



Sofia Alexandra Oliveira da Silva

Licenciada em Ciências de Engenharia Química e Bioquímica

**Validação de um Método de Ensaio para
Análise de Clorobenzenos
por SPME – GC/MS**

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre
em Engenharia Química e Bioquímica

Orientador: Doutor Vítor Vale Cardoso, EPAL, SA

Co-orientador: Professor Doutor Mário Eusébio, FCT/UNL

Júri:

Presidente: Professora Doutora Susana Filipe Barreiros

Arguente: Professor Doutor Marco Diogo Richter Gomes da Silva

Vogal: Doutor Vítor Vale Cardoso



FACULDADE DE
CIÊNCIAS E TECNOLOGIA
UNIVERSIDADE NOVA DE LISBOA

Março 2017

Sofia Alexandra Oliveira da Silva

Licenciada em Ciências de Engenharia Química e Bioquímica

**Validação de um Método de Ensaio para
Análise de Clorobenzenos
por SPME – GC/MS**

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre
em Engenharia Química e Bioquímica

Orientador: Doutor Vítor Vale Cardoso, EPAL, SA

Co-orientador: Professor Doutor Mário Eusébio, FCT/UNL

Março 2017

Validação de um Método de Ensaio para Análise de Clorobenzenos por SPME – GC/MS

Copyright © 2017 por Sofia Alexandra Oliveira da Silva, FCT/UNL e UNL

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 objectivos educacionais ou de investigação, não comerciais, desde que seja dado crédito ao autor e editor.

Agradecimentos

À Eng.^a Maria João Benoliel pela oportunidade concedida de realizar o estágio nas instalações do Laboratório Central da EPAL, SA.

Ao Dr. Vítor Cardoso, pelo acompanhamento dado ao longo do desenvolvimento deste trabalho, por todos os conhecimentos que transmitiu e especialmente pela atmosfera de trabalho que proporcionou.

Ao Professor Mário Eusébio, por todas as correções e sugestões feitas que foram indispensáveis para a conclusão deste trabalho.

Ao António Pato, à Cristina Correia, à Inês, ao João, à Marina, à Marta, à Patrícia e à Salomé que tornaram a estadia no laboratório inesquecível, pela partilha de conhecimentos e principalmente pelo companheirismo e pela amizade ao longo deste período.

Não podia deixar de agradecer também ao resto da equipa do laboratório, Dr. Alexandre Rodrigues, Dra. Ana Neto e Dra. Ana Penetra.

Gostaria também de agradecer à Elidiane e à D^a Júlia pela disponibilidade e pelo auxílio dado.

Por último, mas não menos importante, à minha família sem quem nunca teria conseguido atingir esta meta.

Resumo

O trabalho desenvolvido teve como objectivo a implementação de um método para a análise dos Clorobenzenos: 1,2- Diclorobenzeno, 1,3- Diclorobenzeno, 1,4-Diclorobenzeno, 1,2,3- Triclorobenzeno, 1,2,4- Triclorobenzeno e 1,3,5-Triclorobenzeno, em águas destinadas ao consumo humano, águas superficiais e subterrâneas.

Com o intuito de desenvolver este método, recorreu-se ao processo de microextração em fase sólida como meio de preparação de amostra, associado à técnica analítica de cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa, SPME – GC/MS.

O primeiro passo no desenvolvimento do método consistiu na análise dos Clorobenzenos por espectrometria de massa em modo *Full Scan*, o que permitiu a seleção dos iões característicos mais abundantes de cada composto e a determinação dos respetivos tempos de retenção cromatográficos.

Após a seleção dos iões característicos, todas as análises realizadas posteriormente foram efetuadas usando o modo SIM do espectrómetro de massa.

Foi efetuada a otimização das condições de SPME e GC e a validação do método de ensaio.

Da otimização das condições de SPME, concluiu-se que as melhores condições seriam: a fibra DVB/CAR/PDMS, adsorção de 25 minutos a 40 °C e 250 rpm de agitação, em *headspace*, desadsorção de 3 minutos, sem *salting out* e com 1,5 minutos de *splitless*.

Na validação do método, obtiveram-se coeficientes de correlação superiores a 0,995 e comprovou-se a linearidade do método pelos testes de análise de resíduos e de Mandel. No estudo da repetibilidade, obtiveram-se valores de RSD abaixo de 15%. Para a precisão intermédia o RSD foi inferior a 15% para todos os compostos, excepto para o 12DCB que foi 30%. Obtiveram-se, no geral, percentagens de recuperação na ordem dos 74 a 115%, com excepção mais uma vez do 12DCB que foram na ordem dos 68 a 85%, aliados a valores de RSD inferiores a 25%. Em termos da estimativa de incerteza, estas foram globalmente inferiores a 30%.

Palavras-chave: Clorobenzenos, SPME – GC/MS, otimização, validação

Abstract

The objective of this study was to develop an analytical method for the analysis of the Chlorobenzenes: 1,2-Dichlorobenzene, 1,3-Dichlorobenzene, 1,4-Dichlorobenzene 1,2,3-Trichlorobenzene, 1,2,4- Trichlorobenzene and 1,3,5-Trichlorobenzene, in water destined for human consumption, surface water and groundwater.

In order to develop this method, a solid phase microextraction was used as the sample extraction method and gas chromatography coupled to mass spectrometry, SPME – GC/MS, was used as the analytical method.

The first step in the development of the method was the analysis of each Chlorobenzene by mass spectrometry using the Full Screen acquisition mode, which allowed the selection of the most abundant characteristic ions of each compound, as well as the characterization of the compounds by its chromatographic retention times.

After the selection of the characteristic ions, all subsequent analysis were performed using the SIM mode of the mass spectrometer.

The optimization of SPME and GC conditions as well as the method validation was also performed.

After the optimization of the SPME conditions, the best conditions were: use of DVB/CAR/PDMS fiber, 25 minutes of adsorption at 40 °C and with agitation of 250 rpm, in headspace adsorption, 3 minutes of desorption time, without salting out and with 1,5 minutes of splitless injection mode.

Regarding method validation, correlation coefficients of over 0,995 were obtained and method linearity was proved through residue analysis and Mandel tests. In the repeatability study, a relative standard deviation, RSD, under 15% was obtained. For intermediate precision, RSD was below 15% for all compound, except for 12DCB which was 30%. In general, recovery percentages between 74 and 115% were obtained, except once again for 12DCB, which were between 68 and 85%, along with RSD values below 25%. In terms of the estimation of the measurements uncertainty, these were globally under 30%.

Keywords: Chlorobenzenes, SPME – GC/MS, optimization, validation

Índice de Conteúdos

Capítulo 1 – Introdução	1
1.1 – EPAL.....	1
1.2 – Compostos em Estudo.....	1
1.3 – Motivação e Enquadramento do Tema.....	2
1.4 – Legislação.....	4
Capítulo 2 – Preparação de Amostra	5
2.1 – Princípios da Microextração em Fase Sólida (SPME)	5
2.2 – Otimização do Processo de SPME.....	7
2.2.1 – Variação do Volume de Solvente.....	7
2.2.2 – Seleção da Fibra	8
2.2.3 – Tempo de Adsorção	9
2.2.4 – Temperatura de Adsorção	9
2.2.5 – Tempo de Desadsorção	10
2.2.6 – Agitação	10
2.2.7 – Modo de Extração	10
2.2.8 – Salting Out.....	11
Capítulo 3 – Cromatografia Gasosa/Espectrometria de Massa (GC/MS)	13
3.1 – Cromatografia Gasosa/Espectrometria de Massa.....	13
3.1.1 – Introdução.....	13
3.2 – Cromatografia Gasosa	14
3.2.1 – Introdução.....	14
3.2.2 – Componentes de um Cromatógrafo Gasoso	15
3.2.3 – Aspetos Teóricos	18
3.3 – Espectrometria de Massa.....	22
3.3.1 – Introdução.....	22
3.3.2 – Componentes de um Espectrómetro de Massa	23
Capítulo 4 – Validação de Métodos de Ensaio	27
4.1 – Introdução	27

4.2 – Avaliação Indireta	27
4.2.1 – Seletividade	27
4.2.2 – Precisão	28
4.2.3 – Quantificação	29
4.3 – Avaliação Direta.....	32
4.3.1 – Ensaios Interlaboratoriais.....	32
4.3.2 – Materiais de Referência Certificados, MRC	33
4.3.3 – Ensaios de Recuperação.....	33
Capítulo 5 – Parte Experimental	35
5.1 – Equipamento e Material	35
5.2 – Reagentes	35
5.2.1 – Padrões Certificados.....	35
5.2.2 – Solventes	36
5.2.3 - Amostras	36
5.3 – Procedimento Experimental	36
5.3.1 – Preparação de Soluções Padrão.....	36
5.2.2 – Condições de SPME.....	37
5.3.3 – Condições do Método Cromatográfico	39
Capítulo 6 – Resultados Experimentais Obtidos e Discussão.....	41
6.1 – Identificação dos Compostos em Estudo.....	41
6.2 – Otimização dos Parâmetros do Método de SPME	44
6.2.1 – Volume de Solvente	45
6.2.2 – Tipo de Fibra	46
6.2.3 – Tempo de Adsorção	46
6.2.4 – Temperatura de Adsorção	47
6.2.5 – Tempo de Desadsorção	48
6.2.6 – Agitação	49
6.2.7 – Modo de Extração	50
6.2.8 – <i>Salting Out</i>	51

6.3 – Otimização e Validação do Método Cromatográfico	51
6.3.1 – Tempo de <i>Splitless</i>	51
6.3.2 – Estudo de Linearidade	52
6.3.3 – Seleção da Matriz	56
6.3.4 – Sensibilidade do Método	57
6.3.5 – Limiares Analíticos	57
6.3.6 – Precisão	59
6.3.7 – Ensaio de Recuperação	61
6.3.8 – Incertezas	63
Capítulo 7 – Conclusões	67
Referências Bibliográficas	71
Anexo A – Legislação	I
Anexo B – Propriedades Físico-Químicas dos Compostos em Estudo	III
Anexo C – Método dos Mínimos Quadrados e Análise de Resíduos	V
Anexo D – Teste de Mandel	XIII
Anexo E – Teste de Rikilt	XXI
Anexo F – Teste das Áreas Normalizadas	XXVII
Anexo G – Teste de Homogeneidade de Variâncias	XXXIII
Anexo H – Limiares Analíticos (LOQ e LOD)	XLI
Anexo I – Cálculo de Incertezas	XLIX
Anexo J – Avaliação Económica	LIII

Índice de Figuras

Figura 2.1 – Processo geral de adsorção	6
Figura 2.2 – Processo de desadsorção	7
Figura 2.3 – Representação do sistema de extração em SPME.....	8
Figura 2.4 – Modos de extração em SPME.....	11
Figura 3.1 - Esquema típico de um sistema de GC/MS	13
Figura 3.2 – Representação esquemática de um processo cromatográfico	14
Figura 3.3 – Injetor do tipo split/splitless.....	16
Figura 3.4 – Esquema de uma coluna capilar.....	17
Figura 3.5 – Estrutura geral da cadeia de polisiloxano	17
Figura 3.5 – Cromatograma típico	19
Figuras 3.6 – Representação gráfica da relação entre o valor de H e da velocidade linear para vários gases	22
Figura 3.7 – Representação de uma fonte de ionização EI	24
Figura 3.8 – Representação de um analisador do tipo quadrupolo.....	25
Figura 3.9 – Tipos de multiplicadores de electrões.....	26
Figura 6.1 – Espectro de massa obtido para o 14DCB.....	41
Figura 6.2 - Mecanismos propostos de fragmentação do 14DCB.....	42
Figura 6.3 – Mecanismo de formação do ião característico m/z 111	42
Figura 6.4 - Espectro de massa obtido para o 123TCB.....	43
Figura 6.5 – 1º mecanismo passível de originar o ião característico de m/z 145	43
Figura 6.6 – 2º mecanismo passível de originar o ião característico de m/z 145	44
Figura 6.7 - Cromatograma da solução conjunta de Clorobenzenos.....	44
Figura 6.8 – Variação das áreas dos compostos em função dos volumes de solvente	45
Figura 6.9 - Variação das áreas dos compostos em função da fibra utilizada.....	46
Figura 6.10 – Variação das áreas dos compostos em função do tempo de adsorção	47
Figura 6.11 – Variação das áreas dos compostos em função da temperatura de adsorção	48
Figura 6.12 – Variação das áreas dos compostos em função do tempo de desadsorção	49
Figura 6.13 – Variação da área dos compostos em função da agitação utilizada.....	49
Figura 6.14 – Variação das áreas em função do modo de extração	50
Figura 6.15 - Variação das áreas em função da quantidade de NaCl adicionado.....	51
Figura 6.16 – Variação da área dos compostos em função do tempo de splitless testado	52
Figura 6.17 – Representação gráfica da área dos picos em função da concentração para o 12DCB	52
Figura 6.18 – Representação gráfica da área dos picos em função da concentração para o 13DCB	53

Figura 6.19 – Representação gráfica da área dos picos em função da concentração para o 14DCB	53
Figura 6.20 – Representação gráfica da área dos picos em função da concentração para o 123TCB	53
Figura 6.21 – Representação gráfica da área dos picos em função da concentração para o 124TCB	54
Figura 6.22 – Representação gráfica da área dos picos em função da concentração para o 135TCB	54
Figura 6.23 – Representação gráfica da sensibilidade para cada composto em estudo	57
Figura 7.1 – Causas prováveis para a variabilidade dos resultados obtidos	69
Figura A.1 – Limites legais impostos na legislação para os Triclorobenzenos	I
Figura C.1 – Representação gráfica da concentração em função dos resíduos (12DCB)	VIII
Figura C.2 - Representação gráfica da concentração em função dos resíduos (13DCB)	VIII
Figura C.3 - Representação gráfica da concentração em função dos resíduos (14DCB)	IX
Figura C.4 - Representação gráfica da concentração em função dos resíduos (123TCB)	X
Figura C.5 - Representação gráfica da concentração em função dos resíduos (124TCB)	X
Figura C.6 - Representação gráfica da concentração em função dos resíduos (135TCB)	XI
Figuras D.1 e D.2 – Representação gráfica dos ajustes linear e polinomial (12DCB)	XIV
Figuras D.3 e D.4 – Representação gráfica dos ajustes linear e polinomial (13DCB)	XV
Figuras D.5 e D.6 – Representação gráfica dos ajustes linear e polinomial (14DCB)	XVI
Figuras D.7 e D.8 – Representação gráfica dos ajustes linear e polinomial (123TCB)	XVII
Figuras D.9 e D.10 – Representação gráfica dos ajustes linear e polinomial (124TCB)	XVIII
Figuras D.11 e D.12 – Representação gráfica dos ajustes linear e polinomial (135TCB)	XIX
Figura E.1 – Representação gráfica do teste de Rikilt (12DCB)	XXII
Figura E.2 – Representação gráfica do teste de Rikilt (13DCB)	XXIII
Figura E.3 – Representação gráfica do teste de Rikilt (14DCB)	XXIII
Figura E.4 – Representação gráfica do teste de Rikilt (123TCB)	XXIV
Figura E.5 – Representação gráfica do teste de Rikilt (124TCB)	XXV
Figura E.6 – Representação gráfica do teste de Rikilt (135TCB)	XXV
Figura F.1 – Representação gráfica da concentração em função dos valores normalizados (12DCB)	XXVIII
Figura F.2 – Representação gráfica da concentração em função dos valores normalizados (13DCB)	XXIX
Figura F.3 – Representação gráfica da concentração em função dos valores normalizados (14DCB)	XXIX
Figura F.4 – Representação gráfica da concentração em função dos valores normalizados (123TCB)	XXX

Figura F.5 – Representação gráfica da concentração em função dos valores normalizados (124TCB)	XXXI
Figura F.6 – Representação gráfica da concentração em função dos valores normalizados (135TCB)	XXXI

Índice de Tabelas

Tabela 1.1 - Estrutura e principais aplicações dos compostos em estudo	3
Tabela 1.2 – Limites de referência estipulados para os compostos em estudo	4
Tabela 2.1 – Tipo de fibra e respetivas aplicações.....	9
Tabela 5.1 – Concentração da solução padrão individual de 12DCB preparada	36
Tabela 5.2 – Concentração da solução padrão conjunta preparada.....	37
Tabela 5.3 – Concentrações das soluções dos padrões de trabalho.....	38
Tabela 5.4 – Condições ótimas de SPME obtidas.....	38
Tabela 5.5 – Condições do injetor.....	39
Tabela 5.6 – Condições da coluna cromatográfica.....	39
Tabela 5.7 – Condições operacionais do forno	39
Tabela 5.8 – Condições da interface	39
Tabela 5.9 – Condições do detetor	39
Tabela 5.10 – Modo de Pesquisa no MS.....	40
Tabela 5.11 – Iões de quantificação escolhidos para modo SIM	40
Tabela 6.1 – Condições iniciais utilizadas	45
Tabela 6.2 – Resumo dos resultados da aplicação do método dos mínimos quadrados.....	55
Tabela 6.3 – Resumo dos resultados obtidos da aplicação do teste de Mandel	55
Tabela 6.4 – Resultados obtidos para as análises das diferentes matrizes	56
Tabela 6.5 – Limites de deteção e quantificação obtidos para cada composto pelos dois métodos	58
Tabela 6.6 – Limiares analíticos determinados para uma concentração vestigial.....	58
Tabela 6.7 – Limiares analíticos determinados para o padrão mais baixo da gama de trabalho.	59
Tabela 6.8 – Resultados obtidos para a repetibilidade nas duas gamas de concentração testadas	60
Tabela 6.9 - Resultados obtidos para a precisão intermédia nas duas gamas de concentração testadas	60
Tabela 6.10 – Percentagens de recuperação obtidas na matriz de água para consumo humano para n=6	62
Tabela 6.11 - Percentagens de recuperação obtidas na matriz do rio Tejo para n=6	62
Tabela 6.12 - Percentagens de recuperação obtidas na matriz do rio Zêzere para n=6.....	63
Tabela 6.13 – Resultados obtidos para as incertezas do método pela primeira metodologia.....	63
Tabela 6.14 – Resultados obtidos para as incertezas do método pela segunda metodologia	64
Tabela 6.15 – Incerteza expandida em função do valor paramétrico de alguns compostos orgânicos	64

Tabela 6.16 – Expressão de resultados da gama de trabalho usando 1 algarismo significativo na incerteza da medição	65
Tabela 6.17 - Expressão de resultados da gama de trabalho usando 2 algarismos significativos na incerteza da medição	65
Tabela 7.1 – Compilação dos resultados obtidos na fase de otimização da análise	67
Tabela 7.2 – Resumo dos resultados obtidos após aplicação do método dos mínimos quadrados	68
Tabela 7.3 – Resumo dos resultados obtidos da aplicação dos diversos teste estatísticos	68
Tabela B.1 – Propriedades físico-químicas relevantes para os compostos em estudo	III
Tabela C.1 – Desvios relativamente à concentração-alvo para o 12DCB.....	VII
Tabela C.2 – Desvios relativamente à concentração-alvo (13DCB).....	VIII
Tabela C.3 - Desvios relativamente à concentração-alvo (14DCB).....	IX
Tabela C.4 – Desvios relativamente à concentração-alvo (123TCB)	IX
Tabela C.5 – Desvios relativamente à concentração-alvo (124TCB)	X
Tabela C.6 – Desvios relativamente à concentração-alvo (135TCB)	XI
Tabela D.1 – Áreas calculadas para os ajustes linear e polinomial (12DCB).....	XIV
Tabelas D.2 e D.3 – Erros quadráticos para os dois ajustes (12DCB)	XIV
Tabela D.4 – Áreas calculadas para os ajustes linear e polinomial (13DCB).....	XV
Tabelas D.5 e D.6 – Erros quadráticos para os dois ajustes (13DCB)	XV
Tabela D.7 – Áreas calculadas para os ajustes linear e polinomial (14DCB).....	XVI
Tabelas D.8 e D.9 – Erros quadráticos para os dois ajustes (14DCB)	XVI
Tabela D.10 – Áreas calculadas para os ajustes linear e polinomial (123TCB)	XVII
Tabelas D.11 e D.12 – Erros quadráticos para os dois ajustes (123TCB).....	XVII
Tabela D.13 – Áreas calculadas para os ajustes linear e polinomial (124TCB)	XVIII
Tabelas D.14 e D.15 – Erros quadráticos para os dois ajustes (124TCB).....	XVIII
Tabela D.16 – Áreas calculadas para os ajustes linear e polinomial (135TCB)	XIX
Tabelas D.17 e D.18 – Erros quadráticos para os dois ajustes (135TCB).....	XIX
Tabela E.1 – Cálculo das razões para o teste de Rikilt (12DCB).....	XXII
Tabela E.2 – Cálculo das razões para o teste de Rikilt (13DCB).....	XXII
Tabela E.3 – Cálculo das razões para o teste de Rikilt (14DCB).....	XXIII
Tabela E.4 – Cálculo das razões para o teste de Rikilt (123TCB)	XXIV
Tabela E.5 – Cálculo das razões para o teste de Rikilt (124TCB)	XXIV
Tabela E.6 – Cálculo das razões para o teste de Rikilt (135TCB)	XXV
Tabela F.1 – Cálculo dos valores normalizados (12DCB)	XXVIII
Tabela F.2 – Cálculo dos valores normalizados (13DCB)	XXVIII
Tabela F.3 – Cálculo dos valores normalizados (14DCB)	XXIX
Tabela F.4 – Cálculo dos valores normalizados (123TCB)	XXX

Tabela F.5 – Cálculo dos valores normalizados (124TCB)	XXX
Tabela F.6 – Cálculo dos valores normalizados (135TCB)	XXXI
Tabelas G.1 e G.2 – Áreas obtidas nas duas gamas de concentração (12DCB).....	XXXIV
Tabelas G.3 e G.4 – Áreas obtidas nas duas gamas de concentração (13DCB).....	XXXV
Tabelas G.5 e G.6 – Áreas obtidas nas duas gamas de concentração (14DCB).....	XXXVI
Tabelas G.7 e G.8 – Áreas obtidas nas duas gamas de concentração (123TCB)	XXXVII
Tabelas G.9 e G.10 – Áreas obtidas nas duas gamas de concentração (124TCB)	XXXVIII
Tabelas G.11 e G.12 – Áreas obtidas nas duas gamas de concentração (135TCB)	XXXIX
Tabelas H.1 e H.2 – Áreas e respetivas concentrações obtidas para o padrão da gama baixa (12DCB).....	XLII
Tabelas H.3 e H.4 – Áreas e respetivas concentrações obtidas para o padrão da gama baixa (13DCB).....	XLIII
Tabelas H.5 e H.6 – Áreas e respetivas concentrações obtidas para o padrão da gama baixa (14DCB).....	XLIV
Tabela H.7 e H.8 – Áreas e respetivas concentrações obtidas para o padrão da gama baixa (123TCB)	XLV
Tabelas H.9 e H.10 – Áreas e respetivas concentrações obtidas para o padrão da gama baixa (124TCB)	XLVI
Tabelas H.11 e H.12 – Áreas e respetivas concentrações obtidas para o padrão da gama baixa (135TCB)	XLVII
Tabela J.1 – Custos materiais considerados para a avaliação económica do método	LIII

Listagem de Abreviaturas, Símbolos, Acrónimos e Siglas

12DCB – 1, 2-Diclorobenzeno

13DCB – 1, 3-Diclorobenzeno

14DCB – 1, 4-Diclorobenzeno

123TCB – 1, 2, 3-Triclorobenzeno

124TCB – 1, 2, 4-Triclorobenzeno

135TCB – 1, 3, 5-Triclorobenzeno

A_{100} – Área de Pico Correspondente ao Ponto com Melhor Correlação

A_i – Área de Pico Correspondente a uma Determinada Concentração

b – Ordenada na Origem

C_0 – Concentração Inicial de Analito na Amostra

C_{100} – Concentração Correspondente ao Ponto com Melhor Correlação

CAR – *Carboxen*

C_f – Concentração de Analito na Fibra

C_i – Concentração Correspondente à Área A_i

CI – Ionização Química

C_M – Concentração na Fase Móvel

C_S – Concentração na Fase Estacionária

C_s – Concentração de Analito na Amostra

C_p – Concentração Experimental

C_T – Concentração Teórica

CV_m – Coeficiente de Variação do Método

CW – *Carbowax*

D_f – Coeficiente de difusão

DVB – Divinilbenzeno

DL – Decreto-Lei

ECD - Detector por Captura de Electrões

EI – Electroionização

EPAL – Empresa Portuguesa das Águas Livres

ETA – Estação de Tratamento de Água

EUA – Estados Unidos da América

$F_{crítico}$ – Valor Tabelado da Distribuição de Fisher

FID - Detector de Ionização de Chama

GC – Cromatografia Gasosa

GC/MS – Cromatografia Gasosa Acoplada a Espectrometria de Massa

HETP – Altura Equivalente de um Prato Teórico
HPLC – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
ISO – Organização Internacional de Normalização
k₁ – Razão de partição do primeiro pico
K₁ - Constante de Distribuição do Analito 1
K₂ - Constante de Distribuição do Analito 2
k₂ – Razão de partição do segundo pico
K – Constante de distribuição
k – Fator de Retenção
K_{fs} – Coeficiente de Partição entre o Revestimento e a Fase Aquosa
K_{hs} - Coeficiente de Partição entre o Revestimento e a Fase Gasosa
L – Comprimento da Coluna
LOD – Limite de Detecção (ng/L)
LOQ – Limite de Quantificação (ng/L)
MS – Espectrometria de Massa
m - Declive da Reta de Calibração
m/z – Razão Massa/Carga
N – Número de Pratos Teóricos
n – Quantidade de Analito Adsorvido pela Fibra
NaCl – Cloreto de Sódio
PA – Poliacrilato
PAH – Hidrocarbonetos Aromáticos Policíclicos
PEG – Polietilenoglicol
PG – Valor de Teste (Teste de Homogeneidade de Variâncias)
PDMS – Polidimetilsiloxano
PM – Peso Molecular
PTEF – Politetrafluoretileno
R² – Coeficiente de Determinação da Reta
R_s – Resolução
S – Sensibilidade
S/N – Razão Sinal/Ruído
SA – Sociedade Anónima
SIM – Monitorização Seletiva de Iões
S_m – Desvio Padrão do Método
SPME – Microextração em Fase Sólida
S_{y/x} – Desvio Padrão Residual da Reta de Calibração
S_{x0} – Desvio Padrão dos Brancos/Padrão de Menor Concentração

t_e – Tempo de Equilíbrio
THM – Tri-halometanos
 t_M – Tempo Morto
 t_r – Tempo de Retenção
 t_r' – Tempo de Retenção Ajustado
 \bar{u} – Velocidade Linear da Fase Móvel
 u_c – Incerteza Combinada
 u_{matriz} – Incerteza Associada a Ensaios de Recuperação (Efeito de Matriz)
 $u_{prec\ int}$ – Incerteza Associada à Precisão Intermédia
 $u_{padrão}$ – Incerteza Associada à Preparação de Padrões
 u_{recta} – Incerteza Associada à Interpolação da Leitura
U – Incerteza expandida do método
UE – União Europeia
 V_f – Volume de Revestimento
 V_h – Volume de *Headspace*
VOC – Composto Orgânico Volátil
 V_M – Volume da Fase Móvel
 V_s – Volume de Amostra
VT – Valor de Teste
 W_h – Largura do Pico a Metade da Altura Máxima.
WHO – Organização Mundial de Saúde
 ΔC – Variação de Concentração
 ΔL – variação da Resposta Analítica
 α – Factor de separação

Capítulo 1 – Introdução

1.1– EPAL

A EPAL (atual Empresa Portuguesa das Águas Livres, SA) foi fundada em 1868 como a sucessora da Companhia das Águas de Lisboa (CAL) na função de abastecimento de água à região de Lisboa quando a concessão desta última terminou. Até 1935 a área de actividade da empresa estava limitada ao concelho de Lisboa, mas desde então tem vindo sucessivamente a expandi-la de tal modo que atualmente é responsável pela gestão de um sistema de abastecimento que inclui a captação, tratamento, análise e distribuição de água a uma área que abrange noventa e seis municípios, o que corresponde a cerca de 3,8 milhões de habitantes.

O subsistema de captação é compreendido por duas fontes superficiais na Albufeira de Castelo de Bode e por várias captações subterrâneas nomeadamente a Nascente dos Olhos de Água e os poços das Lezírias, OTA e Alenquer. Das referidas, a captação mais importante é a de Castelo de Bode da qual depende cerca de 75% da produção total de água da empresa.

Existem duas instalações laboratoriais acreditadas pela Norma NP EN ISO/IEC 17025, responsáveis pela análise das águas desde o ponto de captação até à torneira do consumidor, uma localizada na ETA de Vale da Pedra e outra em Lisboa, na qual foi desenvolvido o presente trabalho. Entre estas duas instalações são testados 110 parâmetros correspondendo a 198 compostos e são realizados 135 métodos analíticos para ensaios em águas, divididos pelas áreas de microbiologia, química inorgânica e química orgânica. É deste modo assegurado que a água destinada a consumo humano não só cumpre todos os requisitos impostos pela legislação em vigor mas também que o tratamento que está a ser efetuado é adequado para garantir esse cumprimento [1].

1.2– Compostos em Estudo

No âmbito desta tese serão estudados dois grupos de isómeros de Clorobenzenos: o 1,2 – Diclorobenzeno, 1,3 – Diclorobenzeno, 1,4 – Diclorobenzeno, 1,2,3 – Triclorobenzeno, 1,2,4 – Triclorobenzeno e 1,3,5 – Triclorobenzeno, que constituem uma classe de compostos aromáticos com dois ou três de átomos de cloro presentes no anel benzénico [2]. Os Clorobenzenos são também classificados como compostos orgânicos voláteis (VOCs), que de acordo com a diretiva da EU 1999/13/EC são definidos como “ (...) compostos orgânicos que a 20 °C possuem uma pressão de vapor de 0,01 kPa ou superior (...) ”.

Os isómeros 1,2- e 1,3 – DCB são líquidos incolores e voláteis à temperatura ambiente enquanto o 1,4 – DCB é um sólido cristalino com tendência a sublimar [3].

Relativamente aos Triclorobenzenos, o 1,2,3- e 1,3,5 – TCB apresentam-se como sólidos incolores ao passo que o 1,2,4 – TCB é um líquido incolor [4].

A introdução de Clorobenzenos no meio ambiente pode ser devido à atividade industrial, mais concretamente devido às descargas de efluentes contaminados com estes subprodutos ou como consequência da sua utilização direta numa grande variedade de aplicações comerciais, como se pode verificar na Tabela 1.1 [2]. Podem ainda ser introduzidos de forma natural, tornando a ocorrência destes compostos muito frequente, especialmente em ecossistemas aquáticos [5].

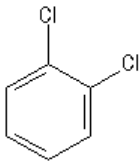
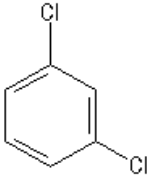
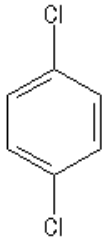
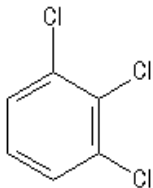
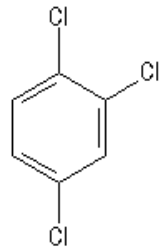
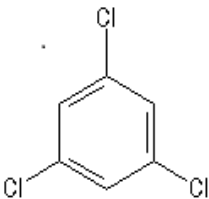
1.3– Motivação e Enquadramento do Tema

O acesso à água sempre esteve conotado com desenvolvimento, quer devido às actividades económicas decorrentes da sua utilização, quer devido à sua aplicação mais óbvia para consumo humano, da qual está fortemente dependente o bem-estar de uma população. De modo a esta segunda aplicação ser possível, é necessário que a água cumpra diversos padrões de qualidade que assegurem a segurança dos seus consumidores.

A boa qualidade da água para consumo humano tem sido alvo de preocupação desde os primórdios da humanidade, como comprovam os escritos Sâsmitos datados de 2000 A.C. que referem o uso de fervura como método de purificação, ou a descoberta do princípio da coagulação pelos Egípcios em 1500 A.C., ou o desenvolvimento do primeiro dispositivo de purificação de água datado de 500 A.C., criado pelo cientista Grego Hipócrates, que consistia num filtro de tecido rudimentar [6]. No entanto, uma vez que se desconhecia a existência de poluentes químicos ou microbianos, o foco do tratamento de água consistia apenas em melhorar o seu sabor e rectificar a turvação, pelo menos até 1676 quando os primeiros microrganismos foram observados pelo cientista Holandês Anton van Leeuwenhoek, descoberta que deu novo impulso ao tratamento de água, verificando-se a partir daí os primeiros grandes avanços que foram decisivos no nível de desenvolvimento que atualmente se atingiu. A título de exemplo pode referir-se a construção da primeira estação de tratamento de água municipal na Escócia em 1804, ou a primeira utilização de cloro numa fonte de água para consumo humano em 1902 na Bélgica e ainda a implementação levada a cabo nos EUA dos primeiros padrões de qualidade bacteriológicos e mais tarde de parâmetros físicos e químicos em 1914 e 1925, respetivamente [7].

Todos estes avanços culminaram nas regras que regem atualmente a qualidade da água destinada ao consumo humano. No entanto, estes padrões de controlo continuam em constante evolução à medida que mais compostos químicos começam a suscitar preocupações em termos da saúde dos consumidores e surge a necessidade de serem monitorizados, quando antes não eram considerados.

Tabela 1.1 - Estrutura e principais aplicações dos compostos em estudo

Clorobenzeno	Estrutura	Principais Aplicações [8][9]
1,2 – Diclorobenzeno		Produção de herbicidas; Solvente em diversas indústrias;
1,3 – Diclorobenzeno		Produção de herbicidas, inseticidas, farmacêuticos e tintas;
1,4 – Diclorobenzeno		Desodorizante de balneários e contentores; Fumigante; Produção de 2,5-dicloroanilina;
1,2,3 – Triclorobenzeno		Produção de herbicidas, pigmentos e corantes;
1,2,4 – Triclorobenzeno		Solvente em diversas indústrias; Produção de pigmentos e têxteis;
1,3,5 – Triclorobenzeno		Intermediário químico; Produção de explosivos e pesticidas;

Dos dois grupos de isômeros de Clorobenzenos estudados no âmbito desta tese, no caso dos Diclorobenzenos não é até à data exigida a sua monitorização de acordo com a legislação em vigor. Já no caso dos Triclorobenzenos apenas a sua presença em águas superficiais está sujeita a

monitorização de acordo com a legislação atual, relativamente às águas de abastecimento não existe essa obrigatoriedade.

Estes compostos não só possuem um vasto leque de aplicações (explicitadas no capítulo anterior), como também demonstram persistência em meios aquáticos e terrestres (a título de exemplo os TCB são capazes de persistir dez meses no solo e cinco na água) e potencial de bioacumulação [10]. Adicionalmente, existem estudos publicados que comprovam os riscos a que a exposição prolongada a estes compostos acarreta para a saúde humana [11][12], ou que pelo menos admitem a importância de serem efetuados estudos adicionais a esta classe de compostos uma vez que admitem existir potenciais riscos à sua exposição [13]. Tendo todos estes fatores em consideração torna-se clara a importância do desenvolvimento de um método de análise robusto e reprodutível que permita a sua deteção e quantificação nas águas de consumo humano, assim como em águas superficiais e subterrâneas.

1.4– Legislação

Como já foi referido, dos compostos em estudo apenas os Triclorobenzenos estão incluídos na legislação Portuguesa. De acordo com o decreto-lei 103/2010 de 24 de Setembro (Anexo A) o valor limite permitido por lei em águas superficiais para os três isómeros é de 0,4 µg/l. Já na 4ª Edição de 2011 realizada pela Organização Mundial de Saúde (WHO) de diretrizes para a qualidade da água para consumo humano, para os Triclorobenzenos não existe um limite máximo legal, ao passo que para dois dos isómeros de Diclorobenzenos são especificados valores guia, indicados na seguinte Tabela 1.2:

Tabela 1.2 – Limites de referência estipulados para os compostos em estudo

Composto	Valor Guia (µg/l) (WHO)	Valor Paramétrico (µg/l) (DL 103/2010)
1,2 – Diclorobenzeno	1000	s/ limite
1,3 - Diclorobenzeno	s/ limite	s/ limite
1,4 – Diclorobenzeno	300	s/ limite
1,2,3 - Triclorobenzeno	s/ limite	0,4
1,2,4 – Triclorobenzeno	s/ limite	0,4
1,3,5 – Triclorobenzeno	s/ limite	0,4

Capítulo 2 – Preparação de Amostra

2.1 – Princípios da Microextração em Fase Sólida (SPME)

Existem diversas técnicas de preparação de amostra dependendo não só da natureza da amostra em si, mas também do que se pretende analisar e quantificar. Num método analítico este passo é dos mais importantes, uma vez que a obtenção de uma amostra representativa é fulcral para o sucesso da análise [14].

Um exemplo destas técnicas é a microextração em fase sólida (SPME), um método desenvolvido em 1989 por Pawliszyn e colaboradores que consiste num processo de extração mais simples realizado essencialmente sem recurso a solventes graças à utilização de uma fibra de sílica fundida revestida com um filme polimérico que permite a adsorção dos analitos de interesse presentes na matriz da amostra. Esta fibra é incorporada numa seringa que mantém a integridade do revestimento e facilita o mecanismo de extração dos analitos através de adsorção [15].

A técnica de SPME pode ser dividida em dois passos fundamentais: o primeiro consiste na partição dos analitos entre a amostra e o revestimento da fibra (representado na Figura 2.1) [16]. Este fenómeno é descrito matematicamente pela constante de partição, K_{fs} , entre a fibra e a matriz da amostra, dada pela equação:

$$K_{fs} = \frac{C_f}{C_s} \quad (\text{Equação 2.1})$$

Onde C_f é a concentração de analito na fibra e C_s a concentração na amostra. A extração decorre por um período pré-determinado tipicamente até ser atingido o equilíbrio entre a concentração de analito na amostra e na fibra. Após este patamar ser atingido a quantidade de analito extraído torna-se independente do tempo de extração, como é descrito pela equação:

$$n = \frac{K_{fs} V_f V_s C_0}{K_{fs} V_f + V_s} \quad (\text{Equação 2.2})$$

Onde n é a quantidade de analito adsorvido, V_f é o volume de revestimento, V_s é o volume de amostra e C_0 a concentração inicial de analito na amostra. É possível simplificar a equação 2.2 em circunstâncias em que o volume de amostra é muito elevado ($V_s \gg K_{fs} V_f$):

$$n = K_{fs} V_f C_0 \quad (\text{Equação 2.3})$$

Esta equação demonstra que a concentração de analito adsorvido é directamente proporcional à concentração da amostra, independentemente do seu volume [15]. Note-se que as equações acima apenas se referem a extração líquida, mas no caso de esta ser efetuada em *headspace* a quantidade de analito absorvido pela fibra é dado pela equação:

$$n = \frac{K_{fs} V_f C_0 V_s}{K_{fs} V_f + K_{hs} V_h + V_s} \quad (\text{Equação 2.4})$$

Em que os termos $K_{fs} V_f$, $K_{hs} V_h$ e V_s representam, respetivamente, as capacidades da fibra, do *headspace* e finalmente da amostra propriamente dita para o analito, isto é, a capacidade de o conterem [16].

(A diferença entre os dois tipos de extração será explicada em pormenor no subcapítulo 2.2.7).

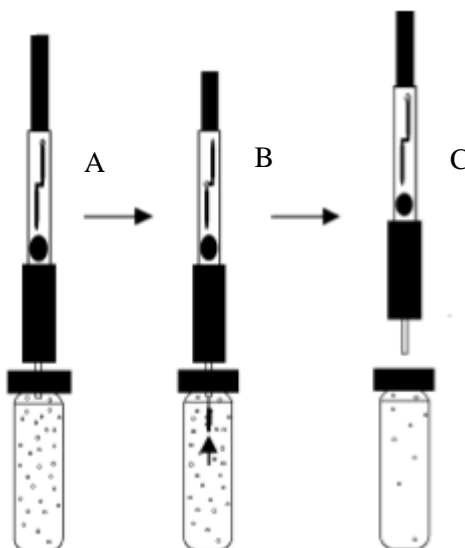


Figura 2.1 – Processo geral de adsorção: A – Perfuração do septo do vial; B – Exposição da fibra; C – Recolha da Fibra (Adaptado de [17])

O segundo passo fundamental da técnica de SPME consiste na desadsorção dos analitos extraídos (representado na Figura 2.2) [16]. Esta é realizada expondo a fibra a uma elevada temperatura promovendo assim a desadsorção térmica dos analitos previamente extraídos.

Esta técnica de preparação de amostra pode ser utilizada em conjunto com técnicas analíticas como GC/MS e HPLC [16].

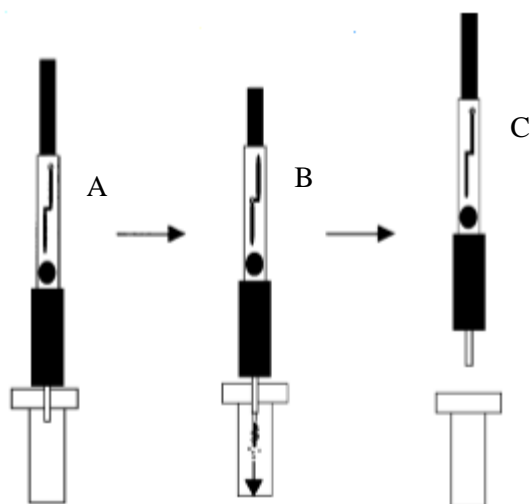


Figura 2.2 – Processo de desadsorção: A – Introdução da agulha no injetor; B – Desadsorção dos analitos; C – Recolha da seringa (Adaptado de [17])

2.2 – Otimização do Processo de SPME

O êxito da análise que sucede o processo de SPME estará dependente da otimização dos parâmetros escolhidos para a extração e desadsorção. Por sucesso entenda-se alcançar um limite de detecção mínimo adequado e obtenção de resultados consistentes e reprodutíveis [17].

Esta otimização é realizada através da manipulação das propriedades intrínsecas dos analitos de interesse como a volatilidade, solubilidade, afinidade para o revestimento da fibra, entre outros. Neste sentido são normalmente testadas várias possibilidades para os parâmetros disponíveis, sendo depois selecionada a melhor combinação de todos, o que em princípio garantirá os melhores resultados possíveis.

2.2.1 – Variação do Volume de Solvente

O primeiro parâmetro que normalmente é testado é a quantidade de solução padrão a colocar no vial onde é realizada a análise. Isto é especialmente importante atendendo a que as soluções padrão são tipicamente preparadas em solventes voláteis como metanol, por exemplo. Nestes casos, pode ocorrer que o solvente compita com os analitos de interesse na partição entre o revestimento da fibra e a matriz da amostra, na eventualidade de serem usados volumes de solução padrão muito elevados. Se este efeito se verificar tem a consequência de reduzir a eficiência da extração e naturalmente afectará também a análise subsequente.

2.2.2 – Seleção da Fibra

Existem vários tipos de revestimentos de fibras que podem ser utilizados, que diferem entre si nas características dos analitos de que tiram vantagem de modo a promover a extração: peso molecular, polaridade, concentração e complexidade da matriz.

O peso molecular determina a velocidade a que o analito se desloca o que influencia a eficácia da retenção por parte do revestimento. Um peso molecular menor significa uma maior velocidade o que por sua vez resulta numa retenção menor. De modo a contrariar este efeito existem fibras mais espessas que permitem aumentar a eficácia da extração [18].

A polaridade do revestimento afeta a seletividade da fibra. Para compostos polares são usados revestimentos polares e o mesmo princípio aplica-se para analitos apolares e semipolares. Deste modo, a seletividade da fibra é maximizada e são evitadas interferências causadas pela utilização de uma matriz mais complexa [15].

Adicionalmente, a espessura do revestimento tem impacto no tempo necessário para se atingir o equilíbrio, t_e , e conseqüentemente no tempo que demora a realizar a extração, como demonstra a fórmula:

$$t_e = t_{95\%} = \frac{(b - a)^2}{2D_f} \quad (\text{Equação 2.4})$$

Da equação 2.4 conclui-se que da espessura da fibra, o termo $(b - a)$, e do coeficiente de difusão do analito para o revestimento, D_f , tem impacto direto no tempo necessário para ser extraído 95% do analito da quantidade disponível no equilíbrio [14].

Os termos da Equação 2.4 podem ser observados na Figura 2.3 para clarificação:

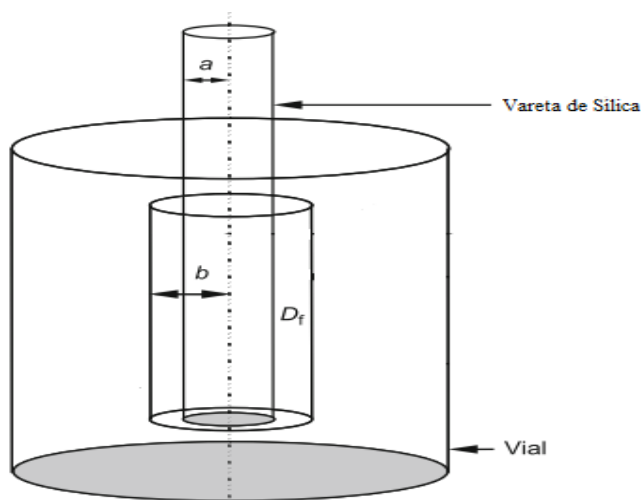


Figura 2.3 – Representação do sistema de extração em SPME: a – Raio interno do revestimento; b – Raio externo do revestimento (Adaptado de [14])

As fibras disponíveis comercialmente para serem utilizadas no processo de SPME são apresentadas na Tabela 2.1:

Tabela 2.1 – Tipo de fibra e respectivas aplicações [15]

Revestimento	Espessura (μm)	Aplicações
PDMS	100	GC/HPLC para voláteis
PDMS	30	GC/HPLC para semi-voláteis
PDMS	7	GC/HPLC para compostos apolares de elevado PM
PDMS/DVB	65	GC/HPLC para voláteis e amins
PA	85	GC/HPLC para semi-voláteis polares
CW/DVB	65, 70	GC/HPLC para álcoois e compostos polares
CAR/PDMS	75, 85	GC/HPLC para gases
DVB/CAR/PDMS	50/30	GC/HPLC para aromatizantes
PDMS/DVB	60	HPLC para amins e compostos polares

2.2.3 – Tempo de Adsorção

É definido como o tempo necessário para se atingir o equilíbrio entre a concentração de analito entre o revestimento e a matriz, ou pelo menos o necessário para garantir o sucesso da análise subsequente, consoante o caso.

O tempo requerido para atingir o equilíbrio irá depender de um conjunto de outros fatores como a utilização de agitação, da escolha da temperatura de extração, do tamanho dos analitos e da espessura da fibra utilizada.

Após ser atingido o equilíbrio a quantidade de analito extraída tende para um valor constante, independentemente do aumento do tempo de adsorção [14].

2.2.4 – Temperatura de Adsorção

Este parâmetro é especialmente importante no caso da extração em *headspace*, modo de operação em que é efetuada a adsorção de compostos mais voláteis. Neste caso, a manipulação da temperatura permite uma extração mais rápida ao influenciar a pressão de vapor dos analitos e consequentemente a cinética do processo, ao favorecer a constante de partição em relação ao *headspace*, isto é, promove a migração dos analitos da matriz da amostra para o *headspace*, colocando-os em contacto com o revestimento da fibra.

No caso da extração direta, o aumento da temperatura pode ter o efeito justamente oposto, ao diminuir a quantidade de analitos disponíveis no seio da amostra para serem absorvidos por contacto direto com o revestimento [19].

2.2.5 – Tempo de Desadsorção

Na fase da extração, independentemente do tempo que se utilize nunca são adsorvidos na totalidade todos os analitos presentes na amostra. Mas após este passo, a manipulação do tempo de desadsorção assegura a transferência por inteiro de todos os analitos para o instrumento de análise posterior, contribuindo assim para o bom funcionamento do processo analítico como um todo.

2.2.6 – Agitação

A utilização ou não, de agitação no processo de SPME é outro parâmetro especialmente importante no caso na extração em *headspace*, à semelhança da manipulação da temperatura de extração e que tem a mesma influencia que este outro parâmetro, ou seja, aumenta a eficiência da extração e diminuí o tempo necessário para que seja atingido o equilíbrio ao variar a constante de partição em favor do *headspace* [20].

A agitação pode ser feita de diversas formas consoante o tipo de aplicação pretendida: magnética, que implica a colocação de um agitador magnético dentro do *vial*; Com *vórtex* que consiste na movimentação direta do *vial* que contém a amostra numa trajetória circular; Intrusiva, entre outras [14].

No entanto é necessário avaliar se a eficácia na extração não é obtida à custa de uma agitação muito excessiva o que por sua vez pode contribuir para danificar a fibra durante o processo de extração e reduzir o seu tempo de vida útil. A escolha da agitação terá de manter um equilíbrio entre estes dois fatores.

2.2.7 – Modo de Extração

Como se pode constatar pela Figura 2.4, a extração em SPME pode ser feita de três formas distintas: por imersão direta, A, em *headspace*, B, ou com recurso a uma membrana protetora, C.

É usual optar-se pela extração em *headspace* quando se pretende analisar compostos de elevada volatilidade. Este modo permite adicionalmente proteger a fibra do contato com contaminantes de elevado PM presentes na matriz.

Já na situação oposta de os analitos de interesse terem mais baixa volatilidade é mais conveniente que a extração seja por imersão direta.

Finalmente, utiliza-se o modo com a membrana protetora quando a matriz que será analisada contém partículas em suspensão ou pode de algum modo ser considerada “suja”, havendo como tal necessidade de proteger a fibra do contato direto com eventuais contaminantes que possam estar presentes, em circunstâncias em que a volatilidade dos analitos de interesse não permita que a extração seja feita em *headspace*. Este último processo tem a desvantagem de ser mais lento uma vez que a membrana dificulta a difusão dos analitos até ao revestimento [19][21].

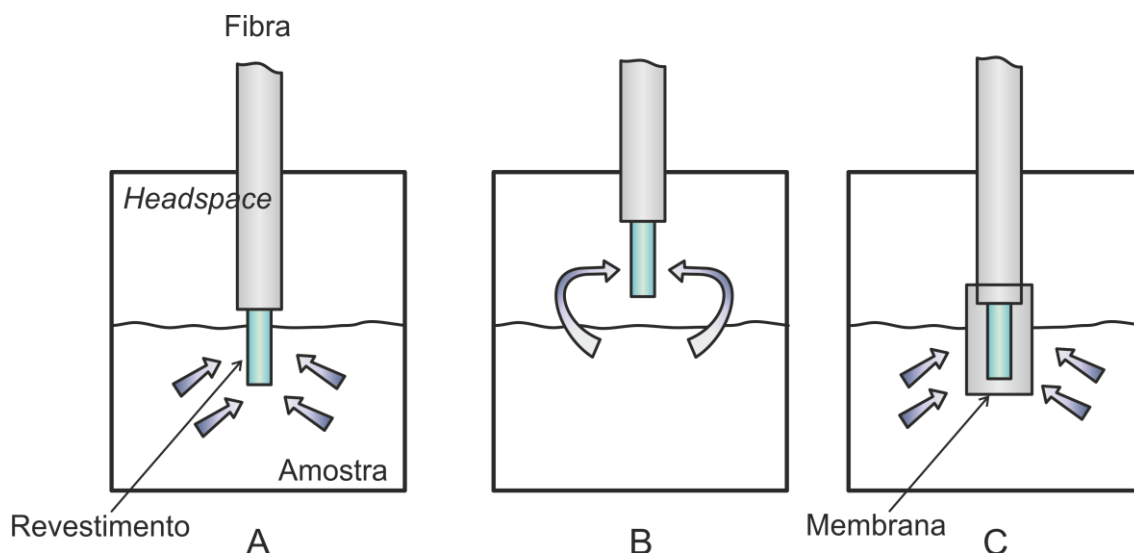


Figura 2.4 – Modos de extração em SPME: A – Imersão direta; B – *Headspace*; C – Com membrana protetora

É de salientar que no âmbito desta tese apenas serão considerados os primeiros dois modos de extração referidos acima.

2.2.8 – Salting Out

A adição de sal a uma solução aquosa pode resultar num aumento da eficiência da extração uma vez que aumenta a força iónica da mesma o que pode reduzir a solubilidade dos analitos presentes na matriz levando-os a volatilizar e migrar para o *headspace*. Este efeito é particularmente eficaz quando se tratam de compostos polares ou voláteis. No entanto, existem casos em que a adição de um sal pode ter pouco impacto ou até mesmo produzir picos interferentes no momento da análise quando os compostos de interesse já possuem coeficientes de distribuição elevados [17].

No caso dos Clorobenzenos, o expectável será que os compostos que possuem maior solubilidade em água, 12DCB e 13DCB (Anexo B), sejam mais fortemente afetados pelo aumento da força iónica resultante da adição de um sal, conduzindo conseqüentemente a um aumento da sua eficiência de extração.

Capítulo 3 – Cromatografia Gasosa/Espectrometria de Massa (GC/MS)

3.1 – Cromatografia Gasosa/Espectrometria de Massa

3.1.1 – Introdução

A técnica de GC/MS consiste no acoplamento de dois métodos analíticos: a cromatografia gasosa e a espectrometria de massa, como o nome indica. A primeira atua no sentido da separação de compostos enquanto a segunda funciona como técnica de identificação e quantificação.

A mistura que se pretende analisar é injetada no cromatógrafo gasoso onde é transportada por um gás de arraste e separada consoante a afinidade para com a fase estacionária que constitui a coluna cromatográfica. Estes compostos são depois direccionados para o espectrómetro de massa onde são analisados e identificados.

Na Figura 3.1 encontra-se um esquema representativo desta técnica.

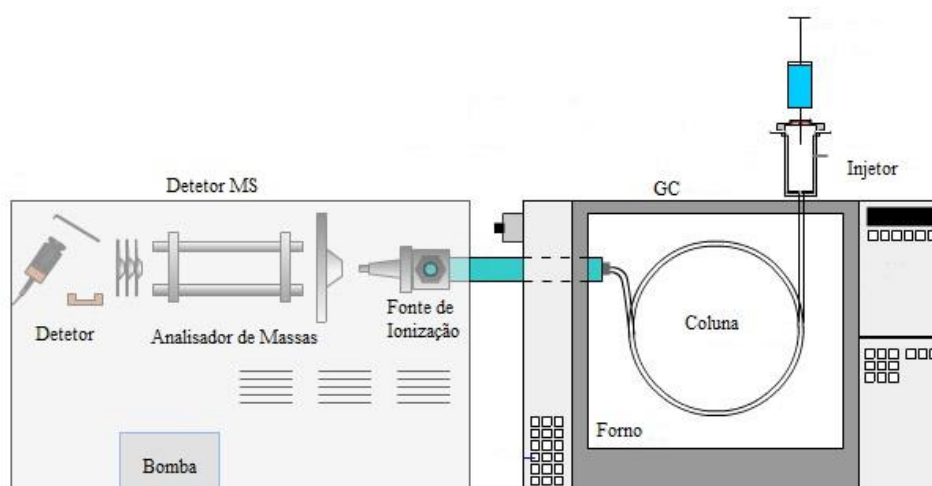


Figura 3.1 - Esquema típico de um sistema de GC/MS (Adaptado de[22])

A combinação destas duas técnicas permite a obtenção de informações quantitativas e qualitativas de forma extremamente eficaz graças aos baixos limites de deteção atingíveis graças à natureza precisa desta análise.

Devido às vantagens que apresenta, o GC/MS é atualmente muito utilizado em análises nas mais variadas áreas como na indústria farmacêutica, alimentar, para análises ambientais, para aferição da qualidade da água, entre outros [23][24].

3.2 – Cromatografia Gasosa

3.2.1 – Introdução

Os métodos cromatográficos em geral têm o objetivo de separar os analitos presentes numa mistura nos seus componentes individuais, tirando proveito das suas propriedades físico-químicas para esse efeito.

A mistura que se pretende analisar é repartida entre duas fases distintas, uma fase móvel (líquida ou gasosa) que dissolve e transporta os compostos através de uma fase estacionária (sólida ou líquida) que está fixa no interior da coluna. São os diferentes graus de interação com essa fase estacionária que promovem a separação, fazendo com que os analitos se desloquem a velocidades distintas, separando-os. O processo pelo qual a separação ocorre é chamado eluição e pode ser observado na Figura 3.2 um esquema representativo deste fenómeno.

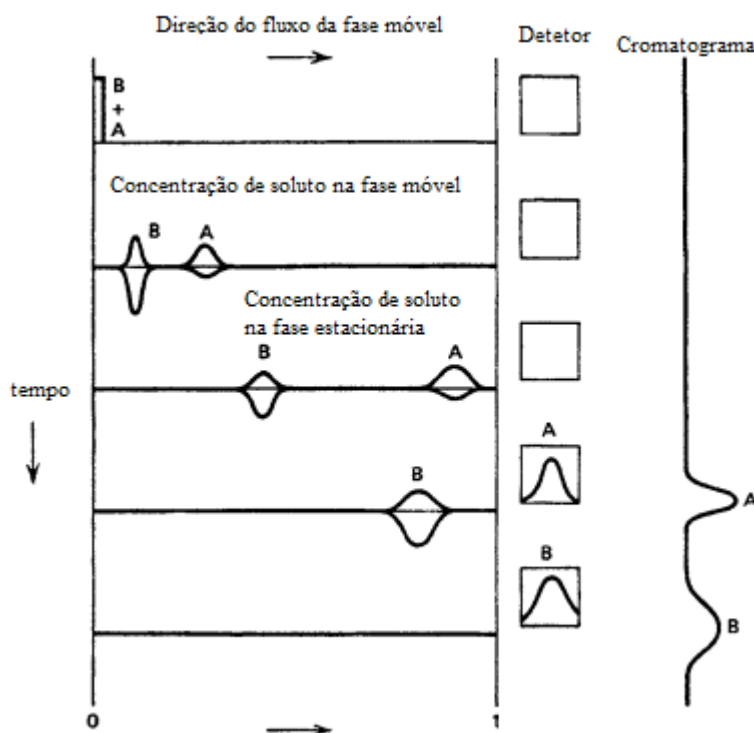


Figura 3.2 – Representação esquemática de um processo cromatográfico (Adaptado de [25])

O processo cromatográfico apresentado na figura utiliza como exemplo uma mistura de dois compostos, A e B, que é introduzida na coluna num dado instante de tempo representado pela primeira das cinco linhas horizontais. A fase móvel transporta os analitos através da fase estacionária onde ocorre uma partição entre as duas fases consoante as afinidades de cada um dos compostos. Pode verificar-se pela figura que o composto B tem maior afinidade pela fase estacionária o que significa que a sua velocidade de deslocação será menor. Já o composto A tem

maior afinidade pela fase móvel e como tal tem velocidade maior. Após a eluição dos dois obtém-se o cromatograma representado do lado direito, onde é de notar que a largura dos picos é dependente do tempo que os compostos permanecem na coluna [24][25].

De modo a compreender plenamente o funcionamento da cromatografia gasosa será necessário abordar ainda a própria constituição de um cromatógrafo gasoso bem como os fundamentos teóricos que regem esta técnica analítica.

3.2.2 – Componentes de um Cromatógrafo Gasoso

O cromatógrafo gasoso é constituído por seis elementos fundamentais: o gás de transporte, o injetor, a coluna, o detetor, o forno e a unidade de aquisição de dados e controlo [26].

3.2.2.1 – Gás de Transporte ou de Arraste

Questões como a escolha do tipo de gás de arraste mais adequado até às condições operacionais dessa corrente de gás são de grande importância no funcionamento de um cromatógrafo gasoso uma vez que deste depende o transporte da amostra através da coluna.

O gás de arraste tem ainda de apresentar certas características como ser inerte, de modo a não reagir com a amostra e possuir um elevado grau de pureza, uma vez que a presença de certos contaminantes como água danificam a coluna.

Podem ser utilizados vários tipos de gases de arraste, nomeadamente hidrogénio, hélio, azoto, árgon, entre outros. A escolha do gás a utilizar dependerá do tipo de aplicação pretendida e do tipo de injetor utilizado [27].

3.2.2.2 – Injetor

A introdução da amostra no cromatógrafo deve ser feita da maneira o mais breve possível e em quantidade adequada. Quer a injeção seja líquida ou gasosa o objetivo é o mesmo, isto é, a introdução da amostra de forma reprodutível e precisa uma vez que este passo tem uma enorme influência na eficiência da coluna cromatográfica.

Em cromatografia gasosa o tipo de injeção mais comum é do tipo *split/splitless*, representado na Figura 3.3. A amostra é injetada através de um septo de borracha e introduzida no injetor, onde passa para uma câmara de vaporização onde existe um *liner* aquecido a uma temperatura tal que permita a vaporização da amostra. O gás de arraste é também introduzido nesta câmara onde se forma uma mistura composta pelo gás e pela amostra. O destino desta mistura dita o tipo de injeção utilizada.

A proporção em que a mistura é dividida, razão de *split*, depende de fatores como a concentração da amostra, a sensibilidade do detetor e a capacidade da coluna utilizada.

Por outro lado, se a mistura for transferida na totalidade para a coluna trata-se de injeção em modo *splitless*. Neste caso a válvula de *split* encontra-se fechada no momento da injeção da

amostra. No entanto, apenas se encontra fechada por um período de tempo manipulável após o qual se abre, ventilando quaisquer vestígios da mistura que ainda se encontrem câmara do injetor.

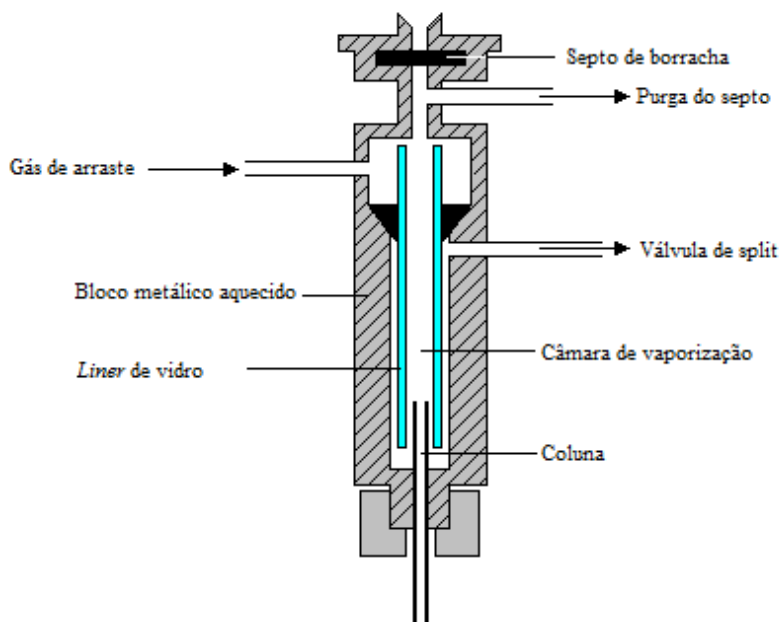


Figura 3.3 – Injetor do tipo split/splitless (Adaptado de [28])

Este tipo de injeção é especialmente utilizada ao serem analisadas amostras com componentes vestigiais [24, 27, 28].

É de referir que este parâmetro foi também alvo de otimização no âmbito desta tese.

3.2.2.3 – A Coluna Cromatográfica

Este é sem dúvida o elemento mais importante de um cromatógrafo gasoso e do qual depende o seu funcionamento, pois sem a coluna não seria possível realizar a separação de misturas nos seus componentes individuais, que é justamente o objetivo desta técnica analítica.

Existem dois tipos de colunas cromatográficas: as colunas de enchimento e as colunas capilares.

As colunas de enchimento têm tipicamente entre 0,6 e 6 metros de comprimento e podem ser produzidas em aço inoxidável ou vidro.

O suporte sólido destas colunas são tipicamente partículas inertes, idealmente pequenas e uniformes em tamanho, revestidas com a fase estacionária líquida.

A eficácia da separação está relacionada com as partículas do suporte uma vez que a retenção dos diversos compostos depende do trajeto que percorrem em torno dessas partículas.

As colunas capilares são as mais tipicamente usadas em GC/MS com um comprimento entre 25 e 150 metros e 0,25 a 0,75 milímetros de espessura.

São constituídas por três elementos fundamentais: um revestimento de poliimida aplicado sobre o tubo de sílica fundida que, por sua vez, está quimicamente ligado a um revestimento interno que forma um filme fino, a fase estacionária, como apresentado na Figura 3.4:

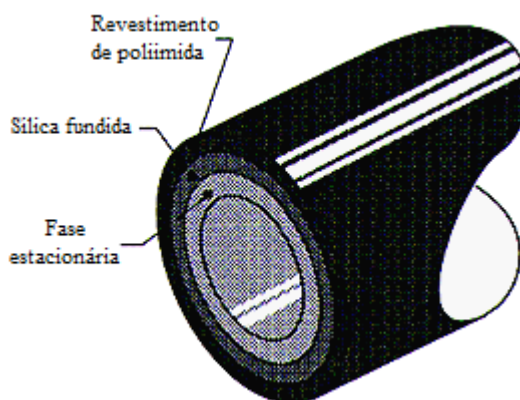


Figura 3.4 – Esquema de uma coluna capilar (Adaptado de [30])

Existem vários tipos de fases estacionárias disponíveis que diferenciam as colunas capilares. As mais comuns são as de cadeia principal em polisiloxano uma vez que são as que apresentam maior robustez, versatilidade e estabilidade.

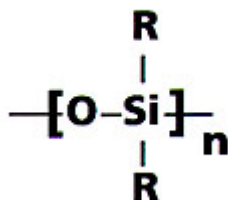


Figura 3.5 – Estrutura geral da cadeia de polisiloxano (Adaptado de [30])

As propriedades concretas da fase estacionária variam de acordo com o número e a natureza dos substituintes da cadeia principal. A escolha da coluna dependerá do tipo de aplicação pretendida [24, 29].

3.2.2.4 – O Detetor

Por detetor entenda-se um instrumento cujo objetivo é converter o resultado cromatográfico obtido para um formato em que possa ser registado.

Pretende-se que o detetor monitorize de forma precisa e reprodutível o conteúdo da corrente que está ser analisada. Adicionalmente deve apresentar elevada sensibilidade de tal modo a identificar analitos presentes mesmo em quantidades vestigiais.

Existem vários tipos de detetores cuja escolha irá mais uma vez depender do tipo de aplicação pretendida. Os mais utilizados são o detetor de ionização por chama (FID), o detetor de captura electrónica (ECD) e o espectrómetro de massa (MS), o qual será utilizado no âmbito deste trabalho e abordado em maior detalhe no capítulo 3.3 [27, 31].

3.2.2.5 – O Forno

É dentro do forno que a coluna cromatográfica está instalada e este componente é o responsável pela criação e manutenção da temperatura adequada para assegurar a eluição dos compostos. Isto porque o tempo de retenção dos compostos está intimamente relacionado com a temperatura e portanto se esta sofrer variações isto resultará numa variação desses mesmos tempos. A título de exemplo temperaturas superiores ao devido levam a que os compostos eluam mais cedo que o esperado e vice-versa.

Se estas variações forem muito severas pode comprometer a identificação dos analitos de interesse, se esta for feita apenas com base nos tempos de retenção, daí a importância da manutenção da temperatura adequada durante a operação [33].

3.2.2.6 – Unidade de Aquisição de Dados e Controlo

Finalmente o último componente de um cromatógrafo gasoso é a unidade responsável pela aquisição de dados e controlo que é essencialmente um ou mais *softwares* que controlam e manipulam as condições operacionais como fluxo de gás de arraste, programas de temperatura, entre outros e que permitem a aquisição e tratamento dos dados experimentais obtidos.

3.2.3 – Aspectos Teóricos

Como já foi referido existem alguns aspectos de cariz teórico que é necessário ter em consideração de modo a perceber plenamente o funcionamento de um cromatógrafo gasoso. Estes parâmetros podem ser também optimizados no sentido de obter o melhor resultado analítico possível.

3.2.3.1 – Constante de Distribuição (K)

O modo como um analito se distribui entre a fase estacionária e a fase móvel é designado como a constante de distribuição, K. É deste fenómeno de que depende a separação cromatográfica e é característico a cada analito. Pode ser descrito matematicamente como a razão entre as concentrações na fase móvel, C_M , e na fase estacionária, C_S :

$$K = \frac{C_S}{C_M} \quad (\text{Equação 3.1})$$

A separação só ocorre se as constantes de distribuição dos analitos forem diferentes, caso contrário, eluem em simultâneo uma vez que ficam retidos na coluna pelo mesmo período de tempo [34].

3.2.3.2 – Tempo de Retenção (t_R)

O tempo que um analito demora a percorrer a coluna é designado como o tempo de retenção, t_R . Pode também ser definido como o tempo entre a injeção até ao momento em que é detectado o máximo do pico cromatográfico, dado pela equação 3.2:

$$t_R = t_M + t'_R \quad (\text{Equação 3.2})$$

Em que t_M é o tempo morto, o tempo que os compostos passam na fase móvel, que é o mesmo para todos os analitos na mistura e pode ser determinado, por exemplo, pela injeção de um composto inerte que não seja retido pela fase estacionária mas que ainda assim seja detetado. E t'_R é o tempo que os analitos permanecem na fase estacionária, tempo de retenção ajustado [34].

A diferença entre os três pode ser clarificada pela Figura 3.5:

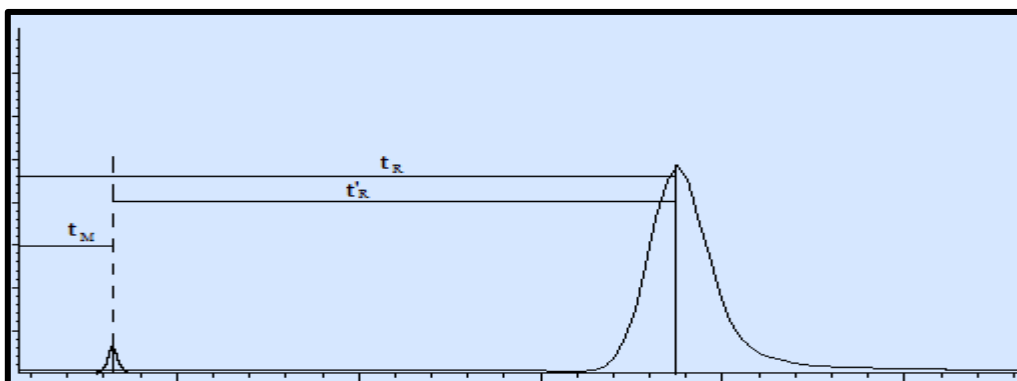


Figura 3.5 – Cromatograma típico

3.2.3.3 – Fator de Retenção (k)

O fator de retenção é um parâmetro que dá uma medida da retenção de um analito ou da sua afinidade para a fase estacionária e que pode ser determinado pelas equações:

$$k = \frac{c_S V_S}{c_M V_M} = K \frac{V_S}{V_M} \quad (\text{Equação 3.3})$$

Em que V_S e V_M se referem aos volumes da fase estacionária e móvel, respetivamente.

Em alternativa, o fator de retenção pode ser determinado com informações obtíveis de um cromatograma:

$$k = \frac{t_R - t_M}{t_M} = \frac{t'_R}{t_M} \quad (\text{Equação 3.4})$$

A determinação do fator de retenção permite averiguar se eventuais mudanças nos tempos de retenção são consequência de alterações na coluna (k varia com a variação de t_R) ou do sistema cromatográfico (k permanece constante com t_R) [34, 35].

3.2.3.4 – Fator de Separação (α)

Pode ocorrer dois analitos terem o mesmo tempo de retenção o que significa que não se separam devidamente, ocorrendo um fenómeno chamado co-eluição que é expresso matematicamente por:

$$\alpha = \frac{k_2}{k_1} = \frac{K_2}{K_1} \quad (\text{Equação 3.5})$$

Onde α é o fator de separação, k_1 e k_2 são os fatores de retenção dos analitos 1 e 2, respetivamente e K_1 e K_2 são as constantes de distribuição dos dois analitos. A designação 1 é sempre dada ao composto que elui primeiro e o 2 é sempre atribuído ao último. Deste modo, α é sempre igual ou superior a um. Caso seja igual a separação entre os analitos não ocorre [33, 34].

3.2.3.5 – Eficiência da Coluna (N)

A eficiência de coluna ou número de pratos teóricos, N , é um conceito adaptado das colunas de destilação e que relaciona a largura de um pico com um determinado tempo de retenção. Apesar de na prática uma coluna cromatográfica não possuir pratos de destilação, a determinação de N dá uma medida da eficiência da coluna no sentido em que quanto maior for o número de pratos teóricos obtidos, maior será a eficiência e menor a largura das bandas obtidas. Este valor pode ser determinado a partir da expressão:

$$N = 5,545 \left(\frac{t_R}{w_h} \right)^2 \quad (\text{Equação 3.6})$$

Em que w_h é a largura do pico a metade da altura máxima.

Alternativamente a eficiência da coluna também pode ser determinada através da altura de um prato, H, ou altura equivalente de um prato teórico, HETP:

$$H = \frac{L}{N} \quad (\text{Equação 3.7})$$

Onde L é o comprimento da coluna.

Apesar de o cálculo de H permitir determinar a eficiência de uma coluna e permitir a comparação entre diferentes colunas, este fator só por si não explica o mecanismo que influencia o alargamento dos picos. De modo a compreender este fenómeno é necessário recorrer à equação condensada de Golay:

$$H = \frac{B}{\bar{u}} + (C_S + C_M)\bar{u} \quad (\text{Equação 3.8})$$

Em que B é uma constante, \bar{u} é a velocidade linear da fase móvel e C_S e C_M descrevem a transferência de massa na fase estacionária e na fase móvel.

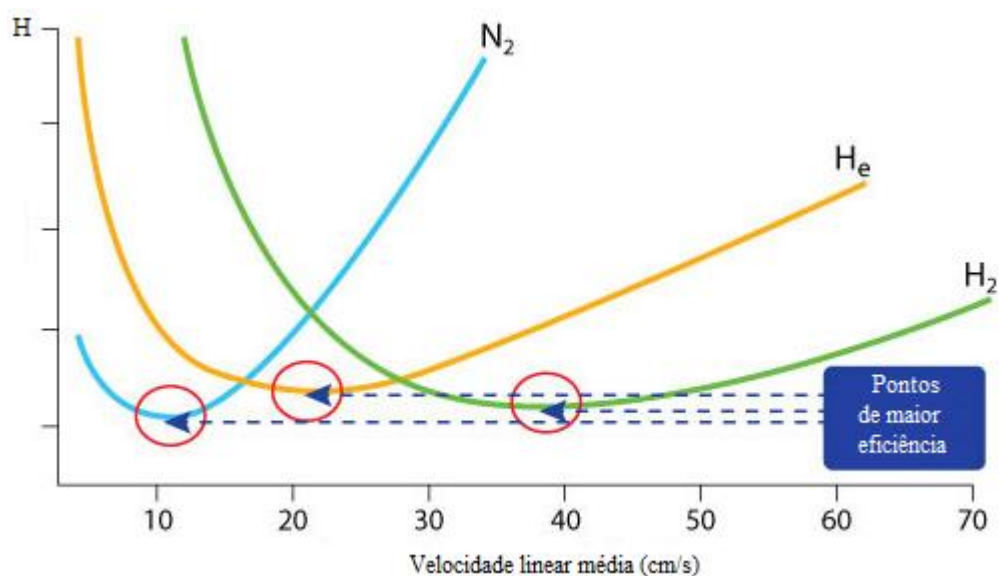
Esta equação é aplicada especificamente a colunas capilares, que como já foi referido são as mais utilizadas em GC/MS. Esta contempla os efeitos de alargamento de picos cromatográficos provocado pela difusão na fase gasosa.

O termo B/\bar{u} traduz o alargamento das bandas devido à difusão longitudinal dos analitos na fase móvel. Este impacto é de difícil minimização. Existem duas opções: a primeira seria a utilização de um gás de arraste de maior densidade mas por outro lado isto reduziria a transferência de massa na fase móvel. A outra opção seria aumentar a velocidade linear do gás, mas esta variação também tem impacto nas transferências de massa.

O termo C_S e C_M são influenciados por características intrínsecas à coluna como a espessura do filme, o diâmetro interno da coluna e os coeficientes de difusão dos analitos nas fases estacionária e móvel.

O ideal é que o valor de H seja mínimo. Para tal ser possível utiliza-se uma velocidade de gás de arraste acima do óptimo de modo a encurtar os tempos de análise, o que resulta num maior número de pratos teóricos e numa maior eficiência de separação [33, 36, 37].

A relação entre H_{\min} e \bar{u}_{opt} pode ser observada na Figura 3.6 para três gases de arraste diferentes:



Figuras 3.6 – Representação gráfica da relação entre o valor de H e da velocidade linear para vários gases (Adaptado de [39])

3.2.3.6 – Resolução da Coluna (R_S)

Por fim, o último parâmetro relevante para a compreensão do funcionamento da cromatografia gasosa é a resolução da coluna, R_S , que é uma medida da separação entre dois picos adjacentes dada pela equação:

$$R_S = 2 \frac{t_{R2} - t_{R1}}{w_{b2} + w_{b1}} \quad (\text{Equação 3.9})$$

Onde t_{R1} e t_{R2} são os tempos de retenção dos picos 1 e 2, respetivamente; w_{b2} e w_{b1} são a largura na base dos picos 2 e 1.

A resolução pode ser melhorada pelo aumento da eficiência da coluna (aumentando o tamanho da mesma), pelo aumento da seletividade (variando por exemplo a temperatura da coluna) e pelo aumento da espessura de filme (especialmente útil para compostos voláteis) [34].

3.3 – Espectrometria de Massa

3.3.1 – Introdução

A espectrometria de massa, MS, é uma técnica analítica largamente utilizada que permite identificar com precisão e quantificar analitos em misturas de complexidade variável. Esta técnica fornece informações qualitativas como massa molecular e estrutura química, que é particularmente útil no caso de se pretender identificar compostos desconhecidos. Fornece ainda

informações de cariz quantitativo, isto é, a quantidade exacta de um analito presente numa amostra.

A primeira fase desta técnica consiste na produção de iões. Esta pode ser feita com recurso a vários métodos distintos dependendo do tipo de iões em causa. Uma dessas opções é a electroionização, EI, em que os analitos da amostra são expostos sob vácuo a um feixe de electrões. Esta exposição pode levar à perda de electrões e à formação de catiões radicais, que por sua vez fragmentam uma ou mais vezes para atingir maior estabilidade.

Estes iões mais pequenos que se formam são conduzidos até ao analisador de massas, onde a razão massa/carga, m/z , permite a sua diferenciação.

Este processo é acompanhado por uma perda de sensibilidade devido ao elevado volume de fragmentos que são necessários analisar. Como tal é necessário recorrer a uma forma de amplificação, o multiplicador electrónico. Este componente amplifica o sinal correspondente às várias razões massa/carga e gera o espectro de massa correspondente [40].

3.3.2 – Componentes de um Espectrómetro de Massa

Um espectrómetro de massa é constituído por três elementos fundamentais: a fonte de ionização, o analisador de razões m/z e o detetor de iões.

3.3.2.1 – Fonte de Ionização

Como já foi referido existem várias fontes de ionização disponíveis, no entanto, apenas duas delas são utilizadas na técnica de GC/MS, a EI que já foi brevemente abordada e a ionização química, CI. Destas duas, a EI é a mais globalmente utilizada, como tal, a ênfase deste subcapítulo será dirigido para esse método.

Esta fonte de ionização consiste numa câmara onde os analitos são expostos a um feixe de electrões energizados entre 50 a 70 eV. Este feixe é limitado devido à configuração da câmara assegurando que a ionização só ocorre numa região controlada.

Na Figura 3.7 está representado um esquema explicativo do mecanismo de ionização.

Os analitos emergem da coluna numa trajectória perpendicular ao feixe concentrado de electrões.

O feixe é produzido num filamento incandescente feito de uma liga de tungsténio-rénio. A interação entre feixe e moléculas ocorre no centro da fonte, e leva à perda de electrões por parte de uma fração das moléculas, ficando positivamente carregadas como consequência.

Este método fornece energia suficiente para a expulsão de um ou mais electrões, uma vez que a energia de ionização típica para compostos orgânicos é na ordem dos 5 a 15 eV, sendo até suficiente para levar à fragmentação do primeiro ião formado, ião molecular, em várias fracções.

Nem sempre são formados iões positivos mas apenas estes são considerados para o espectro de massa que será criado.

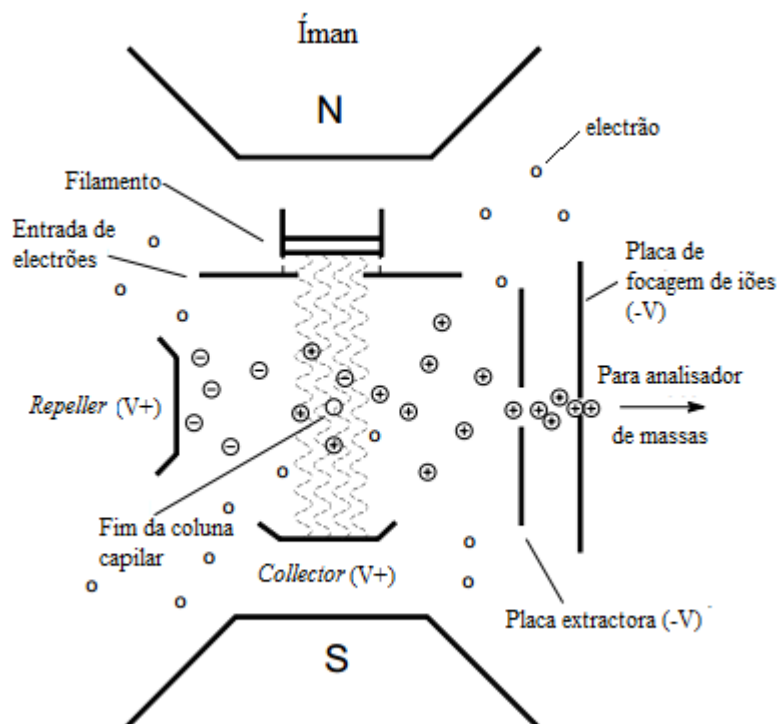


Figura 3.7 – Representação de uma fonte de ionização EI (Adaptado de [41])

Os íons positivos são sujeitos a um campo magnético que promove a sua migração para fora da fonte iónica e em direcção ao analisador de razões m/z ou analisador de massas [41].

3.3.2.2 – Analisador de Razões m/z

A informação proveniente da mistura de íons moleculares e íons fragmentos tem de ser seleccionada e identificada, nomeadamente em termos de quantificação da razão m/z . Para tal ser possível o analisador tira proveito das características intrínsecas dos alvos de análise, ao serem submetidos a um campo eléctrico ou magnético.

Embora em GC/MS o analisador mais utilizado seja o quadrupolo, existem outras possibilidades disponíveis que convém referir, como o analisador de sector magnético, o *ion trap* e o *time of flight*. Apenas será abordado em detalhe o analisador do tipo quadrupolo.

Este é constituído por quatro hastes eléctricas alinhadas entre si, como se pode constatar pela Figura 3.8.

Cada par de hastes apresenta um potencial eléctrico idêntico mas oposto. A um par é aplicada uma corrente alternada e ao outro uma corrente contínua. Esta diferença força os íons provenientes da fonte a uma trajectória específica, por entre as quatro barras. Mas nem todos terão esta trajectória desejada, apenas os que possuem a razão m/z que “responde” favoravelmente à voltagem aplicada.

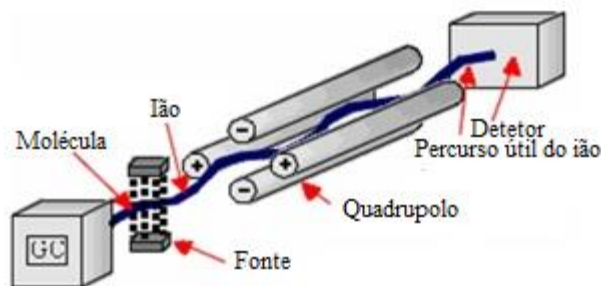


Figura 3.8 – Representação de um analisador do tipo quadrupolo (Adaptado de [42])

Estes analisadores são amplamente utilizados uma vez que são de fácil utilização e possuem um vasto espectro de compatibilidades com outras técnicas analíticas. Apresentam ainda uma vantagem que os diferencia dos demais detetores: a possibilidade de escolha entre monitorizar iões seleccionados (SIM) ou de realizar um varrimento contínuo (*Full Scan*).

No modo *Full Scan* literalmente todos os analitos presentes na amostra dentro de uma gama de massas m/z especificada pelo analista são detetados, obtendo-se o respetivo espectro de massa.

No modo SIM a detecção é feita de maneira muito mais restrita e apenas são tidos em consideração os analitos que exibem as massas m/z escolhidas pelo analista. Deste modo, a sensibilidade do método de análise aumenta exponencialmente devido à precisão com que é executada. A sensibilidade em modo SIM pode ser entre 10 a 100 vezes superior ao modo *Full Scan* [39, 40].

3.3.2.3 – Detetor de iões

A função do detetor é receber os iões provenientes do analisador, já classificados em função das diferentes massas que os caracterizam e em seguida gerar um sinal elétrico concreto que pode ser quantificado.

O detetor mais frequentemente utilizado é o multiplicador de electrões, que pode operar de duas formas distintas: na primeira (A), o sinal recebido é transmitido para uma câmara onde existem vários dínodos de potencial crescente onde o sinal é amplificado. Na segunda (B), o detetor tem a forma de um canal sucessivamente mais estreito onde a amplificação é feita à custa das colisões dos iões com os dínodos que constituem as paredes desse mesmo canal. A diferença entre os dois pode ser observado na Figura 3.9.

A eficácia da amplificação dependerá da voltagem aplicada ao sistema. Os resultados obtidos deste passo são encaminhados para uma unidade de aquisição e tratamento de dados, já descrita anteriormente neste capítulo [44].

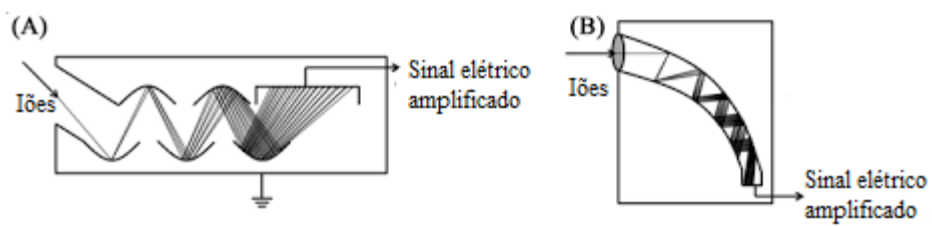


Figura 3.9 – Tipos de multiplicadores de electrões: A – Multiplicador discreto; B – Multiplicador contínuo (Adaptado de [45])

Capítulo 4 – Validação de Métodos de Ensaio

4.1 – Introdução

A validação de métodos de ensaio é uma ferramenta indispensável para assegurar que um método analítico cumpre os objetivos requeridos e conduz a resultados robustos, sistematicamente consistentes e reproduzíveis nas circunstâncias pretendidas, isto é, para os analitos pretendidos, dentro de uma gama de concentrações pré-definidas e na matriz-alvo.

A aplicação dos princípios de validação permite às instituições laboratoriais que utilizem esses métodos assegurar a qualidade dos resultados produzidos.

Para este efeito são realizados diversos ensaios que visam assegurar a fiabilidade do método que se pretende implementar.

Os parâmetros mais comuns suscetíveis de serem estudados são: a seletividade, a precisão, os limites de deteção e quantificação, a linearidade e a gama de trabalho, a exatidão e a incerteza da medição.

Não existe um consenso global, entre organizações relacionadas com a monitorização da qualidade da água, acerca de quais os parâmetros indispensáveis de serem testados no âmbito da validação de um método de ensaio. A título de exemplo, a WHO considera que no mínimo pode ser avaliada a linearidade, o limite de deteção (LOD), a precisão e a exactidão (através da análise de materiais de referência com concentrações conhecidas de analito), para assegurar a validação de um método.

No âmbito deste trabalho serão essencialmente testados os oito parâmetros supramencionados.

4.2 – Avaliação Indireta

4.2.1 – Seletividade

O termo seletividade refere-se à capacidade do método de detetar os analitos de interesse mesmo numa matriz complexa e sem que se verifiquem interferências maiores devido à presença de outros compostos, como eventuais impurezas. Estas interferências podem ser relativas à identificação ou quantificação dos analitos.

Idealmente, um método deveria ser capaz de discriminar outros compostos em detrimento dos analitos-alvo, assegurando assim que a quantificação que é feita apenas se refere aos compostos pretendidos.

Este parâmetro pode ser testado adicionando contaminantes que tipicamente se esperam que estejam presentes nas amostras e verificando se existem ou não interferências. Na

eventualidade de existirem interferências o método deve permitir que estas sejam devidamente identificadas e retificadas.

A seletividade é dependente da concentração e como tal deve ser determinada no limiar de concentração mais baixo que se pretenda utilizar [46].

No estudo em questão, a seletividade é conferida pelo método de extração usado (SPME), pela coluna cromatográfica que permite a separação dos compostos em estudo e pelo uso do modo SIM na aquisição de dados pelo espectrómetro de massa.

4.2.2 – Precisão

A precisão refere-se à capacidade de produzir resultados semelhantes numa série de medições efetuadas nas mesmas condições analíticas, a título de exemplo, em vários padrões preparados com concentrações idênticas.

A precisão pode ser determinada recorrendo a outros três conceitos: a repetibilidade, a reprodutibilidade e a precisão intermédia.

A repetibilidade (ou limite de repetibilidade), r , está associada a medidas efetuadas de modo sistemático, no mesmo dia, utilizando os mesmos materiais e realizadas pelo mesmo analista, ou seja, uma sucessão de medições obtidas estritamente nas mesmas condições analíticas. Pode ser avaliada pela equação:

$$r = 2,8 \times s_r \quad (\text{Equação 4.1})$$

Em que s_r é o desvio padrão das medições, para um nível de significância de 95%.

Esta forma de determinação da repetibilidade é usada principalmente para avaliar duplicados de padrões de controlo numa sequência analítica. O critério de aceitação para os padrões é dado pela expressão: $|x_1 - x_2| < r$, ou seja, a diferença entre o valor absoluto dos dois padrões deve estar abaixo do valor calculado de repetibilidade, para ser aceite.

Alternativamente, a repetibilidade pode ser avaliada em função do desvio padrão relativo, RSD, das concentrações analisadas, sendo necessário que se encontre abaixo de 25%.

A reprodutibilidade, R , trata-se da concordância entre os resultados obtidos em circunstâncias variáveis, como medições efetuadas em dias diferentes, com aparelhos diferentes e realizados por diferentes analistas. A variação de qualquer uma destas condições é uma medida de reprodutibilidade. Mais uma vez pode ser determinada pela equação:

$$R = 2,8 \times s_R \quad (\text{Equação 4.2})$$

Onde s_R é mais uma vez o desvio padrão das medições, para um nível de significância de 95%.

Este parâmetro pode ser testado através de ensaios interlaboratoriais.

A precisão intermédia refere-se à precisão que é avaliada sobre uma amostra ou padrão preparado definindo previamente as condições que serão alvo de variação, nomeadamente o analista que realiza a análise, o equipamento que é utilizado ou efectuando as medidas em dias diferentes. Este parâmetro é considerado como a mais fiável medida de precisão [46].

4.2.3 – Quantificação

De forma a interpretar os dados obtidos experimentalmente é indispensável determinar para esse efeito as curvas de calibração e os limiares analíticos de quantificação e de deteção.

4.2.3.1 – Curvas de Calibração

A calibração, quer seja linear quer seja por curva de calibração é de especial importância porque permite criar uma representação matemática tangível do efeito das variações de concentração dos analitos de interesse nas respostas analíticas obtidas.

Com essa relação matemática é possível quantificar os analitos quando estão presentes em amostras com concentrações desconhecidas, que é o objetivo de principal da implementação de um método de análise.

O processo de calibração consiste na preparação de padrões de concentração conhecida, numa escala adequada (gama de trabalho) que permita abranger todas as gamas de concentração que os analitos possam apresentar nas amostras que se pretendam analisar.

Com os pontos experimentais obtidos é possível construir a curva de calibração correspondente de concentração versus resposta. É a partir desta curva que as concentrações desconhecidas são determinadas em rotina.

As calibrações devem ser efetuadas preferencialmente a par das amostras a analisar e devem ter critérios de aceitação bem definidos. Como referência deve ser utilizada a norma ISO 8466-1. Esta norma recomenda a utilização de regressões lineares pelo método dos mínimos quadrados (Anexo C) como forma de controlo.

Para avaliar se será obrigatória a elaboração de uma reta de calibração em cada sequência de análises, são utilizados os testes de Rikilt (Anexo E) e das áreas normalizadas (Anexo F).

Caso estes testes cumpram os requisitos pode-se optar por uma calibração por fator de resposta a um nível mínimo de concentração.

4.2.3.1.1 – Linearidade

Caso a relação entre a resposta e a concentração seja diretamente proporcional, o caso mais simples possível, esta relação é simplesmente denominada como linearidade.

A linearidade pode ser provada com base nos testes estatísticos de Mandel (Anexo D), como é exigido pela norma ISO 8466, ou usando o teste de análise de resíduos. [49]

4.2.3.1.2 – Gama de Trabalho

A gama de trabalho corresponde à gama de concentrações que compreende as concentrações limite mínimas e máximas para as quais é possível identificar e quantificar com segurança os analitos de interesse.

A gama de trabalho também tem de ser avaliada de acordo com as normas existentes. Esta avaliação pode ser feita com o teste de homogeneidade de variâncias (Anexo G). Neste caso, se a curva de calibração for um polinómio de grau 1 recorre-se à norma ISO 8466-1. Se se tratar de um polinómio de grau 2 a norma adequada é a ISO 8466-2 [49].

4.2.3.2 – Limiares Analíticos

4.2.3.2.1 – Limite de Detecção (LOD)

Por limite de deteção, LOD, entende-se a menor concentração de analito que é possível detetar e identificar com segurança. Também pode ser definido como a menor concentração que dá origem a um sinal significativamente diferente do branco no instrumento analítico, mais concretamente, tem de se verificar uma relação de 3:1 no rácio sinal/ruído.

Para métodos que utilizem reta de calibração para quantificação de analitos pode determinar-se o LOD através da equação:

$$LOD = \frac{3 S_{y/x}}{m} \quad (\text{Equação 4.3})$$

Em que $S_{y/x}$ é o desvio padrão residual da curva de calibração e m o declive da reta de calibração.

Também pode ser determinado mais simplesmente em relação aos ensaios em branco, ou ao padrão de menor concentração, através da expressão:

$$LOD = 3 \times S_{x0} \quad (\text{Equação 4.4})$$

Em que S_{x0} é o desvio padrão das várias medições retiradas dos ensaios em branco ou dos padrões [49].

4.2.3.2.2 – Limite de Quantificação (LOQ)

O limite de quantificação, LOQ, trata-se da concentração mínima de analito que é possível quantificar com segurança. Neste caso o rácio sinal/ruído tem de ser na ordem de 10:1, e o LOQ pode ser determinado através da fórmula:

$$LOQ = \frac{10 S_{y/x}}{m} \quad (\text{Equação 4.5})$$

Ou mais uma vez a partir dos ensaios em branco ou padrões pela equação:

$$LOQ = 10 \times S_{x_0} \quad (\text{Equação 4.6})$$

A escolha do modo de determinação, quer para o limite de quantificação quer para o limite de deteção, depende essencialmente do método analítico em questão, uma vez que nem sempre é possível construir uma reta de calibração e quantificar de forma absoluta os analitos de interesse (situação muito frequente quando se utiliza SPME para preparação de amostra). Ainda assim, no âmbito deste trabalho serão utilizados e comparados os dois métodos acima descritos [49].

Existe uma terceira forma de determinar o LOQ, com base na razão sinal/ruído, S/N.

Como já foi referido, considerando como 10 o rácio S/N e sabendo a concentração do padrão analisado, é possível determinar o LOQ, com base na equação:

$$LOQ = \frac{10 \times [\text{Padrão}]}{S/N} \quad (\text{Equação 4.7})$$

O LOD pode ser calculado por este método, em função do LOQ:

$$LOD = \frac{LOQ}{3} \quad (\text{Equação 4.8})$$

No entanto, esta forma de determinação é considerada pouco fiável por dois motivos: A razão S/N obtida está dependente da região do espectro que se escolhe analisar, sendo como tal subjectiva. O outro motivo é que muito frequentemente o limite de deteção obtido desta forma não corresponde à realidade, não sendo muitas vezes possível sequer visualizar o pico de interesse nesse limite de concentração [50].

4.2.3.3 - Sensibilidade

A sensibilidade, S , pode ser definida como a capacidade de distinção entre diferentes concentrações. Pode ser calculada pela equação:

$$S = \frac{\Delta L}{\Delta C} \quad (\text{Equação 4.9})$$

Onde ΔL é a resposta obtida analiticamente e ΔC é a variação de concentração associada. Quando a variação entre as duas variáveis é diretamente proporcional, ou seja, quando se verifica linearidade, a sensibilidade é dada simplesmente pelo declive da reta do polinómio de grau 1 correspondente [49].

4.3 – Avaliação Direta

Apesar de também poder ser utilizada no processo de validação propriamente dito, existe uma forma de avaliação direta que é mais frequentemente utilizada já após a validação pelos critérios anteriormente descritos. Isto porque é necessária confirmação frequente de que o método implementado continua a cumprir os objectivos para o qual foi criado, nomeadamente ao nível do rigor e da exactidão dos resultados.

Neste sentido, são mantidos controlos rigorosos em rotina como a utilização de ensaios em branco, calibrações, injeção de padrões a intervalos apropriados (monitorizando os resultados obtidos), entre outros. Mas pode ainda recorrer-se a outras formas de validação externas, em que os resultados obtidos são comparados com valores de referência aceites como corretos. A este procedimento é dado o nome de ensaio interlaboratorial.

Outras formas de avaliar a exatidão é através do uso de Materiais de Referência Certificados, MRC, ou de estudos de recuperação.

4.3.1 – Ensaios Interlaboratoriais

A colaboração entre instituições laboratoriais na forma de ensaios permite aferir a fiabilidade dos métodos que estão implementados.

Neste tipo de ensaios, um ou vários laboratórios são testados por uma entidade independente para um dado parâmetro ou análise, num conjunto de condições perfeitamente pré-definidas. Nalguns casos este tipo de avaliação implica a utilização do mesmo método de análise nas instituições em questão, mas nem sempre.

Existem cinco tipos diferentes de ensaios interlaboratoriais:

- Ensaios de Aptidão – Consiste na avaliação do laboratório em si ou dos analistas em particular. Neste caso é dada liberdade de escolha no método de análise;

- Ensaio Colaborativos – Definem as características para a utilização de um método de análise. Neste tipo de ensaio o protocolo é idêntico para todos os participantes;
- Ensaio Comparativos – Comparam resultados obtidos por diferentes métodos de análise. Os diferentes protocolos a serem utilizados são escolhidos em função da capacidade de cada laboratório;
- Ensaio de Consenso – Utilização de diversos laboratórios para determinação de propriedades de um certo material. É especialmente útil na definição de futuros controlos de qualidade;
- Ensaio de Certificação – Permitem fixar os valores reais de um material, ainda que com algum grau de incerteza. É utilizado para testar materiais candidatos a serem certificados;

Quando os ensaios laboratoriais são bem-sucedidos, independentemente do tipo de ensaio realizado, pode representar para o laboratório avaliado uma mais-valia, distinguindo-o dos restantes, e permitindo a acreditação do método de ensaio, após avaliação pela entidade competente nacional (Instituto Português de Acreditação, IPAC) [49].

4.3.2 – Materiais de Referência Certificados, MRC

Existem outras formas de avaliação direta, que se optou por não abordar em grande detalhe, nomeadamente a utilização de Materiais de Referência Certificados, MRC. Estes materiais possuem uma concentração conhecida dos parâmetros de interesse, certificada por um organismo competente para esse efeito. A concentração para cada parâmetro de interesse possui sempre uma incerteza associada.

A análise dos MRC permitem uma avaliação objectiva do desempenho de um laboratório, através da comparação dos resultados obtidos com o valor de concentração certificado (tendo em consideração a incerteza associada).

Apesar da mais-valia associada à utilização deste método, nem sempre existem MRC comercialmente disponíveis para a grande maioria de parâmetros orgânicos [49].

4.3.3 – Ensaio de Recuperação

Outra forma direta de avaliar a exatidão consiste na realização de ensaios de recuperação, este método já mais largamente utilizado.

A realização de ensaios de recuperação permite avaliar a existência de eventuais interferências numa determinada matriz.

O procedimento destes ensaios consiste em fortificar a matriz de interesse com os dois extremos de concentração da gama de trabalho, e avaliar as percentagens de recuperação obtidas

posteriormente, através da relação entre a concentração teórica e a concentração obtida experimentalmente, como se pode verificar pela equação:

$$\textit{Recuperação} (\%) = \frac{C_p}{C_T} \times 100 \quad (\text{Equação 4.10})$$

Em que C_p é a concentração do composto determinada experimentalmente e C_T a concentração teórica.

O sucesso dos resultados obtidos é também avaliado em função do desvio padrão relativo, RSD, associado a cada ensaio, que não pode exceder os 25%.

Capítulo 5 – Parte Experimental

5.1 – Equipamento e Material

- Cromatógrafo gasoso Agilent 6890N, com coluna cromatográfica DB-VRX, 60 m x 0,320 mm x 1,80 μm , acoplado a um espectrômetro de massa Agilent 5973N;
- Fibras para SPME, Supelco:
 - PDMS/DVB 65 μm
 - PA 85 μm
 - DVB/CAR/PDMS 50/30 μm
 - PEG 60 μm
 - PDMS 7 μm
 - CAR/PDMS 75 μm
 - PDMS 100 μm
- *Software* de aquisição de dados, ChemStation MSD
- Sistema de água ultra pura Mili Q, Milipore;
- Pipeta automática e pontas de plástico, Finnpiptette;
- Seringas de vidro de 5, 10, 25, 50, 100 e 250 μL , Agilent;
- Vials de vidro de 20 mL, Gerstel;
- Cápsulas magnéticas com septo de borracha natural/PTEF para vials de 20 mL, Gerstel;
- Capsulador;
- Balões de vidro de 10 e 100 mL, Hirschmann;
- Pipetas de Pasteur, Normax;
- Balança analítica, Mettler Toledo XS204;
- Métodos de aquisição MS:
 - *Full Scan* – clbenzenosFS;
 - SIM – clbenzenosSIM.

5.2 – Reagentes

5.2.1 – Padrões Certificados

- 1,2 – Diclorobenzeno, 99,5%, $\text{C}_6\text{H}_4\text{Cl}_2$, Chem Service;
- 1,3 – Diclorobenzeno, 100 $\mu\text{g/mL}$ em metanol, $\text{C}_6\text{H}_4\text{Cl}_2$, Chem Service;
- 1,4 – Diclorobenzeno, 100 $\mu\text{g/mL}$ em metanol, $\text{C}_6\text{H}_4\text{Cl}_2$, Chem Service;
- 1,2,3 – Triclorobenzeno, 100 $\mu\text{g/mL}$ em metanol, $\text{C}_6\text{H}_3\text{Cl}_3$, Chem Service;

- 1,2,4 – Triclorobenzeno, 100 µg/mL em metanol, C₆H₃Cl₃, Chem Service;
- 1,3,5 – Triclorobenzeno, 100 µg/mL em hexano, C₆H₃Cl₃, Chem Service;

5.2.2 – Solventes

- Águas engarrafadas Vitalis, Carvalhelhos e Evian;
- Água ultra pura;
- Metanol, 99,9%, CH₃OH, Carlos Erba Reagents;
- Cloreto de sódio, 99,5%, NaCl, Merck.

5.2.3 - Amostras

- Água destinada ao consumo humano proveniente da rede de distribuição da EPAL;
- Água superficial (rio Tejo e rio Zêzere);

5.3 – Procedimento Experimental

5.3.1 – Preparação de Soluções Padrão

As soluções padrão mãe e intermédia conjunta foram preparadas utilizando metanol como solvente. Estas soluções foram conservadas por refrigeração (5 ± 3 °C). As soluções padrão de trabalho foram preparadas em água ultra pura no momento de cada análise.

Na preparação das soluções padrão, utilizadas na validação do método cromatográfico, foram efetuadas as seguintes soluções:

Solução padrão individual: Num balão de 100 mL foi adicionado metanol, até quase atingir o traço de aferição, deixando o espaço necessário para a adição do padrão individual pretendido. Foi medido e adicionado o volume necessário de 12DCB de modo a obter a concentração desejada.

A adição do padrão individual ao balão foi feita assegurando que a ponta da seringa se encontrava mergulhada no solvente para evitar perdas de padrão devido à sua volatilidade. Por fim, aferiu-se o volume no balão com metanol até ao traço.

A concentração de solução padrão individual encontra-se na Tabela 5.1:

Tabela 5.1 – Concentração da solução padrão individual de 12DCB preparada

Composto	Solução Padrão* (g/mL)	Solução Padrão Individual (mg/mL)
12DCB	1,3	38,8

*Este valor refere-se à massa específica do padrão comercial

Solução padrão conjunta: Num balão de 10 mL foi adicionado metanol até quase atingir o traço de aferição, deixando o espaço necessário para a adição da solução padrão individual e dos padrões individuais. Foram medidos e adicionados 3 μL da solução padrão individual de 12DCB descrita no ponto anterior e 20 μL dos restantes compostos em estudo, de modo a obter as concentrações pretendidas. Esta adição foi feita mais uma vez tendo o cuidado de manter as pontas das seringas utilizadas mergulhadas no solvente para evitar perdas. Por fim, aferiu-se novamente o volume de metanol até ao traço.

As concentrações obtidas estão explicitadas na Tabela 5.2.

Tabela 5.2 – Concentração da solução padrão conjunta preparada

Composto	Solução Padrão ($\mu\text{g/mL}$)	Solução Padrão Individual (g/mL)	Solução Padrão Conjunta (ng/mL)
12 DCB		38,8	11,6
13 DCB	100		200
14 DCB	100		200
123 TCB	100		200
124 TCB	100		200
135 TCB	100		200

Soluções padrão de trabalho: Foram adicionados, com seringas, diferentes volumes da solução padrão conjunta a 19 vials de 20 mL contendo 15 mL de água ultra pura, tendo o cuidado de fazer a adição de solução padrão conjunta mantendo a ponta da seringa mergulhada no solvente. (As concentrações de 13DCB, 14DCB, 123TCB, 124TCB e 135TCB são idênticas nos padrões de trabalho preliminares preparados, e como tal são indicados na Tabela 5.3 simplesmente como “Restantes Clorobenzenos”, sendo apenas feita a distinção relativamente ao 12DCB).

5.2.2 – Condições de SPME

Como foi referido na introdução, a otimização da técnica de SPME incidiu sobre vários parâmetros, nomeadamente: a variação do volume de injeção, o tipo de fibra a utilizar, o tempo de adsorção, entre outros. Na sequência desta otimização obtiveram-se as condições de extração ótimas, reunidas na Tabela 5.4.

Tabela 5.3 – Concentrações das soluções dos padrões de trabalho

Padrões	Volume Adicionado ao Vial (μL)	Concentração ($\mu\text{g/L}$)	
		12DCB	Restantes Clorobenzenos
P1	1	0,00078	0,013
P2	4	0,0031	0,05
P3	8	0,0062	0,11
P4	12	0,0093	0,16
P5	18	0,014	0,24
P6	24	0,019	0,32
P7	30	0,023	0,40
P8	36	0,028	0,48
P9	44	0,034	0,59
P10	56	0,043	0,75
P11	72	0,056	0,96
P12	84	0,065	1,12
P13	92	0,071	1,23
P14	100	0,078	1,33
P15	140	0,11	1,87
P16	180	0,14	2,40
P17	200	0,16	2,67
P18	210	0,16	2,80
P19	220	0,17	2,93

Tabela 5.4 – Condições ótimas de SPME obtidas

Volume de solvente (μL)	50
Tipo de fibra	DVB/CAR/PDMS
Tempo de adsorção (min)	25
Temperatura de adsorção ($^{\circ}\text{C}$)	40
Tempo de desadsorção (min)	3
Agitação (rpm)	250
Modo de extração	Headspace
Massa de NaCl (g)	s/ NaCl

5.3.3 – Condições do Método Cromatográfico

As condições pertinentes ao método cromatográfico encontram-se nas Tabelas 5.5 a 5.11:

Tabela 5.5 – Condições do injetor

Condições do Injetor	
Temperatura (°C)	200
Modo de injeção	<i>Splitless</i>
Tempo de splitless (min)	1,5

Tabela 5.6 – Condições da coluna cromatográfica

Condições da Coluna	
Tipo de coluna	DB-VRX; 60 m x 320 µm x 1,80 µm
Modo de operação	Contínuo
Gás de arraste/Fluxo (mL/min)	He/1,6

Tabela 5.7 – Condições operacionais do forno

Condições Operacionais do Forno		
Início		35 °C
Rampa 1	10 °C/min	160 °C
Rampa 2	20 °C/min	260 °C
Tempo total de análise		20,50 min

Tabela 5.8 – Condições da interface

Condições da Interface	
Temperatura (°C)	250

Tabela 5.9 – Condições do detetor

Condições do Detetor	
Tipo de detetor	Espectrômetro de massa
Temperatura da fonte (°C)	230
Temperatura do quadrupolo (°C)	150
Tipo de ionização	EI
Energia de ionização (eV)	70

Tabela 5.10 – Modo de Pesquisa no MS

Modo	Intervalo Cromatográfico (min)	m/z
<i>Full Scan</i>	3 - 20	50 - 450
SIM	3 – 16,5	111; 146; 148
	16,5 - 20	180; 182; 184

Tabela 5.11 – Iões de quantificação escolhidos para modo SIM

Compostos	Iões de Quantificação (m/z)
Diclorobenzenos	111; 146; 148
Triclorobenzenos	180; 182; 184

Foram também escolhidos os iões de quantificação de razão m/z 75 e 145 para os Diclorobenzenos e Triclorobenzenos, respetivamente, na eventualidade de ocorrer alguma dificuldade na identificação dos compostos devido a interferências.

Capítulo 6 – Resultados Experimentais Obtidos e Discussão

6.1 – Identificação dos Compostos em Estudo

A grande vantagem de utilizar a espectrometria de massa acoplada à cromatografia gasosa é a possibilidade de identificação dos compostos de forma quase inequívoca, através dos espectros de massa obtidos, particularmente quando a identificação apenas pelo tempo de retenção não é suficiente.

Usando o modo de aquisição *Full Scan* do espectrómetro de massa, foram numa primeira fase deste estudo injetados todos os compostos individualmente, de forma a determinar quais os seus tempos de retenção cromatográficos e quais os seus espectros de massa. Deste último, retiram-se também os iões característicos de cada grupo de isómeros, que são posteriormente utilizados para a análise em modo de aquisição SIM do espectrómetro de massa. Foram escolhidos três iões característicos em função da sua abundância e um quarto reservado para desambiguações na identificação dos compostos.

Nas Figuras 6.1 e 6.3 encontram-se dois exemplos dos espectros de massa adquiridos, dos compostos 14DCB e 123TCB, respetivamente.

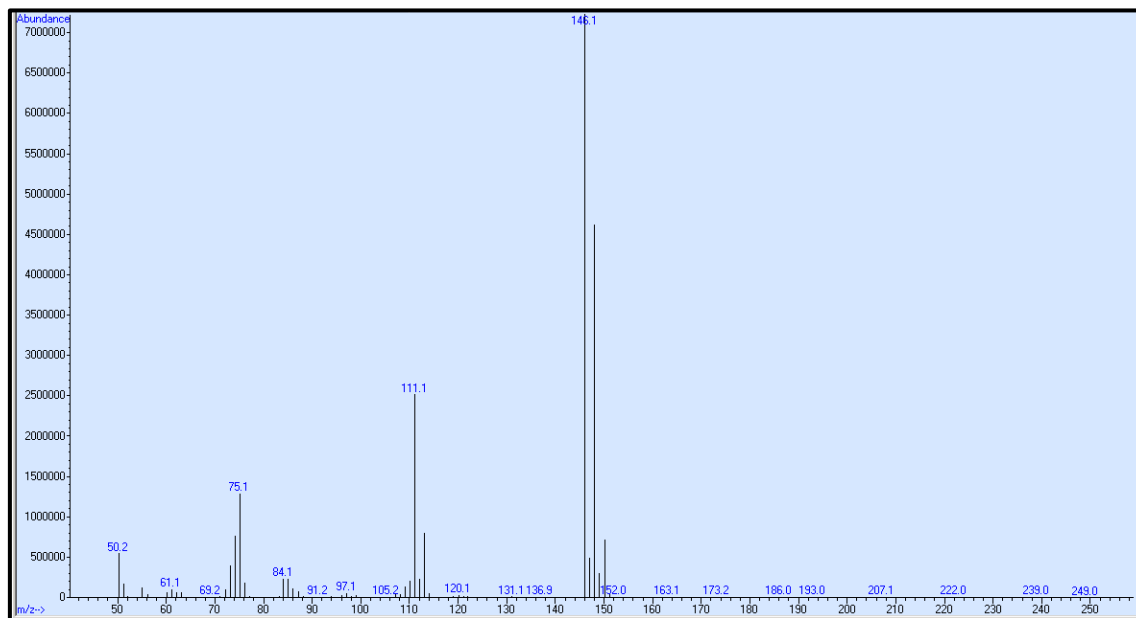


Figura 6.1 – Espectro de massa obtido para o 14DCB

A análise da Figura 6.1 permitiu selecionar os iões característicos para a pesquisa em modo SIM para os Diclorobenzenos.

Os picos selecionados foram os de razões m/z de 146,1, 148 e 111. O pico com m/z de 75, reservado para a eventualidade de ocorrer alguma dificuldade na identificação dos compostos devido a interferências, acabou por não ser necessário.

Na Figura 6.2 estão representados, a título de exemplo, alguns mecanismos propostos de fragmentação:

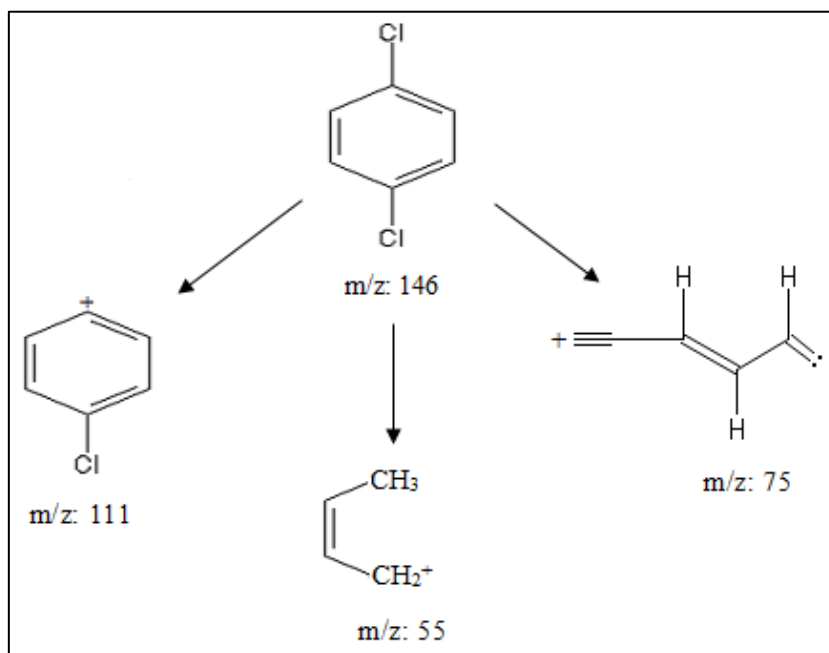


Figura 6.2 - Mecanismos propostos de fragmentação do 14DCB

Na Figura 6.3 está representado com maior detalhe o mecanismo de formação do íon característico de m/z 111:

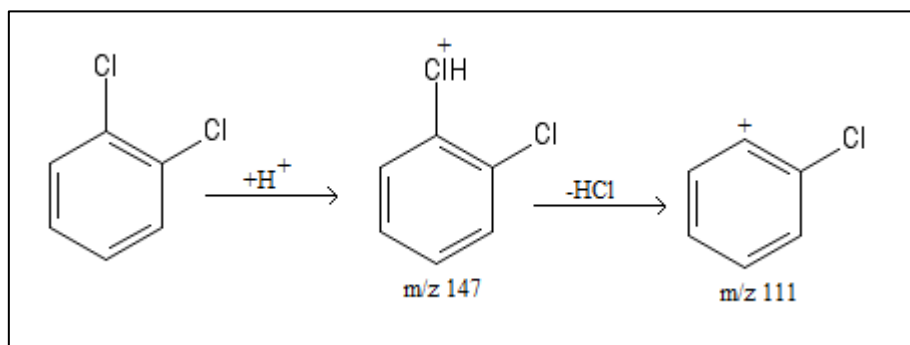


Figura 6.3 – Mecanismo de formação do íon característico m/z 111

Analisando agora o espectro de massa representativo dos Triclorobenzenos, foi escolhido a título de exemplo o 1,2,3-triclorobenzeno, que se encontra representado na Figura 6.4:

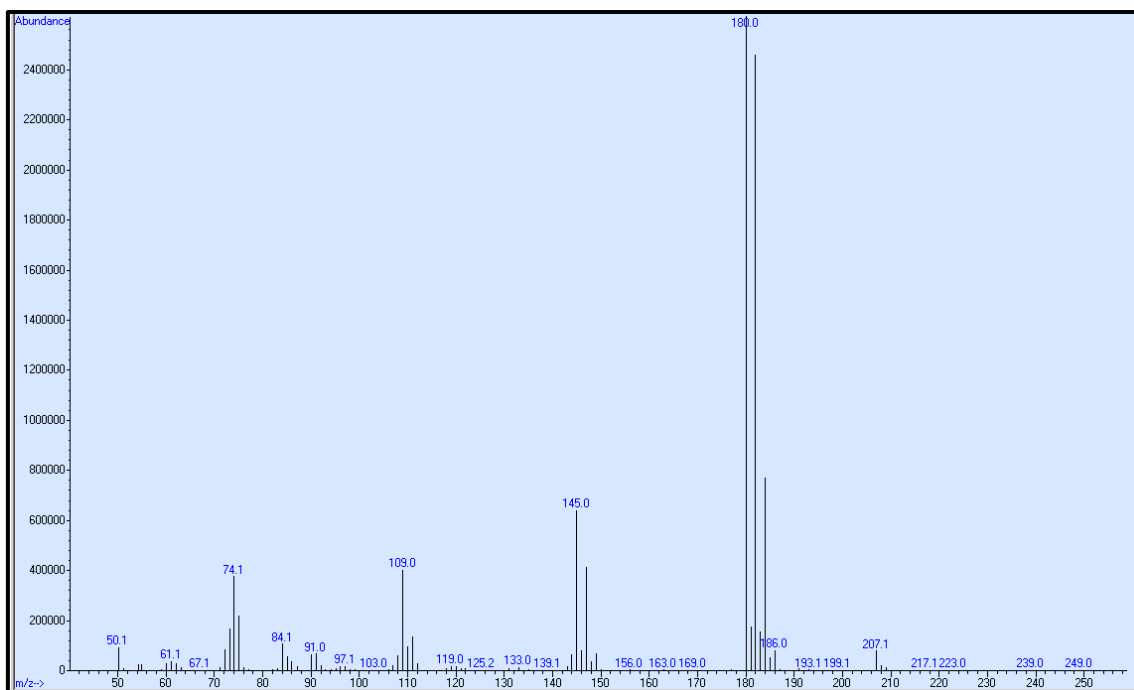


Figura 6.4 - Espectro de massa obtido para o 123TCB

Foram selecionados como iões representativos os que apresentavam as razões m/z de 180, 182, 184. Como salvaguarda foi selecionado o pico de m/z 145, pelo mesmo motivo referido anteriormente.

Os picos 180, 182 e 184 correspondem aos iões isotópicos dos Triclorobenzenos devido aos átomos de cloro nas suas moléculas. O pico de m/z 74 corresponde ao ião $C_6H_2^+$, o pico com m/z 109 corresponde ao ião $C_6H_2Cl^+$ e por último, o pico de m/z 145 é relativo ao ião $C_6H_3Cl_2^+$.

Nas Figuras 6.5 e 6.6 estão representados os mecanismos possíveis de originar o ião com m/z de 145:

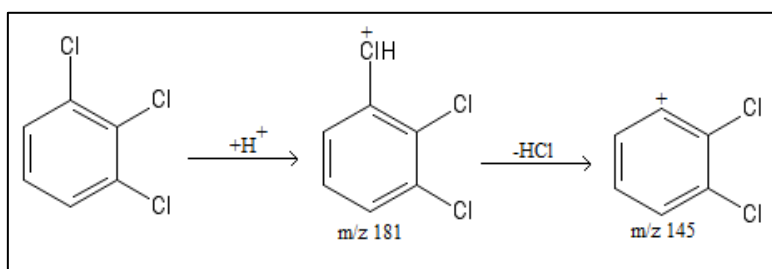


Figura 6.5 – 1º mecanismo passível de originar o ião característico de m/z 145

Obtidos os iões da análise individual de cada um dos compostos, o passo seguinte consistiu na análise, ainda em modo *Full Scan*, da solução conjunta dos seis Clorobenzenos. Após

confirmação da separação adequada, foi então realizada uma análise em modo SIM recorrendo às massas características selecionadas anteriormente, cujo resultado se encontra na Figura 6.7.

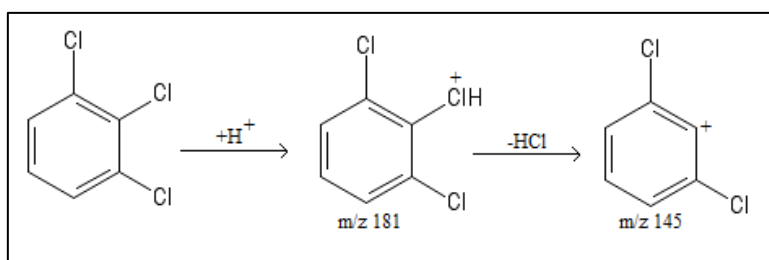


Figura 6.6 – 2º mecanismo passível de originar o ião característico de m/z 145

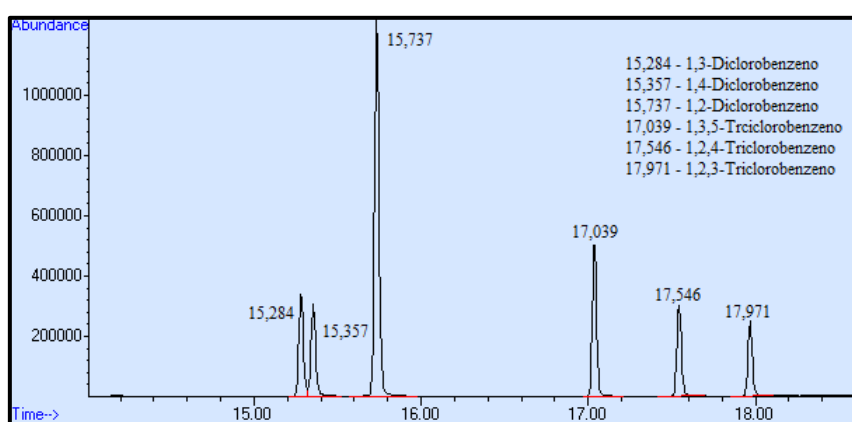


Figura 6.7 - Cromatograma da solução conjunta de Clorobenzenos

6.2 – Otimização dos Parâmetros do Método de SPME

No que respeita ao método de SPME os parâmetros considerados mais pertinentes de serem alvo de otimização foram: o volume de solvente, o tipo de fibra, o tempo de adsorção, a temperatura de adsorção, o tempo de desadsorção, a utilização ou não de agitação, o modo de extração e a adição de sais, *salting out*.

A otimização de todos os parâmetros foi feita em modo SIM registando e comparando as áreas dos picos para cada um dos compostos e selecionando as condições que mais favorecem a extração.

As condições iniciais utilizadas estão explicitadas na Tabela 6.1.

Tabela 6.1 – Condições iniciais utilizadas

Tipo de Fibra	DVB/CAR/PDMS
Tempo de Adsorção (min)	3
Temperatura de Adsorção (°C)	40
Tempo de Desadsorção (min)	5
Agitação (rpm)	250
Modo de Extração	Headspace
Massa de NaCl	s/ NaCl
Tempo de <i>Splitless</i> (min)	0,75

6.2.1 – Volume de Solvente

No estudo dos volumes de solvente, variou-se a quantidade de solução conjunta que é usada para fortificar os 15 mL de água colocados no *vial* de análise, mantendo sempre constante a concentração dos compostos e as condições operacionais.

Foram testados os seguintes volumes de solvente: 20, 40, 60, 80, 100, 120, 140, 160, 200, 250 e 300 μ L. Os resultados obtidos encontram-se na Figura 6.8:

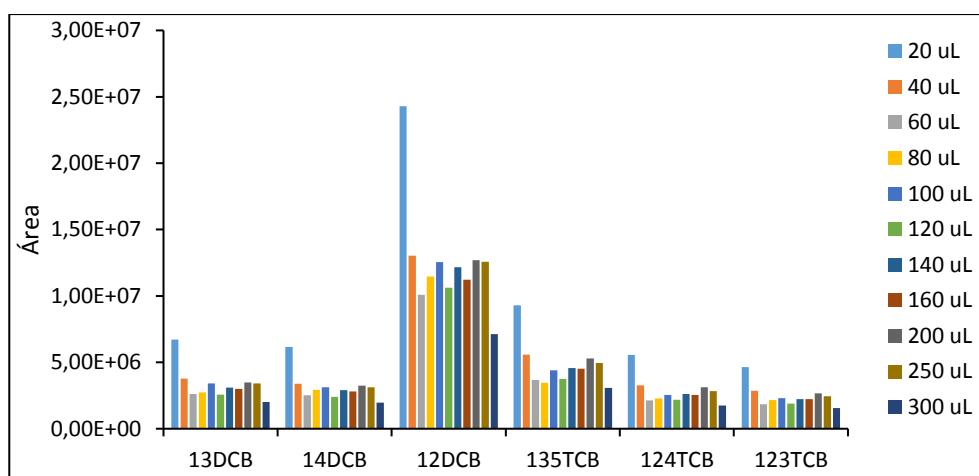


Figura 6.8 – Variação das áreas dos compostos em função dos volumes de solvente

Analisando a Figura 6.8, conclui-se que o volume óptimo é claramente de 20 μ L, no entanto, em caso de necessidade qualquer um dos outros volumes poderia ser utilizado uma vez que apresentam resultados bastante consistentes entre si, exceção feita para o volume de 300 μ L onde ocorre um decréscimo claro das áreas de todos os compostos.

Este decréscimo pode ser explicado pela competição que o solvente em que os padrões são preparados, metanol, faz com os compostos de interesse na migração até ao revestimento da fibra, afectando a quantidade de analitos que são adsorvidos.

De modo a conciliar a quantidade de padrão gasto na preparação das soluções, tendo em conta o elevado número de testes que foi necessário realizar, e as áreas dos compostos de interesse, optou-se por um volume de injeção de 50 μL , que permitia um bom compromisso entre estes dois fatores.

6.2.2 – Tipo de Fibra

No estudo do tipo de fibra mais adequado para realizar a extração, foram feitas várias análises mantendo constante a concentração dos compostos e as condições operacionais, variando apenas o tipo de fibra utilizada. Foram testadas as seguintes fibras no âmbito deste estudo: PDMS/DVB 65 μm , PA 85 μm , DVB/CAR/PDMS 50/30 μm , PEG 60 μm , PDMS 7 μm , CAR/PDMS 75 μm e PDMS 100 μm . A Figura 6.9 mostra os resultados obtidos:

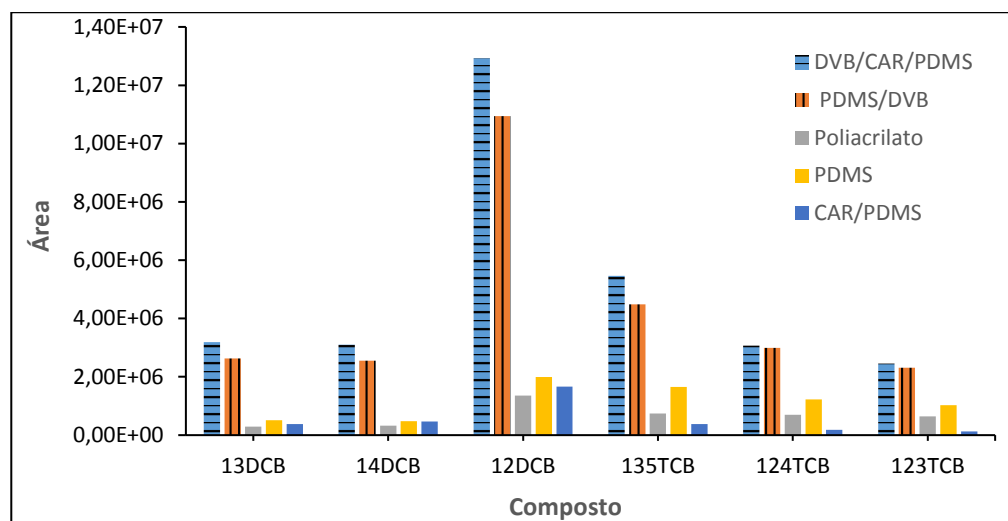


Figura 6.9 - Variação das áreas dos compostos em função da fibra utilizada

Apenas estão representadas no gráfico cinco das fibras testadas devido às restantes não terem demonstrado capacidade de adsorver os compostos de interesse.

Da análise da Figura 6.6 conclui-se que a fibra que globalmente torna a extração mais eficaz é a de DVB/CAR/PDMS 50/30 μm , uma fibra adequada para compostos voláteis e semi-voláteis com PM entre 40 e 275 com propriedades bipolares, como tal, adequada para um vasto leque de compostos, no qual se encaixam os Clorobenzenos em estudo.

6.2.3 – Tempo de Adsorção

No estudo dos tempos de adsorção foram analisadas várias amostras mantendo constantes as concentrações dos analitos e as condições experimentais, variando apenas o tempo de adsorção entre 5 e 40 minutos, com incrementos de cinco minutos. Os resultados obtidos encontram-se na Figura 6.10:

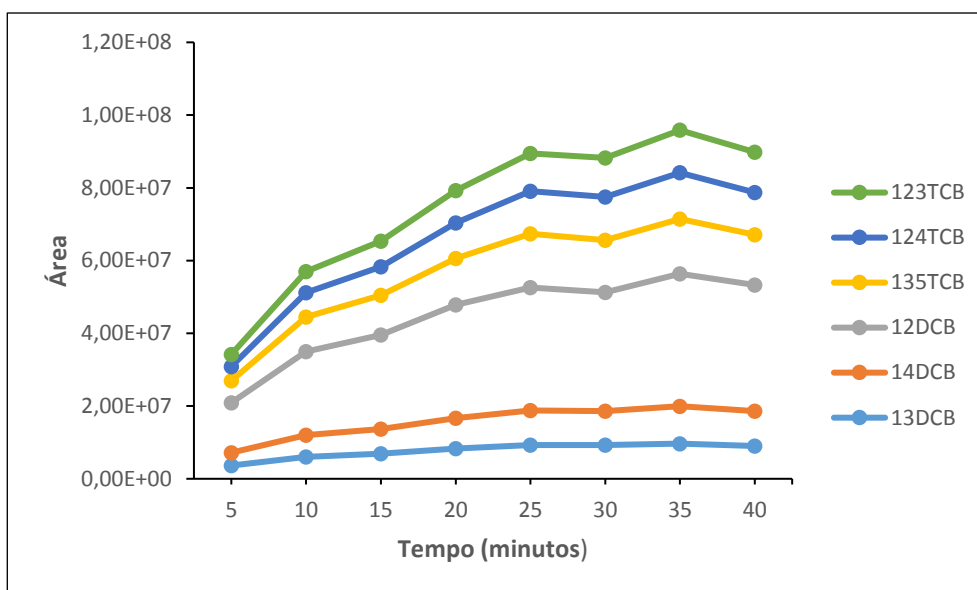


Figura 6.10 – Variação das áreas dos compostos em função do tempo de adsorção

Após análise da Figura 6.10 conclui-se que o tempo ideal de adsorção seria de 25 minutos. Durante este período ocorre um aumento apreciável das áreas de quase todos os compostos, excepto no caso do 14DCB e 13DCB que permanecem praticamente inalterados independentemente do tempo de extração. Após este período, atinge-se um patamar de estabilização que é seguido de um decréscimo das áreas.

A escolha desta duração da fase de adsorção permite favorecer a extração sem, no entanto, tornar o processo desnecessariamente longo.

6.2.4 – Temperatura de Adsorção

No estudo da temperatura de adsorção foram mantidas constantes as concentrações dos analitos e as condições experimentais para as diversas amostras, variando para o efeito apenas a temperatura do forno onde é efetuado o pré-condicionamento dos *vials*. Foram testadas as seguintes temperaturas: 35, 40, 45, 50, 55 e 60 °C. Os resultados obtidos encontram-se na Figura 6.11:

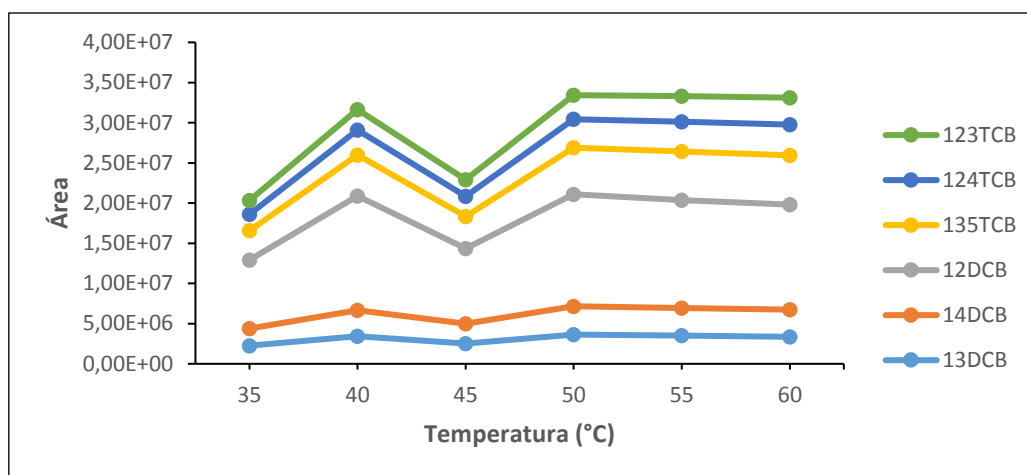


Figura 6.11 – Variação das áreas dos compostos em função da temperatura de adsorção

Analisando a Figura 6.11, verifica-se que as áreas de praticamente todos os compostos sofrem um aumento visível para a temperatura de 40 °C, as exceções são mais uma vez o 13DCB e 14DCB que permanecem essencialmente constantes.

Para temperaturas mais elevadas verifica-se que se atinge um patamar em que as concentrações não variam significativamente, como tal, não compensa a utilização de temperaturas superiores a 40 °C, tendo sido esta a escolhida como ideal.

Os resultados obtidos para a temperatura de 45 °C foram considerados como uma anomalia e devido a limitações de tempo não foi possível repetir a análise para esta temperatura.

Estes resultados não foram como tal tidos em consideração nas observações realizadas.

6.2.5 – Tempo de Desadsorção

No estudo do tempo de desadsorção, as várias análises foram efetuadas mantendo constantes as concentrações dos analitos e as condições experimentais, variando apenas o tempo de desadsorção para este efeito. Os resultados obtidos encontram-se na Figura 6.12:

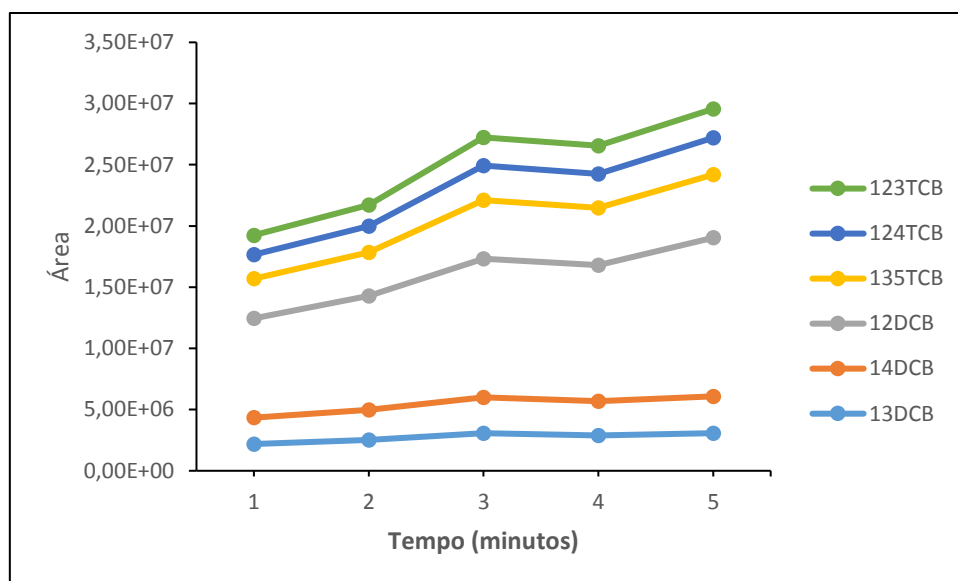


Figura 6.12 – Variação das áreas dos compostos em função do tempo de desadsorção

Analisando a Figura 6.12 é possível verificar que os tempos de desadsorção que maximizam as áreas dos compostos de interesse são aos 3 e 5 minutos.

Optou-se pelo período de 3 minutos como ideal, tendo em conta que não se verifica grande diferença nas áreas correspondentes aos dois pontos, ou melhor, o impacto que tem na extração não justifica a utilização de um tempo superior.

6.2.6 – Agitação

No estudo relativo à necessidade de acompanhar o período de pré-condicionamento de agitação dos *vials*, foram mantidas constantes as concentrações dos analitos e as condições experimentais, tendo apenas sido variado a utilização ou não de agitação. Os resultados obtidos encontram-se na Figura 6.13:

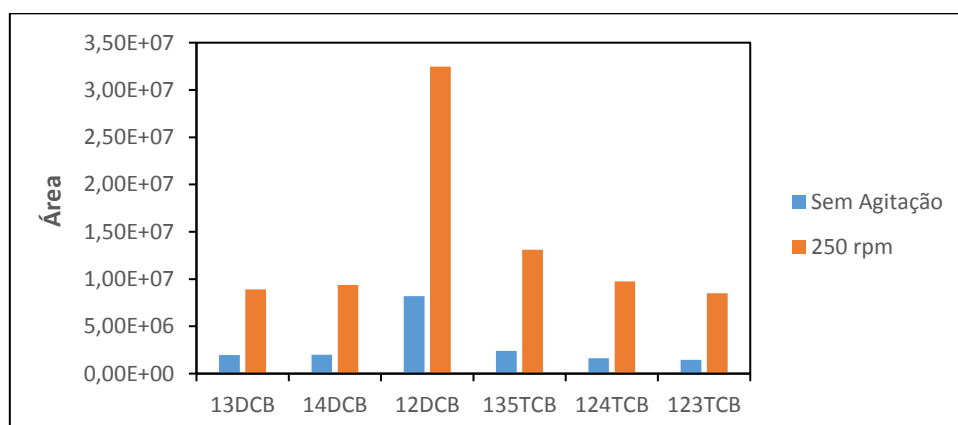


Figura 6.13 – Variação da área dos compostos em função da agitação utilizada

Analisando a Figura 6.13, conclui-se que a utilização de agitação conduz a benefícios claros na eficiência da extração. Como foi referido no Capítulo 2, a otimização deste parâmetro teria que garantir um equilíbrio entre o aumento da eficácia da extração e a praticabilidade do método, salvaguardando a integridade na fibra.

Neste sentido, apenas se testou uma agitação moderada de 250 rpm que aumenta inequivocamente a eficiência da extração e que à partida não danificará a fibra no decurso das atividades de análise.

6.2.7 – Modo de Extração

No estudo do modo de extração foi testada a influência de realizar a adsorção em *headspace* e por imersão direta. Nas análises realizadas foram mantidas constantes as concentrações dos compostos e as condições operacionais, variando apenas o volume contido nos *vials*. No caso da extração em *headspace* foram utilizados 15 mL enquanto na imersão direta foram usados 18 mL. Os resultados obtidos encontram-se na Figura 6.14:

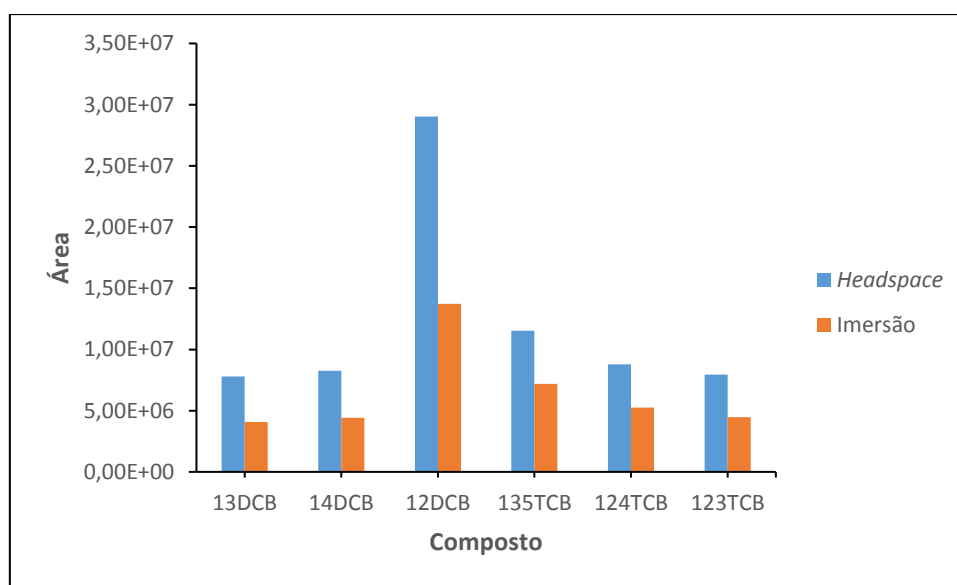


Figura 6.14 – Variação das áreas em função do modo de extração

Da análise da Figura 6.14 conclui-se que o ideal é que a extração seja efetuada em *headspace*, devido às vantagens que representa para a eficácia na extração de todos os compostos em estudo.

Este resultado está de acordo com o previsto uma vez que os compostos em estudo são todos classificados como voláteis, como tal, seria expectável que a extração em *headspace* fosse mais favorável, o que se verificou.

6.2.8 – Salting Out

No estudo do efeito da adição de sal foram utilizados 1, 2 e 3 g de NaCl, mantendo constantes as concentrações dos compostos e as condições analíticas. O sal adicionado foi previamente dissolvido com recurso a ultra-sons e só depois a solução foi fortificada com os analitos de interesse. Os resultados obtidos estão representados na Figura 6.15:

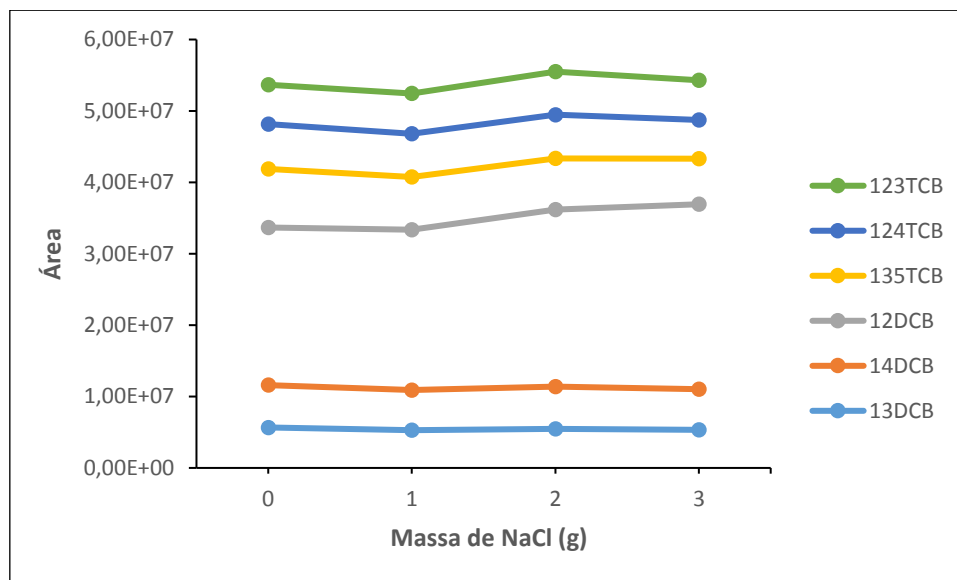


Figura 6.15 - Variação das áreas em função da quantidade de NaCl adicionado

Da análise da Figura 6.15 verifica-se que a adição de sal não produz nenhum efeito relevante na eficiência da extração de nenhum dos analitos. Assim sendo, para estudos posteriores optou-se por não se adicionar sal.

6.3 – Otimização e Validação do Método Cromatográfico

6.3.1 – Tempo de *Splitless*

A par dos parâmetros de SPME que foram alvo de otimização, também um parâmetro do método cromatográfico foi considerado como sendo relevante o estudo do seu efeito nas áreas dos compostos.

Neste sentido, foram testados vários tempos de *splitless*: 0,5, 1, 1,5, 2, 2,5 e 3 min, mantendo as restantes condições analíticas e concentrações constantes. Como foi referido no Capítulo 3, este trata-se do tempo que a válvula de *splitless* permanece fechada após a injeção, abrindo depois para ventilar a câmara do injetor e quaisquer analitos que ainda se encontrem presentes, impedindo-os de atingir a coluna. Os resultados obtidos encontram-se na Figura 6.16:

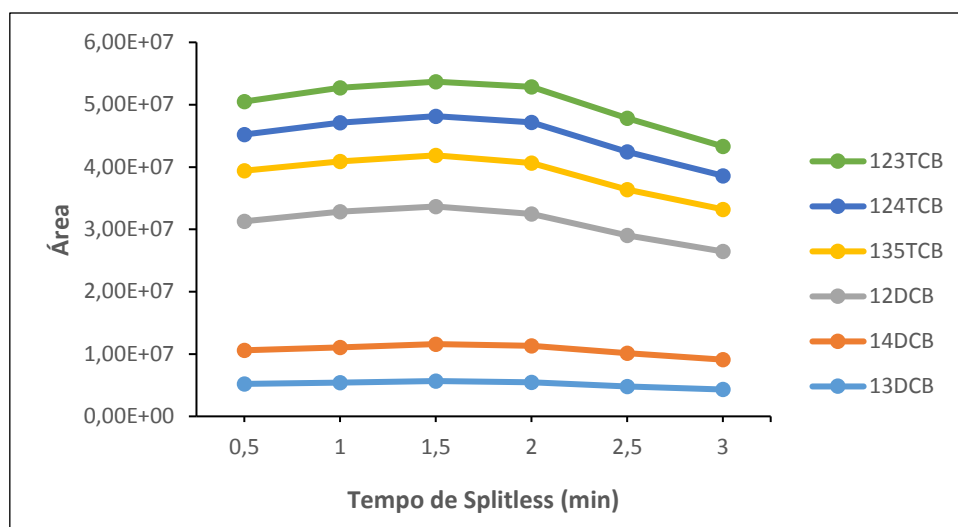


Figura 6.16 – Variação da área dos compostos em função do tempo de splitless testado

Da Figura 6.16 observa-se um aumento, ainda que modesto, das áreas dos compostos até ser atingido o máximo, ao minuto 1,5. Após este momento começa a verificar-se um decréscimo dessas áreas. Como tal, foi selecionado como tempo de *splitless* ideal o valor de 1,5 min.

6.3.2 – Estudo de Linearidade

O estudo de linearidade foi efetuado com recurso a 19 soluções padrão de trabalho de diferentes concentrações (as apresentadas na Tabela 5.3), utilizando a técnica de SPME-GC/MS em modo SIM.

Para verificar em que gama das concentrações testadas existia linearidade, foram traçadas representações gráficas dessas concentrações em função da resposta analítica obtida para cada composto e aplicado o método dos mínimos quadrados para a linearização. Os resultados obtidos encontram-se nas Figuras 6.17 a 6.22:

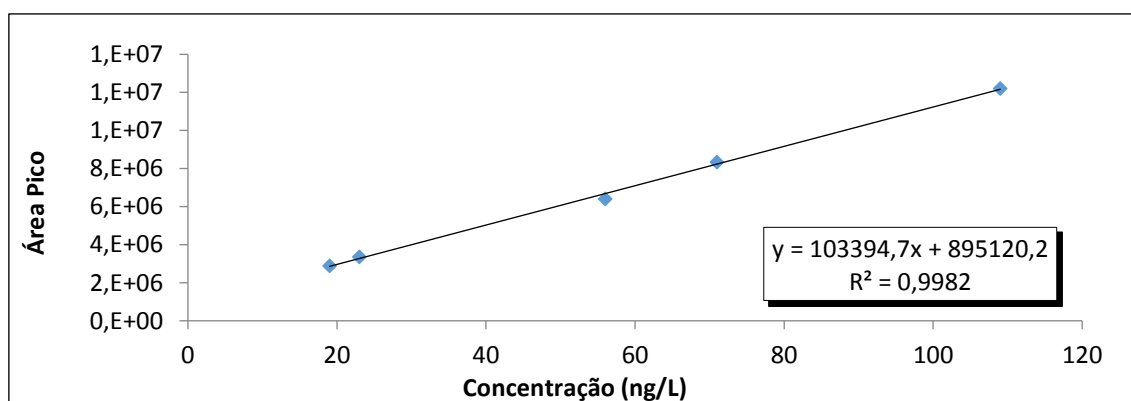


Figura 6.17 – Representação gráfica da área dos picos em função da concentração para o 12DCB

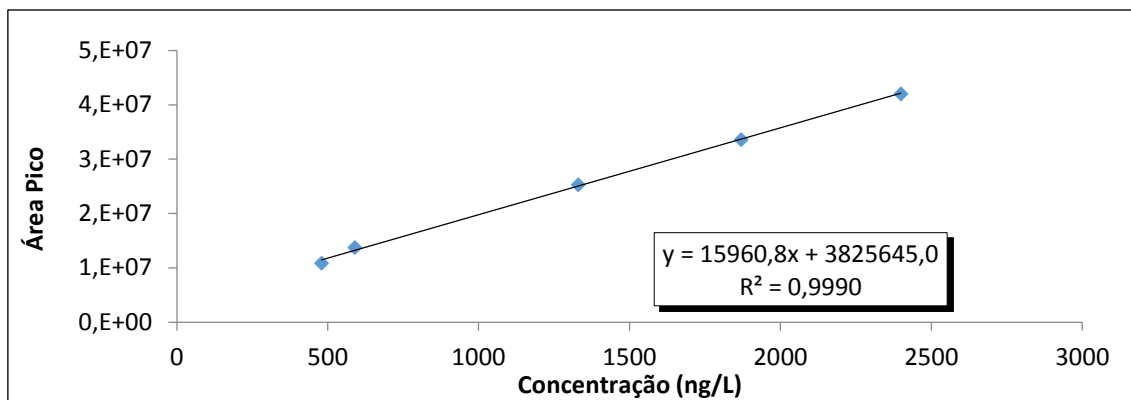


Figura 6.18 – Representação gráfica da área dos picos em função da concentração para o 13DCB

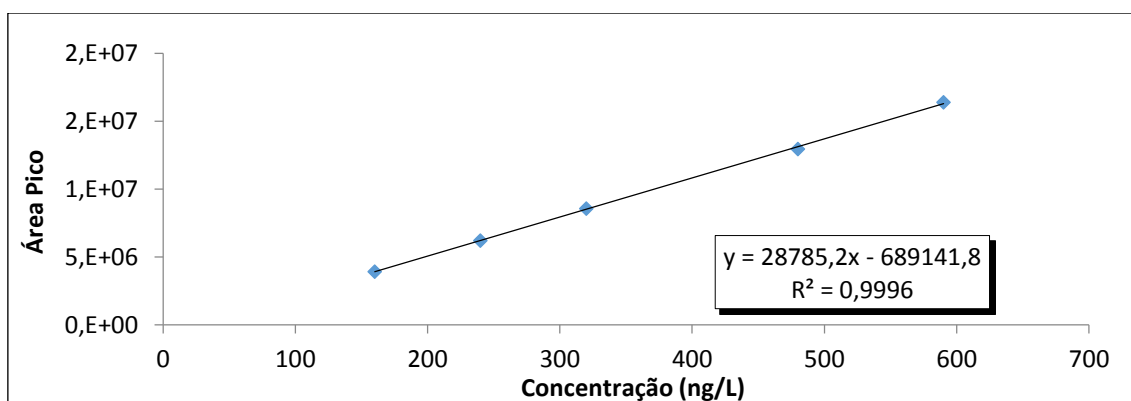


Figura 6.19 – Representação gráfica da área dos picos em função da concentração para o 14DCB

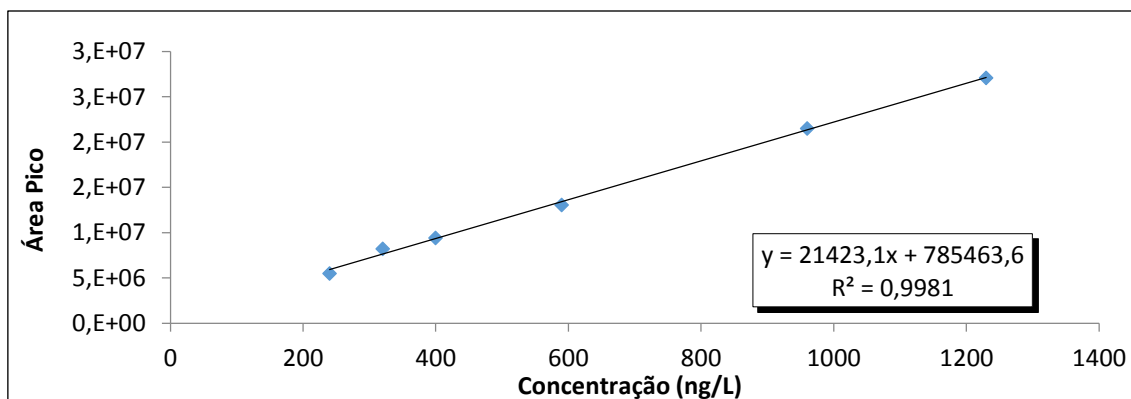


Figura 6.20 – Representação gráfica da área dos picos em função da concentração para o 123TCB

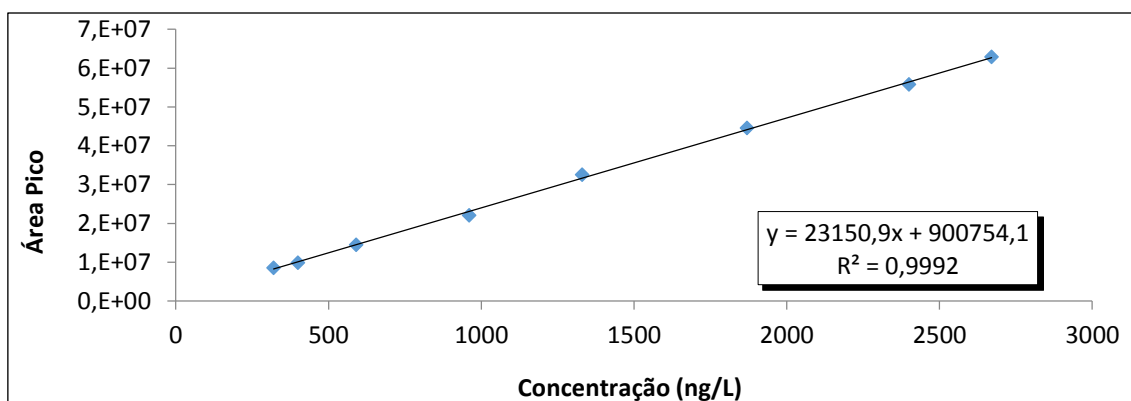


Figura 6.21 – Representação gráfica da área dos picos em função da concentração para o 124TCB

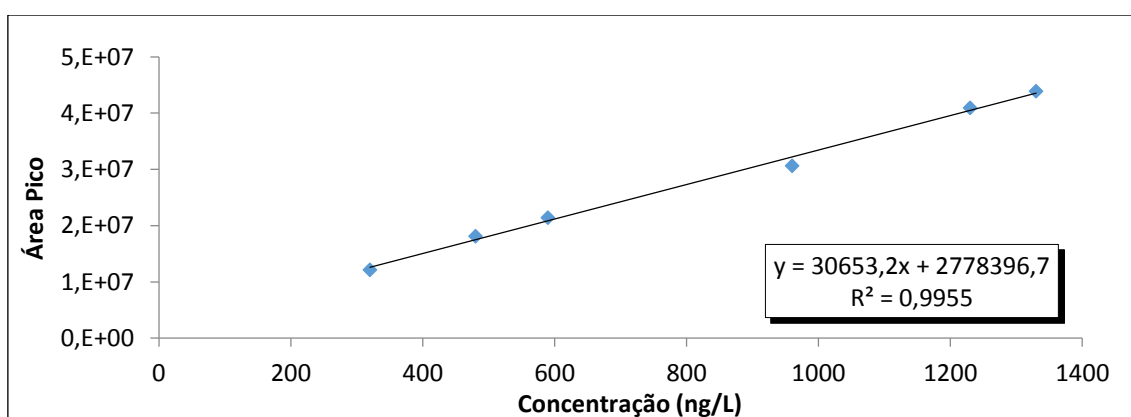


Figura 6.22 – Representação gráfica da área dos picos em função da concentração para o 135TCB

Para além de um número adequado de pontos experimentais distribuídos equitativamente na gama de concentrações pretendida, é também necessário que se cumpram dois outros requisitos no método dos mínimos quadrados: que o coeficiente de correlação, r , seja no mínimo 0,995 e que o limite de quantificação, calculado com base no desvio padrão residual da reta de calibração, seja inferior à menor concentração da gama em estudo. Estes resultados são apresentados na Tabela 6.2.

Dos resultados da Tabela 6.2 verifica-se que os estudos de linearidade conduziram a resultados satisfatórios.

Em simultâneo foi também realizada o teste de análise de resíduos (Anexo C) onde se verifica que existe uma distribuição completamente aleatória dos pontos experimentais para todos os compostos, o que está acordo com os resultados obtidos pelo método dos mínimos quadrados, isto é, de que à partida existe linearidade na gama de concentrações escolhida.

A existência de linearidade foi também confirmada pelo teste de Mandel (Anexo D), cujos resultados se encontram na Tabela 6.3.

Tabela 6.2 – Resumo dos resultados da aplicação do método dos mínimos quadrados

Composto	Gama de Linearidade (ng/L)	Coefficiente de Correlação	Limite de Quantificação (ng/L)
12DCB	19 – 109	0,9991	18
13DCB	480 – 2400	0,9995	300
14DCB	160 – 590	0,9998	41
123TCB	240 – 1230	0,9991	191
124TCB	320 – 2670	0,9996	282
135TCB	320 – 1330	0,9977	314

Tabela 6.3 – Resumo dos resultados obtidos da aplicação do teste de Mandel

Composto	Valor de Teste	Valor Crítico*
12DCB	0,56	18,51
13DCB	0,45	18,51
14DCB	-0,20	18,51
123TCB	0,0013	10,13
124TCB	0,068	6,61
135TCB	-0,37	10,13

*Este valor foi calculado em função dos graus de liberdade dos ajustes linear e polinomial

Relativamente ao teste de Rikilt (Anexo E), verifica-se que a quantificação não pode ser simplesmente feita por fator de resposta para todos os compostos, nomeadamente o 12DCB e 13DCB, sendo obrigatório o uso de uma reta de calibração na quantificação destes dois, uma vez que ultrapassam os limites estabelecidos pelo teste. No caso do 124TCB e 123TCB, existe para cada deles um ponto que apresenta uma variação de 111%, ou seja, ultrapassam o limite máximo de 110%. No entanto, como a diferença é de apenas 1% considera-se desprezável e conclui-se que as gamas de linearidade destes dois compostos cumprem os requisitos do teste de Rikilt.

Para futura referência, para que a quantificação de todos os compostos pudesse ser feita com recurso a fator de resposta, no decurso das análises em rotina, seria necessário expandir a gama de concentrações onde se verificou a linearidade e encontrar outra, onde os compostos 12DCB e 13DCB passassem nos testes estatísticos de Rikilt.

Os resultados do teste das áreas normalizadas foram semelhantes aos anteriores, com a exceção de que o 123TCB e 124TCB cumprem os requisitos deste método. Mais uma vez o 12DCB e 13DCB apresentam pontos fora dos limites pelo que se confirma que a sua quantificação não pode ser feita por fator de resposta.

Por fim, realizou-se o teste da homogeneidade das variâncias (Anexo G). Deste concluiu-se que para todos os compostos em estudo existem diferenças significativas entre as variâncias do padrão de menor concentração e o de maior concentração, isto é, o valor de teste calculado, PG, é superior, para todos os compostos, ao valor tabelado da distribuição de Fisher. Este resultado está de acordo com o que seria de esperar quando se utiliza a técnica de SPME, devido à variabilidade que lhe está associada. Ainda assim, consideram-se como aceites as gamas de trabalho definidas uma vez que ficou demonstrada a linearidade nos outros testes estatísticos realizados.

6.3.3 – Seleção da Matriz

Para a seleção da matriz mais adequada foi necessário averiguar se existiriam Clorobenzenos nalguma das matrizes passíveis de serem utilizadas, pelo que foram analisados brancos, ou seja, sem qualquer fortificação de vários tipos de água, nomeadamente água ultrapura, Carvalhelhos, Evian e Vitalis.

Verificou-se que apenas existe 12DCB e 14DCB em algumas das matrizes analisadas, como se pode verificar pelos resultados apresentados na Tabela 6.4:

Tabela 6.4 – Resultados obtidos para as análises das diferentes matrizes

Matriz	[12DCB]_{Branco} (ng/l)	LOD* (ng/l)	[14DCB]_{Branco} (ng/l)	LOD* (ng/l)
Ultrapura	-		-	
Evian	0,05	6	-	14
Vitalis	-		0,1	
Carvalhelhos	0,05		-	

*Calculados em função do LOQ instrumental apresentado na Tabela 6.1

Analisando a Tabela 6.4, conclui-se que apesar de o 12DCB e 14DCB estarem presentes nalgumas das matrizes, estes encontram-se abaixo dos limites de deteção, como tal, não representam problema.

Adicionalmente, confirmou-se que a matriz mais indicada para a realização dos estudos é a água ultrapura, onde para além de não existirem vestígios de nenhum dos Clorobenzenos em estudo, trata-se também de uma matriz de maior praticabilidade, por oposição às restantes águas engarrafadas.

6.3.4 – Sensibilidade do Método

Como ficou demonstrada a linearidade do método para todos os compostos, a sua sensibilidade pode ser aferida em função dos declives das retas de calibração. A representação gráfica da sensibilidade encontra-se na Figura 6.23.

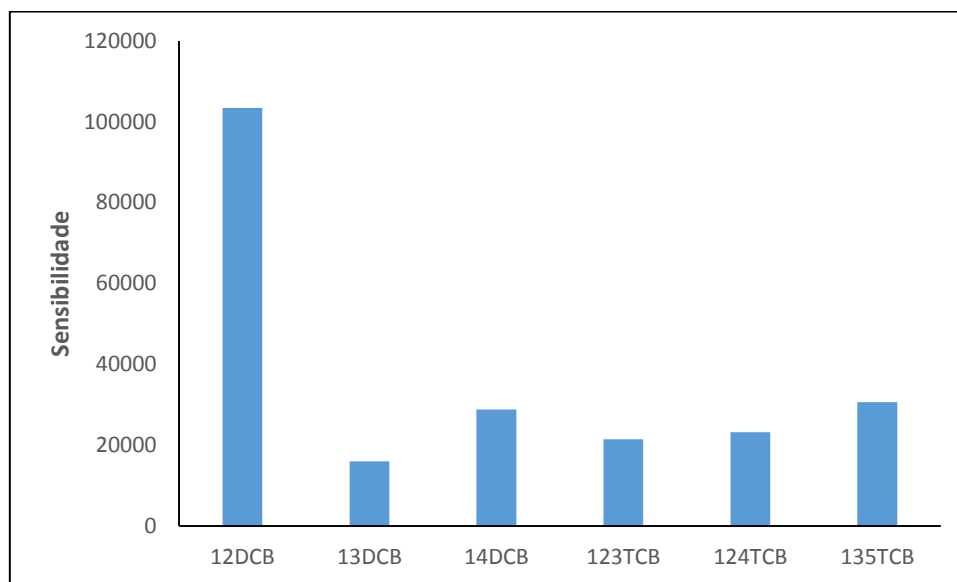


Figura 6.23 – Representação gráfica da sensibilidade para cada composto em estudo

Da análise da Figura 6.23 verifica-se que o 12DCB é o composto que apresenta maior sensibilidade, sendo cerca de cinco vezes superior à dos restantes compostos. Em termos práticos, este resultado traduz-se numa capacidade superior do método de distinguir entre diferentes concentrações. Tipicamente, a sensibilidade diminui com o aumento da concentração devido ao efeito de saturação do sinal [51], como tal, os resultados obtidos estão de acordo com o esperado atendendo que o 12DCB é o composto que possui a gama de linearidade com concentrações mais baixas.

6.3.5 – Limiares Analíticos

Os limiares analíticos teóricos, limite de quantificação e limite de deteção (Anexo H), foram determinados de duas formas distintas, já descritas em pormenor no subcapítulo 4.2.3.2. Para o primeiro modo de determinação foi injetado dez vezes o padrão de calibração correspondente à concentração mais baixa da gama, e calculado o respetivo desvio padrão 1).

A segunda forma de determinação consistiu no cálculo do desvio padrão residual da reta de calibração de cada composto 2).

Os resultados obtidos encontram-se na Tabela 6.5:

Tabela 6.5 – Limites de detecção e quantificação obtidos para cada composto pelos dois métodos

Composto	LOD (ng/L)		LOQ (ng/L)	
	1)	2)	1)	2)
12DCB	3	5	11	18
13DCB	64	90	214	300
14DCB	19	12	63	41
123TCB	35	57	116	191
124TCB	27	84	89	282
135TCB	10	94	34	314

Como seria de esperar, a determinação do LOQ através de estudos de repetibilidade apresenta valores mais baixos.

O DL 83/2011 de 20 de Junho estipula que os limites de quantificação sejam de 30% do limite legislado, ou seja, no caso dos Triclorobenzenos seria de 120 ng/l em relação ao valor paramétrico de 400 ng/l. Como se pode verificar pela Tabela 6.5, todos os Triclorobenzenos cumprem essa especificação.

Foram também determinados os limites de detecção e quantificação com recurso à razão sinal/ruído, S/N, abordada no subcapítulo 4.2.3.2.2, em duas gamas de concentração: para uma concentração vestigial (Tabela 6.6) e para a concentração correspondente ao primeiro padrão da gama de trabalho (Tabela 6.7).

Tabela 6.6 – Limiares analíticos determinados para uma concentração vestigial

Composto	Concentração (ng/L)	S/N (médio)	LOQ (ng/L)	LOD (ng/L)
12DCB	0,78	421	0,02	0,006
13DCB	13	212	0,6	0,2
14DCB	13	206	0,6	0,2
123TCB	13	130	1,0	0,3
124TCB	13	126	1,0	0,3
135TCB	13	94	1,4	0,5

Tabela 6.7 – Limiares analíticos determinados para o padrão mais baixo da gama de trabalho

Composto	Concentração (ng/L)	S/N (médio)	LOQ (ng/L)	LOD (ng/L)
12DCB	19	3306	0,06	0,02
13DCB	480	15145	0,3	0,1
14DCB	160	4748	0,3	0,1
123TCB	240	1179	2,0	0,7
124TCB	240	3301	0,7	0,2
135TCB	320	7931	0,4	0,1

Como seria expectável, os limites de analíticos determinados através das razões S/N são significativamente mais baixos, no entanto, como já foi referido, esta metodologia não é fidedigna, uma vez que produz resultados que frequentemente não traduzem a realidade.

À semelhança do que se verificou com a determinação do limite de quantificação através da repetibilidade, os valores obtidos estão de acordo com o estipulado no DL 83/2011 de 20 de Junho.

6.3.6 – Precisão

A avaliação da precisão foi feita com recurso à determinação da repetibilidade e da precisão intermédia do método.

6.3.6.1 – Repetibilidade

Para o estudo da repetibilidade realizaram-se dez ensaios sob as mesmas condições analíticas, no mesmo dia, na mesma matriz e para duas concentrações distintas (as concentrações mais altas e mais baixas da gama de trabalho), em condições de repetibilidade.

A avaliação da repetibilidade foi efetuada de duas formas: através do cálculo dos desvios padrão relativos, RSD, para as duas gamas de concentração (que é a forma que a instituição laboratorial onde este trabalho foi desenvolvido utiliza como medida de qualidade) e através do cálculo do limite de repetibilidade, r , por uma questão de coerência.

Os resultados obtidos encontram-se na Tabela 6.8.

Tabela 6.8 – Resultados obtidos para a repetibilidade nas duas gamas de concentração testadas

Composto	Concentração			Concentração		
	Gama Baixa (ng/L)	RSD (%)	r	Gama Alta (ng/L)	RSD (%)	r
12DCB	19	6,2	8,0	109	7,6	25,2
13DCB	480	7,0	308,4	2400	12,7	1632,7
14DCB	160	5,0	54,8	590	6,9	207,1
123TCB	240	4,8	82,7	1230	6,3	467,2
124TCB	320	5,5	124,7	2670	9,6	1367,0
135TCB	320	6,2	153,5	1330	10,7	701,2

Analisando a Tabela 6.8, verifica-se que os desvios padrão relativos das duas gamas de concentração, em condições de repetibilidade, estão praticamente todos abaixo dos 10%, exceção feita à gama alta do 13DCB e 135TCB que apresentam valores ligeiramente superiores. No entanto, de acordo com o DL 306/2007 de 27 de Agosto, a característica de desempenho dos métodos usados para a análise de compostos orgânicos indica que a precisão deverá ser inferior a 25%. Como tal, considera-se que os resultados obtidos são satisfatórios relativamente à repetibilidade do método.

6.3.6.2 – Precisão Intermédia

No estudo da precisão intermédia foram analisadas as concentrações mais elevadas e as mais baixas da gama de trabalho, apenas um *vial* de cada, e na mesma matriz. Estes ensaios foram efetuados ao longo de dez dias, com intervalos variáveis entre as análises, assegurando deste modo as condições de precisão intermédia.

Foram calculados os desvios padrão relativos, RSD, correspondentes aos dois extremos de concentração testados, cujos resultados se encontram na Tabela 6.9:

Tabela 6.9 - Resultados obtidos para a precisão intermédia nas duas gamas de concentração testadas

Composto	Concentração		Concentração	
	Gama Baixa (ng/L)	RSD (%)	Gama Alta (ng/L)	RSD (%)
12DCB	19	30,2	109	11,8
13DCB	480	12,1	2400	13,7
14DCB	160	12,6	590	12,1
123TCB	240	13,5	1230	14,0
124TCB	320	14,4	2670	12,2
135TCB	320	13,0	1330	12,3

Relativamente à precisão intermédia, considera-se mais uma vez como aceitável um desvio padrão relativo até 25%, o que se verifica praticamente para todos os compostos nas duas gamas testadas, com excepção da gama baixa do 12DCB.

No entanto, o parâmetro da precisão intermédia não é tão pertinente como a repetibilidade. Isto porque em termos práticos, a análise de amostras e a respetiva calibração nunca serão efetuadas com tanto tempo de intervalo, como o espaçamento temporal entre as análises realizadas no decurso deste estudo.

Posto isto, considera-se que globalmente os resultados obtidos são adequados e que se confirma a precisão intermédia do método.

6.3.7 – Ensaio de Recuperação

Como já foi referido no Capítulo 4.3.3, o objetivo dos ensaios de recuperação é avaliar o impacto que a matriz possa ter na preparação e análise das amostras. Para tal, determinaram-se as percentagens de recuperação em três matrizes: água de consumo humano e duas águas superficiais (rio Zêzere e rio Tejo).

Nas recuperações, todas as matrizes foram fortificadas a partir da mesma solução conjunta. Desta forma fica em princípio assegurada a coerência da concentração com que as matrizes são fortificadas.

Foram mais uma vez analisados os extremos da gama de trabalho nas três matrizes indicadas acima.

6.3.7.1 – Análise de Brancos

Em simultâneo com os ensaios de recuperação, foram também analisados brancos de cada uma das matrizes, de modo a confirmar se não existiam interferentes que pudessem de algum modo influenciar os resultados obtidos.

É de salientar que como os compostos em estudo são clorados, e a água tratada destinada ao consumo humano contém invariavelmente cloro, seria expectável que nesta matriz se verificassem interferências, como tal, foi necessário adicionar tiosulfato de sódio antes de proceder ao estudo dos brancos e aos ensaios de recuperação, de modo a assegurar que o cloro utilizado como tratamento não provocaria interferências na análise dos Clorobenzenos de interesse.

Contrariamente ao que seria expectável, foram detetados vestígios dos Clorobenzenos em estudo nas três matrizes utilizadas. De modo a tentar determinar a sua origem foi analisado um vial vazio, onde mais uma vez se verificou a existência dos compostos de interesse. Concluiu-se deste modo que a origem da contaminação deve ser ambiental, isto é, devido à sua volatilidade ficam vestígios dos Clorobenzenos na sala onde é realizada a amostra e que são detetados no momento da análise.

Como tal, as áreas com as quais se calcularam as percentagens de recuperação foram primeiro afetadas das áreas determinadas nos brancos respectivos.

6.3.7.2 – Determinação da Percentagem de Recuperação

Como já foi referido, foram fortificadas matrizes de três origens distintas para os dois extremos de concentrações da gama de trabalho.

A determinação da percentagem de recuperação foi feita utilizando a Equação 4.8, referida no Capítulo 4.3.3.

Os resultados obtidos nas três matrizes em estudo encontram-se nas Tabelas 6.10 a 6.12.

Da Tabela 6.10, conclui-se que existem algumas discrepâncias entre as percentagens de recuperação nas duas gamas de fortificação, mas que ainda assim apresentam valores plausíveis, quer em termos de percentagem de recuperação (entre 73 e 115%) quer em termos de desvio padrão relativo (todos abaixo de 25%).

Das Tabelas 6.11 e 6.12 pode ser feita uma análise idêntica à da Tabela 6.10, atendendo a que mais uma vez, nas duas matrizes superficiais se obtiveram recuperações aceitáveis, entre 78 e 111% e 68 e 106%, respetivamente.

Tabela 6.10 – Percentagens de recuperação obtidas na matriz de água para consumo humano para n=6

Composto	Concentração			Concentração		
	Gama Baixa (ng/L)	Recuperação (%)	RSD (%)	Gama Alta (ng/L)	Recuperação (%)	RSD (%)
12DCB	19	88,4	15,3	109	73,4	25,0
13DCB	480	76,9	12,5	2400	114,4	14,1
14DCB	160	91,7	3,4	590	83,0	11,8
123TCB	240	91,5	13,2	1230	108,9	19,5
124TCB	320	73,5	11,2	2670	97,8	13,3
135TCB	320	96,5	15,1	1330	105,5	9,8

Tabela 6.11 - Percentagens de recuperação obtidas na matriz do rio Tejo para n=6

Composto	Concentração			Concentração		
	Gama Baixa (ng/L)	Recuperação (%)	RSD (%)	Gama Alta (ng/L)	Recuperação (%)	RSD (%)
12DCB	19	79,0	8,3	109	75,1	15,9
13DCB	480	89,8	12,9	2400	94,0	8,1
14DCB	160	92,8	5,3	590	83,6	10,9
123TCB	240	94,3	9,0	1230	110,9	16,9
124TCB	320	77,6	7,9	2670	100,3	9,5
135TCB	320	88,4	7,5	1330	90,1	11,5

Tabela 6.12 - Percentagens de recuperação obtidas na matriz do rio Zêzere para n=6

Composto	Concentração	Recuperação (%)	RSD (%)	Concentração	Recuperação (%)	RSD (%)
	Gama Baixa (ng/L)			Gama Alta (ng/L)		
12DCB	19	85,3	14,6	109	68,3	10,9
13DCB	480	77,2	17,0	2400	93,9	13,5
14DCB	160	96,5	10,8	590	85,9	14,3
123TCB	240	91,3	16,9	1230	105,3	21,6
124TCB	320	74,0	15,4	2670	99,4	13,6
135TCB	320	86,6	16,0	1330	89,0	15,6

Também relativamente às duas matrizes se obtiveram mais uma vez desvios padrão relativos, RSD, abaixo do limite máximo permitido de 25%.

6.3.8 – Incertezas

Como explicitado no Anexo I, as incertezas consideradas no cálculo da incerteza expandida pela primeira metodologia foram: a incerteza associada à interpolação da leitura, u_{reta} , a incerteza associada à preparação de padrões, $u_{\text{padrão}}$, e a incerteza associada à precisão (através da precisão intermédia), $u_{\text{prec int}}$.

Relativamente à segunda metodologia foram consideradas as seguintes componentes: a incerteza associada aos ensaios de recuperação, u_{matriz} , e a incerteza associada à exatidão, $u_{\text{exatidão}}$.

Nas Tabelas 6.13 e 6.14 encontram-se os resultados obtidos com cada metodologia utilizada, para cada componente da incerteza que foi alvo de estudo, bem como as incertezas combinada, u_c , e expandida, U , para cada Clorobenzeno:

Tabela 6.13 – Resultados obtidos para as incertezas do método pela primeira metodologia

Composto	u_{reta} (%)	$u_{\text{padrão}}$ (%)	$u_{\text{prec int}}$ (%)	u_c (%)	U (%)
12DCB	11	1,6	7,9	14	27
13DCB	8,2	0,37	4,9	9,6	19
14DCB	3,1	0,60	2,8	4,3	8,5
123TCB	10	0,42	2,9	11	21
124TCB	9,5	0,51	4,0	10	21
135TCB	12	0,51	3,0	13	26

Tabela 6.14 – Resultados obtidos para as incertezas do método pela segunda metodologia

Composto	u_{matriz} (%)	$u_{\text{exatidão}}$ (%)	u_c (%)	U (%)
12DCB	7,9	12	14	29
13DCB	5,0	9,9	11	22
14DCB	2,8	7,3	7,9	16
123TCB	2,9	4,9	9,4	19
124TCB	4,0	10	11	22
135TCB	3,1	10	11	21

Não existe atualmente legislação nacional a reger os valores máximos permissíveis em termos de incerteza expandida. Existe sim, uma diretiva Europeia (2015/1787) nesse sentido, mas que ainda não foi transposta para a legislação nacional [52].

Os Clorobenzenos não são contemplados na supramencionada diretiva, mas existem outros compostos orgânicos que podem ser utilizados como termo de comparação, como se pode observar pela Tabela 6.15:

Tabela 6.15 – Incerteza expandida em função do valor paramétrico de alguns compostos orgânicos

Parâmetro	Incerteza da Medição (% do valor paramétrico)
Benzeno	40
Pesticidas	30
THM	40
PAH	50

Da Tabela 6.15 verifica-se que, a título de exemplo, a percentagem mínima permitida para os Pesticidas é de 30% em função do valor paramétrico, ou seja, em função do limite legal máximo que é permitido nas legislações em vigor.

As incertezas expandidas apresentadas nas Tabelas 6.13 e 6.14 foram determinadas em função dos limites inferiores das gamas de linearidade, que se encontram abaixo da concentração máxima permitida na legislação Portuguesa para os Triclorobenzenos.

Tomando 30% como valor máximo teoricamente admissível, e atendendo a que os ensaios de recuperação estão todos abaixo deste limite, conclui-se que as incertezas calculadas após a validação do método analítico são satisfatórias.

Poderia ainda ser usado como referência o DL 83/2011 de 20 de Junho, que estipula que a incerteza associada a uma medição tem de ser inferior a 50%. Comparando com este limite, mais uma vez se considera que as incertezas obtidas são satisfatórias.

A determinação das incertezas permitiu determinar ainda os expressar os resultados em termos de algarismos significativos na gama de trabalho.

A Tabela 6.16 indica o modo de expressão de resultados na gama de trabalho (padrão de concentração mais baixa e padrão de concentração mais alta), usando 1 algarismo significativo na incerteza da medição.

Tabela 6.16 – Expressão de resultados da gama de trabalho usando 1 algarismo significativo na incerteza da medição

Composto	Gama Baixa (µg/l)	Gama Alta (µg/l)
12DCB	0,02 ± 0,01	0,11 ± 0,03
13DCB	0,5 ± 0,1	2,4 ± 0,5
14DCB	0,16 ± 0,03	0,59 ± 0,09
123TCB	0,24 ± 0,05	1,2 ± 0,2
124TCB	0,32 ± 0,07	2,7 ± 0,6
135TCB	0,32 ± 0,07	1,3 ± 0,3

A Tabela 6.17 indica o modo de expressão de resultados na gama de trabalho usando 2 algarismos significativos na incerteza da medição.

Tabela 6.17 - Expressão de resultados da gama de trabalho usando 2 algarismos significativos na incerteza da medição

Composto	Gama Baixa (µg/l)	Gama Alta (µg/l)
12DCB	0,0190 ± 0,0054	0,109 ± 0,031
13DCB	0,48 ± 0,11	2,40 ± 0,53
14DCB	0,160 ± 0,025	0,590 ± 0,093
123TCB	0,240 ± 0,045	1,23 ± 0,23
124TCB	0,320 ± 0,071	2,67 ± 0,59
135TCB	0,320 ± 0,067	1,33 ± 0,28

Capítulo 7 – Conclusões

Os estudos realizados no decurso deste trabalho permitiram concluir que a metodologia de SPME-GC/MS é à partida adequada para realizar as análises em rotina dos Clorobenzenos de interesse em água.

A primeira fase deste trabalho consistiu na otimização dos parâmetros de microextração em fase sólida (SPME) e do método cromatográfico, que resultaram no conjunto de condições experimentais que maximizam a eficiência do método analítico, mesmo face à variabilidade intrínseca à técnica de SPME, assegurando a análise dos compostos de interesse em cerca de 60 minutos. Os principais resultados obtidos nesta fase do trabalho estão compilados na Tabela 7.1:

Tabela 7.1 – Compilação dos resultados obtidos na fase de otimização da análise

Volume de injeção (μL)	50
Tipo de fibra	DVB/CAR/PDMS
Tempo de adsorção (min)	25
Temperatura de adsorção ($^{\circ}\text{C}$)	40
Tempo de desadsorção (min)	3
Agitação (rpm)	250
Modo de extração	<i>Headspace</i>
Massa de NaCl (g)	s/ NaCl
Tempo de <i>Splitless</i> (min)	1,5

Nos estudos de validação subsequentes foi possível obter gamas de linearidade para todos os compostos após aplicação do método dos mínimos quadrados, bem como bons coeficientes de correlação. Foram também determinados os limites de quantificação, como se pode verificar pela Tabela 7.2.

A fase seguinte do trabalho desenvolvido consistiu em provar que a gama de trabalho escolhida passava em testes estatísticos aplicados no sentido de comprovar a linearidade e aferir o método de quantificação a utilizar em análises de rotina, cujos resultados se encontram na Tabela 7.3.

Foram também determinados os limites de deteção por duas metodologias diferentes: através dos estudos de repetibilidade e da razão S/N. Em ambos os casos, verificou-se que os limites calculados cumprem o especificado pelo DL 83/2011 de 20 de Junho, isto é, são inferiores a 30% do valor paramétrico legislado de 400 ng/l.

O estudo dos ensaios de recuperação resultou, para todos os compostos e em todas as matrizes, em valores adequados de percentagem de recuperação (entre 68 e 115%) e respetivo desvio padrão relativo (inferior a 25%).

Por fim, na estimativa das incertezas, verificou-se que para todos os compostos e pelas duas metodologias utilizadas, as incertezas do método se encontram abaixo do auto imposto limite de 30% (estipulado na diretiva Europeia 2015/1787 para os Pesticidas), à falta de um valor real legislado, pelo que se conclui que foram também bem-sucedidas.

Comparando também com o limite de 50% imposto pelo DL 83/2011 de 20 de Junho, pode mais uma vez considerar-se que foram bem-sucedidas.

Tabela 7.2 – Resumo dos resultados obtidos após aplicação do método dos mínimos quadrados

Composto	Gama de Linearidade (ng/l)	Coefficiente de Correlação	LOQ (ng/l)	LOD (ng/l)
12DCB	19 – 109	0,9991	18	5
13DCB	480 – 2400	0,9995	300	90
14DCB	160 – 590	0,9998	41	12
123TCB	240 – 1230	0,9991	191	57
124TCB	320 – 2670	0,9996	282	84
135TCB	320 – 1330	0,9977	314	94

Tabela 7.3 – Resumo dos resultados obtidos da aplicação dos diversos teste estatísticos

Composto	Mandel	Homogeneidade de Variâncias	Rikilt	Áreas Normalizadas
12DCB	✓	☒	☒	☒
13DCB	✓	☒	☒	☒
14DCB	✓	☒	✓	✓
123TCB	✓	☒	✓	✓
124TCB	✓	☒	✓	✓
135TCB	✓	☒	✓	✓

Em suma, o trabalho desenvolvido no âmbito desta tese permitiu a obtenção de um método que cumpre os requisitos tipicamente necessários à implementação de um novo método analítico. Existem, ainda assim, fatores que de futuro podem ser melhorados, como a impossibilidade de realizar a quantificação do 12DCB e 13DCB por fator de resposta. Esta incapacidade pode ser resultado dos vários fatores de variabilidade inerentes à técnica analítica utilizada, particularmente de preparação de amostra, ainda que outros fatores também possam ter influência, de que são exemplo os listados na Figura 7.1.

Como propostas de trabalho futuras, seria pertinente tentar expandir as gamas de linearidade obtidas para o 12DCB e 13DCB e tentar encontrar outras, onde estes dois compostos

passassem nos testes estatísticos de Rikilt e das Áreas Normalizadas, de modo a ser possível em rotina quantificar todos os Clorobenzenos por fator de resposta.

Adicionalmente, seria também pertinente testar um método alternativo de preparação de amostra, como *Purge and Trap*, por exemplo, uma técnica tipicamente utilizada para a análise de VOCs.

Os ensaios realizados ao longo deste trabalho poderiam ser repetidos com recurso ao método *de Purge and Trap*, e a as duas técnicas poderiam ser comparadas tanto em termos de eficácia de extração, como em termos de custos associados ao desenvolvimento do método de análise, selecionando depois a mais vantajosa.

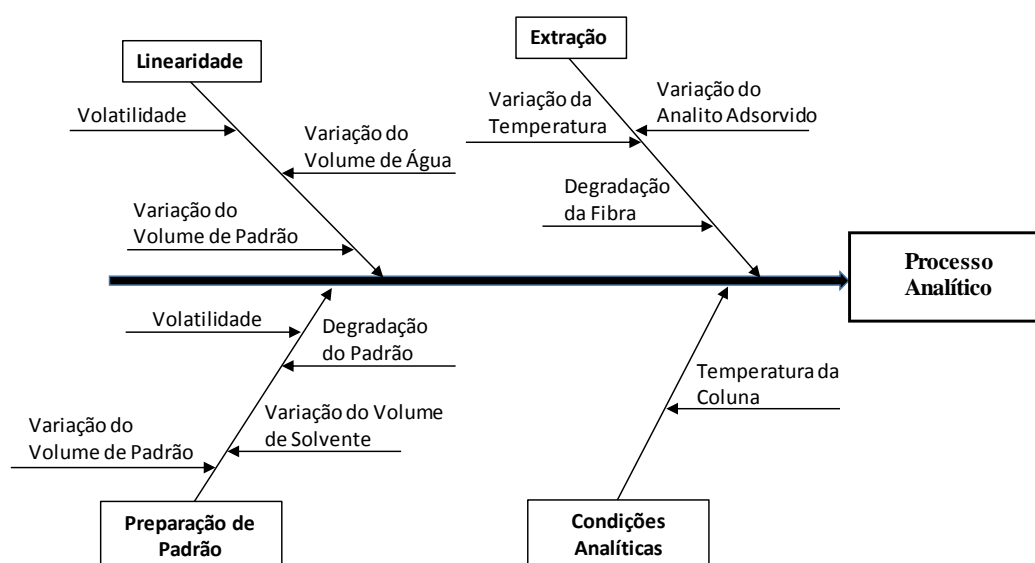


Figura 7.1 – Causas prováveis para a variabilidade dos resultados obtidos

Referências Bibliográficas

- [1] “EPAL - Empresa Portuguesa das Águas Livres, SA.” [Online]. Available: <http://www.epal.pt/EPAL/menu/epal/quem-somos>. [Accessed: 09-Sep-2016].
- [2] H. Hu, Y. Guo, X. Sun, X. Chen, X. Zhang, Q. Liu, and C. Xu, “Determination of Chlorobenzenes in Water Samples by Solid-Phase Disk Extraction and Gas Chromatography – Electron Capture Detection,” *J. Chromatogr. Sci.*, vol. 52, no. 5, pp. 375–82, 2014.
- [3] “Agency for Toxic Substances and Disease Registry - Chemical and Physical Information (Dichlorobenzenes).” [Online]. Available: <https://www.atsdr.cdc.gov/toxprofiles/tp10-c4.pdf>. [Accessed: 15-Oct-2016].
- [4] “Agency for Toxic Substances and Disease Registry - Trichlorobenzenes.” [Online]. Available: <https://www.atsdr.cdc.gov/toxfaqs/tfacts199.pdf>. [Accessed: 15-Oct-2016].
- [5] G. Gericke, “A rapid method for determining chlorobenzenes in dam water systems,” *WaterSA*, vol. 39, no. 1, pp. 23–30, 2013.
- [6] S. D. Faust and O. M. Aly, “Chemistry of Water Treatment, Second Edition - Samuel D. Faust, Osman M. Aly - Google Livros,” *Lewis Publishers*, 1998. [Online]. Available: <https://books.google.pt/books?id=ivLiNH-NjOcC&pg=PA3&dq=history+of+water+treatment&hl=pt-PT&sa=X&ved=0ahUKEwiFla3staHQAhVFfxoKHaPbBeAQ6AEIQDAC#v=onepage&q=history+of+water+treatment&f=false>.
- [7] J. C. Crittenden, R. R. Trussell, D. W. Hand, K. J. Howe, and G. Tchobanoglous, *MWH's Water Treatment: Principles and Design*, 3rd ed. John Wiley & Sons, 2012.
- [8] “NYS Dept. of Environmental Conservation - Uses, Sources and Potential Exposure to Toxic Air Pollutants.” [Online]. Available: <http://www.dec.ny.gov/chemical/89942.html>. [Accessed: 01-Jan-2016].
- [9] R. M. Harrison, *An introduction to pollution science*, 1st ed. RSC Pub, 2006.
- [10] “OSPAR Commission - Hazardous Substances Series (Trichlorobenzenes),” 2005.
- [11] J. Vargas-Medrano, J. A. Sierra-Fonseca, and L. F. Plenge-Tellechea, “1,2-Dichlorobenzene affects the formation of the phosphoenzyme stage during the catalytic cycle of the Ca(2+)-ATPase from sarcoplasmic reticulum,” *BMC Biochem.*, vol. 17, p. 5, Mar. 2016.
- [12] Greenpeace, “Appendix 1 Analytical methodology.” [Online]. Available: [http://greenpeace.to/publications/gujarat pt II.pdf](http://greenpeace.to/publications/gujarat%20pt%20II.pdf). [Accessed: 01-Nov-2016].
- [13] R. H. Hill, D. L. Ashley, S. L. Head, S. L. Head, and J. L. Pirkle, “p-Dichlorobenzene Exposure among 1 000 Adults in the United States,” *Arch. Environ. Heal. An Int. J.*, vol. 50, no. 4, pp. 277–280, Aug. 1995.
- [14] J. Pawliszyn, *Handbook of Solid Phase Microextraction*, 1st ed. Elsevier, 2012.
- [15] M. Somenath, *Sample Preparation Techniques in Analytical Chemistry*, vol. 162. John Wiley & Sons, 2003.
- [16] R. E. Majors, *Solid Phase Microextraction: A Practical Guide*. Taylor & Francis, 1999.
- [17] Supelco, “Bulletin 923 Solid Phase Microextraction : Theory and Optimization of Conditions,” 1998.
- [18] “Sigma-Aldrich - Selecting the Appropriate SPME Fiber Coating (Effect of Analyte Molecular Weight and Polarity).” [Online]. Available: <http://www.sigmaaldrich.com/technical-documents/articles/reporter-eu/selecting-the-appropriate.html>.
- [19] J. Pawliszyn, *Applications of Solid Phase Microextraction*, 2nd ed. RSC Chromatography Monographs, 1999.
- [20] S. J. Shahtaheri, H. R. Heidari, F. Golbabaie, M. Alimohammadi, and A. R. Froshani, “Solid Phase Microextraction For Trace Analysis Of Benzene In Environmental Monitoring,” *J. Environ. Heal. Sci. Eng.*, vol. 3, no. 3, pp. 169–176, 2006.
- [21] E. Carasek and J. Merib, “Membrane-based microextraction techniques in analytical chemistry: A review,” *Anal. Chim. Acta*, vol. 880, no. February, pp. 8–25, 2014.
- [22] “LC GC Chromacademy - Schematic Diagram of a typical GC-MS system.” [Online].

- Available: <http://www.chromacademy.com/essential-guide/nov2010/fig-1.jpg>. [Accessed: 19-Mar-2017].
- [23] M. C. McMaster, *GC/MS: A Practical User's Guide*, 2nd ed. John Wiley & Sons, 2008.
- [24] S. Borman, "Scripps Center for Mass Spectrometry - Mass Spec History." [Online]. Available: <https://masspec.scripps.edu/mshistory/perspectives/sborman.php#link4>. [Accessed: 06-Nov-2016].
- [25] J. M. Miller, *Chromatography: Concepts and Contrasts*. Wiley & Sons, 2005.
- [26] D. Bhanot, "Introduction to Gas Chromatography and Its Parts." [Online]. Available: <http://lab-training.com/landing/gc-module-3/>. [Accessed: 06-Nov-2016].
- [27] R. Kaiser, *Gas Phase Chromatography*, 1st ed. Butterworth & Co., 1973.
- [28] "Sheffield Hallam University - Gas Chromatography." [Online]. Available: <http://teaching.shu.ac.uk/hwb/chemistry/tutorials/chrom/gaschr.htm>. [Accessed: 06-Nov-2016].
- [29] "Agilent Technologies - GC Inlets An Introduction," 2005.
- [30] "Agilent Technologies - Capillary GC Columns." [Online]. Available: <https://www.chem.agilent.com/cag/cabu/capgccols.htm>. [Accessed: 06-Nov-2016].
- [31] "Chemistry Dictionary - Definition of Gas Chromatography Columns." [Online]. Available: http://www.chemicool.com/definition/gas_chromatography_columns.html.
- [32] D. Bhanot, "Types of Gas Chromatography Detectors." [Online]. Available: <http://lab-training.com/landing/gc-module-8/>. [Accessed: 06-Nov-2016].
- [33] J. V. Hinshaw, "GC Ovens — A Hot Topic," *LC•GC Eur.*, vol. 18, no. 10, pp. 1040–1047, 2001.
- [34] W. Engewald and K. Dettmer-Wilde, "Chapter 2 - Theory of Gas Chromatography," in *Practical Gas Chromatography A Comprehensive Reference*, 1st ed., Springer, 2014, pp. 21–57.
- [35] T. Wenzel, "Separation Science - Chromatography Unit," pp. 1–81, 2014.
- [36] "Thermo Scientific - Chromatography Resource Center - Glossary of Gas Chromatography Terms." [Online]. Available: <http://www.separatedbyexperience.com/library/article.aspx?id=37>. [Accessed: 07-Nov-2016].
- [37] "Gas Chromatography." [Online]. Available: <http://ion.chem.usu.edu/~sbialkow/Classes/361/GC/GC.html>. [Accessed: 07-Nov-2016].
- [38] "Agilent Technologies - Number of Theoretical Plates (N), Height Equivalent to a Theoretical Plate (H), Utilization of Theoretical Efficiency (UTE%), Resolution (RS), Phase Ratio (β)."
- [39] K. Oden, B. Burger, and Rigdon Amanda, "Alternative Carrier Gases for Simulated Distillation Analysis." [Online]. Available: http://www.restek.com/Technical-Resources/Technical-Library/Petroleum-Petrochemical/petro_PCAR2269-UNV. [Accessed: 14-Mar-2017].
- [40] T. Taylor, "Electron Ionization for GC–MS," *LCGC North Am.*, vol. 30, no. 4, p. 358, 2012.
- [41] R. M. Smith, *Understanding Mass Spectra - A Basic Approach*, 2nd ed. John Wiley & Sons, 2004.
- [42] "Introduction to Mass Spectrometry." [Online]. Available: http://cbc.arizona.edu/massspec/intro_html/intro.html. [Accessed: 17-Jan-2017].
- [43] "ALS Environmental - GC/MS-Full Scan vs GC/MS-SIM." [Online]. Available: <http://www.caslab.com/News/gcms-full-scan-vs-cgms-sim.html>. [Accessed: 13-Dec-2016].
- [44] P. Gates, "University of Bristol - Ion Detectors." [Online]. Available: <http://www.chm.bris.ac.uk/ms/detectors.xhtml>. [Accessed: 13-Dec-2016].
- [45] "Module 2: Spectroscopic Techniques." [Online]. Available: <http://nptel.ac.in/courses/102103044/module2/lec12/7.html>.
- [46] C. Burgess, *Valid Analytical Methods & Procedures*. Royal Society of Chemistry, 2000.
- [47] United Nations Office On Drugs and Crime (UNODC), *Guidance for the Validation of Analytical Methodology and Calibration of Equipment used for Testing of Illicit Drugs*

- in Seized Materials and Biological Specimens*. United Nations, 2009.
- [48] C. M. Riley, *Development and Validation of Analytical Methods*, 1st ed. Pergamon, 1996.
- [49] Relacre, “Ensaio Interlaboratoriais em Química.”
- [50] G. Wells, “Agilent Technologies - Why use Signal-To-Noise as a Measure of MS Performance When it is Often Meaningless?,” 2017.
- [51] Natural Resources Management and Environment Department, “Quality Of Analytical Procedures.” [Online]. Available: <http://www.fao.org/docrep/W7295E/w7295e09.htm>. [Accessed: 02-Mar-2017].
- [52] European Commission, “COMMISSION DIRECTIVE (EU) 2015/1787 of 6 October 2015.”
- [53] “Anexo 6 - Método dos Mínimos Quadrados.” [Online]. Available: http://repositorio.ul.pt/bitstream/10451/252/23/20023_23_Anexos_6_MMQ.pdf. [Accessed: 30-Dec-2016].
- [54] “Anexo 10 - Teste de Mandel ou Teste de Fisher/Snedecor.” [Online]. Available: http://repositorio.ul.pt/bitstream/10451/252/27/20027_27_Anexos_10_Mandel.pdf. [Accessed: 03-Jan-2017].
- [55] “Anexo 9 - Teste de RIKILT.” [Online]. Available: http://repositorio.ul.pt/bitstream/10451/252/26/20026_26_Anexos_9_RIKILT.pdf. [Accessed: 03-Jan-2017].
- [56] “Anexo 7 - Teste das Áreas Normalizadas.” [Online]. Available: http://repositorio.ul.pt/bitstream/10451/252/24/20024_24_Anexos_7_ANormaliz.pdf. [Accessed: 03-Jan-2017].
- [57] B. W. Wenclawiak, Michael Koch, and Evsevios Hadjicostas, *Quality Assurance in Analytical Chemistry*, 2 nd. 2010.
- [58] “Anexo 12 - Estimativa de Incertezas.” [Online]. Available: http://repositorio.ul.pt/bitstream/10451/252/29/20029_29_Anexos_12_Incert.pdf. [Accessed: 11-Jan-2017].

Anexo A – Legislação

4296 *Diário da República, 1.ª série—N.º 187—24 de Setembro de 2010*

C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7
Número	Nome da substância	Número CAS (a)	NQA-MA (b) Águas doces superficiais (c)	NQA-MA (b) Outras águas superficiais (e)	NQA-CMA (d) Águas doces superficiais (c)	NQA-CMA (d) Outras águas superficiais (e)
	Benzo[g,h,i]perileno	191-24-2	Σ = 0,002	Σ = 0,002	Não aplicável	Não aplicável
(29)	Indeno[1,2,3-cd]pireno	193-39-5				
(30)	Simazina	122-34-9	1	1	4	4
	Compostos de tributilestanho (Catião tributilestanho)	26643-28-4	0,0002	0,0002	0,0015	0,0015
(31)	Triclorobenzenos (1,2,3-, 1,2,4- e 1,3,5-triclorobenzeno)	12002-48-1	0,4	0,4	Não aplicável	Não aplicável
(32)	Triclorometano	67-68-3	2,5	2,5	Não aplicável	Não aplicável
(33)	Trifluralina	1582-09-8	0,03	0,03	Não aplicável	Não aplicável

Parte B — Normas de qualidade ambiental para outros poluentes, expressas em µg/l

C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7
Número	Nome da substância	Número CAS (a)	NQA-MA (b) Águas doces superficiais (c)	NQA-MA (b) Outras águas superficiais (e)	NQA-CMA (d) Águas doces superficiais (c)	NQA-CMA (d) Outras águas superficiais (e)
(6a)	Tetracloro de carbono (j)	56-23-5	12	12	Não aplicável	Não aplicável.
(9a)	Pesticidas ciclodienos:		Σ = 0,01	Σ = 0,005	Não aplicável	Não aplicável.
	Aldrina (j)	309-00-2				
	Dieldrina (j)	60-57-1				
	Endrina (j)	72-20-8				
	Isodrina (j)	465-73-6				
(9b)	DDT total (j), (k)	Não aplicável	0,025	0,025	Não aplicável	Não aplicável.
	p-p'-DDT (j)	50-29-3	0,01	0,01	Não aplicável	Não aplicável.
(29a)	Tetracloroetileno (j)	127-18-4	10	10	Não aplicável	Não aplicável.
(29b)	Tricloroetileno (j)	79-01-6	10	10	Não aplicável	Não aplicável.

(a) CAS: Chemical Abstracts Service.
(b) Este parâmetro constitui a NQA expressa em valor médio anual (NQA-MA). Salvo indicação em contrário, aplica-se à concentração total de todos os isómeros e refere-se à concentração total na amostra integral de água, com exceção dos metais (cádmio, chumbo, mercúrio e níquel).
(c) Estas normas são aplicadas às águas de rios e de lagos e a todas as águas artificiais e às águas fortemente modificadas com elas relacionadas.
(d) Este parâmetro constitui a NQA expressa em concentração máxima admissível (NQA-CMA) e refere-se à concentração total na amostra integral de água, com exceção dos metais (cádmio, chumbo, mercúrio e níquel). Quando nas colunas se indica «Não aplicável» significa que se considera que os valores NQA-MA protegem contra picos de poluição de curta duração em descargas contínuas, visto que são significativamente inferiores aos valores determinados com base na toxicidade aguda.
(e) Estas normas são aplicadas às águas de transição, às águas costeiras e às águas territoriais.

Figura A.1 – Limites legais impostos na legislação para os Triclorobenzenos

Anexo B – Propriedades Físico-Químicas dos Compostos em Estudo

Tabela B.1 – Propriedades físico-químicas relevantes para os compostos em estudo

	12DCB	13DCB	14DCB	123TCB	124TCB	135TCB
Fórmula Molecular	C ₆ H ₄ Cl ₂	C ₆ H ₄ Cl ₂	C ₆ H ₄ Cl ₂	C ₆ H ₃ Cl ₃	C ₆ H ₃ Cl ₃	C ₆ H ₃ Cl ₃
Massa Molecular (g/mol)	146,99	146,99	146,99	181,44	181,44	181,44
Massa Específica (g/mL)	1,305	1,288	1,248	1,690	1,454	1,387
Ponto de Ebulição (°C)	181	173	174	219	214	208
Solubilidade em Água (mg/L)	91,1	123	30,9	12,2	45,3	4,01
Coefficiente de Partição, Log K_{oa}	3,38	3,48	3,38	4,04	3,98	4,02

Anexo C – Método dos Mínimos Quadrados e Análise de Resíduos

Este método é o mais vulgarmente utilizado, no entanto, só por si não permite validar a linearidade da gama de concentrações em teste de maneira definitiva, mas é um ponto de partida adequado.

A equação da reta é definida algebricamente como:

$$y = mx + b$$

Onde m é o declive da reta, b a sua ordenada na origem e x os valores de concentrações pré-definidos.

Esta reta é composta por um conjunto de pontos (x_1, x_2, \dots, x_n) aos quais está associada a respetiva imagem (y_1, y_2, \dots, y_n) que formam pares ordenados e independentes, onde n representa o número de pontos utilizados na construção da reta. A variável x refere-se à concentração dos padrões utilizados e a variável y à resposta analítica.

A avaliação da fiabilidade de uma calibração é feita com recurso ao cálculo do coeficiente de correlação, r , dado pela fórmula:

$$r = \frac{\sum\{(x_i - \bar{x})(y_i - \bar{y})\}}{\sqrt{[\sum(x_i - \bar{x})^2] \{\sum(y_i - \bar{y})^2\}}}$$

O coeficiente de correlação pode assumir valores entre -1 e 1. Se $r = -1$ significa que existe uma correlação negativa, $r = 1$ indica uma correlação positiva e $r = 0$ indica que não existe correlação entre as duas variáveis.

No entanto, como já foi referido, este método só por si não é suficiente para assegurar a linearidade, uma vez que um valor elevado de coeficiente de correlação (próximo de 1) não garante necessariamente a existência de linearidade, sendo como tal sempre aconselhável o recurso a testes estatísticos adicionais.

Os coeficientes da reta de regressão são determinados pelas equações:

$$m = \frac{\sum\{(x_i - \bar{x})(y_i - \bar{y})\}}{\sum(x_i - \bar{x})^2}$$

$$b = \bar{y} - m \times \bar{x}$$

Em que x_i são os valores de concentração nas soluções padrão, y_i os valores da resposta analítica, \bar{y} e \bar{x} representam os valores médios dessas variáveis.

Estes parâmetros dão uma estimativa da verdadeira função que é limitada pela dispersão do método. A precisão dessa estimativa é quantificável pela determinação do desvio padrão residual, $S_{y/x}$:

$$S_{y/x} = \sqrt{\frac{\sum\{(y_i - (b + m \times x_i))\}^2}{N - 2}}$$

O desvio padrão residual exprime a dispersão dos valores do sinal analítico em torno da curva de calibração. Os desvios padrão do declive da reta e da ordenada na origem são dados pelas equações:

$$S_m = \frac{S_{y/x}}{\sqrt{\sum(x_i - \bar{x})^2}}$$

$$S_b = S_{y/x} \sqrt{\frac{\sum x_i^2}{N \times \sum(x_i - \bar{x})^2}}$$

Que podem ser utilizadas no cálculo dos limites de confiança dos dois coeficientes:

$$b \pm t \times S_b \qquad m \pm t \times S_m$$

Em que t é o valor da variável t de *Student* para o nível de significância pretendido com $(N-2)$ graus de liberdade.

Após a determinação do declive da reta e da ordenada na origem pode calcular-se a concentração de uma amostra, interpolando-a a partir da curva de calibração:

$$x_i = \frac{y_i - b}{m}$$

Adicionalmente pode ainda determinar-se o coeficiente de variação do método, CV_m , e o desvio padrão do método, S_m , através das equações:

$$CV_m = \frac{S_{y/x}}{\bar{x}} \times 100$$

$$S_m = \frac{S_{y/x}}{m} \times 100$$

O coeficiente de variação permite a comparação de diferentes calibrações e métodos analíticos enquanto o desvio padrão do método permite ao próprio analista verificar a qualidade das análises realizadas [53].

- Análise de Resíduos

Após a determinação do declive da reta de calibração e da ordenada na origem é possível fazer a análise de resíduos. Primeiro determinam-se as áreas de picos estimadas (y) recorrendo à equação da reta, $y = mx + b$, dado que b, m e x (concentração) são conhecidos. Em seguida é determinado o quociente entre os picos obtidos experimentalmente e as áreas de picos estimadas. Finalmente, são determinados os vários desvios (percentuais) entre os valores observados e os esperados.

Da representação gráfica desses desvios em função das respectivas concentrações, representada nas Figuras C.1 a C.6, é possível concluir quanto à linearidade do modelo que descreve os dados. A linearidade verifica-se quando os pontos apresentam uma distribuição claramente aleatória.

- Análise de Resíduos para o 12DCB

Tabela C.1 – Desvios relativamente à concentração-alvo para o 12DCB

Área Pico estimada	Área Experimental / Área Estimada	Concentração (ng/L)	Desvio (%)
2859619	1,01	19	1,3
3273198	1,03	23	2,7
6685223	0,96	56	-4,2
8236143	1,01	71	1,4
12165141	1,00	109	0,4

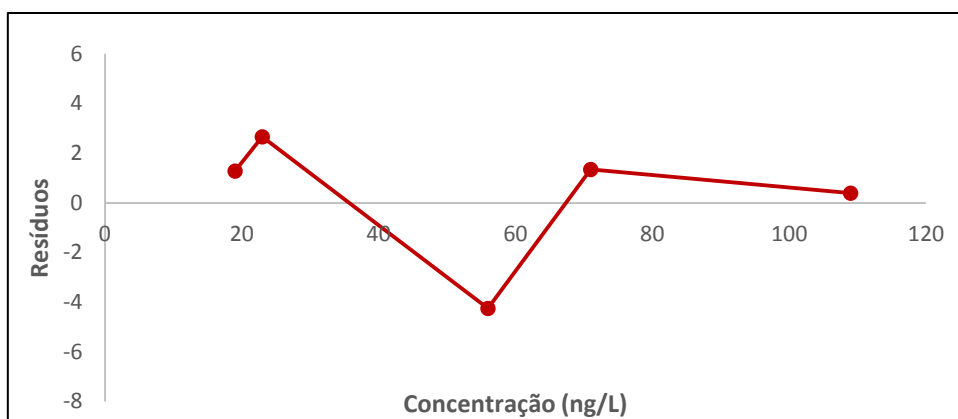


Figura C.1 – Representação gráfica da concentração em função dos resíduos (12DCB)

- **Análise de Resíduos para o 13DCB**

Tabela C.2 – Desvios relativamente à concentração-alvo (13DCB)

Área Pico estimada	Área Experimental / Área Estimada	Concentração (ng/L)	Desvio (%)
11486837	0,95	480	-5,2
13242527	1,04	590	3,7
25053531	1,01	1330	1,1
33672372	1,00	1870	-0,2
42131605	1,00	2400	-0,3

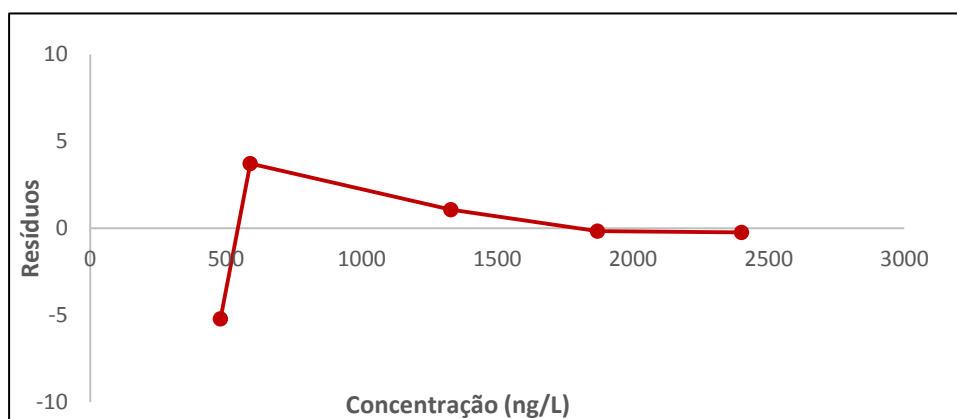


Figura C.2 - Representação gráfica da concentração em função dos resíduos (13DCB)

- **Análise de Resíduos para o 14DCB**

Tabela C.3 - Desvios relativamente à concentração-alvo (14DCB)

Área Pico estimada	Área Experimental / Área Estimada	Concentração (ng/L)	Desvio (%)
3916492	1,00	160	0,3
6219309	1,00	240	0,0
8522125	1,01	320	0,6
13127759	0,99	480	-1,3
16294132	1,01	590	0,7

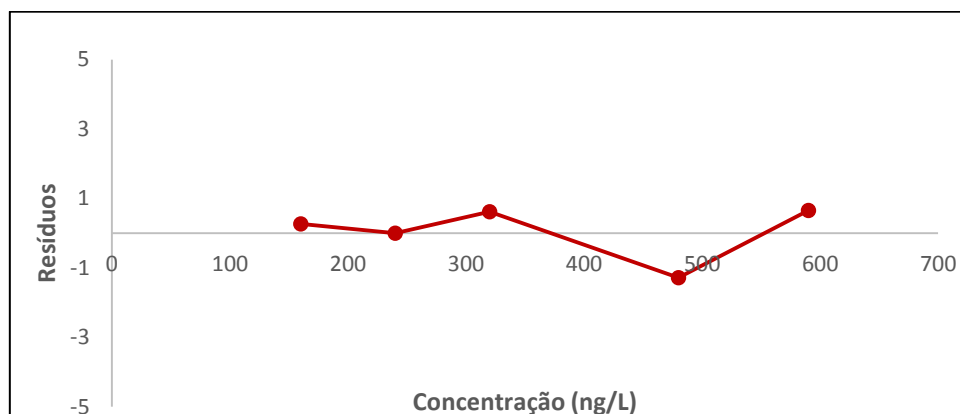


Figura C.3 - Representação gráfica da concentração em função dos resíduos (14DCB)

- **Análise de Resíduos para o 123TCB**

Tabela C.4 – Desvios relativamente à concentração-alvo (123TCB)

Área Pico estimada	Área Experimental / Área Estimada	Concentração (ng/L)	Desvio (%)
5927000	0,93	240	-7,1
7640845	1,08	320	7,7
9354691	1,01	400	0,9
13425073	0,97	590	-2,6
21351608	1,01	960	0,7
27135837	1,00	1230	-0,2

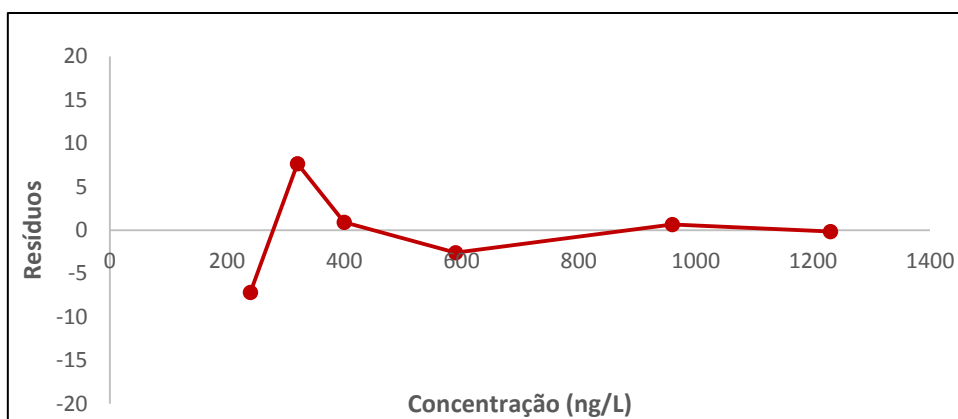


Figura C.4 - Representação gráfica da concentração em função dos resíduos (123TCB)

- **Análise de Resíduos para o 124TCB**

Tabela C.5 – Desvios relativamente à concentração-alvo (124TCB)

Área Pico Estimada	Área Experimental / Concentração	Concentração (ng/L)	Desvio (%)
8309039	1,04	320	4
10161110	0,98	400	-2,2
14559779	1	590	0,1
23125608	0,96	960	-4,2
31691437	1,03	1330	2,8
44192917	1,01	1870	1
56462888	0,99	2400	-1,2
62713628	1	2670	0,3

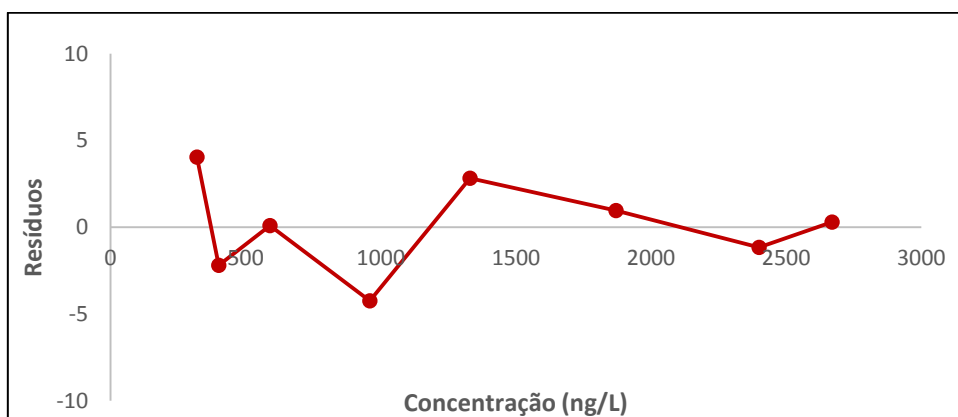


Figura C.5 - Representação gráfica da concentração em função dos resíduos (124TCB)

- **Análise de Resíduos para o 135TCB**

Tabela C.6 – Desvios relativamente à concentração-alvo (135TCB)

Área Pico Estimada	Área Experimental / Área Estimada	Concentração (ng/L)	Desvio (%)
12587418	0,97	320	-3,5
17491929	1,04	480	3,7
20863780	1,03	590	2,7
32205461	0,95	960	-4,9
40481822	1,01	1230	1,1
43547142	1,01	1330	0,8

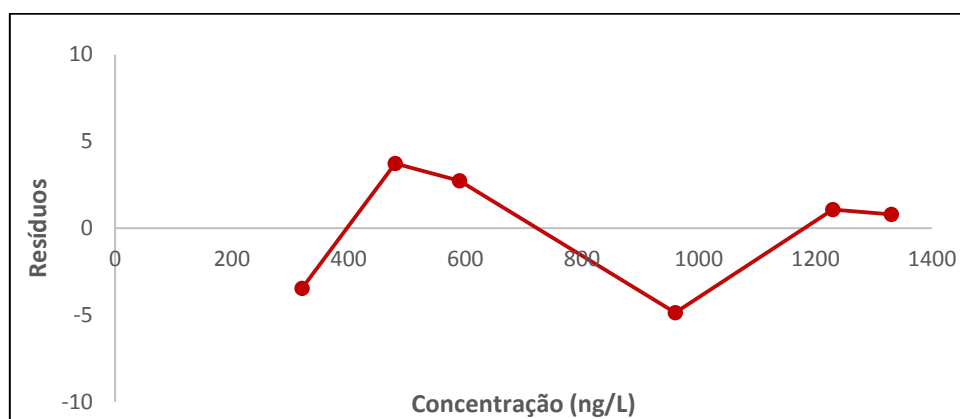


Figura C.6 - Representação gráfica da concentração em função dos resíduos (135TCB)

Anexo D – Teste de Mandel

As normas ISO 8466-1 e 8466-2 recomendam a avaliação da linearidade com recurso ao teste estatístico de Mandel, para polinómios de primeiro e segundo grau, respetivamente.

Com os resultados experimentais obtidos são determinadas as funções de calibração correspondentes, linear e polinomial (representadas nas Figuras D.1 a D.12), assim como os respectivos desvios padrão residuais, $S_{y/x}$ e S_{y^2} , através das equações:

$$S_{y/x} = \sqrt{\frac{\sum (y_i - \bar{y}_i)^2}{N - 2}}$$

$$S_{y^2} = \sqrt{\frac{\sum (y_i - \bar{y}_{i2})^2}{N - 3}}$$

Onde N corresponde ao número de padrões de calibração, y_i é o sinal analítico obtido, \bar{y}_i e \bar{y}_{i2} são os sinais estimados pelas duas funções de calibração, linear e polinomial, respetivamente.

Em seguida determina-se a diferença de variâncias, DS^2 :

$$DS^2 = (N - 2) \times S_{y/x}^2 - (N - 3) \times S_{y^2}^2$$

Finalmente, calcula-se o chamado valor de teste, VT, pela expressão:

$$VT = \frac{DS^2}{S_{y^2}^2}$$

Para averiguar se existe linearidade compara-se o valor de teste obtido com os valores tabelados da distribuição de Fisher, considerando um nível de significância de 95%.

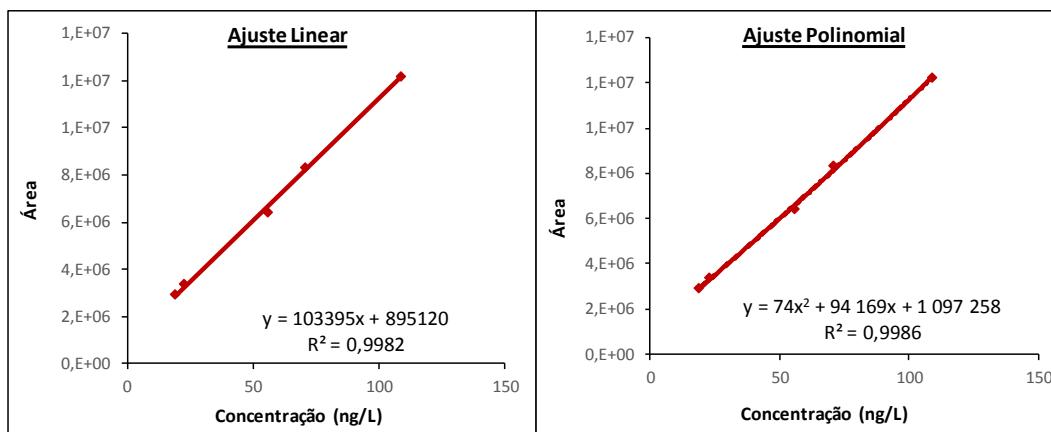
Caso $VT \leq F_{\text{crítico}}$ conclui-se que a função de calibração polinomial não resulta num ajuste adequado aos dados, como tal, a função de calibração linear é que deve ser utilizada.

Caso $VT > F_{\text{crítico}}$ conclui-se que a gama de trabalho deve ser reduzida até que se verifique a linearidade. Apenas em último caso se deve utilizar a função de calibração polinomial [54].

• **Teste de Mandel para o 12DCB**

Tabela D.1 – Áreas calculadas para os ajustes linear e polinomial (12DCB)

Concentração (ng/L)	Área	Área Ajuste Linear	Área Ajuste Polinomial
19	2896208	2859619	2913183
23	3360566	3273198	3302291
56	6401597	6685223	6602786
71	8347341	8236143	8156291
109	12213612	12165141	12240873



Figuras D.1 e D.2 – Representação gráfica dos ajustes linear e polinomial (12DCB)

Tabelas D.2 e D.3 – Erros quadráticos para os dois ajustes (12DCB)

$(y-y_i)^2$	$(y-y_i)^2$
1,34E+09	2,88E+08
7,63E+09	3,40E+09
8,04E+10	4,05E+10
1,24E+10	3,65E+10
2,35E+09	7,43E+08
Soma = 1,04E+11	Soma = 8,14E+10
N-2 = 3	N-3 = 2
S_{y/x} = 186306,07	S_{y/x(2^a) =} 201747,87

$$DS^2 = (N - 2) S_{y/x}^2 - (N - 3) S_{y/x(2^a)}^2$$

$$DS^2 = 2,27E+10$$

$$VT = DS^2 / S_{y/x(2^a)}^2$$

$$VT = 5,58E-01$$

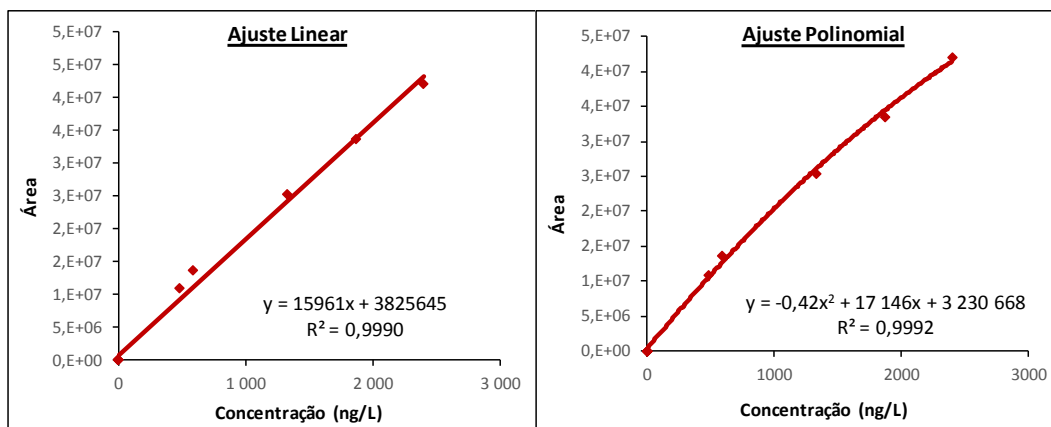
$$F_{(1,5)95\%} = 18,51$$

Como VT < F, a função de calibração linear conduz a um bom ajuste dos pontos experimentais.

• **Teste de Mandel para o 13DCB**

Tabela D.4 – Áreas calculadas para os ajustes linear e polinomial (13DCB)

Concentração (ng/L)	Área	Área Ajuste Linear	Área Ajuste Polinomial
480	10888221	11486837	11363980
590	13735833	13242527	13200606
1330	25321143	25053531	25291910
1870	33615983	33672372	33824990
2400	42025692	42131605	41961868



Figuras D.3 e D.4 – Representação gráfica dos ajustes linear e polinomial (13DCB)

Tabelas D.5 e D.6 – Erros quadráticos para os dois ajustes (13DCB)

$(y-y_i)^2$	$(y-y_i)^2$
3,58E+11	2,26E+11
2,43E+11	2,86E+11
7,16E+10	8,55E+08
3,18E+09	4,37E+10
1,12E+10	4,07E+09
Soma = 6,88E+11	Soma = 5,61E+11
N-2 = 3	N-3 = 2
S y/x = 478785,09	S y/x(2ª) = 529823,82

$$DS^2 = (N - 2) S_{y/x}^2 - (N - 3) S_{y/x(2^a)}^2$$

$$DS^2 = 1,26E+11$$

$$VT = DS^2 / S_{y/x(2^a)}^2$$

$$VT = 4,50E-01$$

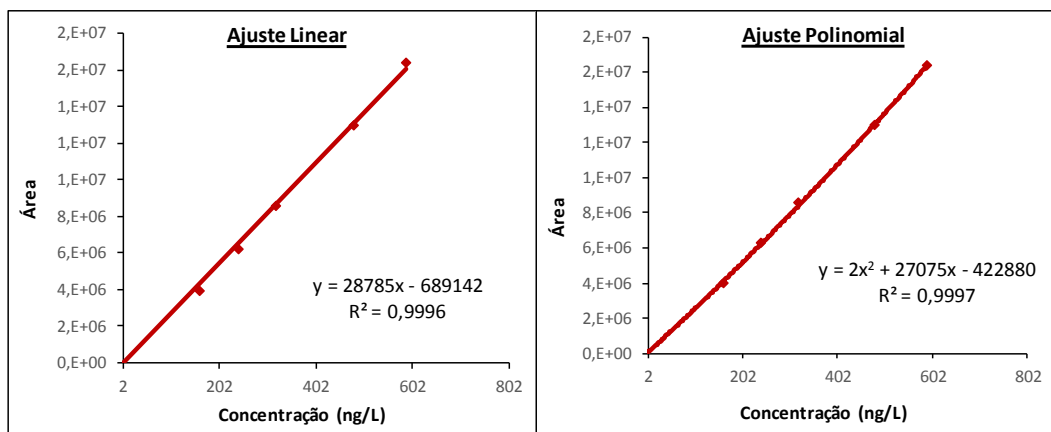
$$F_{(1,5)95\%} = 18,51$$

Como VT < F, a função de calibração linear conduz a um bom ajuste dos pontos experimentais.

• **Teste de Mandel para o 14DCB**

Tabela D.7 – Áreas calculadas para os ajustes linear e polinomial (14DCB)

Concentração (ng/L)	Área	Área Ajuste Linear	Área Ajuste Polinomial
160	3926783	3916492	3960320
240	6219153	6219309	6190320
320	8574661	8522125	8445920
480	12959074	13127759	13033920
590	16400146	16294132	16247570



Figuras D.5 e D.6 – Representação gráfica dos ajustes linear e polinomial (14DCB)

Tabelas D.8 e D.9 – Erros quadráticos para os dois ajustes (14DCB)

$(y-y_i)^2$	$(y-y_i)^2$
1,06E+08	1,12E+09
2,42E+04	8,31E+08
2,76E+09	1,66E+10
2,85E+10	5,60E+09
1,12E+10	2,33E+10
Soma = 4,26E+10	Soma = 4,74E+10
N-2 = 3	N-3 = 2
S_{y/x} = 119107,09	S_{y/x(2°)} = 153967,00

$$DS^2 = (N - 2) S_{y/x}^2 - (N - 3) S_{y/x(2^\circ)}^2$$

$$DS^2 = -4,85E+09$$

$$VT = DS^2 / S_{y/x(2^\circ)}^2$$

$$VT = -2,05E-01$$

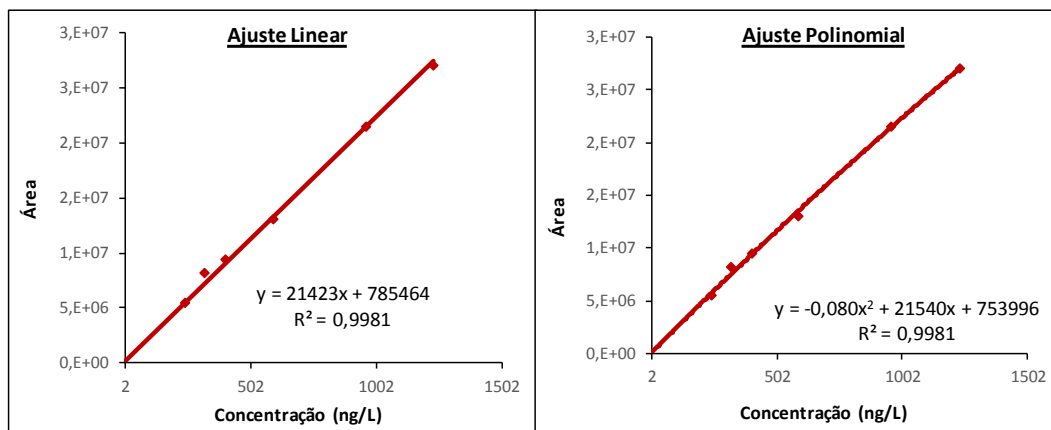
$$F_{(1,5)95\%} = 18,51$$

Como $VT < F$, a função de calibração linear conduz a um bom ajuste dos pontos experimentais.

• **Teste de Mandel para o 123TCB**

Tabela D.10 – Áreas calculadas para os ajustes linear e polinomial (123TCB)

Concentração (ng/L)	Área	Área Ajuste Linear	Área Ajuste Polinomial
240	5503338	5927000	5919000
320	8226872	7640845	7638624
400	9439193	9354691	9357228
590	13077685	13425073	13434818
960	21493580	21351608	21358852
1230	27094386	27135837	27127467



Figuras D.7 e D.8 – Representação gráfica dos ajustes linear e polinomial (123TCB)

Tabelas D.11 e D.12 – Erros quadráticos para os dois ajustes (123TCB)

	$(y-y_i)^2$
	1,79E+11
	3,43E+11
	7,14E+09
	1,21E+11
	2,02E+10
	1,72E+09
Soma =	6,73E+11
N-2 =	4
S y/x =	410064,08

	$(y-y_i)^2$
	1,73E+11
	3,46E+11
	6,72E+09
	1,27E+11
	1,82E+10
	1,07E+09
Soma =	6,72E+11
N-3 =	3
S y/x(2ª) =	473398,11

$$DS^2 = (N - 2) S^2_{y/x} - (N - 3) S^2_{y/x(2^a)}$$

$$DS^2 = 2,93E+08$$

$$VT = DS^2 / S^2_{y/x(2^a)}$$

$$VT = 1,31E-03$$

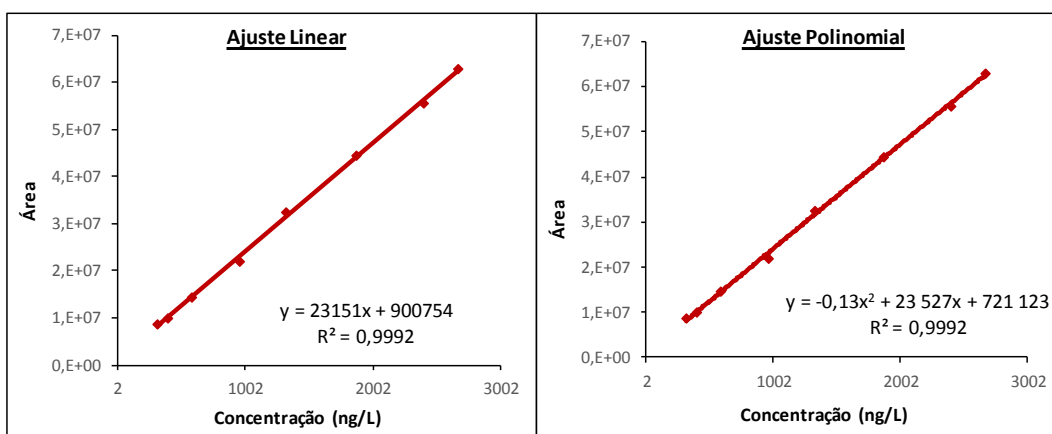
$$F_{(1,5)95\%} = 10,13$$

Como $VT < F$, a função de calibração linear conduz a um bom ajuste dos pontos experimentais.

• **Teste de Mandel para o 124TCB**

Tabela D.13 – Áreas calculadas para os ajustes linear e polinomial (124TCB)

Concentração (ng/L)	Área	Área Ajuste Linear	Área Ajuste Polinomial
320	8644164	8309039	8236625
400	9938512	10161110	10111395
590	14572842	14559779	14557392
960	22147446	23125608	23188802
1330	32585662	31691437	31785083
1870	44620110	44192917	44267961
2400	55808152	56462888	56446915
2670	62899517	62713628	62623575



Figuras D.9 e D.10 – Representação gráfica dos ajustes linear e polinomial (124TCB)

Tabelas D.14 e D.15 – Erros quadráticos para os dois ajustes (124TCB)

$(y-y_i)^2$		$(y-y_i)^2$	
	1,12E+11		1,66E+11
	4,95E+10		2,99E+10
	1,71E+08		2,39E+08
	9,57E+11		1,08E+12
	8,00E+11		6,41E+11
	1,82E+11		1,24E+11
	4,29E+11		4,08E+11
	3,46E+10		7,61E+10
Soma =	2,56E+12	Soma =	2,53E+12
N-2 =	6	N-3 =	5
S y/x =	653732,44	S y/x(2º) =	711299,47

$$DS^2 = (N - 2) S^2_{y/x} - (N - 3) S^2_{y/x(2^\circ)}$$

$$DS^2 = 3,45E+10$$

$$VT = DS^2 / S^2_{y/x(2^\circ)}$$

$$VT = 6,81E-02$$

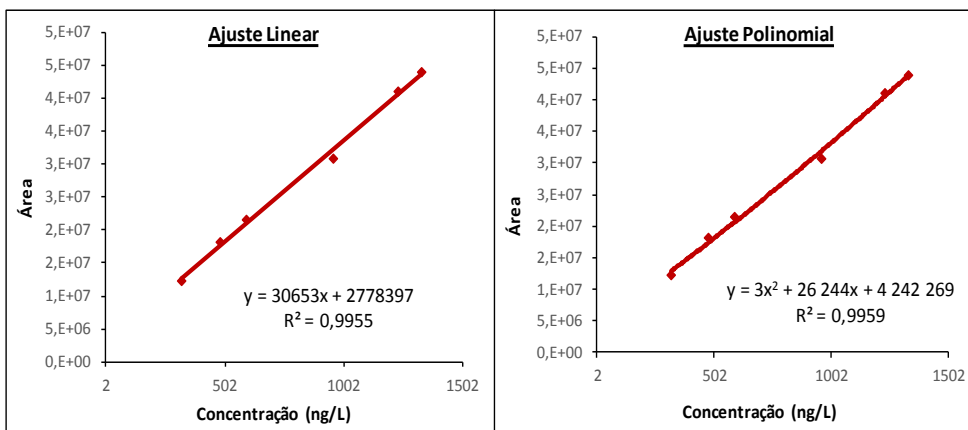
$$F_{(1,5)95\%} = 6,61$$

Como $VT < F$, a função de calibração linear conduz a um bom ajuste dos pontos experimentais.

• **Teste de Mandel para o 135TCB**

Tabela D.16 – Áreas calculadas para os ajustes linear e polinomial (135TCB)

Concentração (ng/L)	Área	Área Ajuste Linear	Área Ajuste Polinomial
320	12151565	12587418	12947549
480	18144982	17491929	17530589
590	21433050	20863780	20770529
960	30638373	32205461	32201309
1230	40918609	40481822	41061089
1330	43890972	43547142	44453489



Figuras D.11 e D.12 – Representação gráfica dos ajustes linear e polinomial (135TCB)

Tabelas D.17 e D.18 – Erros quadráticos para os dois ajustes (135TCB)

(y-yi)^2	(y-yi)^2
1,90E+11	6,34E+11
4,26E+11	3,77E+11
3,24E+11	4,39E+11
2,46E+12	2,44E+12
1,91E+11	2,03E+10
1,18E+11	3,16E+11
Soma = 3,71E+12	Soma = 4,23E+12
N-2 = 4	N-3 = 3
S y/x = 962455,29	S y/x(2ª) = 1187363,78

$$DS^2 = (N - 2) S_{y/x}^2 - (N - 3) S_{y/x(2^a)}^2$$

$$DS^2 = -5,24E+11$$

$$VT = DS^2 / S_{y/x(2^a)}^2$$

$$VT = -3,72E-01$$

$$F_{(1,5;95\%)} = 10,13$$

Como VT < F, a função de calibração linear conduz a um bom ajuste dos pontos experimentais.

Anexo E – Teste de Rikilt

Este teste permite primeiro retirar uma conclusão de cariz prático relevante para as análises realizadas no dia-a-dia de qualquer instituição laboratorial: o modo de quantificação.

Como já foi referido, quando se realizam procedimentos analíticos em rotina é necessário que este sejam acompanhados de calibração, de modo a ser possível quantificar os analitos presentes na amostra. Existem duas possibilidades de realizar a quantificação: com recurso a uma reta de calibração que pode ter validade variável (pode ser diária ou até mesmo mensal), a outra opção consiste na utilização do fator de resposta, determinado pela fórmula:

$$F_r = \frac{\text{área de pico do padrão}}{\text{concentração do padrão}}$$

O fator de resposta é determinado através de múltiplas injeções (quatro ou cinco, por exemplo) do padrão de concentração mais baixa e pode ser depois aplicado na determinação da concentração dos analitos da amostra através da equação:

$$[\text{analito}] = \frac{\text{área de pico da amostra}}{F_r}$$

A escolha entre um ou outro método de quantificação depende se a gama de linearidade cumpre os requisitos do teste de Rikilt.

Tipicamente, em análises que envolvem SPME como técnica de preparação de amostra é mais frequentemente utilizado o método do fator de resposta. Isto devido à variabilidade associada a esta técnica e que dificulta a utilização de reta de calibração.

O teste de Rikilt consiste essencialmente na avaliação da dispersão dos dados experimentais em relação a valores de referência considerados ótimos.

Para tal, determinam-se as razões área/concentração da gama de linearidade bem como a sua média. Calculam-se depois as percentagens de cada uma das razões em função da média calculada. Os valores calculados, de modo a cumprirem os requisitos impostos pelo teste de Rikilt têm de estar compreendidos entre 90% e 110% [55], cuja aplicação se pode observar nas Figuras E.1 a E.6.

- **Teste de Rikilt para o 12DCB**

Tabela E.1 – Cálculo das razões para o teste de Rikilt (12DCB)

Concentração (ng/L) = xi	Área = yi	Razão yi / xi	% yi / xi	Limite Superior	Limite Inferior
19	2896208	152432	119	110	90
23	3360566	146112	114	110	90
56	6401597	114314	89	110	90
71	8347341	117568	91	110	90
109	12213612	112051	87	110	90
Média		128495,49			

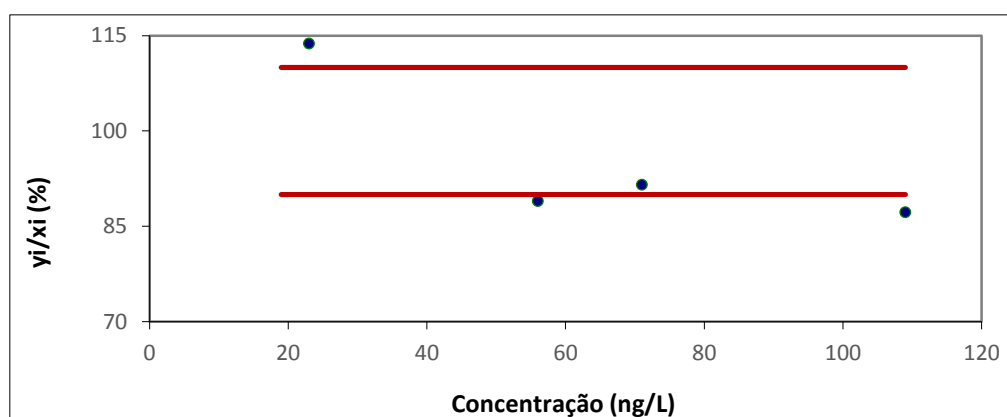


Figura E.1 – Representação gráfica do teste de Rikilt (12DCB)

- **Teste de Rikilt para o 13DCB**

Tabela E.2 – Cálculo das razões para o teste de Rikilt (13DCB)

Concentração (ng/L) = xi	Área = yi	Razão yi / xi	% yi / xi	Limite Superior	Limite Inferior
480	10888221	22684	113	110	90
590	13735833	23281	116	110	90
1330	25321143	19038	95	110	90
1870	33615983	17976	89	110	90
2400	42025692	17511	87	110	90
Média		20098,10			

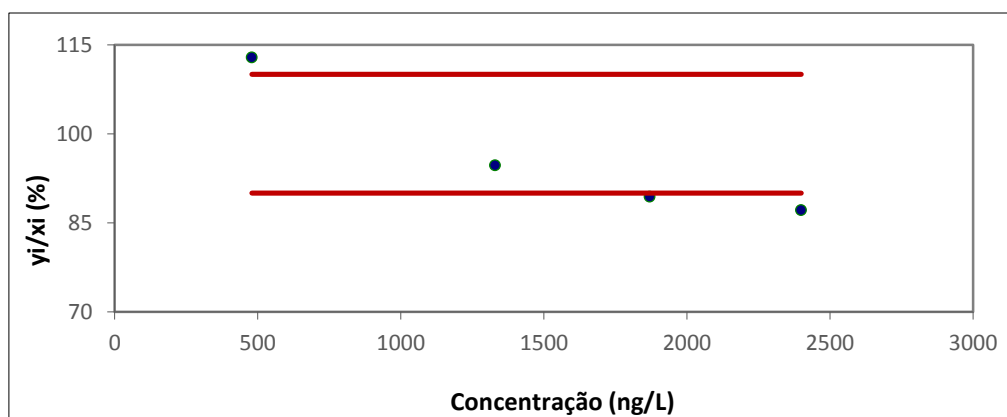


Figura E.2 – Representação gráfica do teste de Rikilt (13DCB)

- **Teste de Rikilt para o 14DCB**

Tabela E.3 – Cálculo das razões para o teste de Rikilt (14DCB)

Concentração (ng/L) = xi	Área = yi	Razão yi / xi	% yi / xi	Limite Superior	Limite Inferior
160	3926783	24542	93	110	90
240	6219153	25913	98	110	90
320	8574661	26796	101	110	90
480	12959074	26998	102	110	90
590	16400146	27797	105	110	90
Média		26409,26			

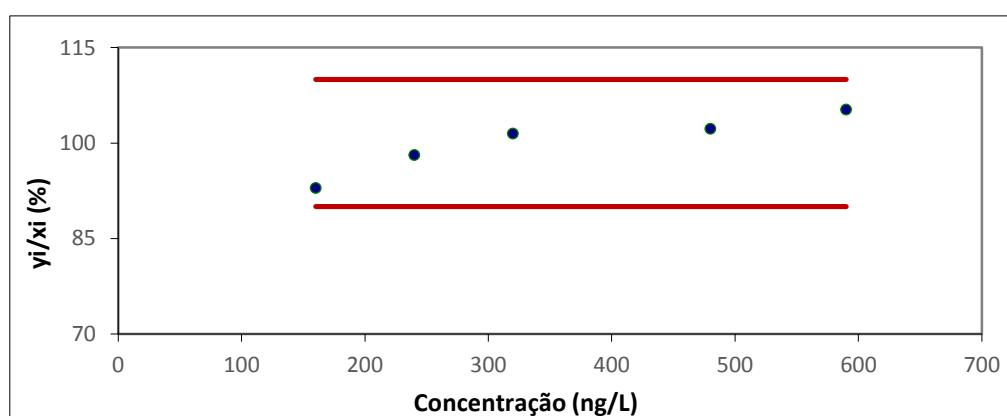


Figura E.3 – Representação gráfica do teste de Rikilt (14DCB)

- **Teste de Rikilt para o 123TCB**

Tabela E.4 – Cálculo das razões para o teste de Rikilt (123TCB)

Concentração (ng/L) = xi	Área = yi	Razão yi / xi	% yi / xi	Limite Superior	Limite Inferior
240	5503338	22931	99	110	90
320	8226872	25709	111	110	90
400	9439193	23598	102	110	90
590	13077685	22166	96	110	90
960	21493580	22389	97	110	90
1230	27094386	22028	95	110	90
Média		23136,70			

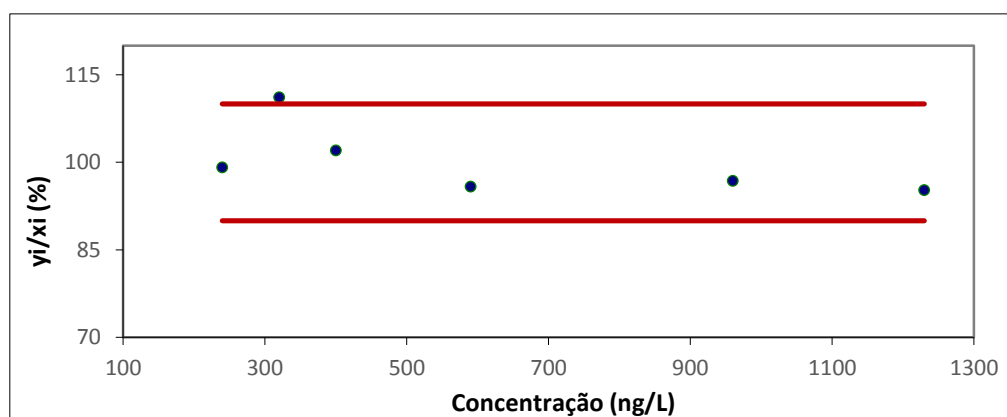


Figura E.4 – Representação gráfica do teste de Rikilt (123TCB)

- **Teste de Rikilt para o 124TCB**

Tabela E.5 – Cálculo das razões para o teste de Rikilt (124TCB)

Concentração (ng/L) = xi	Área = yi	Razão yi / xi	% yi / xi	Limite Superior	Limite Inferior
320	8644164	27013	111	110	90
400	9938512	24846	102	110	90
590	14572842	24700	101	110	90
960	22147446	23070	95	110	90
1330	32585662	24500	101	110	90
1870	44620110	23861	98	110	90
2400	55808152	23253	95	110	90
2670	62899517	23558	97	110	90
Média		24350,26			

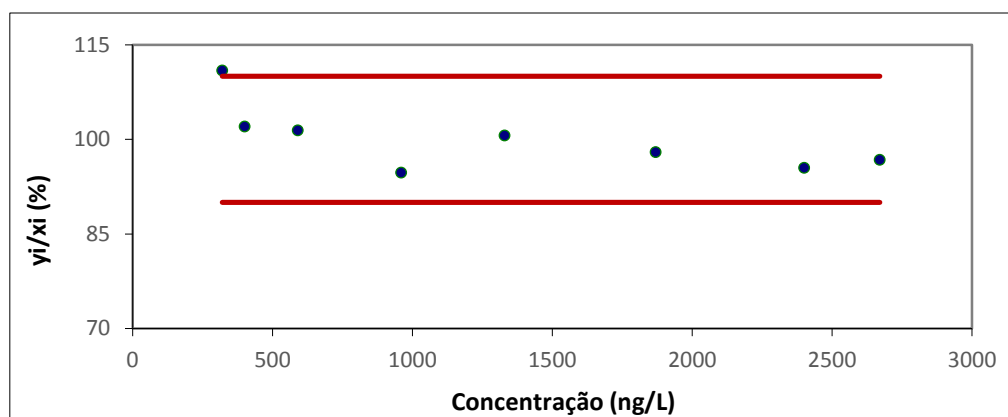


Figura E.5 – Representação gráfica do teste de Rikilt (124TCB)

• **Teste de Rikilt para o 135TCB**

Tabela E.6 – Cálculo das razões para o teste de Rikilt (135TCB)

Concentração (ng/L) = xi	Área = yi	Razão yi / xi	% yi / xi	Limite Superior	Limite Inferior
320	12151565	37974	108	110	90
480	18144982	37802	108	110	90
590	21433050	36327	104	110	90
960	30638373	31915	91	110	90
1230	40918609	33267	95	110	90
1330	43890972	33001	94	110	90
Média		35047,63			

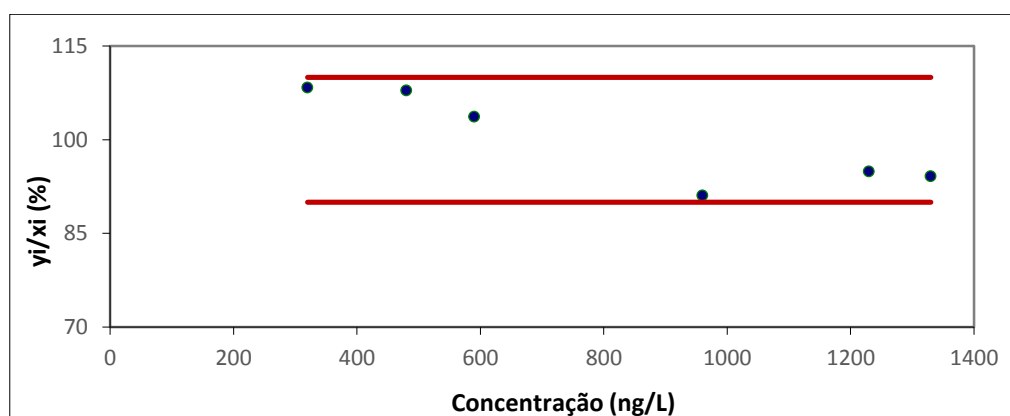


Figura E.6 – Representação gráfica do teste de Rikilt (135TCB)

Anexo F – Teste das Áreas Normalizadas

O teste das áreas normalizadas permite, à semelhança do teste de Rikilt, retirar conclusões relativamente ao método que pode ser utilizado na quantificação dos analitos presentes numa amostra.

Utilizando a equação da reta obtida pela regressão linear são estimadas as áreas dos picos correspondentes às concentrações usadas. Para cada valor de área calcula-se a razão área experimental/área estimada.

A concentração para a qual a razão é mais próxima de 1, ou seja, tem melhor correlação, é considerado como o valor de referência, denominado C_{100} . As áreas normalizadas são então calculadas pela fórmula:

$$\text{Área Normalizada} = \frac{\frac{A_i}{C_i} \times 100 \times C_{100}}{A_{100}}$$

Onde A_{100} corresponde à área do pico com melhor correlação, C_i e A_i são a concentração e a respetiva área correspondente de um dado pico.

Considera-se que é possível quantificar os analitos apenas por fator de resposta, sempre que as áreas normalizadas apresentem valores entre 85% e 115% [56]. A representação gráfica destes resultados encontra-se nas Figuras F.1 a F.6.

- **Teste das Áreas Normalizadas para o 12DCB**

Tabela F.1 – Cálculo dos valores normalizados (12DCB)

Área Pico Estimada	Área Experimental / Área Estimada	Concentração (ng/L)	Valores Normalizados
2859619	1,01	19	74
3273198	1,03	23	77
6685223	0,96	56	98
8236143	1,01	71	95
12165141	1,00	109	100

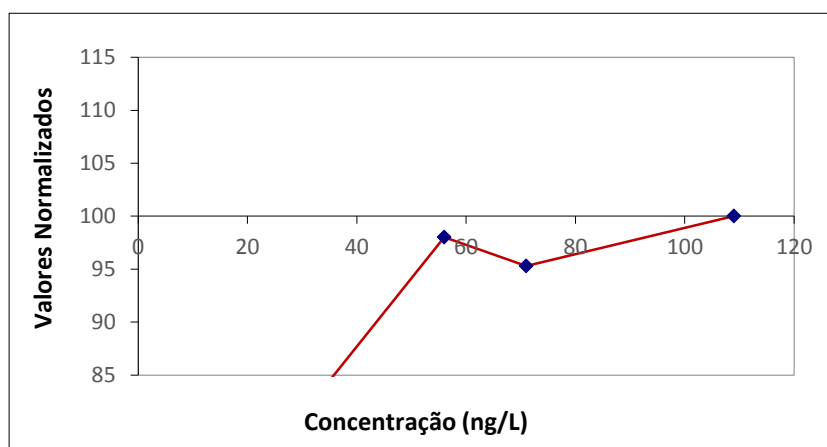


Figura F.1 – Representação gráfica da concentração em função dos valores normalizados (12DCB)

- **Teste das Áreas Normalizadas para o 13DCB**

Tabela F.2 – Cálculo dos valores normalizados (13DCB)

Área Pico Estimada	Área Experimental / Área Estimada	Concentração (ng/L)	Valores Normalizados
11486837	0,95	480	79
13242527	1,04	590	77
25053531	1,01	1330	94
33672372	1,00	1870	100
42131605	1,00	2400	103

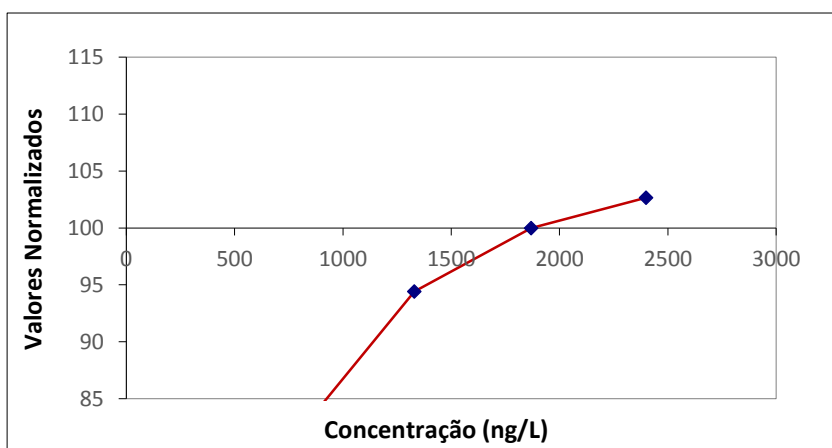


Figura F.2 – Representação gráfica da concentração em função dos valores normalizados (13DCB)

- **Teste das Áreas Normalizadas para o 14DCB**

Tabela F.3 – Cálculo dos valores normalizados (14DCB)

Área Pico Estimada	Área Experimental / Área Estimada	Concentração (ng/L)	Valores Normalizados
3916492	1,00	160	106
6219309	1,00	240	100
8522125	1,01	320	97
13127759	0,99	480	96
16294132	1,01	590	93

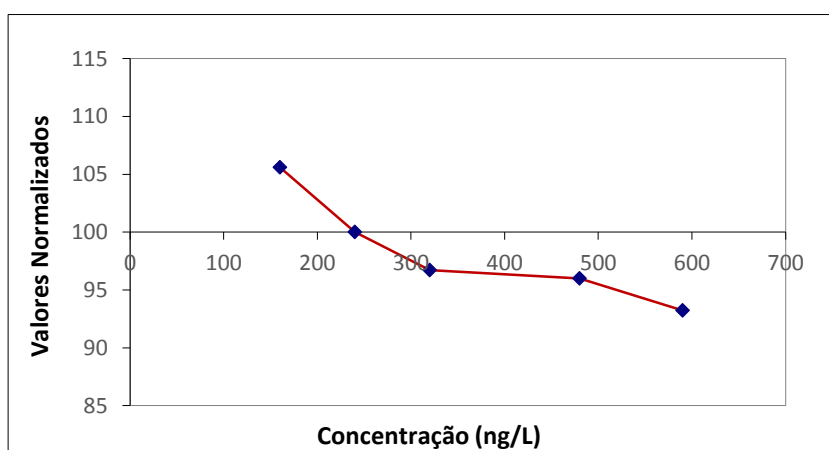


Figura F.3 – Representação gráfica da concentração em função dos valores normalizados (14DCB)

- **Teste das Áreas Normalizadas para o 123TCB**

Tabela F.4 – Cálculo dos valores normalizados (123TCB)

Área Pico Estimada	Área Experimental / Área Estimada	Concentração (ng/L)	Valores Normalizados
5927000	0,93	240	96
7640845	1,08	320	86
9354691	1,01	400	93
13425073	0,97	590	99
21351608	1,01	960	98
27135837	1,00	1230	100

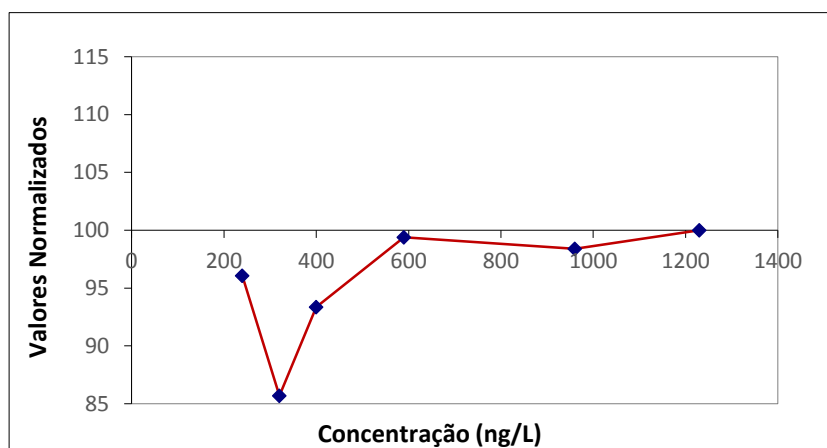


Figura F.4 – Representação gráfica da concentração em função dos valores normalizados (123TCB)

- **Teste das Áreas Normalizadas para o 124TCB**

Tabela F.5 – Cálculo dos valores normalizados (124TCB)

Área Pico Estimada	Área Experimental / Área Estimada	Concentração (ng/L)	Valores Normalizados
8309039	1,04	320	9
10161110	0,98	400	99
14559779	1,00	590	100
23125608	0,96	960	107
31691437	1,03	1330	101
44192917	1,01	1870	104
56462888	0,99	2400	106
62713628	1,00	2670	105

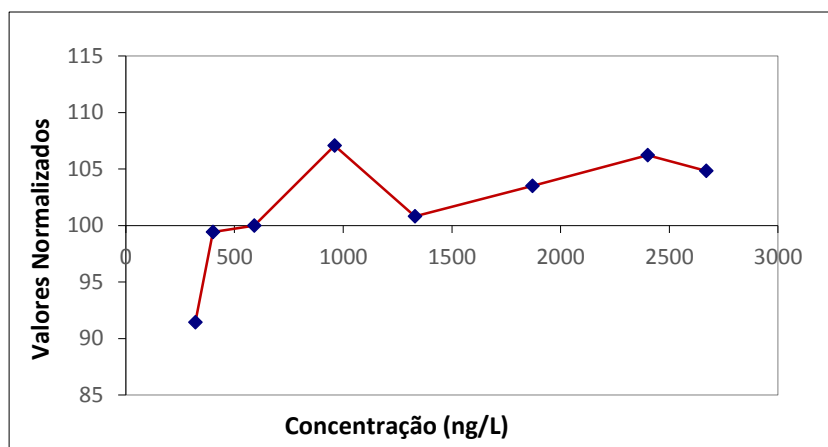


Figura F.5 – Representação gráfica da concentração em função dos valores normalizados (124TCB)

- **Teste das Áreas Normalizadas para o 135TCB**

Tabela F.6 – Cálculo dos valores normalizados (135TCB)

Área Pico Estimada	Área Experimental / Área Estimada	Concentração (ng/L)	Valores Normalizados
12587418	0,97	320	87
17491929	1,04	480	87
20863780	1,03	590	91
32205461	0,95	960	103
40481822	1,01	1230	99
43547142	1,01	1330	100

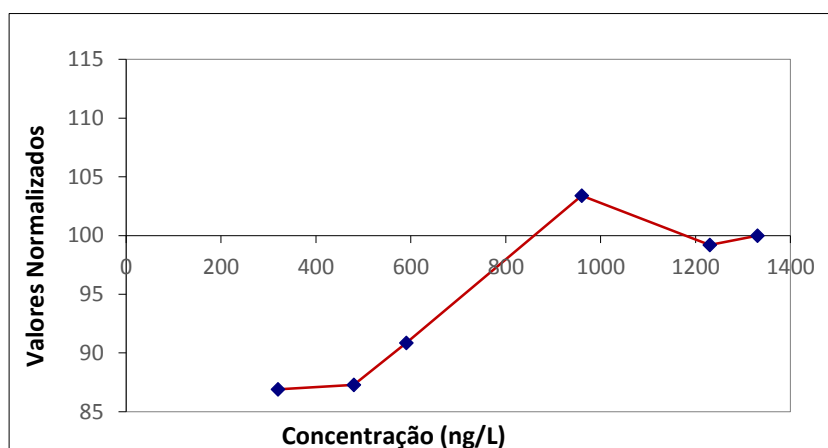


Figura F.6 – Representação gráfica da concentração em função dos valores normalizados (135TCB)

Anexo G – Teste de Homogeneidade de Variâncias

A adequação da gama de trabalho pode ser avaliada pelo teste de homogeneidade de variâncias. De acordo com a norma em vigor, a ISO 8466, devem para este efeito ser utilizadas retas com o mínimo de cinco pontos de calibração, sem exceder os dez, que têm necessariamente de estar distribuídos de modo equitativo pela gama de concentrações em causa.

Foram analisadas no mesmo dia dez réplicas independentes das concentrações mais baixas e mais elevadas de cada composto na gama de trabalho. Deste modo, é avaliado se a gama de trabalho está bem ajustada, analisando a variância dos padrões limite da reta de calibração. A variância de cada uma das concentrações foi calculada com recurso à seguinte equação:

$$S_i^2 = \frac{\sum (y_{ij} - \bar{y}_i)^2}{n_i - 1}$$

As variâncias foram testadas contemplando dois cenários distintos: $S_2^2 > S_1^2$ e $S_1^2 > S_2^2$, respetivamente, através das equações:

$$F_{obs1} = \frac{S_2^2}{S_1^2}$$

$$F_{obs2} = \frac{S_1^2}{S_2^2}$$

Após o cálculo, se $F_{obs} > F_{crítico}$ (valor tabelado da distribuição de Fisher consoante os graus de liberdade pretendidos), conclui-se que as variâncias não são homogéneas e vice-versa [57].

• **Teste de Homogeneidade de Variâncias para o 12DCB**

Tabelas G.1 e G.2 – Áreas obtidas nas duas gamas de concentração (12DCB)

Concentração inferior: 19 ng/L

Concentração superior: 109 ng/L

Área
4873524
4922001
5380707
4559439
4825408
4389998
4780110
5119299
4565500
4571592

Área
13472529
10471260
13190351
12986338
12607072
11459804
12108266
11479499
11899818
12690844

N-1 =	9
Média =	4798757,80
Desvio Padrão =	296951,16
Desvio Relativo =	6,19 (%)
Variância =	8,8180E+10

N-1 =	9
Média =	12236578,10
Desvio Padrão =	928905,37
Desvio Relativo =	7,59 (%)
Variância =	8,6287E+11

VALOR TESTE (PG) = s_1^2 / s_2^2 se $s_1^2 > s_2^2$ ou **PG** = s_2^2 / s_1^2 se $s_2^2 > s_1^2$

F_{99%} = 5,35

PG = 9,79

Uma vez que **PG** é superior ao **F**, não se pode afirmar que existe homogeneidade de variâncias na gama de trabalho estudada (19 a 109 ng/L).

• **Teste de Homogeneidade de Variâncias para o 13DCB**

Tabelas G.3 e G.4 – Áreas obtidas nas duas gamas de concentração (13DCB)

Concentração inferior: 480 ng/L

Concentração superior: 2400 ng/L

Área
25560400
25435621
28731752
24549614
25796230
23312040
25002305
27313573
24199423
22883125

Área
79228869
70933195
85556879
84417339
70646161
74830443
73838114
62731201
55294655
77759607

N-1 = 9
Média = 25278408,30
Desvio Padrão = 1758010,95
Desvio Relativo = 6,95 (%)
Variância = 3,0906E+12

N-1 = 9
Média = 73523646,30
Desvio Padrão = 9306712,78
Desvio Relativo = 12,66 (%)
Variância = 8,6615E+13

VALOR TESTE (PG) = s_1^2 / s_2^2 se $s_1^2 > s_2^2$ ou PG = s_2^2 / s_1^2 se $s_2^2 > s_1^2$

$F_{99\%} = 5,35$

PG = 28,03

Uma vez que PG é superior ao F, não se pode afirmar que existe homogeneidade de variâncias na gama de trabalho estudada (480 a 2400 ng/L).

• **Teste de Homogeneidade de Variâncias para o 14DCB**

Tabelas G.5 e G.6 – Áreas obtidas nas duas gamas de concentração (14DCB)

Concentração inferior: 160 ng/L

Concentração superior: 590 ng/L

Área
10333533
10856635
11819570
10488628
11135205
10301664
10895850
11486365
10643177
10141586

Área
33553860
27406660
33646647
33595000
31401589
30144092
31440753
29664035
28826921
30783049

N-1 = 9
Média = 10810221,30
Desvio Padrão = 543171,50
Desvio Relativo = 5,02 (%)
Variância = 2,9504E+11

N-1 = 9
Média = 31046260,60
Desvio Padrão = 2129003,84
Desvio Relativo = 6,86 (%)
Variância = 4,5327E+12

VALOR TESTE (PG) = s_1^2 / s_2^2 se $s_1^2 > s_2^2$ ou **PG** = s_2^2 / s_1^2 se $s_2^2 > s_1^2$

F_{99%} = 5,35

PG = 15,36

Uma vez que **PG** é superior ao **F**, não se pode afirmar que existe homogeneidade de variâncias na gama de trabalho estudada (160 a 590 ng/L).

• **Teste de Homogeneidade de Variâncias para o 123TCB**

Tabelas G.7 e G.8 – Áreas obtidas nas duas gamas de concentração (123TCB)

Concentração inferior: 240 ng/L

Concentração superior: 1230 ng/L

Área
13242321
13442758
14614462
13210879
12783299
12501862
12906477
13958973
12880379
12842473

Área
63574550
50399021
60886337
58383099
54487322
56258383
55862860
56886632
55638997
58082383

N-1 = 9
Média = 13238388,30
Desvio Padrão = 632457,49
Desvio Relativo = 4,78 (%)
Variância = 4,0000E+11

N-1 = 9
Média = 57045958,40
Desvio Padrão = 3574391,26
Desvio Relativo = 6,27 (%)
Variância = 1,2776E+13

VALOR TESTE (PG) = s_1^2 / s_2^2 se $s_1^2 > s_2^2$ ou **PG** = s_2^2 / s_1^2 se $s_2^2 > s_1^2$

F_{99%} = 5,35

PG = 31,94

Uma vez que PG é superior ao F, não se pode afirmar que existe homogeneidade de variâncias na gama de trabalho estudada (240 a 1230 ng/L).

• **Teste de Homogeneidade de Variâncias para o 124TCB**

Tabelas G.9 e G.10 – Áreas obtidas nas duas gamas de concentração (124TCB)

Concentração inferior: 320 ng/L

Concentração superior: 2670 ng/L

Área
19272594
19221029
21588381
18835082
18855626
18270887
18964608
20283738
18787569
18040158

Área
125412002
120659881
133101721
129867587
110968237
121772687
117497033
105408349
95767904
116219518

N-1 = 9
Média = 19211967,20
Desvio Padrão = 1031120,40
Desvio Relativo = 5,37 (%)
Variância = 1,0632E+12

N-1 = 9
Média = 117667491,90
Desvio Padrão = 11302538,75
Desvio Relativo = 9,61 (%)
Variância = 1,2775E+14

VALOR TESTE (PG) = s^2_1 / s^2_2 se $s^2_1 > s^2_2$ ou **PG** = s^2_2 / s^2_1 se $s^2_2 > s^2_1$

F_{99%} = 5,35

PG = 120,15

Uma vez que **PG** é superior ao **F**, não se pode afirmar que existe homogeneidade de variâncias na gama de trabalho estudada (320 a 2670 ng/L).

• **Teste de Homogeneidade de Variâncias para o 135TCB**

Tabelas G.11 e G.12 – Áreas obtidas nas duas gamas de concentração (135TCB)

Concentração inferior: 320 ng/L

Concentração superior: 1330 ng/L

Área
27088213
26554303
30529364
26328887
27380918
25849997
26986778
28477083
26403400
24117696

Área
79135737
74067663
81356288
78849642
67561741
75095010
73304346
62215088
57732548
68722661

N-1 =	9
Média =	26971663,90
Desvio Padrão =	1680554,25
Desvio Relativo =	6,23 (%)
Variância =	2,8243E+12

N-1 =	9
Média =	71804072,40
Desvio Padrão =	7676023,32
Desvio Relativo =	10,69 (%)
Variância =	5,8921E+13

VALOR TESTE (PG) = s_1^2 / s_2^2 se $s_1^2 > s_2^2$ ou PG = s_2^2 / s_1^2 se $s_2^2 > s_1^2$

F_{99%} = 5,35

PG = 20,86

Uma vez que PG é superior ao F, não se pode afirmar que existe homogeneidade de variâncias na gama de trabalho estudada (320 a 1330 ng/L).

Anexo H – Limiares Analíticos (LOQ e LOD)

O cálculo dos limiares analíticos, limite de quantificação e limite de detecção, foi realizado do modo descrito em pormenor nos subcapítulos 4.2.3.2.1 e 4.2.3.2.2, respetivamente. Neste sentido, foi injetada dez vezes a solução correspondente à menor concentração de todos os compostos, calculado o respectivo desvio padrão e o limite de detecção foi determinado com base na equação 4.4. Procedimento idêntico foi efetuado para o limite de quantificação, mas recorrendo à equação 4.6.

Adicionalmente, os limiares analíticos foram também determinados com base desvio padrão residual da reta de calibração, recorrendo às equações 4.5 e 4.7. Esta determinação foi feita no momento da aplicação do método dos mínimos quadrados.

Por este motivo, neste Anexo são apenas explicitados os cálculos relativos ao modo de determinação que depende do padrão de concentração mais baixa.

- **Limites de deteção e quantificação para o 12DCB**

Tabelas H.1 e H.2 – Áreas e respetivas concentrações obtidas para o padrão da gama baixa (12DCB)

Procedimento: Os limites foram determinados com recurso a $n = 7$ leituras do padrão de concentração mais baixa (19 ng/l)

	Área	
	1709503	
	1672602	
	1670652	
	1678456	m = 58806
	1697456	b = 752096
	1648539	
	1843704	
Média =	1702987	
Desvio Padrão =	65076	
Desvio Relativo (%) =	4	

Utilizou-se a equação da recta para determinar a concentração estimada:

	Concentração Estimada (ng/L)	Erro (%)
	16	14
	16	18
	16	18
	16	17
	16	15
	15	20
	19	2
Média =	16	
Desvio Padrão =	1	

LOD =	3	(ng/L)
LOQ =	11	(ng/L)

• **Limites de deteção e quantificação para o 13DCB**

Tabelas H.3 e H.4 – Áreas e respetivas concentrações obtidas para o padrão da gama baixa (13DCB)

Procedimento: Os limites foram determinados com recurso a n = 8 leituras do padrão de concentração mais baixa (480 ng/l)

	Área	
	10299412	
	9548356	
	9670793	
	9957783	m = 13092
	9930345	b = 3979397
	9736435	
	10088196	
	9478245	
Média =	9838696	
Desvio Padrão =	280296	
Desvio Relativo (%) =	3	

Utilizou-se a equação da recta para determinar a concentração estimada:

	Concentração Estimada (ng/L)	Erro (%)
	483	-1
	425	11
	435	9
	457	5
	455	5
	440	8
	467	3
	420	12
Média =	448	
Desvio Padrão =	21	

LOD =	64	(ng/L)
LOQ =	214	(ng/L)

- **Limites de deteção e quantificação para o 14DCB**

Tabelas H.5 e H.6 – Áreas e respetivas concentrações obtidas para o padrão da gama baixa (14DCB)

Procedimento: Os limites foram determinados com recurso a $n = 9$ leituras do padrão de concentração mais baixa (160 ng/l)

Área	
4606108	
4891103	
4854207	
4825529	
4545493	m = 25052
4767520	b = 360408
4769125	
4461329	
4535995	
Média =	4695157
Desvio Padrão =	158798
Desvio Relativo (%) =	3

Utilizou-se a equação da recta para determinar a concentração estimada:

Concentração Estimada	
(ng/L)	Erro
169	-6
181	-13
179	-12
178	-11
167	-4
176	-10
176	-10
164	-2
167	-4
Média =	173
Desvio Padrão =	6

LOD =	19	(ng/L)
LOQ =	63	(ng/L)

• **Limites de deteção e quantificação para o 123TCB**

Tabela H.7 e H.8 – Áreas e respetivas concentrações obtidas para o padrão da gama baixa (123TCB)

Procedimento: Os limites foram determinados com recurso a $n = 7$ leituras do padrão de concentração mais baixa (240 ng/l)

	Área	
	4464359	
	4230975	
	4317069	
	4307184	
	4167077	
	4709112	
	4243628	
Média =	4348486	m = 15887
Desvio Padrão =	184338	b = 1019712
Desvio Relativo (%) =	4	

Utilizou-se a equação da recta para determinar a concentração estimada:

	Concentração Estimada (ng/L)	Erro (%)
	217	10
	202	16
	208	14
	207	14
	198	17
	232	3
	203	15
Média =	210	
Desvio Padrão =	12	

LOD =	35	(ng/L)
LOQ =	116	(ng/L)

- **Limites de detecção e quantificação para o 124TCB**

Tabelas H.9 e H.10 – Áreas e respetivas concentrações obtidas para o padrão da gama baixa (124TCB)

Procedimento: Os limites foram determinados com recurso a $n = 6$ leituras do padrão de concentração mais baixa (320 ng/l)

	Área	
	6884998	
	6537878	
	6633288	m = 16281
	6537057	b = 2320945
	6512741	
	6724610	
Média =	6638429	
Desvio Padrão =	144523	
Desvio Relativo (%) =	2	

Utilizou-se a equação da recta para determinar a concentração estimada:

	Concentração Estimada (ng/L)	Erro (%)
	280	12
	259	19
	265	17
	259	19
	257	20
	270	15
Média =	265	
Desvio Padrão =	9	

LOD =	27	(ng/L)
LOQ =	89	(ng/L)

• **Limites de deteção e quantificação para o 135TCB**

Tabelas H.11 e H.12 – Áreas e respetivas concentrações obtidas para o padrão da gama baixa (135TCB)

Procedimento: Os limites foram determinados com recurso a n = 6 leituras do padrão de concentração mais baixa (320 ng/l)

	Área	
	8267739	
	8298333	
	8353449	m = 22440
	8444328	b = 2455872
	8224453	
	8299858	
Média =	8314693	
Desvio Padrão =	76345	
Desvio Relativo (%) =	1	

Utilizou-se a equação da recta para determinar a concentração estimada:

	Concentração Estimada (ng/L)	Erro (%)
	259	19
	260	19
	263	18
	267	17
	257	20
	260	19
Média =	261	
Desvio Padrão =	3	

LOD =	10	(ng/L)
LOQ =	34	(ng/L)

Anexo I – Cálculo de Incertezas

Na determinação da incerteza do método recorrendo às duas metodologias foram consideradas as seguintes fontes de incerteza:

- 1) Incerteza associada à interpolação da leitura da amostra na curva de calibração;
- 2) Incerteza associada à precisão;
- 3) Incerteza associada a ensaios de recuperação (efeito de matriz);
- 4) Incerteza associada à preparação de padrões;
- 5) Incerteza associada à exatidão (Ensaio Interlaboratoriais, EIL).

Após a determinação de cada uma das incertezas individuais, calculou-se a incerteza combinada e a incerteza expandida.

- Incerteza associada à interpolação da leitura da amostra na curva de calibração

A incerteza associada à interpolação por meio da reta de calibração, assumindo que a curva de calibração cumpre os requisitos impostos pelo método de linearização dos mínimos quadrados, pode ser calculada através da equação:

$$u_{\text{reta}} = \frac{S_{y/x}}{m} \sqrt{\frac{1}{N} + \frac{1}{n} + \frac{(\bar{y}_b - \bar{y})^2}{m^2 \sum (x_i - \bar{x})^2}}$$

Atendendo que $\bar{y} = m\bar{x} + b$ e $\bar{y}_b = mC + b$, a equação anterior pode ser simplificada como:

$$u_{\text{reta}} = \frac{S_{y/x}}{m} \sqrt{\frac{1}{N} + \frac{1}{n} + \frac{(C - \bar{x})^2}{\sum (x_i - \bar{x})^2}}$$

Em que $S_{y/x}$ traduz o desvio padrão residual, calculado através da equação:

$$S_{y/x} = \sqrt{\frac{\sum (y_i - mx_i - b)^2}{N - 2}}$$

- Incerteza associada à precisão

Quando a determinação da incerteza está associada à aplicação de um método de ensaio analítico, a incerteza combinada terá uma componente adicional resultante da precisão do método de ensaio, de modo a agrupar os feitos aleatórios/ de dispersão/ de variabilidade não contabilizados e que eventualmente possam existir em qualquer fase do método de ensaio.

Para este efeito pode optar-se entre a precisão intermédia ou pela repetibilidade, conforme qual seja mais utilizada no laboratório. Neste caso, optou-se pela precisão intermédia, tendo sido analisadas dez amostras em replicado (N=10).

Como tal, para os padrões de controlo a incerteza pode ser calculada pela fórmula:

$$u_{prec\ int} = \frac{S_N}{\sqrt{N}}$$

Em que S_N representa o desvio padrão associado à média das concentrações obtidas na análise dos N padrões de controlo.

- Incerteza padrão combinada

Com as incertezas associadas às três componentes pertinentes à primeira metodologia, é finalmente possível a determinação da incerteza combinada, dada pela equação:

$$u_c(C) = \sqrt{(u_{reta}^2 + u_{prec\ int}^2 + u_{padrão}^2)}$$

Na segunda metodologia, serão consideradas as outras duas componentes de incertezas, isto é, as associadas à exatidão e aos ensaios de recuperação.

- Incerteza associada a ensaios de recuperação (efeito de matriz)

Esta componente da incerteza é avaliada através fortificação de uma matriz com uma quantidade bem definida dos analitos de interesse. Esta determinação foi realizada através dos estudos de fortificação descritos em detalhe no subcapítulo 6.3.7.

A incerteza pode ser determinada pela equação:

$$u_{matriz} = \frac{S_N}{\sqrt{N}}$$

Em que S_N representa o desvio padrão associado à média dos N ensaios de recuperação.

- Incerteza associada à exatidão (EIL)

Apesar de não terem sido realizados EIL no decurso desta validação de método analítico, para a determinação da componente da incerteza associada à exatidão, foi aplicado o mesmo princípio teórico com ensaios de recuperação, ou seja, comparar o valor alvo de concentração teórica com os resultados obtidos e calcular a respetiva amplitude entre eles.

- Incerteza padrão combinada

Neste caso, a incerteza padrão combinada será dada pela equação:

$$u_c(C) = \sqrt{(u_{matriz}^2 + u_{exactidão}^2)}$$

- Incerteza expandida

O cálculo da incerteza expandida é realizado afetando a incerteza combinada do fator de expansão, k (que normalmente toma valores entre 2 e 3), para um nível de confiança tipicamente situado entre 95% ou 99%.

A incerteza expandida é dada então a partir da incerteza combinada pelas seguintes equações:

$$U(C) = k \times u_c(C)$$

$$U(C) = 2 \times u_c(C)$$

- Expressão do resultado

A concentração mais provável é dada por:

$$C \pm U(C) \text{ [Unidades de concentração]}$$

A incerteza deve ser apresentada no máximo com dois algarismos significativos. Já o número de dígitos do resultado do ensaio estará limitado pela incerteza do resultado [58].

Anexo J – Avaliação Económica

De modo a completar o estudo realizado, considerou-se pertinente realizar também uma avaliação económica do custo associado ao desenvolvimento do presente método de análise.

Foram para este efeito contabilizados todos os custos materiais (dentro do que foi possível determinar) relevantes ao desenvolvimento desta técnica em todas as suas fases:

Tabela J.1 – Custos materiais considerados para a avaliação económica do método

Tipo de Material	Marca	Quantidade Utilizada	Preço (€)
Fibras:			
PDMS/DVB	Supelco	1 Cx	200,00
PA	Supelco	1 Cx	200,00
DVB/CAR/PDMS	Supelco	1 Cx	200,00
PEG	Supelco	1 Cx	200,00
CAR/PDMS	Supelco	1 Cx	200,00
PDMS	Supelco	1 Cx	200,00
Consumíveis:			
Septos	Gerstel	3 Embalagens	222,00
Acessórios:			
Coluna	Agilent	1 Unidade	1128,20
Suporte de Fibras	Supelco	1 Unidade	208,50
Capsulador	Agilent	1 Unidade	212,60
Descapsulador	Agilent	1 Unidade	77,00
Seringas	Agilent	6 Unidades	307,80
Padrões Analíticos:			
12DCB	Chem Service	1 Caixa	42,00
13DCB	Chem Service	1 Caixa	42,00
14DCB	Chem Service	1 Caixa	42,00
123TCB	Chem Service	1 Caixa	42,00
124TCB	Chem Service	1 Caixa	42,00
135TCB	Chem Service	1 Caixa	42,00
Solventes:			
Metanol	Carlo Erba Reagents	2,5L	5,40
Total			3613,50