no prazo de transposição à data de escrita desta dissertação.

* Grupos IARC: Grupo 1- Carcinogénico para humanos; Grupo 2A- Provavelmente carcinogénico para humanos; Grupo 2B- Possivelmente carcinogénico para humanos; Grupo 3- Não classificável quanto à sua carcinogenicidade para humanos; NA- Não avaliado quanto à sua carcinogenicidade para humanos.

Tabela 1.1- Valores paramétricos dos PAHs, em águas próprias para consumo.¹¹

Substância	Valor paramétrico (ppb)	Incerteza de medição (%)
BaP	0,01	0,005
PAHs	0,1 ^{a)}	0,04 ^{b)}

a) Soma das concentrações de BbF, BkF, IcdP e BghiP.

b) Aplicam-se às substâncias individuais (BbF, BkF, IcdP e BghiP).

2 Cromatografia

2.1 Generalidades

A cromatografia é um método físico de separação de componentes de uma mistura. A separação ocorre durante a distribuição das moléculas entre duas fases: a fase estacionária e a fase móvel.¹² Esta pode ser classificada de acordo com o estado físico das fases utilizadas. No caso de uma fase móvel gasosa e de uma fase estacionária sólida ou líquida, o método de separação é referido como cromatografia gás-sólido ou cromatografia gás-líquido (GC), respetivamente. Se a fase móvel for líquida, a cromatografia é denominada de cromatografia líquida (LC). Quando se recorre a colunas com partículas pequenas e altos níveis de pressão, estamos a utilizar o método de cromatografia líquida de alta pressão, também designado de alto desempenho ou eficiência (HPLC).^{12,13}

Toda a informação obtida a partir de um processo cromatográfico está presente num cromatograma (Figura 2.1). Este apresenta-se sob a forma de um gráfico da resposta do detetor em função do tempo.

A posição no eixo das abcissas num cromatograma é caracterizado pelo tempo de retenção total (t_R) que é constituído por duas componentes: tempo morto (t_M) e tempo de retenção ajustado (t'_R), pelo que:

$$t_R = t_M + t'_R \text{ Equação 2-1}$$

onde, t_M é o tempo requerido para que um composto, que não interaja com a fase estacionária elua e t'_R corresponde ao tempo em que as moléculas estão a interagir com a fase estacionária. Essencialmente, o tempo de retenção total é o tempo decorrido entre a entrada na coluna e a deteção.^{12,13}

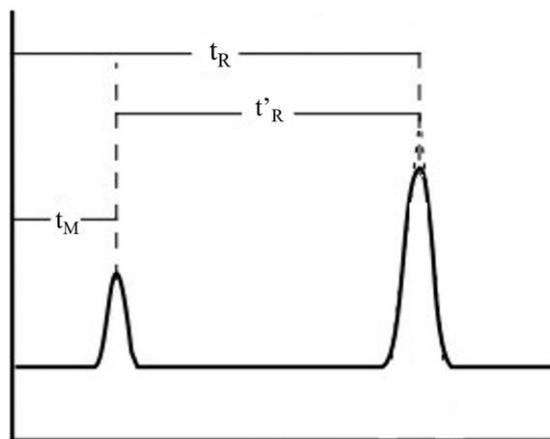


Figura 2.1-Tempos de eluição medidos no cromatograma.¹⁴

2.2 Cromatografia gasosa

Em GC, a separação dos componentes é possível se a sua pressão vapor e/ou a intensidade das suas interações com a fase estacionária forem diferentes. Além disso, é necessário que os componentes sejam voláteis à temperatura de trabalho e que não sejam termolábeis à temperatura a que são expostos no injetor e na coluna. Os componentes não voláteis são passíveis de análise por GC mediante processos de derivatização, convertendo estes compostos não voláteis em derivados voláteis.^{15,16}

O cromatógrafo gasoso é constituído por uma fonte de gás inerte (gás vetor), injetor de amostra, uma coluna, um forno, um detetor e um sistema de dados para armazenar e apresentar cromatogramas (Figura 2.2).¹⁷

Em geral, a fase estacionária em GC capilar reveste as paredes internas de um tubo aberto de sílica fundida que é coberta exteriormente por uma resina de poliimida que lhe confere resistência e flexibilidade mecânicas. As colunas capilares possuem diâmetros internos entre 0,1 e 0,5 mm e, em geral, comprimentos de 10 a 100 m. A fase estacionária líquida pode ter espessuras de filme entre 0,1 e 0,5 μm . Apenas ocorre a separação dos compostos-alvo caso as suas pressões vapor e/ou as intensidades das suas interações com a fase estacionária forem diferentes. Geralmente, as fases estacionárias não polares são adequadas para separar solutos não polares e, fases polares para moléculas polares.¹⁸

A fase móvel é um gás que não reage com a fase estacionária nem com os diferentes componentes da amostra, denominado de gás de arraste ou vetor. Este encontra-se normalmente num cilindro pressurizado. A principal função do gás de arraste é transportar os componentes da amostra ao longo da coluna. Os gases de arraste mais utilizados são hidrogénio, hélio e azoto.^{16,19}

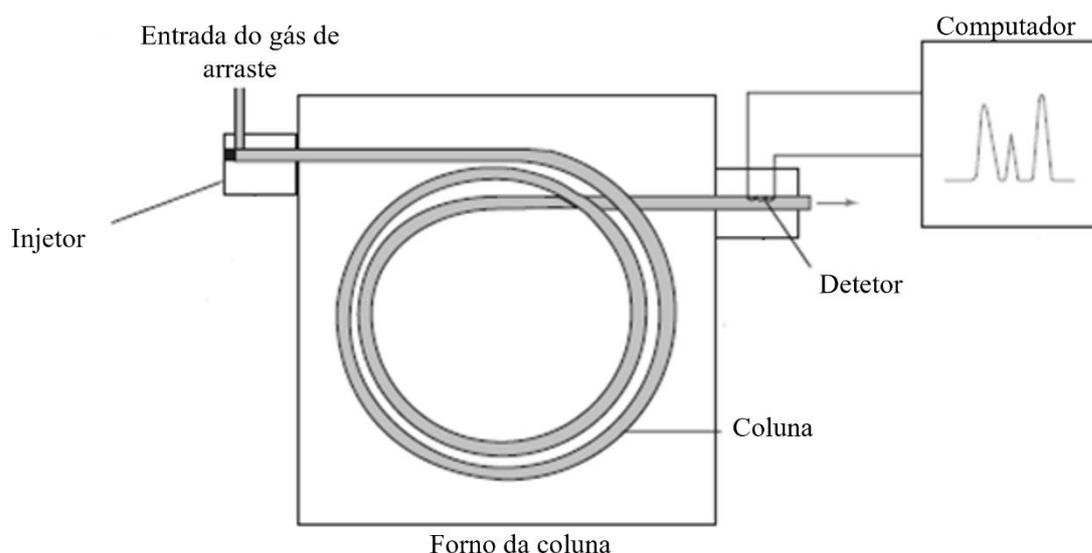


Figura 2.2- Esquema de um cromatógrafo gasoso.²⁰

2.2.1 Sistemas de injeção

Para que ocorra cromatografia em fase gasosa é necessário que os constituintes da amostra passem à fase de vapor. Assim, a vaporização da amostra ocorre num tubo protetor de vidro (*liner*). Estes podem também ser constituídos por quartzo e possuir lã de vidro no seu interior. Existem diversas geometrias de *liners*, dependendo da técnica e tipo de injeção a ser utilizada. A escolha do *liner* pode influenciar o desempenho da cromatografia, na forma dos picos, na sensibilidade e na reprodutibilidade da análise.²¹

Existem vários sistemas de introdução de amostras tais como: injeção com repartição (mais conhecida como *split*), injeção sem repartição (*splitless*) e injeção sob vaporização a temperatura programada (denominada de PTV), entre outros.¹⁵

O injetor de *split/splitless* é constituído por um bloco de aquecimento que o aquece a uma determinada temperatura e a mantém; um *liner* de quartzo; um septo que tem como função selar o interior do injetor e permite que a seringa injete a amostra líquida no *liner* e, por fim, uma válvula de *split*.

Em modo *split*, a válvula encontra-se aberta, fazendo com que apenas uma fração da amostra chegue à coluna. Normalmente usam-se razões de repartição entre 1:10 e 1:100. No entanto, na injeção *splitless* esta válvula encontra-se fechada no ato da injeção e por um período determinado de tempo, que é otimizado caso a caso, pelo que a totalidade da amostra chega à coluna. No final da injeção, a válvula abre-se para purgar o material residual.

O sistema de PTV é semelhante ao injetor de *split/splitless*, no entanto, tem como vantagem a possibilidade de utilização de um programa de aquecimento dentro do próprio injetor, permitindo gradientes balísticos de temperatura, desde a temperatura ambiente até 400°C ou superior dependendo do desenho do injetor.^{22,23}

A injeção de grande volume (LVI) consiste na introdução de maiores quantidades de amostra até 100 µL de volume. Este método de injeção é adequado para análise vestigial pois permite obter maior sensibilidade e reduz a necessidade de concentrar extratos.²¹ Em conjunto com o PTV, pode ser usada a técnica de *solvent split* (repartição de solvente) de forma a mitigar a quantidade de solvente que é introduzido no sistema cromatográfico.

O procedimento envolve 3 passos – injeção, *solvent venting* e transferência em *splitless* (Figura 2.3). Durante a injeção, a purga encontra-se aberta e a temperatura do PTV está no ponto de ebulição do solvente. O solvente evapora e abandona o sistema, enquanto os analitos voláteis ficam retidos no *liner*. Depois da eliminação de solvente, a purga fecha e inicia-se o aquecimento balístico do injetor, onde os analitos são transferidos do *liner* para a coluna, em modo *splitless*. Depois da transferência dos analitos, a purga é reaberta para remover o vapor de solvente residual e compostos da matriz com elevado ponto de ebulição.²⁴

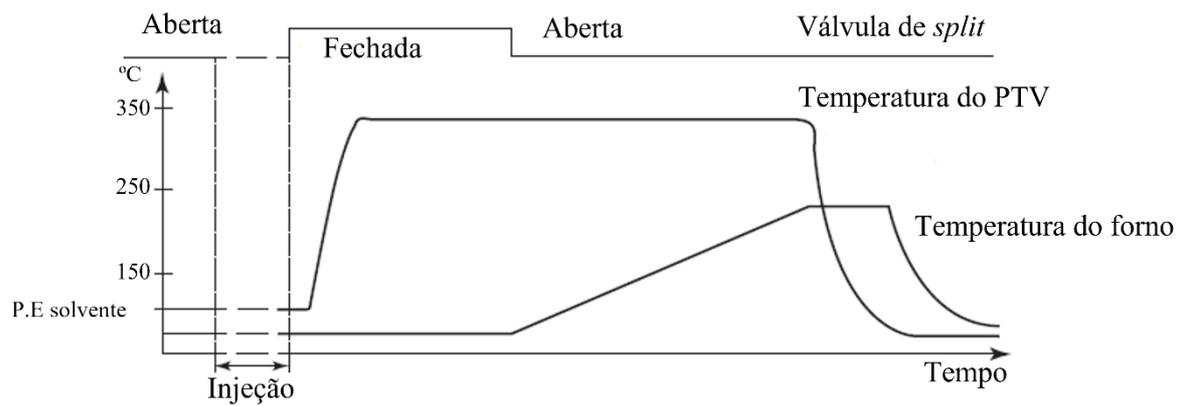


Figura 2.3- Gráfico da temperatura do forno e do injetor durante a técnica LVI-PTV *solvent split*.²¹

3 Detetores em cromatografia gasosa

Os detetores são responsáveis por gerar um sinal em resposta à eluição de um componente. O detetor encontra-se diretamente ligado à saída da coluna, podendo ser classificados quanto à sua especificidade como universal, se detetar todos ou a maioria dos compostos que eluem e, como seletivo se apenas detetar uma classe específica de compostos. Podem ser sensíveis à massa ou concentração. Detetores sensíveis à massa caracterizam-se por responder à massa do analito em função do tempo, enquanto os detetores sensíveis à concentração respondem em função da concentração do analito. Além disso, podem também ser classificados em função da sua destrutividade dos analitos. Detetores destrutivos destroem ou alteram quimicamente os compostos, e, detetores não destrutivos mantêm a amostra intacta após a sua análise.²⁵

3.1 Detetor de ionização de chama

O detetor de ionização de chama (FID) (Figura 3.1) é caracterizado por possuir baixos limites de detecção, estabilidade a longo prazo, ser fácil de operar e conseguir detetar quase todos os compostos orgânicos. É um detetor dependente do fluxo de massa. A sua resposta é proporcional à massa de carbono que chega ao detetor por unidade de tempo.¹⁷

O sinal do FID resulta da combustão dos compostos orgânicos numa chama. O gás de arraste da coluna é misturado com hidrogénio e queimado num orifício estreito de uma câmara, na presença de um fluxo de ar. Um eléctrodo coletor encontra-se acima da chama e tem como função recolher os iões formados durante a combustão. Em virtude da recolha destes iões, gera-se uma corrente eléctrica que é ampliada e digitalizada.¹⁷

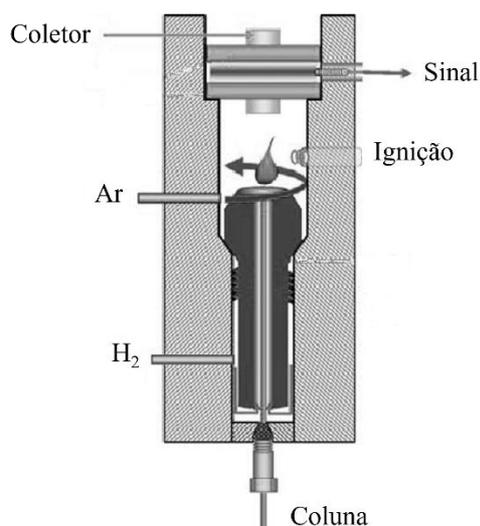


Figura 3.1- Corte transversal de um FID adaptado de ²⁶.

3.2 Espectrometria de massa

O princípio da espectrometria de massa (MS) baseia-se na formação de iões com o objetivo de os separar através da sua relação massa-carga (m/z) e detetá-los quantitativa e qualitativamente pelo seu respetivo m/z e abundância.²⁷

Um espectrómetro de massa é constituído pela introdução de amostra, fonte de ionização, analisador de massa, detetor e sistema de dados que recolhe e processa os dados oriundos do detetor (Figura 3.2). Em sistemas GC/MS há transporte contínuo de compostos pelo gás de arraste para dentro da fonte de ionização. A ionização por impacto eletrónico (EI) é o processo mais comum de ionização de amostra.^{21,27}

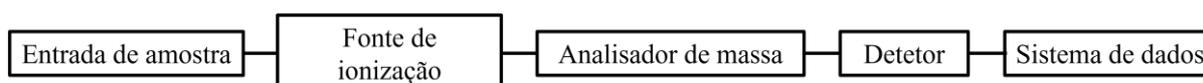


Figura 3.2- Diagrama com os principais componentes de um espectrómetro de massa.²⁶

3.2.1 Tempo de voo

Na análise de massa por tempo de voo (TOF) (Figura 3.3), um pulso de iões é acelerado por uma energia cinética constante (E_{kin}) e os iões deslocam-se pelo tubo de voo.

$$E_{kin} = v^2 \times \frac{m/z}{2} \text{ Equação 3.1}$$

Ao assumir que o ião se encontra em repouso no momento inicial pode-se reorganizar a Equação 3.1:

$$v = \sqrt{\frac{2E_{kin}}{m/z}} \text{ Equação 3.2}$$

Os iões adquirem uma velocidade característica (v), inversamente proporcional à raiz quadrada do seu m/z , chegando ao detetor em tempos diferentes.²⁸ O m/z de um ião é determinado a partir do tempo que este demorou a chegar ao detetor. Iões de igual massa podem chegar ao detetor em tempos diferentes, devido à propagação da energia cinética nos iões, diminuindo assim, a resolução da massa. A solução para este problema é a instalação de um refletor que minimiza a propagação da energia cinética. O refletor é um espelho de iões que consiste numa série de lentes e fornece uma compensação nos tempos de voo dos iões com igual m/z , ao pará-los no campo elétrico de abrandamento e empurrando-os de volta na direção do detetor. Iões de maior energia com o mesmo m/z penetram mais profundamente dentro do espelho, sendo deste modo, a propagação reduzida e a resolução melhorada. Em virtude dos refletores, a sensibilidade de um TOF em *full scan* (varrimento total) é alta.^{21,29}

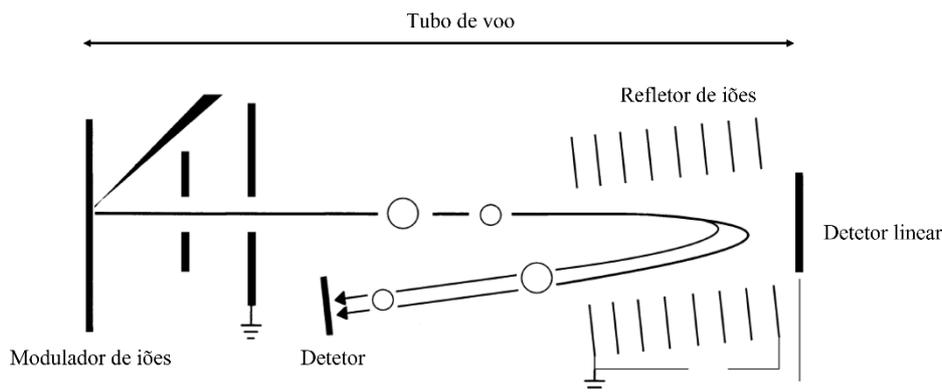


Figura 3.3- Esquema de um TOF equipado com um refletor.²⁸

3.2.2 Quadrupolo

Um quadrupolo consiste em 4 hastes cilíndricas paralelas entre si, encontrando-se eletricamente ligadas a uma fonte de tensão constituída por uma componente de corrente contínua e outra componente de radiofrequência. As voltagens aplicadas a cada conjunto de hastes paralelas têm sinais opostos com a mesma magnitude. O campo elétrico formado pelas hastes desvia os íons em trajetórias complexas, à medida que íons migram desde a fonte de ionização em direção ao detector. O movimento de um íon no campo elétrico depende do seu m/z e das tensões aplicadas. Apenas íons com determinada m/z terão trajetórias estáveis e chegarão ao detector. Ao variar as tensões é possível selecionar íons de diferentes massas que podem alcançar o detector.^{18,29}

3.2.2.1 Modos de aquisição

Neste analisador de massa existem três modos de aquisição diferentes – *full scan* (FS), monitorização de íon selecionado (SIM) e monitorização de reação selecionada (SRM), caso se trate de um triplo quadrupolo –, que de resto são dois quadrupolos em série interpolados por uma câmara de colisão e daí a designação de triplo quadrupolo (como se descreve abaixo).

Em modo FS, o espectro de massa é repetitivamente medido entre duas massas extremas (p.e., entre 40 e 600 Da) continuamente, ao longo de toda a corrida cromatográfica. O modo FS e a monitorização dos tempos de retenção permitem a identificação tentativa dos analitos, pela comparação com bibliotecas de espectro de massas. Quando se opera em FS, apenas um m/z é medido ao longo do varrimento (*scan*), tornando-se necessário vários *scans* para a deteção total de todos os íons. Por este motivo, a sensibilidade da análise é menor quando comparada com SIM, sendo este modo insuficiente para análise vestigial.^{21,30}

O modo SIM é usado exclusivamente para a quantificação de compostos-alvo. Os íons são previamente selecionados numa determinada janela temporal, tornando a deteção seletiva para os analitos desejados. As intensidades relativas dos íons selecionados servem como critério de identificação.^{21,29}

O modo de SRM requer o uso de um instrumento de espectrometria de massa em *tandem*. Um equipamento frequentemente usado é o triplo quadrupolo (QqQ) (Figura 3.4). Este é constituído por várias unidades de quadrupolo em sequência.

Os iões entram no primeiro quadrupolo (Q1), onde o ião é selecionado (ião precursor) e passa para o segmento seguinte. Ao entrar célula de colisão (Q2, CID), os iões colidem com moléculas de gás (p.e., árgon, azoto) e fragmentam-se, dando origem aos iões produto. Estes migram para o Q3, onde ocorre a seleção do ião produto-alvo que, por sua vez, chega ao detetor.²¹

Se este modo for aplicado para monitorizar vários iões produto originados pelo mesmo ião precursor o modo é designado por monitorização de reações múltiplas (MRM).

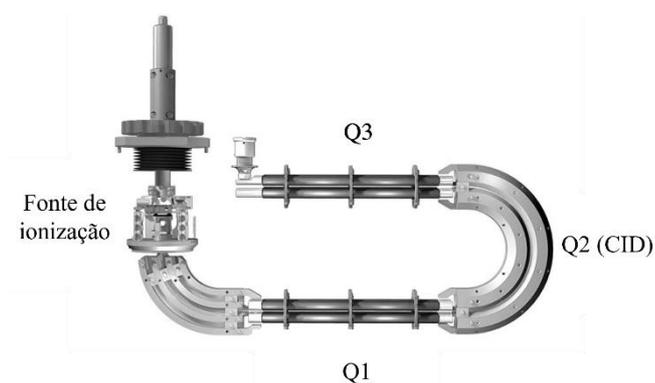


Figura 3.4- Esquema de um triplo quadrupolo. ³¹

4 Preparação de amostra

A preparação de amostra é um processo de transformação de uma amostra para torná-la adequada para uma análise química ou para melhorar o desempenho do processo analítico. Esta ação é necessária para uma análise quando uma dada amostra não pode ser analisada diretamente ou para otimizar a obtenção de baixos níveis de concentração. A preparação de amostra pode ser realizada apenas nos analitos, na totalidade da matriz ou em ambos, efetuando dissolução, limpeza, concentração ou modificação química da amostra. O resultado final da preparação de amostra é uma amostra processada, representativa e fiel à matriz original, que pode ser posteriormente analisada pelo método analítico selecionado.

Este processo é caracterizado por ser demorado e afeta significativamente os resultados analíticos. Num método analítico, recorre-se ao número mínimo de operações de preparação de amostra. A realização de múltiplas operações requer tempos de processamento mais longos que conduzem a maiores fontes de erro, perdas de analitos e, conseqüentemente, a resultados analíticos menos exatos.³²

4.1 Extração em fase sólida

A extração em fase sólida (SPE) é uma técnica de preparação de amostra que consiste na utilização de uma fase sólida para reter compostos específicos de uma solução. A retenção ocorre quando é passada uma solução pela fase sólida contida num cartucho. Os compostos retidos podem ser libertados posteriormente com recurso a um eluente. Este processo é frequentemente utilizado na limpeza da amostra (*clean-up*) sendo igualmente um processo que promove a concentração dos analitos na amostra a analisar, potenciando a obtenção de baixos limites de deteção do método analítico como um todo.

O procedimento desta técnica está esquematizado na Figura 4.1 e consiste nestes cinco passos:

1. Condicionamento da fase sólida ao passar solvente adequado para a sua ativação;
2. Lavagem para remover o solvente de ativação com um solvente similar à natureza da matriz da amostra;
3. Carregamento da amostra. Neste passo os componentes da amostra ficam retidos na fase estacionária, que surge como um sólido;
4. Lavagem para remover os compostos interferentes retidos no passo anterior com um solvente que não remove os analitos;
5. Eluição dos analitos com o solvente apropriado;

Apesar de este procedimento ser o mais comum para SPE, a natureza do analito, amostra e natureza dos cartuchos de SPE bem como das fases estacionárias determinam quais os solventes que devem ser usados.^{15,33}

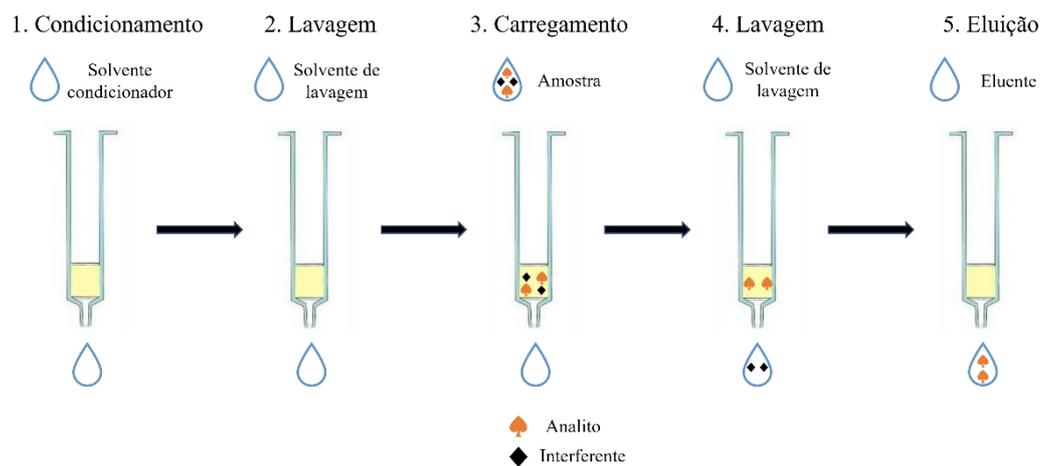


Figura 4.1- Esquema geral para o procedimento de SPE.³⁴

5 Validação de método

Durante o desenvolvimento do método é selecionada uma metodologia, baseada na literatura ou num método já conhecido. Após a seleção dos parâmetros e da sua otimização, o método é então validado para assegurar que é adequado ao fim pretendido.³⁵

5.1 Curvas de calibração

Em análises quantitativas, a utilização de curvas de calibração é determinante para a o cálculo de concentrações desconhecidas de um dado composto, numa amostra. A curva de calibração tem de ser linear, ao longo de toda a gama de trabalho, de forma que a resposta do equipamento seja proporcional à concentração do analito.

Na construção de curvas de calibração são preparadas, no mínimo, cinco soluções-padrão, com concentrações conhecidas. Os resultados obtidos permitem a construção de um gráfico correspondente à curva calibração, com a resposta do equipamento em função da concentração.

Para o tratamento matemático dos resultados recorre-se a regressões lineares, cuja forma algébrica é $y = mx + b$, onde m representa o declive da reta (traduzindo igualmente a sensibilidade do método) e b , a ordenada na origem. A partir da reta é calculado o coeficiente de determinação (r^2), parâmetro usado para avaliar a linearidade dos dados. O valor de r^2 deve ser superior a 0,995.^{35,36}

5.1.1 Gama de trabalho

A gama de trabalho é o intervalo de concentrações do analito que cumpre os requisitos de linearidade, exatidão e precisão. É calculada a partir da curva de calibração pelo teste de homogeneidade de variâncias.

As variâncias são testadas com recurso ao cálculo do valor teste PG, cujo valor é comparado com o valor tabulado da distribuição F de Snedecor/Fisher. Se $PG \leq F$, as diferenças de variâncias não são significativas, o que se traduz numa gama de trabalho ajustada. Caso contrário a gama de trabalho deverá ser reajustada.^{35,36}

5.1.2 Limite de deteção

O limite de deteção (LOD) corresponde à quantidade mínima de analito que pode ser detetada, mas não quantificada como valor exato. Este calcula-se a partir da equação:

$$LOD = \frac{3,3 \times S_{y/x}}{m} \text{ Equação 5.1}$$

Onde $S_{y/x}$ corresponde ao desvio-padrão residual da curva de calibração e m o declive da mesma.^{35,36}

5.1.3 Limite de quantificação

Paralelamente ao limite de detecção, o limite de quantificação (LOQ) é a quantidade mínima de analito que pode ser determinada quantitativamente, com precisão e exatidão adequada. A expressão usada para calcular este limite é semelhante à Equação 5.1, no entanto:

$$LOQ = \frac{10 \times s_{y/x}}{m} \text{ Equação 5.2}$$

5.2 Testes de recuperação

Um teste de recuperação consiste na dopagem do analito, em amostras com a mesma matriz, ao longo das várias concentrações, presentes na gama de trabalho. Um método analítico pode ser considerado aplicável quando as taxas de recuperação são próximas de 100% (sendo aceites em geral valores de 70 a 120%, em que valores superiores a 100% traduzem efeitos de matriz habituais, porém aceites em amostras complexas).³⁶

6 *Design* experimental

O *design* experimental (DoE) é uma metodologia que auxilia a realização e planeamento de experiências e tem como objetivo de extrair o máximo de informação possível, com o menor número de análises. Esta metodologia ajuda na determinação de quais as variáveis que são importantes e que precisam de ser controladas, assim como as correlações entre elas com vista à otimização de um sistema com multivariáveis.³⁷

O *design* de Plackett-Burman foi estruturado para melhorar o controlo de qualidade do estudo dos efeitos dos parâmetros e auxiliar a tomada de decisões. Este *design* implica a construção de uma matriz, após serem selecionados os parâmetros e valores a serem otimizados (Tabela 1.1). Cada linha corresponde a uma experiência e cada elemento da coluna corresponde a valores de alto nível (+1) e de baixo nível (-1). A resposta instrumental das experiências para cada analito é colocada na matriz e é seguido pelo cálculo dos efeitos de cada parâmetro e posteriormente escolhidos os parâmetros e valores mais adequados.³⁸

Tabela 6.1 Exemplo de um diagrama de Plackett-Burman.

Experiência	X1	X2	X3	X4	X5
1	-1	-1	1	-1	1
2	1	-1	-1	-1	-1
3	-1	1	-1	-1	1
4	1	1	1	-1	-1
5	-1	-1	1	1	-1
6	1	-1	-1	1	1
7	-1	1	-1	1	-1
8	1	1	1	1	1

7 Estado de arte

Ao longo dos anos os PAHs têm sido monitorizados em diversas matrizes, sobretudo ar, águas, solos, comida e lamas e águas residuais pois são as principais vias de exposição à população.¹ Em matrizes aquosas, os PAHs estão presentes em níveis vestigiais. Portanto, é necessário a utilização de procedimentos com altos fatores de enriquecimento que permitem ser detetados nos instrumentos analíticos. As técnicas de extração de PAHs em águas mais usadas são SPE, micro-extração em fase sólida, extração líquido-líquido (LLE), extração sólido-líquido (LSE) e extração sorptiva com barra de agitação.³

No decorrer dos anos, as legislações direcionadas para o cumprimento dos limites de concentração dos PAHs têm sido atualizadas de modo a tornarem-se o mais atuais e rigorosas possíveis. Os métodos analíticos mais utilizados para a determinação de PAHs são aprovados por organizações internacionais, designadamente: USEPA, *International Organization for Standardization* (ISO), *National Institute for Occupational Safety and Health* (NIOSH) e Comité Europeu de Estandardização (CEN).³

Os métodos mais comuns para a análise de PAHs são de HPLC e de GC. Os métodos de HPLC utilizam detetores de ultra-violeta (UV), fluorescência (FL) ou a espectrometria de massa. Enquanto os métodos GC recorrem ao FID ou à espectrometria de massa.³

Para a determinação de PAHs em águas de consumo, a EPA aprovou os métodos presentes na Tabela 7.1. Os métodos EPA 525.2 e 525.3 permitem a análise de uma vasta variedade de contaminantes orgânicos. No entanto, Nap, Ace e Fla não constam na lista de substâncias monitorizadas. Os altos limites de deteção para Nap, Ace e Acy, presentes nos métodos EPA 550 e 550.1, resultam da utilização do detetor de absorção de ultravioleta. Este detetor é muito menos sensível quando comparado ao detetor de fluorescência utilizado nos outros compostos.³⁹

Tabela 7.1- Métodos aprovados pela EPA para a determinação de PAHs em águas para consumo.³⁹

Método	Data	Específico para PAHs	Técnica de extração	Técnica de separação	Limite de deteção (ppb)
EPA 525.2	Agosto 1995	Não	LSE	GC/MS	0,010 – 0,54
EPA 525.3	Fevereiro 2012	Não	SPE	GC/MS	0,013 – 0,11
EPA 550	Julho 1990	Sim	LLE	HPLC/UV/FL	0,002 – 3,30
EPA 550.1	Julho 1990	Sim	LSE	HPLC/UV/FL	0,003 – 2,20

Com o aumento do conhecimento relativo ao perigo dos PAHs para os humanos há a necessidade de legislar de forma mais rigorosa relativamente ao teor máximo destes compostos. Por isso, os métodos analíticos têm de ser capazes de fornecer a informação e de atingir os limites requeridos pela legislação. Ao longo dos anos têm surgido novas metodologias com mais sensibilidade da resposta instrumental de modo a chegar aos LODs e LOQs mais baixos. É de destacar a técnica de injeção de LVI-PTV (Secção 2.2.1) que permite injetar mais volume de amostra, o que pode melhorar a sensibilidade do sistema.²⁴ Delgado-Marín *et al.*⁴⁰ desenvolveram uma metodologia para um GC-FID com LVI-PTV para a monitorização de PAHs em solos. À luz do conhecimento atual nenhum método semelhante foi desenvolvido para águas para consumo.

A maioria das publicações recentes acerca de análises de PAHs recorrem à técnica de MRM. No entanto, as estruturas destes compostos não são favoráveis à fragmentação, o que pode levar à perda de sensibilidade. Com isto, Shang *et al.*⁴¹ propuseram um método alternativo que consiste no aproveitamento da má fragmentação ao transferir seletivamente os iões para o segundo quadrupolo sem provocar a sua fragmentação. Assim as transições serão ião precursor → ião precursor resultando em melhor sensibilidade.

O DOE tem sido uma ferramenta bastante útil para a otimização de métodos, pois permite a otimização simultânea de vários parâmetros e também a interação dos mesmos. Assim, é possível realizar superfícies de resposta que permite chegar ao valor ótimo verdadeiro que não é possível chegar pelo método tradicional de otimização de um parâmetro de cada vez.³⁷ Yusà *et al.*⁴² recorreram ao DOE para a otimização de vários parâmetros de LVI-PTV para a determinação de PAHs partículas em suspensão.

8 Objetivos

Como foi referido na Secção 1, a exposição aos PAHs é motivo de preocupação, o que torna relevante a sua monitorização. O objetivo desta dissertação centrou-se no desenvolvimento de um método para a monitorização de PAHs em águas próprias para consumo por GC/TOFMS, GC/MS/MS e GC-FID. As metodologias atuais recorrem a MS que é bastante dispendioso, pelo que há a necessidade de desenvolver métodos alternativos mais económicos e exequíveis a nível de rotina de laboratório.

Durante a realização experimental desta dissertação foram realizados vários estudos nomeadamente *screening* dos parâmetros das condições operacionais de LVI PTV-GC/TOFMS, impacto da geometria do *liner* e da temperatura de injeção e o desenvolvimento de um método de MRM para GC/MS/MS. Estes resultados serão depois transpostos para o GC-FID de modo a desenvolver um método mais económico.

9 Parte experimental

9.1 Reagentes

Na realização desta dissertação foram utilizados os seguintes reagentes: padrão com os 16 PAHs apresentados na Figura 1.4 em diclorometano (Supelco), fosfato de tri-*p*-cresilo (98%, Tokyo Chemical Industry), heneicosano (C₂₁) e tritriacontano (C₃₃) ambos padrões analíticos (Sigma-Aldrich). Os solventes utilizados foram: acetona grau GC/MS (Carlo Erba), hexano grau GC-*spectrophotometric quality* (J.T.Baker), Água *reagent grade* (J.T.Baker), metanol grau GC/MS (Carlo Erba).

9.2 Preparação de soluções

Na preparação da solução-mãe dos PAHs foi pipetado todo o volume de padrão de PAHs presente na ampola de 1 mL (10 ppm) em acetonitrilo para um balão de 10 mL, ao qual se adicionou hexano perfazendo até 10 mL. A solução resultante tem concentração de 1 ppm. A partir da solução-mãe foi preparada uma solução de 100 ppb de concentração com o uso de uma solução de mistura hexano:acetona (1:1) como solvente. Foi preparada uma solução-padrão de 10 ppm com o volume de 100 µL a partir da evaporação de 1 mL de solução-mãe.

Na preparação solução de padrão foram dissolvidos 1,4 mg de fosfato de tri-*p*-cresilo, 1,1 mg de C₂₁, 0,8 mg de C₃₃ em 20 mL hexano:acetona (1:1). Foi pipetado 0,5 mL desta solução e adicionou-se hexano:acetona (1:1) até perfazer 25 mL, obtendo-se assim, uma solução com 1 ppm de concentração.

Soluções padrão de PAHs de concentrações 20, 50, 80, 100, 150 e 200 ppb com 100 ppb de padrão foram preparadas a partir da solução-mãe da mistura de PAHs e da solução de 1 ppm de concentração de padrão (Figura 9.1).

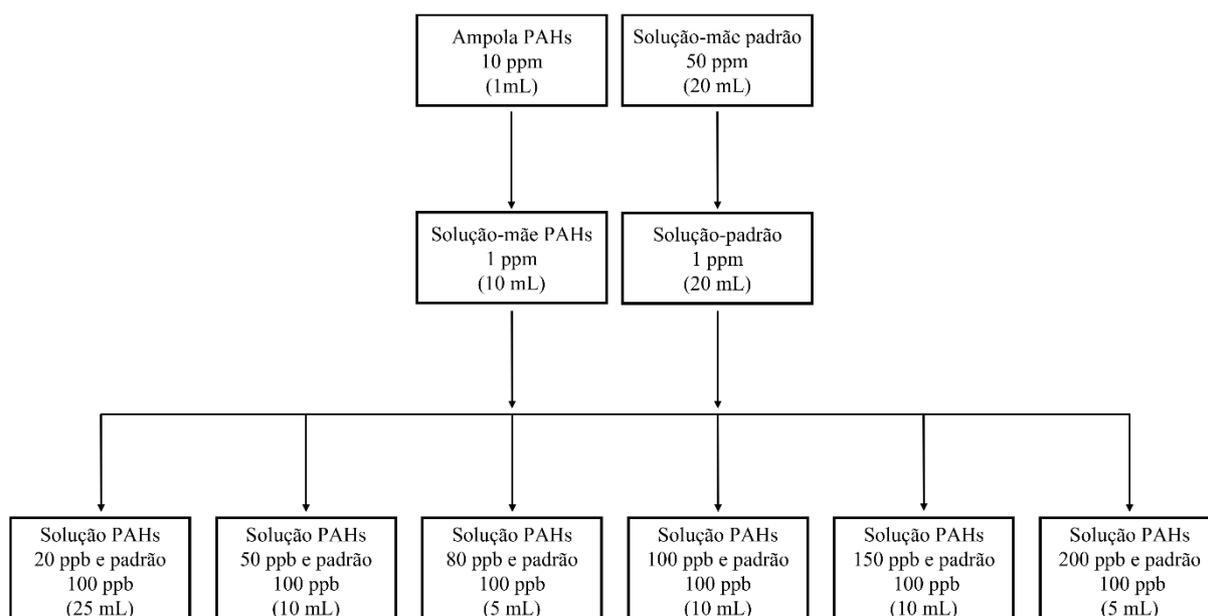


Figura 9.1- Fluxograma seguido durante a preparação das soluções-padrão.

9.3 Parâmetros cromatográficos de GC-FID

As análises foram realizadas num cromatógrafo *HP 6890* (Agilent Technologies). A separação dos analitos ocorreu numa coluna capilar *BR-5MS* (15 m × 0,250 mm × 0,25 µm; Bruker Corporation) cuja fase estacionária é constituída por polímero fenil arileno não polar, virtualmente equivalente a 5% fenil-95% metilpolisiloxano. O gás de arraste utilizado foi hidrogénio a um fluxo constante de 1,0 mL/min. A injeção foi manual e injetou-se 1 µL em modo *splitless* durante 2 minutos. A temperatura do injetor foi de 270°C. No programa de temperatura utilizado, a temperatura inicial do forno foi fixada a 70 °C durante 2 minutos, verificando-se um aumento de 30 °C/min até aos 200 °C, sendo depois aumentada a um ritmo de 5 °C/min até aos 300 °C e finalmente, fixada por um período de 2 minutos. A temperatura do detetor foi estabelecida a 300°C.

9.4 Otimização de parâmetros de injeção para GC/TOFMS

As análises foram realizadas num *Pegasus BT GC/TOFMS* (LECO Corp.) equipado com um cromatógrafo *Agilent 7890B GC* (Agilent Technologies) e um amostrador automático *L-PAL3*. O software utilizado foi *ChromaTOF* (v5.40.12.0.60635). A separação dos analitos ocorreu numa coluna capilar *DB-5MS Ultra Inert* (25 m × 0,250 mm × 0,25 µm; J&W Scientific) cuja fase estacionária é constituída por polímero fenil arileno não polar, virtualmente equivalente a 5% fenil-95% metilpolisiloxano. O gás de arraste utilizado foi hélio a um fluxo constante de 1,0 mL/min. No programa de temperatura utilizado, a temperatura inicial do forno foi fixada a 70 °C durante 2 minutos, verificando-se um aumento de 30 °C/min até aos 200 °C, sofrendo um posterior incremento a um ritmo de 5 °C/minuto até aos 300 °C e finalmente, fixada por um período de 15 minutos. A injeção ocorreu no injetor de modos múltiplos

(MMI), em modo splitless durante 3 minutos. Os parâmetros de injeção utilizados em cada condição como a temperatura de injeção (T_{inj}), uso de rampa de temperatura e de *hot needle* estão presentes na Tabela 9.1. Na condição 1 utilizou-se o *liner* representado pela Figura 9.2 a) e nas restantes condições o *liner* da Figura 9.2 b). O volume de injeção foi de 1 μ L. O método de ionização foi EI com a energia de 70 eV. As temperaturas da fonte de ionização e da linha de transferência foram 250 °C e 300 °C, respectivamente. A aquisição foi realizada em FS de gama de massa compreendia entre 30 e 400 Da, com uma taxa de aquisição de 10 espectros/s. O *delay* de aquisição foi estabelecido em 300 s.

Tabela 9.1- Condições de injeção utilizadas.

Condição	T_{inj} (°C)	Uso de <i>Hot needle</i>
1	270	Não
2	270	Não
3	270	Sim
4	270-290	Não
5	290	Não
6	270-290	Sim
7	290	Sim



Figura 9.2-a) *Liner* de precisão com lã de vidro de diâmetro interno de 4,0 mm, de comprimento de 78,5 mm e de diâmetro exterior de 6,3 mm. b) *Liner* de cone único com lã de vidro de diâmetro interno de 4,0 mm, de comprimento de 78,5 mm e de diâmetro exterior de 6,5 mm.

9.5 Extração de PAHs por SPE

A extração dos PAHs foi efetuada com recurso à extração de fase sólida (SPE) utilizando cartuchos *Oasis HLB* (200 mg, 6 mL; Waters), um coletor de SPE ligado a uma bomba de vácuo. Os cartuchos de SPE foram condicionados com lavagens de 10 mL de hexano, 10 mL de diclorometano, 10 mL de metanol, respectivamente, seguido pelo reequilíbrio com 15 mL de água *reagent grade*. As amostras de volumes de 20 mL, 100 mL e de 1 L (lamas, águas residuais e águas para consumo, respectivamente) foram carregadas nos cartuchos, e de seguida repousaram em vácuo durante 15 minutos. Os PAHs retidos foram eluídos com 2 lavagens de 10 mL de uma solução hexano/acetona (1:1), e assim foram obtidos extratos com 20 mL.

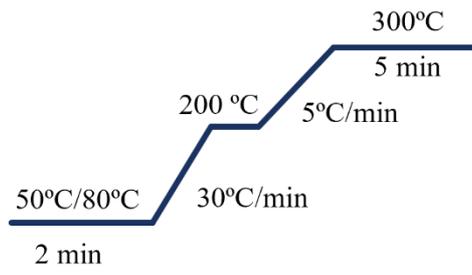
9.6 Preparação de amostras de lamas e águas residuais

Para a preparação de amostras de lamas, 2,5 g de lamas foram recolhidos, dissolvidos em 500 mL de H₂O e submetidos ao ultrassons durante 15 min. Posteriormente, foram centrifugados durante 10 min a 4500 rpm. O sobrenadante foi filtrado com um filtro de membrana com poros de 0,7 µm (FILTER-LAB). O precipitado foi dissolvido em 20 mL em hexano:acetona (1:1) e depois foi filtrado com filtro de seringa PTFE 0,45 µm (FILTER-LAB). As amostras de águas residuais foram filtradas com filtros de seringa PTFE 0,45 µm. Às amostras foram fortificadas com metanol numa proporção de 2% do seu volume. A extração dos PAHs foi realizada através do procedimento de SPE mencionado na Secção 9.5. Por fim, as amostras foram reconcentradas em 1 mL por linha de azoto. Em alguns extratos, foi observado a existência de duas fases pelo que se procedeu à realização de duas extrações com 2 mL de hexano e foi retomada a reconcentração dos extratos. As amostras foram analisadas qualitativamente com os parâmetros da Condição 6 mencionados na Secção 9.4.

9.7 Otimização de parâmetros LVI-PTV-GC/TOFMS

As análises foram realizadas num *Pegasus BT GC/TOFMS* (LECO Corp.) equipado com um cromatógrafo *Agilent 7890B GC* (Agilent Technologies) e um amostrador automático *L-PAL3*. O software utilizado foi *ChromaTOF* (v5.40.12.0.60635). A separação dos analitos ocorreu numa coluna capilar *DB-5MS Ultra Inert* (25 m × 0,250 mm × 0,25 µm; J&W Scientific) cuja fase estacionária é constituída por polímero fenil arileno não polar, virtualmente equivalente a 5% fenil-95% metilpolisiloxano. O gás de arraste utilizado foi hélio a um fluxo constante de 1,0 mL/min. A injeção foi realizada num injetor MMI com recurso à técnica de *LVI solvent split*. Os parâmetros de *solvent split* utilizados estão na Tabela 9.2. O volume de injeção foi de 10 µL. A temperatura da linha de transferência foi mantida a 300 °C. As rampas de temperatura do forno e do injetor estão presentes na Figura 9.3. O método de ionização foi EI com a energia de 70 eV. A aquisição foi realizada em FS de gama de massa compreendia entre 40 e 550 Da, com uma taxa de aquisição de 10 espetros/s. O *delay* de aquisição foi estabelecido em 260 s. As condições experimentais para elaborar o diagrama de Packett-Burman encontram-se descritas na Tabela 9.2.

Forno:



Injetor:

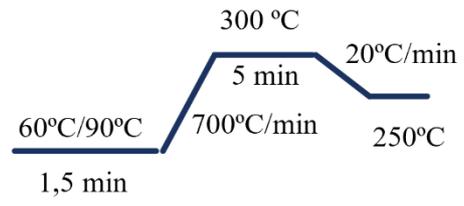


Figura 9.3- Rampas de temperatura utilizadas no forno e no injetor.

Tabela 9.2- Diagrama de Packett-Burman com os parâmetros utilizados em cada experiência.

Experiência	Tempo de purga (s)	Pressão da purga (psi)	Tempo de <i>splitless</i> (s)	T _{fonte} (°C)	T _{i inlet} (°C)
1	30	1	60	250	90
2	90	1	60	250	60
3	30	5	60	250	90
4	90	5	120	250	60
5	30	1	120	280	60
6	90	1	60	280	90
7	30	5	60	280	60
8	90	5	120	280	90

9.8 Análise por GC/MS/MS

As análises foram realizadas num sistema GC/MS/MS equipado com um cromatógrafo *Bruker GC 456* (Bruker Corporation), um espectrômetro de massa *Scion TQ* (Bruker Corporation) e um amostrador automático *CombiPAL* (CTC Analytics GmbH). Os dados foram adquiridos com recurso ao *software MSWS 8.2 Bruker* e analisados com *Bruker MS Data Review 8.0*. A separação dos analitos ocorreu numa coluna capilar ZB-5MS (30 m × 0,250 mm × 0,25 µm; Zebtron) cuja fase estacionária é constituída por polímero fenil arileno não polar, virtualmente equivalente a 5% fenil-95% metilpolisiloxano. O gás de arraste utilizado foi hélio a um fluxo constante de 1,0 mL/min. O volume de injeção foi de 1 µL. A injeção foi no modo *splitless* durante 1 minuto. As temperaturas da linha de transferência e da fonte de ionização foram mantidas a 310 °C e 280 °C, respetivamente. A temperatura do injetor foi mantida a 290 °C. A rampas de temperatura do forno está presente na Figura 9.4. O método de ionização foi EI com a energia de 70 eV. O *delay* de aquisição foi estabelecido em 240 s. A aquisição em FS foi realizada de gama de massa compreendia entre 40 e 500 Da, com uma taxa de aquisição de 10 espectros/s.

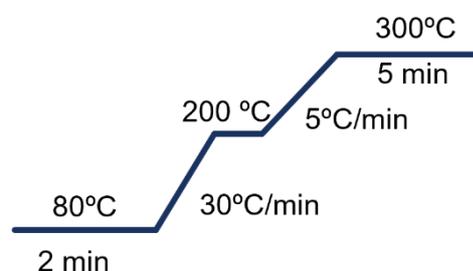


Figura 9.4- Rampa de temperatura utilizada no forno.

A metodologia do desenvolvimento do método de MRM baseou-se na aquisição em FS onde foram obtidos os t_R dos analitos, janelas temporais e os seus respetivos iões com maior intensidade.

Estes iões foram selecionados como iões precursores. De seguida foi adquirido o espetro de iões produto, de modo a escolher quais as transições. O ião produto com maior intensidade foi selecionado como ião quantificador e o ião com a segunda maior intensidade foi selecionado como ião qualificador e ajustou-se as janelas temporais. Por fim, deu-se a otimização das energias de colisão através de uma aquisição em MRM em que foram utilizadas várias energias de colisão (10, 20, 30, 40, 50 e 60 eV). A energia de colisão em que é obtida a maior intensidade do ião quantificador ou qualificador é selecionada.²¹

9.9 Amostras dopadas

A 6 L de água canalizada foram adicionados 60 µL da solução-mãe da mistura dos 16 PAHs com o objetivo de obter uma amostra de água com a concentração de 100 ppb de PAHs. Extraíu-se 4 porções de 1 L da amostra dopada, utilizando o procedimento descrito na Secção 9.5. Os quatro extratos obtidos foram levados à secura, sendo que dois deles foram ressuspensos em 20 µL e os restantes em 100 µL de hexano:acetona (1:1) com recurso a ultrassons.

9.10 Amostras reais de água

As amostras de água canalizada foram adquiridas a partir da rede pública e a sua origem está representada na Figura 9.5. As amostras foram armazenadas em recipientes de plástico de 1 L e armazenadas à temperatura ambiente. As amostras foram extraídas de acordo com o procedimento descrito na Secção 9.5. Os extratos obtidos foram levados à secura e posteriormente ressuspensos em 100 µL de hexano:acetona (1:1). Em alguns extratos foi observada a existência de duas fases pelo que se procedeu à realização de duas extrações com 2 mL de hexano e foi retomada a reconcentração dos extratos.

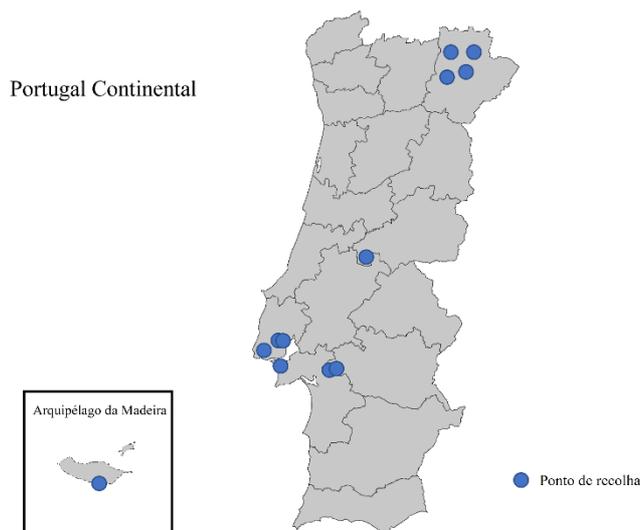


Figura 9.5- Mapa com as origens das amostras de água canalizada.

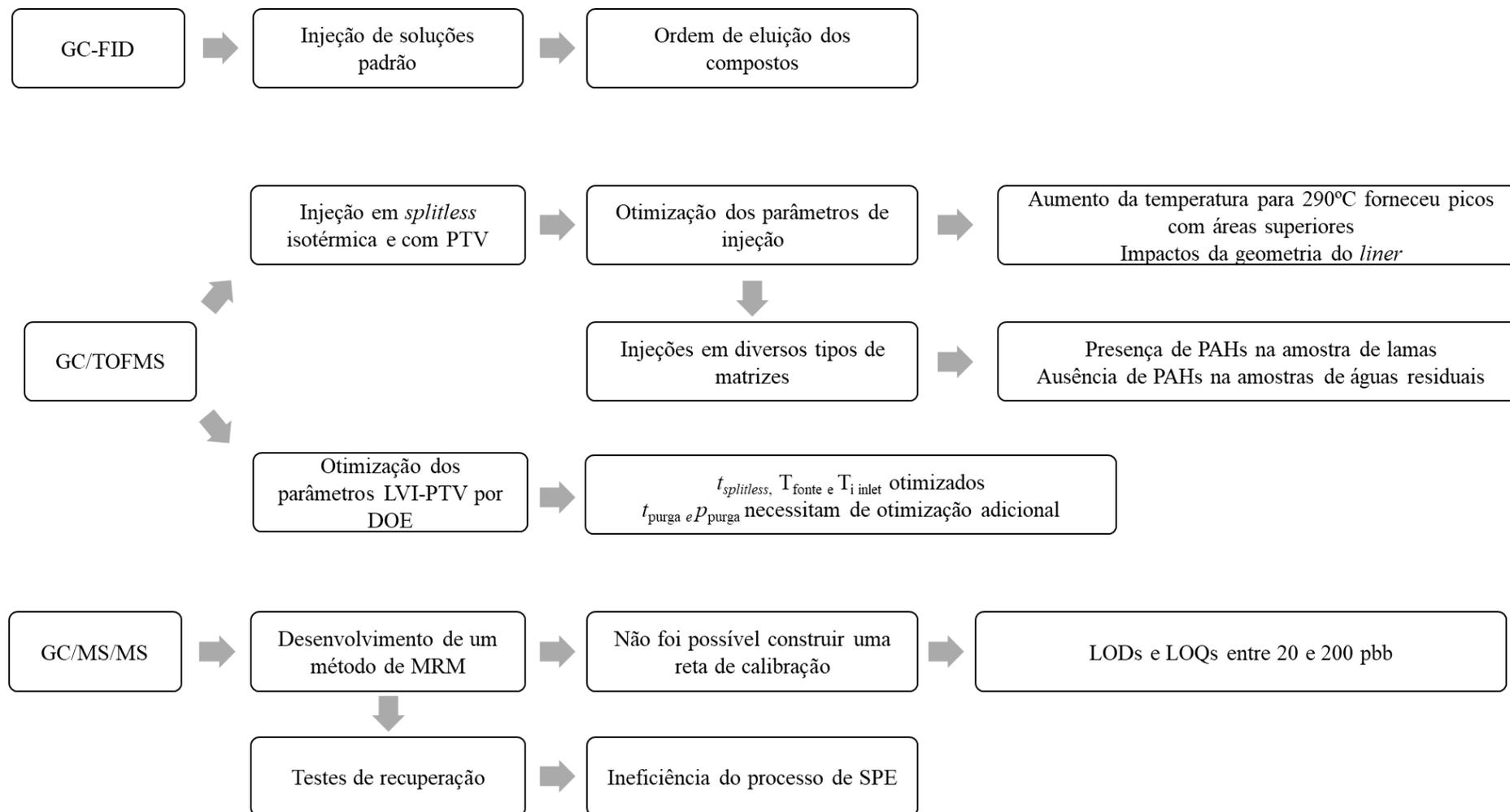


Figura 9.6- Sumário do procedimento e resultados desta dissertação.

10 Resultados e discussão

10.1 Ordem de eluição da mistura de PAHs

Uma amostra padrão da mistura de PAHs padrão com 10 ppm foi injetada no sistema GC-FID com os parâmetros descritos na Secção 9.3 com o intuito de conhecer a ordem de eluição dos compostos presentes na mistura (Figura 10.1 a)).

Adicionalmente, foi injetada uma solução padrão de BaP para proceder à identificação dos picos (Figura 10.1 b)). Nas mesmas condições cromatográficas, o mesmo composto irá eluir sempre no mesmo t_R , daí o pico com o t_R de cerca 21 minutos corresponde ao BaP. Como o detetor FID não consegue identificar compostos, é necessário recorrer-se à utilização de uma solução-padrão para proceder à sua identificação. As atribuições dos restantes picos foram realizadas a partir da comparação com o estudo de Lynam *et al.*⁴³ em que foi demonstrado a separação dos PAHs numa coluna DB-5ms.

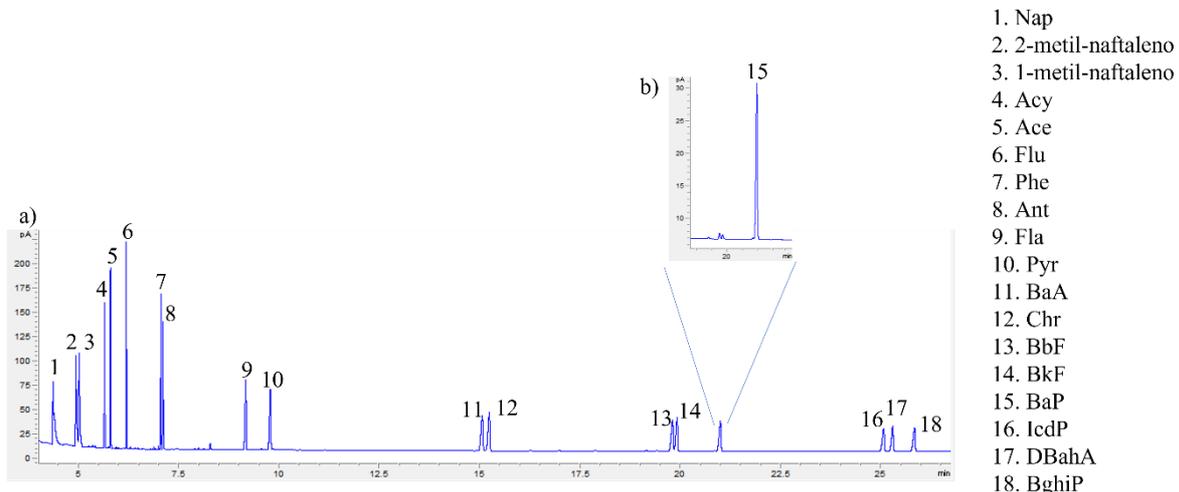


Figura 10.1-a) Cromatograma da injeção da amostra padrão da mistura de PAHs de 10 ppm. b) Cromatograma da injeção da amostra padrão de BaP de 10 ppm. As abreviaturas utilizadas na legenda estão na Figura 1.4. Os dois cromatogramas foram obtidos no sistema GC-FID.

10.2 Diferenças na geometria do *liner* e otimização dos parâmetros de injeção no modo *splitless*

Foram analisados sedimentos com os parâmetros mencionados na condição 1 na Secção 9.4 por GC/TOFMS durante vários dias. Ao fim de várias análises e após a troca do septo deparou-se com uma quebra de cerca de 55% nas áreas HPAHs. Na Figura A. 1 é possível observar a diferença nos picos de BaP. Contudo, as áreas dos LPAHs mantiveram-se. (Figura 10.2). A diminuição nas áreas estava associada ao fenómeno de discriminação que consiste na baixa intensidade nas áreas dos compostos menos voláteis comparativamente às áreas de compostos mais voláteis. Consequentemente, a amostra deixa de

ser fiel à amostra original.⁴⁴ Além disso, este fenómeno pode ter sido potenciado pela atividade do *liner*. A atividade do *liner* pode ter origem na degradação da desativação ou na deposição de componentes não voláteis da matriz na superfície do vidro, o que contribuiu para absorção e retenção dos analitos menos voláteis no *liner*.²¹

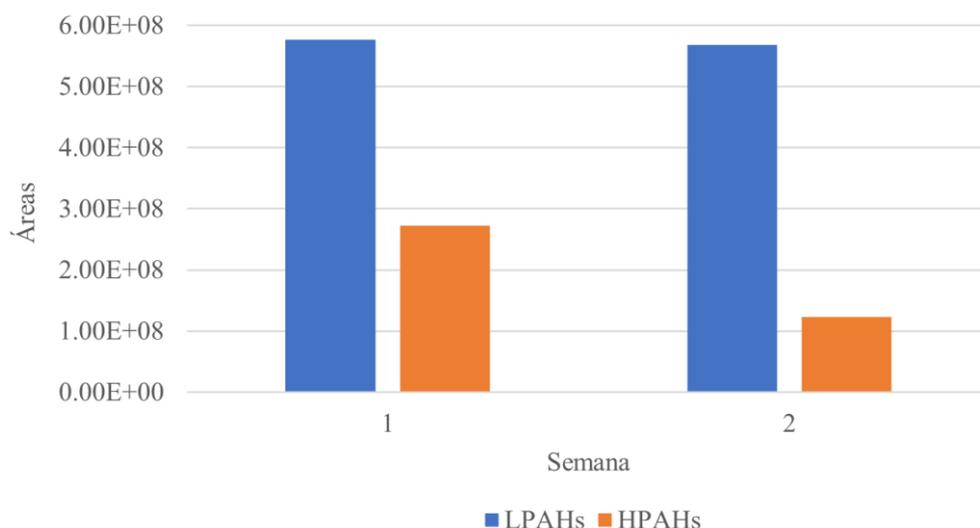


Figura 10.2- Áreas dos picos da amostra-padrão da mistura de PAHs com 2 ppm de concentração. As análises foram efetuadas em duas semanas diferentes e em que na injeção da 2ª semana foi utilizado um septo novo. Os parâmetros cromatográficos foram os indicados na condição 1 da Tabela 9.1. As barras azuis correspondem aos PAHs de baixa massa molecular (LPAHs) e as de cor de laranja correspondem aos PAHs com elevada massa molecular (HPAHs).

Procedeu-se à troca do *liner*, verificando-se a sujidade depositada no mesmo, justificando deste modo, a aparente discriminação. (Figura A. 2). Contudo, o *liner* trocado possuía uma geometria diferente - o primeiro, um *liner* de precisão (Figura 9.2-a) e o segundo um *liner* de cone único (Figura 9.2-b). A escolha da geometria do *liner* e do empacotamento da lã de vidro podem ter impacto significativo no desempenho do método analítico.

Comparativamente à condição 1, na injeção da condição 2, ambos os grupos de PAHs apresentaram menores áreas (33% para os HPAHs e 27% para os LPAHs, Figura 10.3) (Figura A. 3). Isto pode ser explicado pelo facto de o primeiro *liner* possuir lã de vidro no topo. A posição da lã permite-lhe ser penetrada pela agulha da seringa pelo que a injeção ocorre diretamente na lã de vidro, o que contribuiu para uma melhor volatilização dos compostos presentes na amostra. Por outro lado, no segundo *liner* a injeção ocorre por cima da lã de vidro, o que terá provocado a diminuição da resposta.⁴⁵

Dada a diferente resposta obtida no *liner* decidiu testar-se vários parâmetros de injeção a fim de se obter uma resposta semelhante à do *liner* de precisão. Em primeiro lugar foi testado o uso da técnica de *hot needle*, que consiste no aquecimento da agulha durante 3 a 5 segundos antes da injeção (condição 3). No entanto, o uso desta técnica não provocou alterações significativas nas áreas relativamente à condição 2 (Figura 10.3). Portanto optou-se por aumentar a temperatura de injeção para 290 °C e por usar PTV, com uma rampa balística de 270 °C para 290 °C. Com o aumento da temperatura (condição

4) observou-se um aumento considerável das áreas para todos os PAHs em relação à injeção anterior. (40% para os LPAHs e 88% para os HPAHs; Figura 10.3) (Figura A. 4). Este resultado seria esperado dado que a uma temperatura mais elevada, melhor será a volatilização. A injeção em condições isotérmicas, a 290°C apresentou resultados semelhantes. Assim, pode-se afirmar que o aumento de temperatura que provocou a melhor injeção dos analitos. É de salientar que as áreas dos HPAHs foram ligeiramente superiores às injeções com *liner* de precisão. Por fim, testaram-se as mesmas temperaturas com o uso de *hot needle*. Nestas condições foram obtidas maiores áreas especialmente para os LPAHs. No entanto, as áreas dos HPAHs diminuiram ligeiramente. Observou-se que o método de injeção com rampa de temperatura e *hot needle* (condição 6) foi onde se obteve melhores resultados. Adicionalmente este *liner* pode ser comparado com o *liner* de precisão, no que diz respeito às suas características. No entanto, a utilização do *liner* de precisão com temperaturas de injeção mais elevadas pode eventualmente fornecer picos com área superior.

Apesar de não ter sido possível testar-se esta hipótese é de interesse a realização de um estudo num futuro próximo. É de salientar que este estudo foi realizado sem análises em triplicado, o que leva à possibilidade destas variações ligeiras sejam só variações aleatórias do sistema e não das condições. A realização dos triplicados aumentaria a precisão dos valores obtidos, tornando possível uma discussão mais aprofundada deste tema.

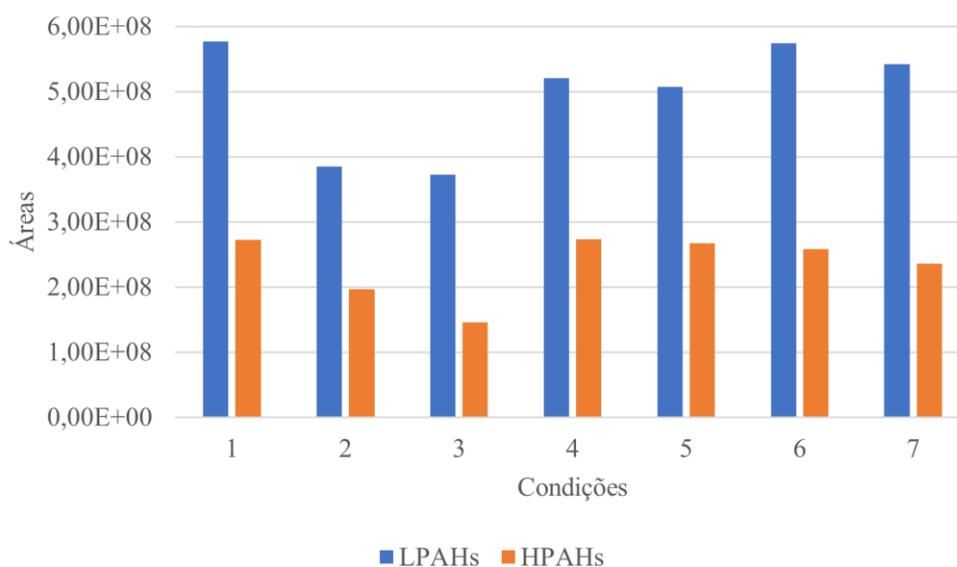


Figura 10.3- Áreas dos picos da amostra-padrão da mistura de PAHs com 2 ppm de concentração. Os parâmetros cromatográficos estão mencionados na Tabela 9.1. As barras azuis correspondem aos PAHs de baixa massa molecular (LPAHs) e as de cor de laranja correspondem aos PAHs com elevada massa molecular (HPAHs).

10.3 Presença de PAHs em diferentes tipos de matrizes

As amostras foram preparadas e analisadas com o procedimento mencionado na Secção 9.6. Este estudo foi realizado com o intuito de perceber quais os PAHs presentes nas várias matrizes. Os PAHs identificados em cada matriz estão presentes na Tabela 10.1.

A presença dos PAHs na fração sólida das lamas era expetável dada à tendência destes compostos para se acumularem na matéria orgânica presente nas lamas.³ Inesperadamente, na fração líquida os PAHs mais solúveis (p.e Nap e Ace) não foram detetados. Porém, foram detetados Pyr e BaA que são PAHs praticamente insolúveis em água (135 e 14 µg/L a 25°C, respetivamente)⁷, pois são PAHs constituídos por quatro anéis.³ Isto indica a presença de matéria orgânica na fração líquida o que é corroborado pela observação de partículas na amostra durante a sua preparação, pelo que foi necessário filtrá-la.

Nas águas residuais não foi detetado nenhum PAH. A baixa solubilidade dos PAHs contribuíram para a pouca quantidade de analito nesta matriz e assim, o sistema GC/TOFMS não teve sensibilidade suficiente. Adicionalmente, o procedimento de extração pode não ter sido adequado, uma vez que se extraiu 150 mL de águas residuais, e na metodologia do método 610 da EPA são extraídos 1 L de águas residuais, pelo que o volume de amostra extraído pode não ter sido suficiente para que os PAHs tivessem sido detetados. Além disso, a amostra foi filtrada com um filtro de PTFE antes de ser extraída, significando, isto que, apenas a fração solúvel foi extraída, ou seja, os PAHs podem ter ficado na fração particulada que ficou retida no filtro que posteriormente não foi extraída nem analisada.

As lamas são normalmente utilizadas como fertilizante de solos, enquanto que, as águas residuais são utilizadas para irrigação dos campos agrícolas. Contudo, estes podem conter poluentes orgânicos, incluindo PAHs, acabando por contaminar os solos durante a sua aplicação. Adicionalmente, a presença de PAHs nas colheitas está diretamente relacionada com o seu crescimento em solos contaminados, sendo que o seu consumo é uma das principais vias de exposição destes compostos à população.⁴⁶

Atualmente, a Comissão Europeia não tem nenhum limite regulado para a concentração de PAHs em lamas e águas residuais. No entanto, um relatório elaborado para a Comissão Europeia sugeriu que o somatório das concentrações de Ace, Phe, Flu, Fla, Pyr, BbF, benzo[*j*]fluoranteno, BkF, BaP, BghiP e IcdP não deve ultrapassar os 6 mg/kg de matéria seca.⁴⁶⁻⁴⁸ Estes PAHs foram detetados nas amostras de lamas, o que demonstra a necessidade de quantificação destas substâncias em matrizes de lamas e águas residuais para uma utilização segura na agricultura.

Tabela 10.1- PAHs detetados nas matrizes testadas.

Matriz	Lamas (fração sólida)	Lamas (fração líquida)	Águas residuais
	Todos os 16 EPA PAHs e		
PAHs detetados	2-metilnaftaleno e 1-metilnaftaleno	Flu, Pyr e BaA	-

10.4 Otimização de parâmetros LVI-PTV-GC/TOFMS

Foram testados cinco parâmetros do sistema LVI-PTV: tempo de purga (t_{purga}), pressão da purga (p_{purga}), tempo de *splitless* ($t_{\text{splitless}}$), temperatura da fonte de ionização (T_{fonte}) e temperatura inicial do injetor (T_{injetor}).

Com o objetivo de estimar a influência dos parâmetros na resposta instrumental foi utilizado o diagrama de Plackett-Burman (Tabela 3.1). Em resumo, os valores selecionados para cada parâmetro foram:

- 30 e 90 s para o t_{purga} ,
- 1 e 5 psi para p_{purga} ,
- 60 e 120 s para o $t_{\text{splitless}}$,
- 250 e 280 °C para a T_{fonte} e
- 60 e 90 °C para a T_{injetor} .

Foram consideradas as áreas dos picos como a resposta instrumental.

O cálculo do efeito principal de cada parâmetro foi feito a partir da multiplicação da resposta instrumental de cada experiência pelo níveis -1 e +1 presentes na Tabela 1.2. Os produtos são somados e divididos por metade do número de experiências.³⁷ A partir do sinal do fator principal pode-se afirmar qual o valor mais adequado para otimizar a resposta instrumental, isto é, se for positivo o valor de alto nível é mais adequado para o determinado parâmetro e vice-versa. Os efeitos principais para todos os PAHs analisados estão apresentados na Tabela A. 1 e os seus sinais na Tabela 10.2.

Tabela 10.2- Parâmetros mais adequados para cada composto. O sinal indica se o valor de alto ou baixo nível é o mais adequado para um determinado parâmetro.

Composto	Tempo de purga (s)	Pressão de purga (psi)	Tempo de <i>splitless</i> (s)	T _{fonte} (°C)	T _{i inlet} (°C)
Nap	-	-	+	+	-
Acy	-	-	+	+	+
Ace	-	-	+	+	+
Flu	+	-	+	+	+
Phe	+	-	+	+	+
Ant	+	-	+	+	+
Fla	+	-	+	+	+
Pyr	+	-	+	+	+
Chr	+	+	+	+	+
BaA	+	-	+	+	+
BkF	+	+	+	+	+
BbF	+	+	+	+	+
BaP	+	+	+	+	+
IcdP	+	+	+	+	+
DBahA	-	+	+	+	-
BghiP	+	-	+	+	+

Os parâmetros T_{fonte}, T_{i inlet} e t_{splitless} possuem efeitos positivos porque as mudanças para valores mais altos provocaram um aumento da resposta da maioria dos PAHs. Consequentemente, os valores de alto nível para a T_{fonte}, T_{i inlet} e t_{splitless} são os mais adequados. Ao contrário do descrito por Yusà *et al.*⁴², verificou-se que a T_{i inlet} tinha um efeito positivo na resposta instrumental, ou seja, temperaturas maiores melhorar a resposta cromatográfica.

Com o aumento do t_{purga} observou-se efeitos positivos para a maioria dos compostos exceto para os três PAHs mais voláteis (Nap, Acy e Ace) e com o aumento da p_{purga}, de 1 para 5 psi, o conjunto dos PAHs de baixa massa molecular teve uma diminuição na resposta. Este acontecimento pode estar relacionado com o facto de que pequenas quantidades dos componentes mais voláteis, podem ser expulsas

do injetor pela purga. Quanto maior a p_{purga} maior é a probabilidade de ocorrerem perdas de compostos mais voláteis. Dado que, a resposta não foi unanime para os PAHs será necessária uma otimização mais detalhada para t_{purga} e p_{purga} . Na Tabela 10.3 estão esquematizados os resultados obtidos do *screening* para os parâmetros estudados de LVI-PTV.

Tabela 10.3- Resultados do *screening* para os parâmetros estudados de LVI-PTV.

Tempo de purga (s)	Pressão da purga (psi)	Tempo de <i>splitless</i> (s)	T_{fonte} (°C)	$T_{\text{i inlet}}$ (°C)
Necessita de otimização adicional	Necessita de otimização adicional	120	280	90

10.5 Análise por GC/MS/MS

Procedeu-se ao desenvolvimento de um método de MRM. Iniciou-se pela aquisição em FS (Figura 10.4) de uma solução-padrão de mistura dos 16 PAHs e foram adquiridos os t_R , janelas temporais e a seleção dos iões precursoros. (Tabela 10.4). Em todos os analitos os iões com maior intensidade foram os respectivos iões moleculares pelo que foram estes os iões selecionados como iões precursoros (Figura 10.5, exemplo para o BaP).

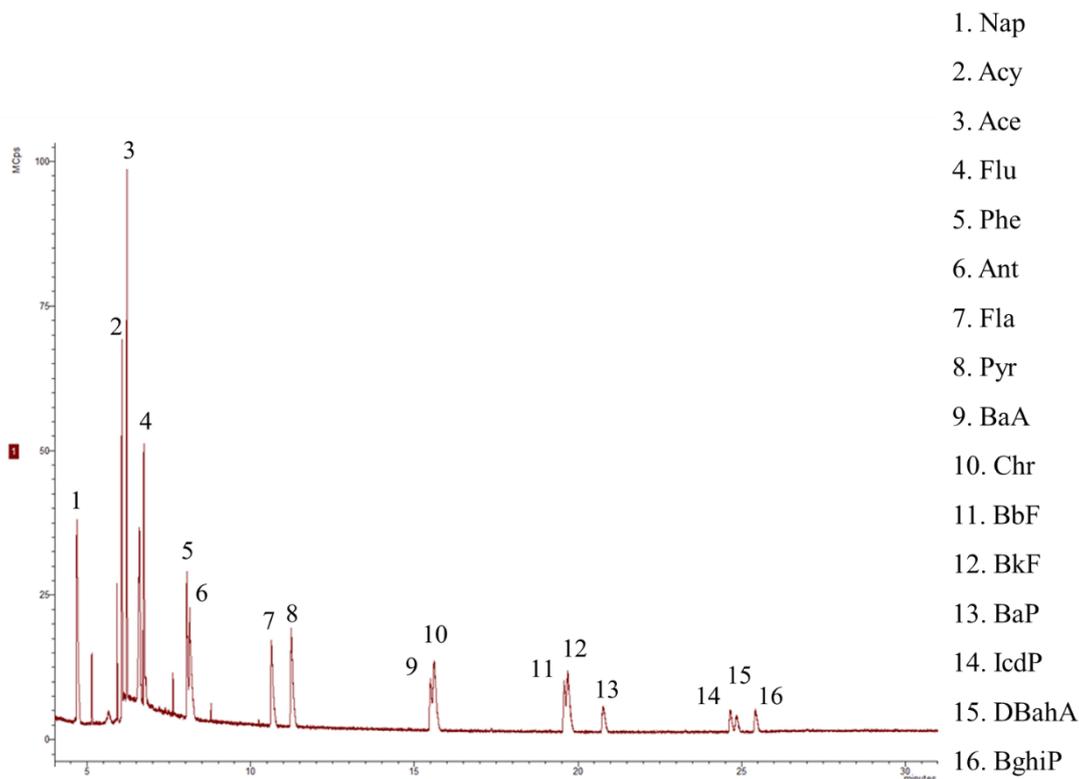


Figura 10.4- Cromatograma em FS da solução-padrão da mistura de PAHs a 10 ppm. As abreviaturas utilizadas na legenda estão na Figura 1.4.

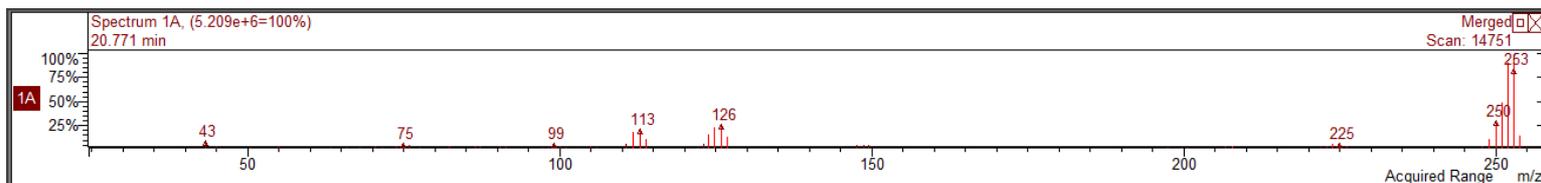


Figura 10.5- Espectro de massa do composto BaP obtido a partir do FS da solução padrão da mistura de PAHs a 10 ppm.

Para selecionar os íons quantificadores e qualificadores procedeu-se à experiência dos produtos, consistindo no varrimento dos íons fragmentos originados a partir de um íon precursor.

No Q1 apenas os íons de m/z selecionado, num determinado tempo, passam para a CID e são posteriormente fragmentados e o Q2 faz o varrimento dos íons formados.²¹

Em todos os PAHs os íons- produtos com maior intensidade são os íons moleculares, o que se deve à grande estabilidade química destes compostos. Também neste trabalho foi observada esta maior intensidade dos íons moleculares comparativamente aos outros íons formados tal como observado diversas vezes na literatura.^{41,49} Na metodologia apresentada no *Handbook of GC/MS* para o desenvolvimento de métodos de MRM, deve-se selecionar os íons de maior intensidade.²¹ No entanto, a sua escolha levaria ao desenvolvimento de um método de pseudo MRM (pMRM). Este método consiste na transferência seletiva de íons para o Q3 sem fragmentação induzida pela colisão, ou seja, a monitorização de transições íon precursor \rightarrow íon precursor.⁴¹ Consequentemente, os íons selecionados como qualificadores e quantificadores foram os íons com a segunda e terceira maior intensidade, respetivamente. Estes íons foram na maioria íons do tipo $[M-H]^+$ e $[M-2H]^+$ (Tabela 10.4). Esta escolha pode levar a perdas de sensibilidade do método comparativamente ao método de pMRM.

De seguida, realizou-se a otimização das energias de colisão. Ao efetuar uma análise em MRM de uma solução com os íons precursores e produtos selecionados foram estudadas seis energias de colisão - 10, 20, 30, 40, 50 e 60 eV - ao efetuar uma análise em MRM da mesma solução com os íons precursores e produtos selecionados. As energias em que foram obtidas maiores intensidades de íons produto foram as selecionadas (Tabela 10.4).

Tabela 10.4- Parâmetros otimizados no modo MRM.

Composto	Quantificador			Qualificador	
	t _R (min)	Ião	E _{colisão} (eV)	Ião	E _{colisão} (eV)
Nap	4,682	128 → 127	20	128 → 126	50
Acy	6,059	152 → 151	20	152 → 150	50
Ace	6,210	154 → 153	20	154 → 152	40
Flu	6,735	166 → 165	30	166 → 164	60
Ant	8,041	178 → 177	30	178 → 175	50
Phe	8,130	178 → 177	40	178 → 176	60
Fla	10,640	202 → 201	40	202 → 200	50
Pyr	11,240	202 → 201	40	202 → 200	60
BaA	15,501	228 → 227	40	228 → 226	60
Chr	15,609	228 → 227	40	228 → 226	60
BbF	19,583	252 → 251	50	252 → 250	60
BkF	19,689	252 → 251	50	252 → 250	60
BaP	20,799	252 → 251	50	252 → 250	60
IdcP	24,661	276 → 275	50	276 → 274	60
DBahA	24,835	278 → 277	50	278 → 276	60
BghiP	25,426	276 → 275	50	276 → 274	60

10.6 Desempenho do modo de MRM

Após o desenvolvimento do método e respetiva otimização procedeu-se à avaliação do seu desempenho. Para tal, foram preparadas soluções padrão diluídas a partir da solução-mãe com a mistura dos 16 PAHs de 1 ppm de concentração e de uma solução mistura de C₂₁, C₃₃ e fosfato como padrão. A descrição da preparação de amostra está mencionada na Secção 9.2.

O ponto central da reta foi definido a 100 ppb, sendo os outros pontos da reta 20, 50, 80, 150 e 200 ppb. Esta escolha de gama de concentrações foi cerca de cem vezes menor que a concentração de PAHs utilizada na otimização. Observou-se desvios nos t_R e consequentemente as janelas temporais e em alguns pares críticos como Phe e Ant, BaA e Chr, e BbF e BkF, ocorreu co-eluição. O fenómeno de co-eluição é frequentemente observado na literatura devido ao uso de colunas com a fase estacionária 5% fenil-95% metilpolisiloxano.⁵⁰ No entanto, este problema é resolvido com a utilização de fases estacionárias como a da coluna ZB-PAHs que consegue resolver os pares críticos.⁵¹

Com a adição de padrão, foi necessário selecionar também, analogamente aos PAHs, os seus iões-precusores e iões-produtos. No entanto, as energias de colisão não foram otimizadas, tendo sido utilizado 45 eV, pois é considerado um valor de energia intermédio. (Tabela 10.5).

Tabela 10.5- Parâmetros de MRM para os padrões internos.

Padrão Interno	Quantificador			Qualificador	
	t_R (min)	Ião	$E_{\text{colisão}}$ (eV)	Ião	$E_{\text{colisão}}$ (eV)
C ₂₁	10,710	57 → 56	45	57 → 29	45
Fosfato	19,120	368 → 367	45	368 → 366	45
C ₃₃	26,460	57→41	45	57→56	45

A partir dos cromatogramas obtidos, foi feita a integração dos picos para obtenção das áreas e razões sinais-ruído (S/N). Considerou-se que os picos com $S/N < 10$ não seriam integrados. A maioria dos picos revelou possuir S/N bastante baixas devido à baixa sensibilidade do detetor e à forma não gaussiana dos picos (Figura A. 5). Em consequência, não foi possível realizar curvas de calibração para todos os compostos, dado que é necessário no mínimo cinco pontos para estabelecer uma reta de calibração.⁵² O ião quantificador do Nap foi a única exceção.

Deste modo, não foi possível calcular os limiares analíticos pelas equações e a gama de trabalho do método descritos nas Secção 5. Alternativamente, considerou-se o LOD e o LOQ para cada analito quando a sua concentração originava picos com S/N superior a 3 e a 10, respetivamente.⁵³ Os resultados estão representados na Tabela 10.6. O método desenvolvido foi capaz de detetar todos os PAHs com a exceção de Flu. Os menores LOD foram para os LPAHs comparativamente aos HPAHs, o que é expectável dado que os LPAHs obtêm melhores respostas instrumentais. Trata-se do fenómeno da discriminação na injeção dos compostos menos voláteis que também foi observado e discutido na Secção 10.2.

Em termos quantitativos, o método apresenta um desempenho deficiente, pois os valores de LOQs são bastante altos e a gama estudada não foi adequada à realidade instrumental, não tendo sido possível a construção da curva de calibração. Para a sua construção, ter-se-ia de analisar soluções-padrão coma concentrações mais elevadas. Contudo, estas novas concentrações estariam fora da gama de trabalho pretendida, uma vez que os limites máximos previstos por lei para o BaP correspondem ao ponto médio da gama estudada.

Os LOQs e LODs dos iões quantificadores e qualificadores foram semelhantes, resultado expetável dado que durante a seleção dos iões-produtos, as suas intensidades têm a mesma magnitude. A exceção foi o Ace, cujo LOQ do ião qualificador foi bastante superior ao do ião quantificador.

Tabela 10.6- Número de pontos, LODs, LOQs obtidos a partir da tentativa de construção de uma curva de calibração para os iões quantificadores e qualificadores.

Composto	Quantificador			Qualificador		
	Nº de pontos	LOD (ppb)	LOQ (ppb)	Nº de pontos	LOD (ppb)	LOQ (ppb)
Nap	5	20	20	4	20	50
Acy	3	20	100	3	20	100
Ace	4	20	50	4	20	150
Flu	0	-	-	0	-	-
Phe e Ant	4	20	20	4	20	20
Fla	3	50	100	3	50	100
Pyr	3	50	100	3	50	100
BaA e Chr	4	20	50	4	20	50
BbF e BkF	2	50	150	2	50	150
BaP	0	100	-	0	100	-
IcdP	1	100	200	1	100	200
DBahA	0	200	-	0	200	-
BghiP	-	100	-	-	100	-

Outros fatores que contribuíram para a fraca sensibilidade do método foram o desgaste do detetor, consequência da sua “idade” e a avaria do Q0. O Q0 (Figura 10.6) é um quadruplo curvo de apenas radiofrequência que tem a função de focar os iões. Esta focagem resulta numa melhor sensibilidade e resolução espectral.⁵⁴ Esta avaria provocou a forma não gaussiana dos picos (Figura A. 5), o que contribuiu para a baixa sensibilidade do método e também dificultou a integração e a obtenção do S/N dos picos. Em primeira análise, atribuiu-se esta forma dos picos à baixa sensibilidade do detetor, contudo semanas após a realização deste estudo foi comprovado que de facto o Q0 estava inoperacional.

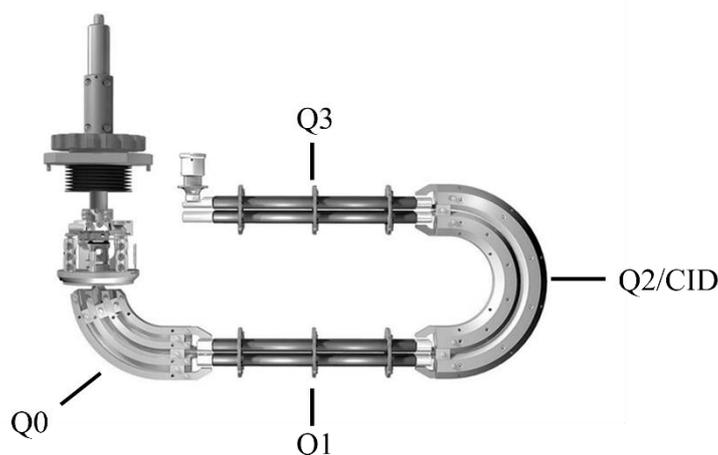


Figura 10.6- Esquema triplo quadrupolo, com a indicação da localização do Q0.³¹

10.6.1 Testes de recuperação

Para a preparação da amostra *spike* foi necessário determinar qual a quantidade máxima de hexano que era dissolvido em 6 L de água. Por cálculo, determinou-se que a quantidade máxima de hexano que se podia adicionar era de 86 μL . Consequentemente, foram adicionados 60 μL da solução padrão da mistura de PAHs de 1 ppm sendo obtida uma amostra de água dopada de concentração 0,01 ppb de PAHs, sendo este valor de concentração, o limite legal para a presença de BaP em águas para consumo. Como este limite é bastante desafiante para o equipamento, a nível de sensibilidade do sistema, e esta conjectura assume uma recuperação de 100%, que nunca corresponde à realidade, optou-se por concentrar ainda mais o extrato em 100 μL e posteriormente 20 μL . Concentrar mais a amostra *spike* não seria adequado uma vez que a quantidade máxima de hexano adicionar à amostra é de 86 μL .

Assumindo uma recuperação de 100%, em 100 μL obter-se-ia 100 ppb no sistema e a 20 μL obter-se-ia 2 ppm. Estes volumes impossibilitam o uso de *autosampler*, sendo necessário recorrer-se à injeção manual. O resultado expetável é que os picos das amostras *spike* com o volume 20 μL fossem quantificáveis. Contudo, só estavam presentes dois picos passíveis de quantificação no cromatograma, não tendo acontecido o mesmo com o seu duplicado devido à $S/N < 10$.

As diferenças entre duplicados foram bastante acentuadas como se pode verificar na Figura 10.7. Estas diferenças podem ser devidas sobretudo ao manuseamento durante o procedimento da evaporação e à injeção manual. Assim, apenas foi possível integrar os picos do Phe e Ant e do Pyr. Devido à falta de uma curva de calibração, e de este volume fazer corresponder a 2 ppm (valor fora da gama de trabalho) não foi possível estimar a sua recuperação. Nas amostras de 100 μL nenhum pico foi quantificável.

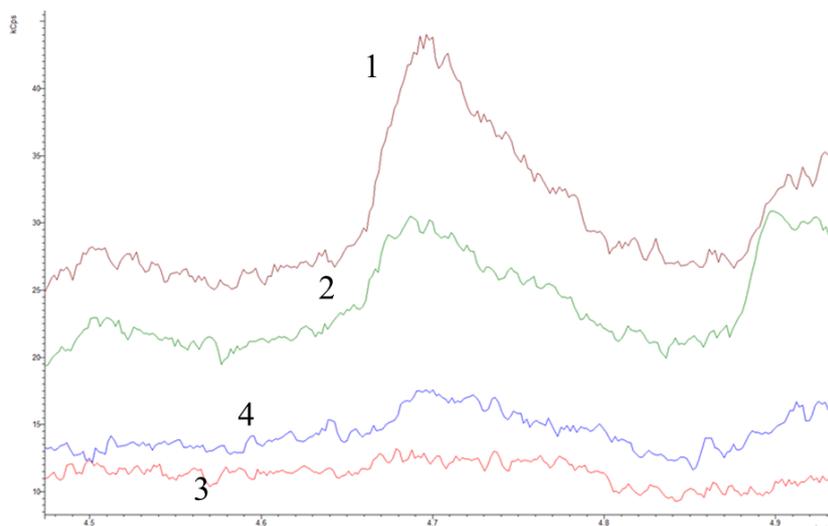


Figura 10.7- Cromatograma da transição 128 → 127 na janela temporal do Nap (Tabela 10.4) das amostras spike. 1. Amostra *spike 1* (20 μL); 2. Amostra *spike 2* (20 μL); 3. Amostra *spike 3* (100 μL); 4. Amostra *spike 4* (100 μL).

Este estudo demonstrou a ineficiência da metodologia realizada para a extração. O procedimento de SPE realizado tratou-se de um procedimento genérico, necessitando de ser otimizado. O volume a extrair foi selecionado com base no método 525.3 da EPA em que é extraído 1 L de amostra de água. Posteriormente, o extrato é reconcentrado em 1 mL, ou seja, um fator de enriquecimento de 1000. Dado o estado do equipamento, optou-se por reconcentrar em 100 μL e 20 μL , cujos fatores de enriquecimento são 1×10^4 e 5×10^4 , respectivamente. Sem embargo, a maioria dos picos não foram quantificáveis, reforçando assim a necessidade de otimizar o procedimento da SPE.

Este estudo também permitiu perceber que os padrões internos C_{21} e C_{33} foram inadequados. A solução de PAHs que foi utilizada na dopagem não possuía padrão, sendo que estes originavam picos com intensidades elevadas, resultados da escolha dos íons produtos de MRM. (Figura A. 6). Os íons dos padrões estão presentes também em interferentes, pelo que a sua utilização não foi adequada.

Numa situação ideal, os melhores padrões a utilizar correspondem aos analitos de interesse marcados isotopicamente. A seleção dos padrões nesta dissertação vieram realçar a importância dessa escolha. É evidente que, em trabalho futuro, toda a análise quantitativa terá de ser efetuada com padrões marcados isotopicamente. No entanto, para o Fosfato não foi apresentado este problema.

10.6.2 Amostras reais

A extração dos PAHs das amostras reais foi realizada de acordo com o procedimento descrito na Secção 9.5. Foram extraídas 12 amostras de água de vários pontos do país (Figura 9.5). Na totalidade das amostras os picos foram escassos. No entanto, foram detetados picos na janela do BaP em várias amostras (Figura 10.8). Esta atribuição não é 100% confiável, uma vez que este composto é o mais monitorizado e também não é solúvel em água. A hipótese que o pico de BaP tenha origem da água é descartável devido ao rigor das autoridades locais., em relação ao tratamento e monitorização de águas destinadas ao consumo. Por exemplo, em Almada os níveis de BaP foram de 0,003 ppb⁵³ que seria impossível detetar com o atual estado equipamento.

Uma vez que não foram detetados picos de outros PAHs, é possível afirmar que não se encontra presente uma contaminação do solvente com a solução padrão de mistura de PAHs. A origem do interferente identificado na janela de temporal do BaP pode estar relacionada com o processo de evaporação.

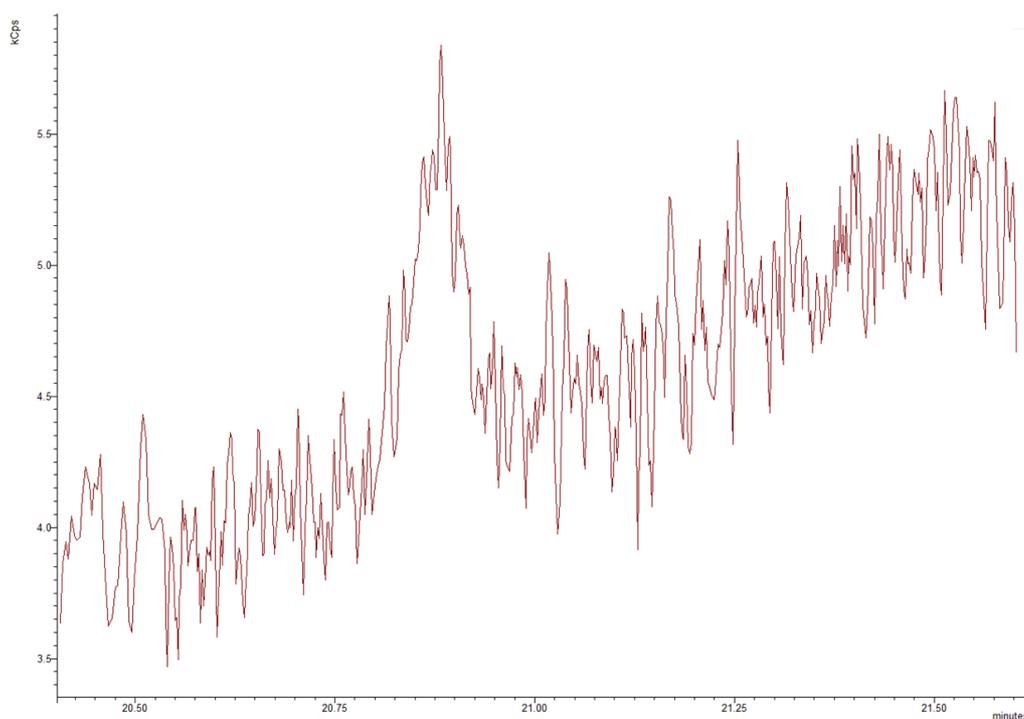


Figura 10.8- Cromatograma da transição 252 → 251 na janela temporal do BaP (Tabela 10.4) da amostra real de Almada.

10.7 Retrospectiva

Ao longo da realização desta dissertação foram sentidas várias dificuldades, relacionadas com o estado dos detetores e a quantidade de solução padrão disponível. O estado dos detetores contribuiu bastante para a baixa sensibilidade dos sistemas. No sistema GC/TOFMS, a injeção por LVI foi crucial dado que com concentrações de 100 ppb não seriam detetados picos com a injeção no modo *splitless*.

No sistema GC/MS/MS o modo de MRM poderia conseguir detetar baixas concentrações das soluções-padrão. Para chegar a LOQs inferiores a 0,01 ppb era necessário trabalhar com uma gama de baixas concentrações.

A avaria do Q0 diminuiu ainda mais a sensibilidade, pelo que não foi possível construir-se uma curva de calibração. Adicionalmente, os picos não possuíam forma gaussiana e os seus S/N eram inferiores a 10.

A única solução para obter uma reta seria obviamente utilizar uma gama de concentrações maiores, no entanto, isto não seria possível, uma vez que a solução-mãe tinha 1 ppm de concentração e não havia mais ampolas disponíveis. Como alternativa, poder-se-ia preparar uma solução a partir da evaporação de 1 *vial* com a misturas de PAHs a 1 ppm. De facto, esta evaporação foi efetuada de modo a conseguir uma solução com 10 ppm para usar durante o FS e análise de produtos do MRM visto que a 1 ppm o sistema não detetava picos dos HPAHs em FS. Infelizmente, esta abordagem não foi viável para a preparação de soluções para a curva, uma vez que a sua concentração não seria nada rigorosa. Além disso, o uso de uma gama mais concentrada levaria em consideração da utilização de volumes mais pequenos para serem injetados. Isto foi a metodologia utilizada nas amostras *spike* e na prática permitiu apenas detetar PAHs nestas amostras.

Outra dificuldade observada foi a integração manual dos picos e a obtenção dos seus S/N. Ao longo dos anos têm sido criados novos procedimentos e algoritmos para a integração automática de picos cromatográficos. Apesar do desenvolvimento de *softwares* cada vez mais consistentes e precisos ainda requerem revisão humana e reintegrações manuais, pois a adaptação crítica dos humanos é superior à do *software*, por exemplo, em situações de co-eluições, ruído ou picos de ombro. No entanto, a revisão da integração por parte do analista pode ser bastante demorada e é impraticável em situações de rotina. Além disso há bastante variabilidade de pessoa para pessoa dependendo sobretudo da sua experiência e os humanos cometem erros, o que provoca à realização de processos diferentes de integração. Recentemente, têm sido reportados progressos nas técnicas *machine learning* e *deep learning* que podem contribuir para novos progressos nesta problemática.⁵⁵⁻⁵⁷

Para chegar aos LOQs desejados num sistema GC-FID a técnica de LVI-PTV pode ser promissora. Comparativamente a *splitless*, esta técnica consegue ser ainda mais sensível. Além disso, o PTV contribuiu para diminuição da discriminação dos PAHs mais voláteis⁴⁰ como foi observado na Secção 10.2. No entanto, ainda não há dados disponíveis na literatura acerca desta técnica em GC-FID para quantificação de PAHs em águas para consumo. A utilização de outra fase estacionária como a ZB-PAHs também pode ser eficaz já que consegue separar totalmente os pares críticos e assim obter picos com elevado S/N. Não obstante, o objetivo é o desenvolvimento de um método para análises de rotina pelo que é recomendada a utilização de uma fase estacionária mais versátil como a DB-5.

Outro ponto relevante é a eficiência do método de extração. A otimização da SPE pode ser o ponto fulcral para chegar aos limites desejados. Os resultados das amostras *spike* (Secção 10.6.1) demonstraram que o método de extração utilizado apresentou rendimentos bastante baixos. Mesmo não

sendo possível calcular rigorosamente é possível fazer uma estimativa. A amostra dopada possuía 0,01 pbb da mistura de PAHs e mesmo com fatores de enriquecimento de 5×10^4 não foi possível quantificar todos os PAHs. Com este fator de enriquecimento a concentração da amostra possuiria 2 ppm de concentração, se a recuperação fosse de 100%. A esta concentração é expetável que o método MRM fosse capaz de quantificar os PAHs. Isto comprovou a necessidade de otimizar o método de SPE.

Para a realização da otimização dos parâmetros cromatográficos e da extração é recomendado a utilização de DOE. Ao longo dos anos, o DOE demonstrou ser uma ferramenta poderosa na otimização, pois consegue correlacionar os parâmetros, de modo a permitir uma seleção de parâmetros com maior impacto a otimizar e na obtenção de pontos médios de otimização, a partir de mapas de superfície, permitindo poupar tempo e recursos.³⁷ Na otimização dos parâmetros de LVI-PTV com DOE é relatada a utilização dos seguintes parâmetros: tempo de purga, pressão de purga, tempo de *splitless*, temperatura de injeção, temperatura de vaporização, tempo de vaporização, volume de injeção e velocidade de injeção.^{42,58} Para a SPE, o tipo, o volume de solvente utilizado durante a eluição, natureza do sorvente têm sido os parâmetros alvos de otimização.⁵⁹⁻⁶¹

11 Conclusões e trabalho futuro

O objetivo desta dissertação consistiu no estudo de diversos parâmetros em sistemas GC/TOFMS e GC/MS/MS para que os seus resultados fossem transpostos para GC-FID.

O estudo efetuado na Secção 10.2 demonstrou o impacto das diferentes geometrias dos *liners* e observou-se o fenómeno da discriminação. As utilizações de altas temperaturas de injeção podem contribuir para a obtenção de maiores áreas e para a diminuição da discriminação. A utilização de rampas de temperatura também contribuiu para contrariar a discriminação. No entanto, a utilização da *hot needle* não demonstrou afetar as áreas dos picos. Além disso, permitiu observar a importância de mudar o *liner* após várias injeções.

Os testes em diferentes matrizes (Secção 10.3) demonstraram a necessidade da monitorização de PAHs em lamas para sejam utilizadas em segurança na agricultura. Adicionalmente, permitiu constatar o impacto da solubilidade dos PAHs na sua presença em diferentes matrizes.

O desenvolvimento do método de MRM não foi concluído com sucesso. O mau estado do detetor e a avaria no Q0 foram fulcrais para um resultado aquém das expectativas. Os picos não possuíam formas gaussianas e assim os seus S/N foram bastante baixos pelo que a maioria dos picos não eram quantificáveis.

Os testes de recuperação demonstraram a ineficiência do procedimento efetuado de extração, pelo que a extração necessita de ser otimizada. Além disso, os testes nas águas residuais também apontaram para o mesmo problema. A otimização da SPE pode também ser um ponto fulcral para o sucesso.

A técnica de injeção LVI-PTV é uma técnica promissora para a quantificação de PAHs em águas para consumo porque é mais sensível que *splitless*. A utilização desta técnica em GC-FID pode permitir a obtenção de LOQs compatíveis com o objetivo desta dissertação. Segundo o *screening* efetuado, os parâmetros p_{purga} e t_{purga} necessitam de ser otimizados em mais detalhe.

Como trabalho futuro dever-se-á começar com o *screening* dos parâmetros a otimizar de SPE e de LVI-PTV-GC-FID. Após a seleção dar-se-á à otimização dos parâmetros com recurso a DOE. Esta metodologia demonstrou ser eficaz para a otimização e, ao mesmo tempo, permite poupar tempo e recursos. Em seguida, proceder-se-á à validação do método. Caso a validação seja bem-sucedida para o fim pretendido, o método poderá ser aplicado a amostras reais e em rotina.

12 Bibliografia

- (1) Lawal, A. T. Polycyclic Aromatic Hydrocarbons. A Review. *Cogent Environ. Sci.* **2017**, 3 (1). <https://doi.org/10.1080/23311843.2017.1339841>.
- (2) Kim, K.-H.; Jahan, S. A.; Kabir, E.; Brown, R. J. C. A Review of Airborne Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs) and Their Human Health Effects. *Environ. Int.* **2013**, 60, 71–80. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2013.07.019>.
- (3) Adeniji, A. O.; Okoh, O. O.; Okoh, A. I. Analytical Methods for Polycyclic Aromatic Hydrocarbons and Their Global Trend of Distribution in Water and Sediment: A Review. In *Recent Insights in Petroleum Science and Engineering*; Zoveidavianpoor, Mansoor, Eds.; InTech, 2018; pp 393–428. <https://doi.org/10.5772/intechopen.71163>.
- (4) Abdel-Shafy, H. I.; Mansour, M. S. M. A Review on Polycyclic Aromatic Hydrocarbons: Source, Environmental Impact, Effect on Human Health and Remediation. *Egypt. J. Pet.* **2016**, 25 (1), 107–123. <https://doi.org/10.1016/j.ejpe.2015.03.011>.
- (5) Net, S.; Dumoulin, D.; El-Osmani, R.; Rabodonirina, S.; Ouddane, B. *Case Study of PAHs, Me-PAHs, PCBs, Phthalates and Pesticides Contamination in the Somme River Water, France*; 2014; Vol. 8, pp 1159–1170. <https://doi.org/10.22059/ijer.2014.809>.
- (6) Mojiri, A.; Zhou, J. L.; Ohashi, A.; Ozaki, N.; Kindaichi, T. Science of the Total Environment Comprehensive Review of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Water Sources , Their Effects and Treatments. *Sci. Total Environ.* **2019**, 696, 133971. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.133971>.
- (7) World Health Organization. *Polynuclear Aromatic Hydrocarbons in Drinking-Water Background Document for Development of WHO Guidelines for Drinking-Water Quality*; 2003.
- (8) Rocha, A. C.; Palma, C. Source Identification of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Soil Sediments: Application of Different Methods. *Sci. Total Environ.* **2019**, 652, 1077–1089. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.10.014>.
- (9) Andersson, J. T.; Achten, C. Time to Say Goodbye to the 16 EPA PAHs? Toward an Up-to-Date Use of PACs for Environmental Purposes. *Polycycl. Aromat. Compd.* **2015**, 35 (2–4), 330–354. <https://doi.org/10.1080/10406638.2014.991042>.
- (10) International Agency for Research on Cancer. List of Classifications – IARC Monographs on the Identification of Carcinogenic Hazards to Humans <https://monographs.iarc.who.int/list-of-classifications> (accessed Mar 4, 2021).
- (11) Parlamento Europeu. DIRETIVA (UE) 2020/2184 DO PARLAMENTO EUROPEU E DO CONSELHO de 16 de Dezembro de 2020 Relativa à Qualidade Da Água Destinada Ao Consumo Humano (Reformulação). *J. Of. da União Eur.* **2020**, 2019, 1–62.
- (12) Etre, L. S. Nomenclature for Chromatography (Iupac Recommendations 1993). *Pure Appl.*

- Chem.* **1993**, 65 (4), 819–872. <https://doi.org/10.1351/pac199365040819>.
- (13) Poole, C. F. Chapter 1 - General Concepts in Column Chromatography. In *The Essence of Chromatography*; Poole, C. F., Ed.; Elsevier Science: Amsterdam, 2003; pp 1–78. <https://doi.org/10.1016/B978-044450198-1/50014-8>.
- (14) Dunnivant, F. M.; Ginsbach, J. W. Gas Chromatography, Liquid Chromatography, Capillary Electrophoresis
http://people.http/people.whitman.edu/~dunnivfm/C_MS_Ebook/CH1/1_2.html (accessed Sep 26, 2021).
- (15) Lundanes, E.; Reubsæet, L.; Greibrokk, T. *Chromatography: Basic Principles, Sample Preparations and Related Methods*, 1 st.; Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA: Boschstr. 12, 69469 Weinheim, Germany, 2014.
- (16) Poole, C. F. Chapter 2 - The Column in Gas Chromatography; Poole, C. F., Ed.; Elsevier Science: Amsterdam, 2003; pp 79–170. <https://doi.org/10.1016/B978-044450198-1/50015-X>.
- (17) Poole, C. F. Chapter 3 - Instrumental Aspects of Gas Chromatography. In *The Essence of Chromatography*; Poole, C. F., Ed.; Elsevier Science: Amsterdam, 2003; pp 171–266. <https://doi.org/10.1016/B978-044450198-1/50016-1>.
- (18) Harris, D. C. Chapter 21-Mass Spectrometry. In *Quantitative Chemical Analysis*; Marshall, C., Ed.; W. H. Freeman and Company: California, 2010; pp 502–536.
- (19) Eiceman, G. A. Instrumentation of Gas Chromatography. In *Encyclopedia of Analytical Chemistry*; Meyer, R. A., Eiceman, G. A., Eds.; Major Reference Works; 2006. <https://doi.org/10.1002/9780470027318.a5505>.
- (20) Harris, D. C. Chapter 23- Gas Chromatography. In *Quantitative Chemical Analysis*; Marshall, C., Ed.; W. H. Freeman and Company: California, 2010; pp 565–594.
- (21) Hübschmann, H.-J. Chapter 2- Fundamentals. In *Handbook of GC-MS Fundamentals and Applications*; Hübschmann, H.-J., Ed.; Wiley-VCH Verlag GmbH & Co.: Weinheim, 2015.
- (22) das Neves, H. J. C.; Freitas, A. M. C. *Introdução à Cromatografia Gás-Líquido de Alta Resolução*, 1º.; Dias de Sousa, Lda.: Póvoa de Santa Iria, 1996.
- (23) Tipler, A. Chapter 8 - Sample Introduction Methods. In *Gas Chromatography*; Poole, C. F., Ed.; Elsevier: Amsterdam, 2012; pp 187–219. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-385540-4.00008-0>.
- (24) Hoh, E.; Mastovska, K. Large Volume Injection Techniques in Capillary Gas Chromatography. *J. Chromatogr. A* **2008**, 1186 (1), 2–15. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2007.12.001>.
- (25) Blumberg, L. M. Chapter 2 - Theory of Gas Chromatography. In *Gas Chromatography*; Poole, C. F., Ed.; Elsevier: Amsterdam, 2012; pp 19–78. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-385540-4.00002-X>.
- (26) Klee, M. S. Chapter 12 - Detectors. In *Gas Chromatography*; Poole, C. F., Ed.; Elsevier: Amsterdam, 2012; pp 307–347. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-385540-4.00012-2>.
- (27) Gross, J. H. Chapter 1- Introduction. In *Mass Spectrometry A Textbook*; Springer-Verlag: Berlin

- Heidelberg, 2011; pp 1–20.
- (28) Gross, J. H. Chapter 4- Instrumentation. In *Mass Spectrometry A Textbook*; Springer-Verlag: Berlin Heidelberg, 2011; pp 117–222.
- (29) Poole, C. F. Chapter 9 - Spectroscopic Detectors for Identification and Quantification. In *The Essence of Chromatography*; Poole, C. F., Ed.; Elsevier Science: Amsterdam, 2003; pp 719–792. <https://doi.org/10.1016/B978-044450198-1/50022-7>.
- (30) Hoffmann, E. de; Stroobant, V. Chapter 5- Mass Spectrometry/ Chromatography Coupling. In *Mass Spectrometry: Principles and Applications, 3rd Edition*; John Wiley & Sons Ltd: West Sussex, 2007.
- (31) How the Triple Quadrupole works? - GC/MS/MS technology - GC/MS/MS - Chromatography / Chromservis.eu <https://www.chromservis.eu/i/how-the-triple-quadrupole-works?fbclid=IwAR3np9BU58m47XiutaoyS7Jon4Pd16AjiC4-lyGKxgPHqFQBMapgNpiayR0> (accessed Sep 26, 2021).
- (32) Bonfant et-al, L. Sample Preparation in Chromatography. *Journal of Chromatography Library*. 2002, pp 287–339.
- (33) Berrueta, L. A.; Gallo, B.; Vicente, F. A Review of Solid Phase Extraction: Basic Principles and New Developments. *Chromatogr.* 1995 407 **1995**, 40 (7), 474–483. <https://doi.org/10.1007/BF02269916>.
- (34) Sandoval R., M. Extraction of Phorbol Esters (PEs) from Pinion Cake Using Computationally-Designed Polymers as Adsorbents for Solid Phase Extraction, 2017.
- (35) Dejaegher, B.; Smeyers-Verbeke, J.; Heyden, Y. Vander. Chapter 18 - Validation of Gas Chromatographic Methods. In *Gas Chromatography*; Poole, C. F., Ed.; Elsevier: Amsterdam, 2012; pp 435–449. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-385540-4.00018-3>.
- (36) Castro, A. F. R.; Cabrita, L. J. *Guia RELACRE 13 Validação de Métodos Internos de Ensaio Em Análise Química*; 2000; Vol. 13.
- (37) Hibbert, D. B. Experimental Design in Chromatography: A Tutorial Review. *J. Chromatogr. B* **2012**, 910, 2–13. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2012.01.020>.
- (38) Vanaja, K.; Shobha Rani, R. H. Design of Experiments: Concept and Applications of Plackett Burman Design. *Clin. Res. Regul. Aff.* **2007**, 24 (1), 1–23. <https://doi.org/10.1080/10601330701220520>.
- (39) US EPA. Analytical methods approved for drinking water compliance monitoring of organic contaminants <https://nepis.epa.gov/Exe/ZyPDF.cgi?Dockey=P100WD47.txt> (accessed Sep 26, 2021).
- (40) Delgadillo-Marín, M. Á.; Peña-Álvarez, A.; Villalobos, M. Application of Programmed Temperature Vaporization Large Volume Injection Gas Chromatography (PTV-LVI-GC) to the Analysis of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs) in Soils. *J. Mex. Chem. Soc.* **2013**, 57 (2), 85–91. <https://doi.org/10.29356/jmcs.v57i2.217>.

- (41) Shang, D.; Kim, M.; Haberl, M. Rapid and Sensitive Method for the Determination of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Soils Using Pseudo Multiple Reaction Monitoring Gas Chromatography/Tandem Mass Spectrometry. *J. Chromatogr. A* **2014**, *1334*, 118–125. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2014.01.074>.
- (42) Yusà, V.; Quintas, G.; Pardo, O.; Pastor, A.; Guardia, M. de la. Determination of PAHs in Airborne Particles by Accelerated Solvent Extraction and Large-Volume Injection-Gas Chromatography-Mass Spectrometry. *Talanta* **2006**, *69* (4), 807–815. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2005.11.018>.
- (43) Lynam, K.; Smith, D. PAH Analysis Using an Agilent J&W DB-5ms Ultra Inert Capillary GC Column. *Agil. Technol.*
- (44) Grob, K.; Rennhard, S. Evaluation of Syringe Handling Techniques for Injections into Vaporizing GC Injectors. *J. High Resolut. Chromatogr.* **1980**, *3* (12), 627–633. <https://doi.org/10.1002/jhrc.1240031205>.
- (45) Trajan. Inlet Liner Geometry and the Impact on GC Sample Analysis. **2012**, *2*.
- (46) Suciú, N. A.; Lamastra, L.; Trevisan, M. PAHs Content of Sewage Sludge in Europe and Its Use as Soil Fertilizer. *Waste Manag.* **2015**, *41*, 119–127. <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2015.03.018>.
- (47) Villar, P.; Callejón, M.; Alonso, E.; Jiménez, J. C.; Guiraúm, A. Temporal Evolution of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs) in Sludge from Wastewater Treatment Plants: Comparison between PAHs and Heavy Metals. *Chemosphere* **2006**, *64* (4), 535–541. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2005.11.022>.
- (48) Comissão Europeia. *Environmental, Economic and Social Impacts of the Use of Sewage Sludge on Land Final Report Part I: Overview Report RPA*.
- (49) Chen, H.; Gao, G.; Liu, P.; Pan, R.; Liu, X.; Lu, C. Determination of 16 Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Tea by Simultaneous Dispersive Solid-Phase Extraction and Liquid-Liquid Extraction Coupled with Gas Chromatography-Tandem Mass Spectrometry. *Food Anal. Methods* **2016**, *9* (8), 2374–2384. <https://doi.org/10.1007/s12161-016-0427-4>.
- (50) Barco-Bonilla, N.; Romero-González, R.; Plaza-Bolaños, P.; Fernández-Moreno, J. L.; Garrido Frenich, A.; Martínez Vidal, J. L. Comprehensive Analysis of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Wastewater Using Stir Bar Sorptive Extraction and Gas Chromatography Coupled to Tandem Mass Spectrometry. *Anal. Chim. Acta* **2011**, *693* (1–2), 62–71. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2011.03.010>.
- (51) Dhandapani, R.; Elabaji, R. TN-2094 -Optimal Separation of PAH Compounds Including Chrysene & Triphenylene Using Zebron™ ZB-PAH-CT GC Column.
- (52) ISO 8466-1. Water Quality-Calibration and Evaluation of Analytical Methods and Estimation of Performance Characteristics-Part 1: Statical Evaluation of the Linear Calibration Function. **1990**, *1990*.

- (53) Dolan, J. The Role of the Signal-to-Noise Ratio in Precision and Accuracy. *LCGC Eur.* **2006**, *19* (1), 12–16.
- (54) Hang, W.; Lewis, C.; Majidi, V. Practical Considerations When Using Radio Frequency-Only Quadrupole Ion Guide for Atmospheric Pressure Ionization Sources with Time-of-Flight Mass Spectrometry. *Analyst* **2003**, *128* (3), 273–280. <https://doi.org/10.1039/b209109g>.
- (55) Lehotay, S. J. Utility of the Summation Chromatographic Peak Integration Function to Avoid Manual Reintegrations in the Analysis of Targeted Analytes. *LC-GC Eur.* **2017**, *30* (10), 530–540.
- (56) McDowall, R. D. Are You Controlling Peak Integration to Ensure Data Integrity? *LC-GC North Am.* **2020**, *38* (6), 346–354.
- (57) Wu, Z.; Serie, D.; Xu, G.; Zou, J. PB-Net: Automatic Peak Integration by Sequential Deep Learning for Multiple Reaction Monitoring. *J. Proteomics* **2020**, *223* (May), 103820. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2020.103820>.
- (58) Vallejo, A.; Fernández, L. A.; Olivares, M.; Prieto, A.; Etxebarria, N.; Usobiaga, A.; Zuloaga, O. Optimization of Large Volume Injection-Programmable Temperature Vaporization-Gas Chromatography-Mass Spectrometry Analysis for the Determination of Estrogenic Compounds in Environmental Samples. *J. Chromatogr. A* **2010**, *1217* (52), 8327–8333. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2010.10.098>.
- (59) Haleyur, N.; Shahsavari, E.; Mansur, A. A.; Koshlaf, E.; Morrison, P. D.; Osborn, A. M.; Ball, A. S. Comparison of Rapid Solvent Extraction Systems for the GC–MS/MS Characterization of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Aged, Contaminated Soil. *MethodsX* **2016**, *3*, 364–370. <https://doi.org/10.1016/J.MEX.2016.04.007>.
- (60) Kouzayha, A.; Al Iskandarani, M.; Mokh, S.; Rabaa, A. R.; Budzinski, H.; Jaber, F. Optimization of a Solid-Phase Extraction Method Using Centrifugation for the Determination of 16 Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Water. *J. Agric. Food Chem.* **2011**, *59* (14), 7592–7600. <https://doi.org/10.1021/jf200123v>.
- (61) Ferreira, V.; Jarauta, I.; Ortega, L.; Cacho, J. Simple Strategy for the Optimization of Solid-Phase Extraction Procedures through the Use of Solid–Liquid Distribution Coefficients: Application to the Determination of Aliphatic Lactones in Wine. *J. Chromatogr. A* **2004**, *1025* (2), 147–156. <https://doi.org/10.1016/J.CHROMA.2003.10.086>.

13 Anexos

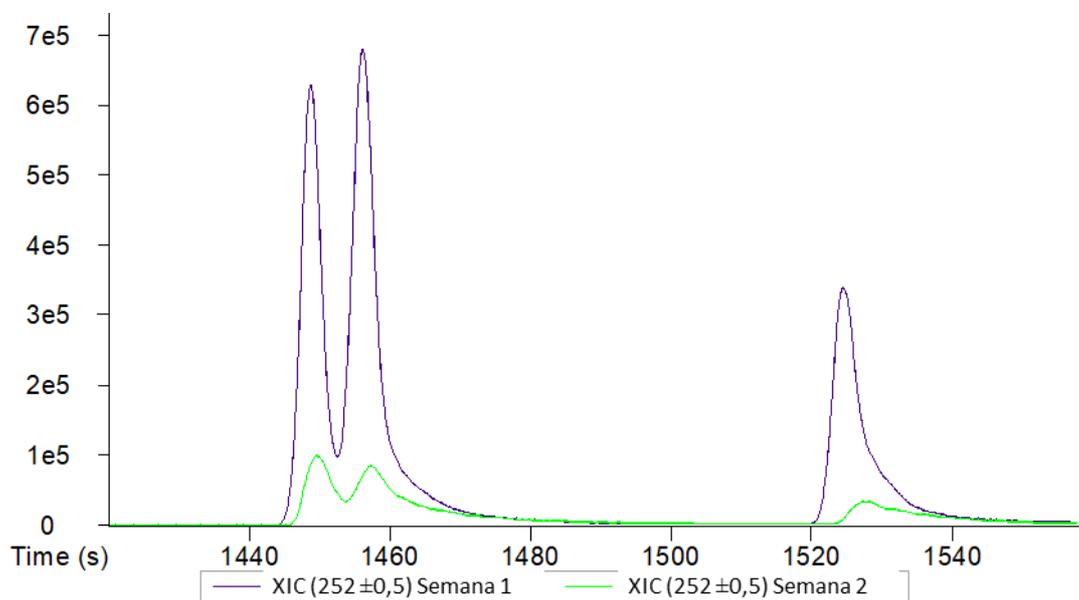


Figura A. 1- Cromatograma de ião extraído (XIC) para o ião 252 com a comparação dos picos de BaP entre as Semana 1 (azul) e 2 (verde).



Figura A. 2- *Liner* de precisão trocado. Este *liner* possuía bastante sujidade durante o momento da troca.

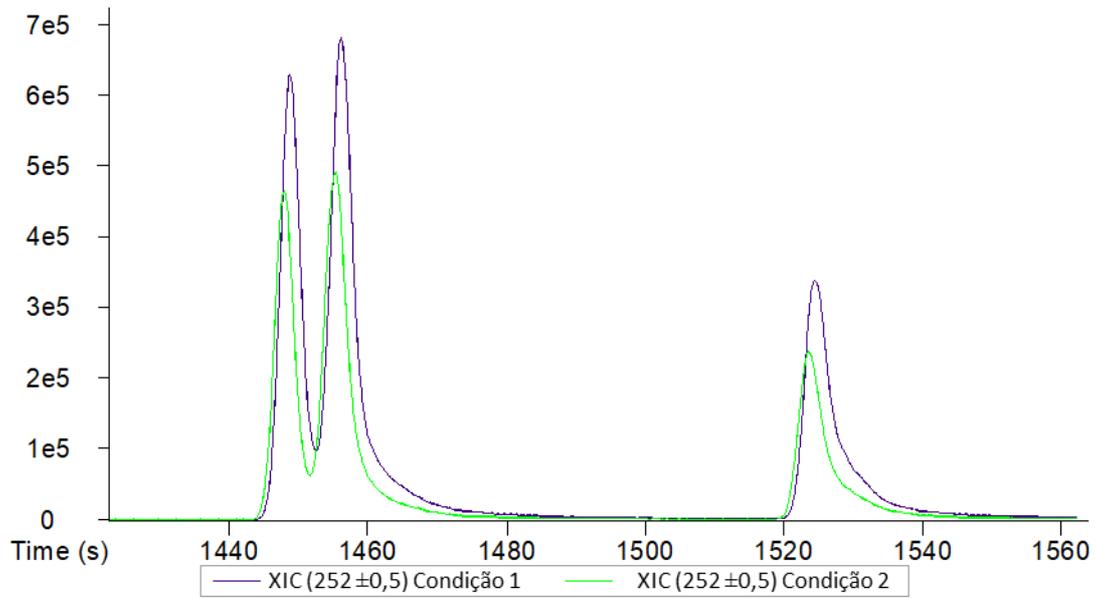


Figura A. 3 Cromatograma de ião extraído (XIC) para o ião 252 com a comparação dos picos de BaP entre as Condições 1 (azul) e 2 (verde).

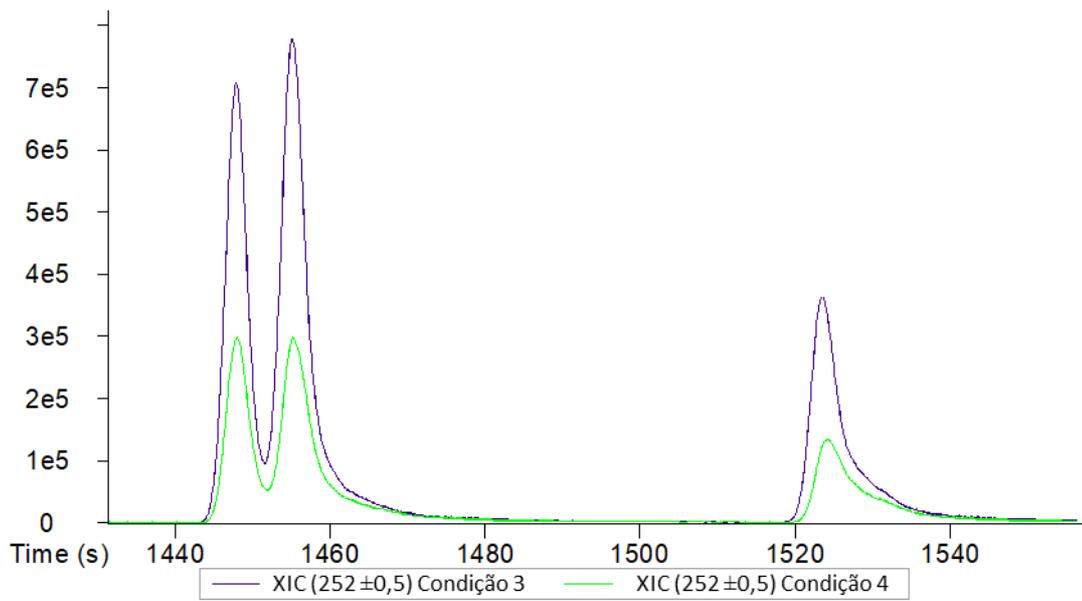


Figura A. 4- Cromatograma de ião extraído (XIC) para o ião 252 com a comparação dos picos de BaP entre as Condições 3 (azul) e 4 (verde).

Tabela A. 1 Efeito principal calculado de cada parâmetro para cada composto

Composto	Tempo de purga (s)	Pressão de purga (psi)	Tempo de splitless (s)	T_{fonte} (°C)	T_{i inlet} (°C)
Nap	-3.91E+06	-2.64E+05	3.41E+06	3.01E+06	-1.20E+07
Acy	-4.34E+05	-2.09E+05	3.12E+06	2.21E+06	2.93E+06
Ace	-5.09E+05	-2.14E+05	1.97E+06	7.00E+05	1.25E+06
Flu	6.07E+05	-3.76E+05	2.66E+06	2.14E+06	3.13E+06
Phe	7.40E+05	-6.07E+05	3.88E+06	2.25E+06	3.00E+06
Ant	4.43E+05	-4.25E+05	2.93E+06	1.41E+06	1.82E+06
Fla	7.18E+05	-1.44E+05	2.75E+06	1.99E+06	1.75E+06
Pyr	7.29E+05	-2.63E+05	2.76E+06	2.11E+06	1.89E+06
Chr	8.36E+04	3.79E+04	5.90E+05	2.29E+05	1.74E+05
BaA	1.39E+05	-1.22E+04	8.26E+05	3.33E+05	2.38E+05
BkF	8.03E+04	4.72E+04	5.73E+05	3.40E+05	1.63E+05
BbF	6.87E+04	2.15E+04	4.60E+05	1.54E+05	1.01E+05
BaP	3.04E+03	3.69E+04	6.76E+05	3.65E+05	1.80E+05
IcdP	7.88E+04	2.85E+04	3.53E+05	6.69E+04	5.85E+04
DBahA	-6.59E+03	9.55E+04	1.81E+05	1.05E+05	-1.49E+03
BghiP	1.36E+05	-6.52E+04	8.19E+05	3.35E+05	1.73E+05

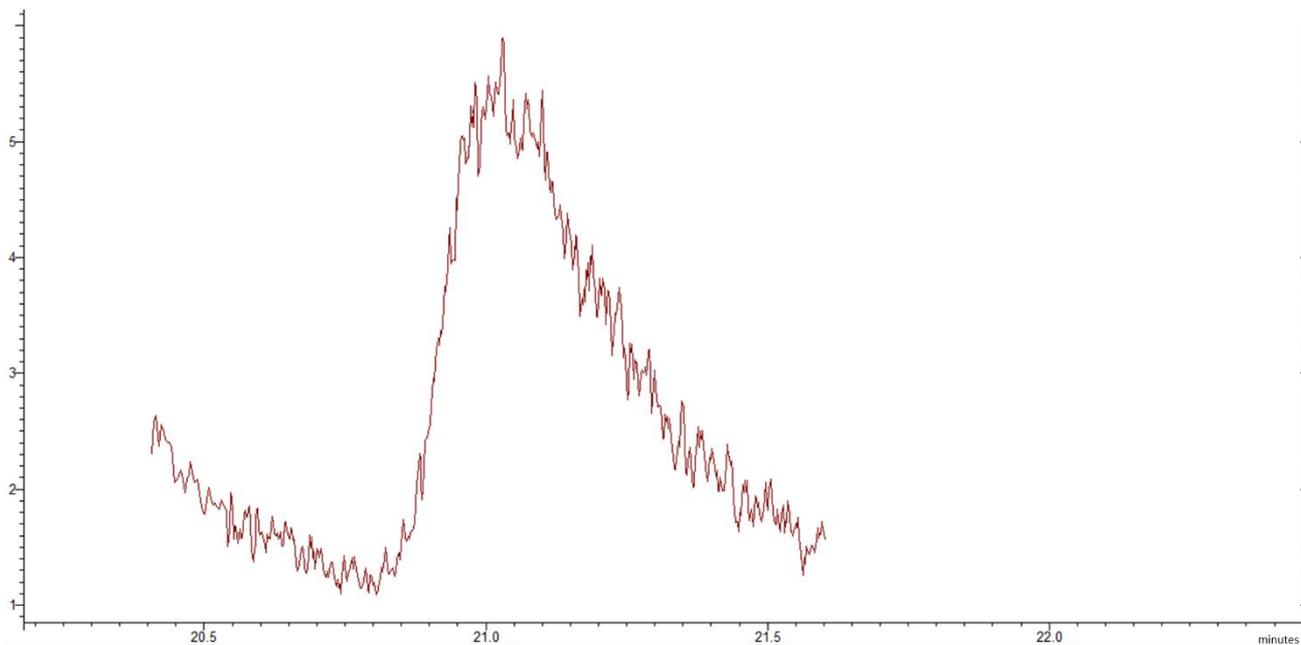


Figura A. 5- Cromatograma da transição 252 → 251 na janela temporal do BaP (Tabela 10.4) da amostra padrão 200 ppb.

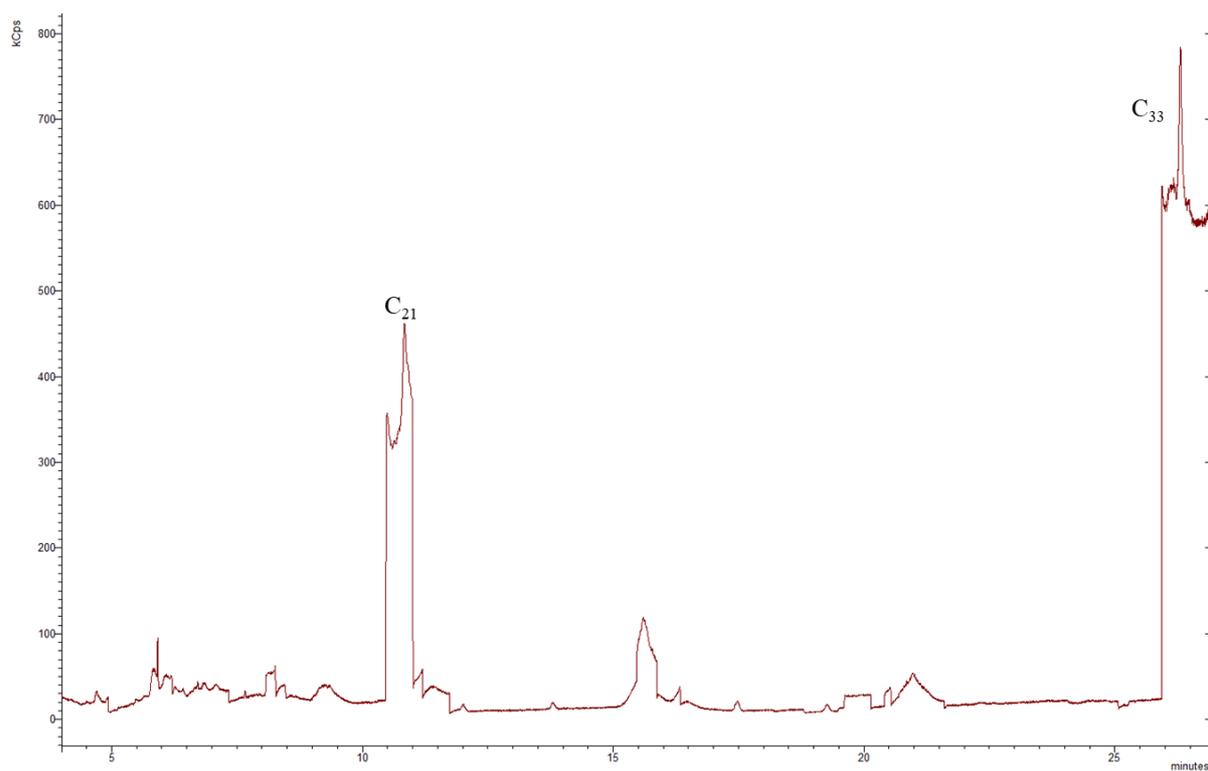


Figura A. 6- Cromatograma total da amostra *spike* 1 com os picos dos padrões interno C₂₁ e C₃₃ realçados.



Bruno Miguel Caldeira António

Desenvolvimento de métodos de GC/TOFMS, GC/MS/MS e GC-
FID para a monitorização de PAHs