



INÊS ISABEL VIDIGAL FERREIRA DE OLIVEIRA

Licenciada em Ciências de Engenharia Química e Bioquímica

IMPLEMENTAÇÃO E VALIDAÇÃO DE UM MÉTODO DE
ENSAIO PARA ANÁLISE DE PRODUTOS DE
DEGRADAÇÃO DE AGENTES ESTABILIZANTES DE
MATERIAIS USADOS EM CONTACTO COM ÁGUA DE
CONSUMO HUMANO

MESTRADO EM ENGENHARIA QUÍMICA E BIOQUÍMICA

Universidade NOVA de Lisboa
Setembro, 2022

IMPLEMENTAÇÃO E VALIDAÇÃO DE UM MÉTODO DE ENSAIO PARA ANÁLISE DE PRODUTOS DE DEGRADAÇÃO DE AGENTES ESTABILIZANTES DE MATERIAIS USADOS EM CONTACTO COM ÁGUA DE CONSUMO HUMANO

INÊS ISABEL VIDIGAL FERREIRA DE OLIVEIRA

Licenciada em Ciências de Engenharia Química e Bioquímica

Orientador: Dr. Vítor Manuel do Vale Cardoso,
Responsável da área de Química Orgânica do Laboratório de Análises de Água, EPAL, S.A.

Coorientador: Professor Mário Fernando José Eusébio,
Professor Auxiliar, FCT NOVA

Júri:

Presidente: Doutor Pedro Miguel Calado Simões,
Professor Associado com Agregação da FCT NOVA

Arguente: Doutor Marco Diogo Richter Gomes da Silva,
Professor Associado com Agregação da FCT NOVA

Orientador: Doutor Vítor Manuel do Vale Cardoso,
Responsável da área de Química Orgânica do Laboratório de Análises de Água, EPAL, S.A

Implementação e validação de um método de ensaio para a análise de Produtos de Degradação de Agentes Estabilizantes de Materiais usados em contacto com Água de Consumo Humano

Copyright © Inês Isabel Vidigal Ferreira de Oliveira, NOVA School of Science and Technology | FCT NOVA

A NOVA School of Science and Technology | FCT NOVA têm o direito, perpétuo e sem limites geográficos, de arquivar e publicar esta dissertação através de exemplares impressos reproduzidos em papel ou de forma digital, ou por qualquer outro meio conhecido ou que venha a ser inventado, e de a divulgar através de repositórios científicos e de admitir a sua cópia e distribuição com objetivos educacionais ou de investigação, não comerciais, desde que seja dado crédito ao autor e editor.

AGRADECIMENTOS

O árduo e gratificante percurso que levou à concretização desta tese apenas foi possível graças a um conjunto de pessoas que marcou esta experiência pela positiva.

Primeiramente, quero agradecer aos meus orientadores que acompanharam com rigor o trabalho que foi realizado no Laboratório de Análises de Água da EPAL, SA. Ao Doutor Vítor Cardoso por me ter introduzido ao fantástico mundo da química orgânica. A sua vasta partilha de conhecimentos foi determinante para a realização desta tese, assim como a sua atenção ao detalhe e simpatia constantes. À Doutora Ana Penetra que facilitou a minha integração no laboratório, demonstrando disponibilidade para me apoiar sempre que necessário. A sua confiança no meu trabalho permitiu-me explorar o tema estudado em toda a sua abrangência.

Agradeço à Direção de Laboratórios da EPAL, em especial ao Eng.º Rui Neves Carneiro que tornou este estágio curricular uma realidade, mantendo a ligação com a NOVA-SST ao longo dos anos.

Ao Professor Mário Eusébio que ao longo destes últimos 2 anos me proporcionou uma visão esclarecedora do que é ser uma Engenheira Química, desafiando-me todas as semanas. Os seus conselhos foram essenciais para o meu desenvolvimento.

À Professora Cristina de Almeida e à Andreia Videira pela ajuda prestada no laboratório e pelos seus ensinamentos.

Recordo ainda a Catarina Vitorino, a Cristina Correia, a Sofia Silva e a Raquel Franco, a quem agradeço a afável receção e a boa disposição que resultaram um ambiente de trabalho agradável e descontraído.

À Gabriela e à Vânia Cristina que foram indispensáveis ao garantir sempre o material necessário durante o decorrer do estágio.

Finalmente, mas não menos importante, agradeço à minha família e aos meus amigos que me apoiaram sempre. Em especial, aos meus pais, à minha irmã e ao meu namorado que estiveram presentes em todos os momentos. Sem eles não tinha sido possível chegar onde cheguei.

Obrigada!

RESUMO

Este trabalho tem como objetivo validar e implementar um método de ensaio para a análise de produtos de degradação de agentes estabilizantes usados na composição de materiais em contacto com a água de consumo humano. Foram estudados os seguintes compostos: 4-etilfenol, 4-terc-butilfenol, 2,6-di-terc-butil-p-benzoquinona, 2,4-di-terc-butilfenol, 2,6-di-terc-butil-4-vinilfenol, 3,5-di-terc-butil-4-hidroxibenzaldeído, 3,5-di-terc-butil-4-hidroxiacetofenona, 7,9-di-terc-butil-1-oxaspiro(4,5)deca-6,9-dieno-2,8-diona, 3-(3,5-di-terc-butil-4-hidroxifenil) propionato de metilo e o ácido 3-(3,5-di-terc-butil-4-hidroxifenil) propiónico. Foram estudadas três matrizes de água incluindo: águas de consumo humano, superficiais e subterrâneas.

A preparação das amostras foi efetuada com base na Extração Líquido-Líquido e a técnica analítica selecionada foi a Cromatografia Gasosa acoplada à Espetrometria de Massas (LLE-GC/MS). Inicialmente foi proposta a implementação da técnica de Extração em Fase Sólida (SPE), no entanto, após diferentes estudos tornou-se evidente a inviabilidade desta via, devido à contaminação dos ensaios em branco com alguns dos compostos em estudo.

A validação do método de ensaio cumpriu com todos os requisitos necessários para demonstrar a robustez do método. Os coeficientes de correlação registaram valores entre 0,9997 e 0,9999 e a análise de resíduos e o teste de Mandel demonstraram resultados aceitáveis para todos os compostos. Os ensaios de repetibilidade e de precisão intermédia apresentaram valores de RSD (%) inferiores a 10%. No estudo da exatidão obtiveram-se percentagens médias de recuperação entre 82% e 96% com um RSD (%) associado inferior a 25%. Os limites de quantificação do método obtidos foram inferiores a 30% dos valores de referência. A estimativa da incerteza expandida levou à obtenção de valores inferiores a 50%. A realização de ensaios de migração a alguns materiais usados no sistema de abastecimento de água revelou a presença dos compostos 2,6-di-terc-butil-p-benzoquinona, 2,4-di-terc-butilfenol, 3,5-di-terc-butil-4-hidroxibenzaldeído e 3-(3,5-di-terc-butil-4-hidroxifenil) propionato de metilo.

Tendo em conta estes resultados, foi possível cumprir o objetivo definido podendo este método de ensaio ser implementado em rotina no laboratório da EPAL.

Palavras-chave: alquilfenóis, SPE-GC/MS, LLE-GC/MS, ensaios a materiais, otimização, validação

ABSTRACT

This study has the objective of validation and implementation of an analytical method for the analysis of degradation products from stabilizing agents used in the composition of materials in contact with drinking water. The following compounds were studied: 4-ethylphenol, 4-tert-butylphenol, 2,6-di-tert-butyl-p-benzoquinone, 2,4-di-tert-butyl phenol, 3,5-di-tert-butyl-4-hydroxy styrene, 3,5-di-tert-butyl-4-hydroxybenzaldehyde, 3,5-di-tert-butyl-4-hydroxyacetophenone, 7,9-di-tert-butyl-1-oxaspiro[4.5]deca-6,9-diene-2,8-dione, methyl 3-(3,5-di-tert-butyl-4-hydroxyphenyl) propionate and 3-(3,5-di-tert-butyl-4-hydroxyphenyl) propionic acid. The studied water matrixes were drinking water, surface water and groundwater.

The sample preparation was accomplished with Liquid-Liquid Extraction and the analytical technique selected was Gas Chromatography coupled with Mass Spectrometry (LLE-GC/MS). Initially the proposed technique was Solid Phase Extraction (SPE), however, after different studies it became clear that this route was impracticable due to blank contamination with some of the studied compounds.

The method validation complied with all the necessary requirements to demonstrate the method's robustness. The correlation coefficient registered values between 0,9997 and 0,9999 and the residue analysis and Mandel tests offered acceptable results for all the compounds. The repeatability and the intermediate precision tests originated RSD (%) values below 10%. In the accuracy study it was obtained mean recovery percentages between 82% and 96% with a RSD (%) below 25%. The quantification limits obtained were inferior to 30% of the reference limits. The expanded uncertainty estimated led to the achievement of values below 50%. The execution of migration experiments of some materials used in the water supply system revealed the presence of compounds 2,6-di-tert-butyl-p-benzoquinone, 2,4-di-tert-butyl phenol, 3,5-di-tert-butyl-4-hydroxybenzaldehyde and methyl 3-(3,5-di-tert-butyl-4-hydroxyphenyl) propionate.

Regarding these results, the goal of this work was accomplished and the routine analysis in the EPAL's Laboratory can be implemented.

Keywords: alkylphenols, SPE-GC/MS, LLE-GC/MS, migration experiments, optimization, validation

ÍNDICE

1	INTRODUÇÃO	1
1.1	Motivação e enquadramento	1
1.2	Sistema de distribuição de água	2
1.3	Agentes estabilizantes.....	3
1.4	Produtos de degradação.....	9
1.5	Estado de arte.....	13
1.6	Mecanismos de degradação	23
1.7	Legislação.....	26
1.8	Empresa Portuguesa das Águas Livres, S.A.....	29
2	MÉTODO DE PREPARAÇÃO DA AMOSTRA	31
2.1	Extração em fase sólida (SPE)	31
2.1.1	Introdução	31
2.1.2	Princípios gerais.....	31
2.1.3	Etapas	32
2.1.4	Mecanismos de extração.....	34
2.1.5	Enchimentos.....	36
2.1.6	Otimização do processo SPE	36
2.2	Extração Líquido-Líquido (LLE).....	38
2.2.1	Introdução	38
2.2.2	Princípios Gerais	38
2.2.3	Otimização do processo LLE.....	39
3	CROMATOGRAFIA GASOSA / ESPETROMETRIA DE MASSA (GC/MS).....	43
3.1	Cromatografia gasosa	43
3.1.1	Introdução	43
3.1.2	Componentes de um cromatógrafo gasoso.....	44
3.1.3	Aspetos teóricos sobre cromatografia.....	49

3.2	Espetrometria de massa	59
3.2.1	Introdução	59
3.2.2	Componentes do Espetrómetro de Massas.....	60
3.3	Cromatografia gasosa acoplada a Espetrometria de Massa.....	64
4	ENSAIOS A MATERIAIS	65
4.1	Introdução.....	65
4.2	Etapas	65
4.3	Expressão dos resultados.....	67
5	VALIDAÇÃO DE MÉTODOS DE ENSAIO	69
5.1	Introdução.....	69
5.2	Avaliação Indireta.....	70
5.2.1	Seletividade (Especificidade).....	70
5.2.2	Precisão.....	70
5.2.3	Quantificação.....	72
5.3	Avaliação Direta	76
5.3.1	Exatidão	76
5.4	Estimativa das Incertezas.....	80
6	MATERIAIS E MÉTODOS	87
6.1	Equipamento e Material	87
6.2	Reagentes.....	87
6.3	Preparação das soluções padrão	89
6.3.1	Soluções padrão primárias individuais	89
6.3.2	Soluções padrão intermédias individuais	90
6.4	Extração em fase sólida	91
6.4.1	Preparação da solução conjunta e intermédia	91
6.4.2	Preparação das soluções padrão de trabalho.....	92
6.4.3	Preparação de soluções padrão de trabalho em matriz ajustada	93

6.4.4	Preparação das soluções de fortificação.....	94
6.5	Extração Líquido-Líquido	95
6.5.1	Solução padrão conjunta e intermédia	95
6.5.2	Solução conjunta dos padrões internos.....	96
6.5.3	Soluções padrão de trabalho	96
6.5.4	Soluções padrão de trabalho com padrões internos.....	97
6.5.5	Soluções de fortificação	98
6.5.6	Soluções padrão para o estudo da linearidade dos padrões internos.....	99
6.6	Condições do método cromatográfico.....	100
6.7	Validação do método de ensaio.....	104
6.7.1	Estudo de Linearidade.....	104
6.7.2	Limites analíticos instrumentais	104
6.7.3	Precisão.....	104
6.7.4	Efeito de Matriz.....	104
6.7.5	Ensaio de recuperação	105
6.8	Condições de preparação da amostra	106
6.8.1	Extração em Fase sólida.....	106
6.8.2	Extração Líquido-Líquido	107
6.9	Ensaio de migração a materiais.....	108
6.9.1	Condições do ensaio	108
7	APRESENTAÇÃO E DISCUSSÃO DE RESULTADOS	111
7.1	Identificação dos compostos em estudo	111
7.2	Validação do Método de Ensaio - SPE-GC/MS.....	122
7.2.1	Efeito de matriz.....	122
7.2.2	Ensaio de recuperação	124
7.2.3	<i>Troubleshooting</i> – Contaminação do branco	125
7.3	Validação do Método de Ensaio - LLE-GC/MS	130

7.3.1	Estudo de linearidade dos compostos.....	132
7.3.2	Confirmação da identidade dos compostos em estudo.....	137
7.3.3	Efeito de matriz.....	138
7.3.4	Identificação do padrões internos.....	139
7.3.5	Escolha do padrão interno para cada um dos compostos em análise.....	141
7.3.6	Estudo de Linearidade dos padrões internos.....	143
7.3.7	Estudo de Linearidade dos compostos usando padrões internos.....	144
7.3.8	Sensibilidade.....	151
7.3.9	Limiares Analíticos instrumentais.....	151
7.3.10	Precisão.....	154
7.3.11	Ensaio de recuperação	157
7.3.1	Estabilidade da amostra	161
7.3.1	Estabilidade do extrato	162
7.3.2	Limite de quantificação do método.....	163
7.3.3	Incertezas	164
7.4	Ensaio de migração a materiais	167
8	CONCLUSÃO	173
A.	PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS.....	183
B.	MÉTODO DOS MÍNIMOS QUADRADOS	185
C.	ANÁLISE DE RESÍDUOS	189
D.	TESTE DE MANDEL.....	201
E.	TESTE DE RIKILT	227
F.	TESTE DAS ÁREAS NORMALIZADAS	243
G.	TESTE DE HOMOGENEIDADE DE VARIÂNCIAS.....	259
H.	LIMIARES ANALÍTICOS (LOQ E LOD)	267
I.	PRECISÃO	283
J.	VALIDAÇÃO DO MÉTODO EM SPE.....	285
K.	ENSAIOS DE MIGRAÇÃO A MATERIAIS	289

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.1- Diferentes tipos de tubos utilizados no sistema de distribuição de água.....	2
Figura 1.2- Mecanismo de degradação dos polímeros.....	3
Figura 1.3- Estrutura química do fenol.....	9
Figura 1.4- Materiais onde foram detetados produtos de degradação.....	13
Figura 1.5- Materiais com antioxidantes na sua constituição.....	23
Figura 1.6- Mecanismo de formação do <i>Irgafos 168</i>	23
Figura 1.7- Mecanismo de degradação do <i>Irgafos 168</i>	24
Figura 1.8- Mecanismo de formação do <i>Irganox 1010</i> e do <i>Irganox 1076</i>	24
Figura 1.9- Mecanismo de degradação do <i>Irganox 1010</i>	25
Figura 1.10- Mecanismo de degradação do composto X.....	25
Figura 2.1- Etapas referentes ao SPE.....	34
Figura 2.2- Seleção do melhor tipo de enchimento.....	35
Figura 2.3- Constituintes do cartucho de SPE.....	36
Figura 2.4- Etapas da LLE.....	39
Figura 2.5- Etapas da LLE fracionada.....	41
Figura 3.1- Etapas da separação dos compostos numa amostra em GC.....	43
Figura 3.2- Constituintes do injetor.....	45
Figura 3.3- Constituintes da coluna capilar.....	46
Figura 3.4- Representação de um cromatograma típico.....	50
Figura 3.5- Formas possíveis dos picos cromatográficos.....	53
Figura 3.6- Pico cromatográfico com fenómeno de <i>Tailing</i>	54
Figura 3.7- Representação da largura da base do pico cromatográfico.....	55
Figura 3.8- Representação dos termos relevantes da equação de Van Deemter.....	57
Figura 3.9- Efeito do gás de arraste na equação de Van Deemter.....	58
Figura 3.10- Separação incompleta de dois picos cromatográficos.....	59
Figura 3.11- Representação de uma fonte de ionização EI. Adaptado de [95].....	61
Figura 3.12- Vantagens dos diferentes tipos de analisadores de massas.....	62
Figura 3.13- Representação de um analisador do tipo quadrupolo. Adaptado de [97].....	63
Figura 3.14- Tipos de multiplicadores de eletrões: A- Multiplicador contínuo; B- Multiplicador discreto.....	63

Figura 3.15- Representação dos componentes do GC/MS.....	64
Figura 4.1- Esquema do procedimento de ensaio a 23 °C, com águas de ensaio cloradas e não cloradas.....	66
Figura 6.1- Segmento do cromatograma obtido com as condições operacionais iniciais do forno (tabela 6.17)	101
Figura 6.2- Segmento do cromatograma obtido com as condições operacionais finais do forno (tabela 6.18)	102
Figura 7.1- Cromatograma com o modo de operação <i>Full Scan</i> tendo em conta as condições operacionais iniciais do forno obtido pela análise da solução conjunta	111
Figura 7.2- Espetro de massa do 4-etilfenol (I)	112
Figura 7.3- Mecanismo de fragmentação proposto do 4-etilfenol (I).....	113
Figura 7.4- Espetro de massa do 4-terc-butilfenol (II)	113
Figura 7.5- Espetro de massa do 2,6-di-terc-butil-p-benzoquinona (III).....	114
Figura 7.6- Mecanismo de fragmentação proposto do 2,6-di-terc-butil-p-benzoquinona (III)	114
Figura 7.7- Espetro de massa do 2,4-di-terc-butilfenol (IV).....	115
Figura 7.8- Espetro de massa do 2,6-di-terc-butil-4-vinilfenol (V).....	115
Figura 7.9- Espetro de massa do 3,5-di-terc-butil-4-hidroxibenzaldeído (VI)	116
Figura 7.10- Mecanismo de fragmentação proposto do 3,5-di-terc-butil-4-hidroxibenzaldeído (VI)	116
Figura 7.11- Espetro de massa do 3,5-di-terc-butil-4-hidroxiacetofenona (VII)	117
Figura 7.12- Mecanismo de fragmentação proposto do 3,5-di-terc-butil-4-hidroxiacetofenona (VII).....	117
Figura 7.13- Espetro de massa do 3-(3,5-di-terc-butil-4-hidroxifenil) propionato de metilo (IX)	117
Figura 7.14- Segmento do cromatograma obtido na análise do 7,9-di-terc-butil-1-oxaspiro (4,5) deca-6,9-dieno-2,8-diona (VIII) em modo <i>Full scan</i>	118
Figura 7.15- Espetro de massa do 7,9-di-terc-butil-1-oxaspiro (4,5) deca-6,9-dieno-2,8-diona (VIII) ao $t_R=18,14$ min.....	118
Figura 7.16- Espetro de massa do pico cromatográfico da impureza 1 ao $t_R=16,41$ min.....	119
Figura 7.17- Segmento do cromatograma obtido do composto Ácido 3-(3,5-di-terc-butil-4-hidroxifenil) propiónico (X) em modo <i>Full scan</i>	120
Figura 7.18- Espetro de massa do ácido 3-(3,5-di-terc-butil-4- hidroxifenil) propiónico (X) ao $t_R=18,46$ min.....	120

Figura 7.19- Espetro de massa do pico cromatográfico da impureza 1 ao $t_R=16,43$ min.....	121
Figura 7.20- Espetro de massa do pico cromatográfico da impureza 2 ao $t_R=18,19$ min	121
Figura 7.21- Efeito de matriz em diferentes matrizes por SPE	122
Figura 7.22- Efeito de matriz em águas de consumo humano por SPE em matriz ajustada..	123
Figura 7.23- Intensidade do sinal cromatográfico dos compostos em estudo no extrato do ensaio em branco	126
Figura 7.24- Diagrama causa-efeito referente à contaminação do branco.....	127
Figura 7.25- Diferença entre a intensidade do sinal cromatográfico obtido nos extratos dos brancos em SPE e LLE	131
Figura 7.26- Representação gráfica da reta de calibração do 4-etilfenol (I)	133
Figura 7.27- Representação gráfica da reta de calibração do 4-terc-butilfenol (II)	133
Figura 7.28- Representação gráfica da reta de calibração do 2,6-di-terc-butil-p-benzoquinona (III).....	134
Figura 7.29- Representação gráfica da reta de calibração do 2,4-di-terc-butilfenol (IV).....	134
Figura 7.30- Representação gráfica da reta de calibração do 3,5-di-terc-butil-4-hidroxibenzaldeído (VI)	134
Figura 7.31- Representação gráfica da reta de calibração do 3,5-di-terc-butil-4-hidroxiacetofenona (VII).....	135
Figura 7.32- Representação gráfica da reta de calibração do 3-(3,5-di-terc-butil-4-hidroxifenil) propionato de metilo (IX).....	135
Figura 7.33- Efeito de matriz em águas de consumo humano por LLE.....	138
Figura 7.34- Espetro de massa do 4-etilfenol- d_{10}	140
Figura 7.35- Espetro de massa do 4-terc-butil- d_9 -fenol-2,3,5,6- d_4	140
Figura 7.36- Cromatograma da mistura de compostos em estudo e dos padrões internos deuterados obtido após análise por GC-MS em modo <i>Full Scan</i>	141
Figura 7.37- Representação gráfica da reta de calibração do 4-etilfenol- d_{10}	143
Figura 7.38- Representação gráfica da reta de calibração 4-terc-butil- d_9 -fenol-2,3,5,6- d_4	143
Figura 7.39- Representação gráfica da reta de calibração do 4-etilfenol com padrão interno (4-etilfenol- d_{10}).....	145
Figura 7.40- Representação gráfica da reta de calibração do 4-terc-butilfenol com padrão interno (4-terc-butil- d_9 -fenol-2,3,5,6- d_4).....	145
Figura 7.41- Representação gráfica da reta de calibração do 2,6-di-terc-butil-p-benzoquinona com padrão interno (4-terc-butil- d_9 -fenol-2,3,5,6- d_4)	146

Figura 7.42- Representação gráfica da reta de calibração do 2,4-di-terc-butilfenol com padrão interno (4-terc-butil-d ₉ -fenol-2,3,5,6-d ₄).....	146
Figura 7.43- Representação gráfica da reta de calibração do 3,5-di-terc-butil-4-hidroxibenzaldeído com padrão interno (4-terc-butil-d ₉ -fenol-2,3,5,6-d ₄)	147
Figura 7.44- Representação gráfica da reta de calibração do 3,5-di-terc-butil-4-hidroxiacetofenona com padrão interno (4-terc-butil-d ₉ -fenol-2,3,5,6-d ₄).....	147
Figura 7.45- Representação gráfica da reta de calibração do 3-(3,5-di-terc-butil-4-hidroxifenil) propionato de metilo com padrão interno (4-terc-butil-d ₉ -fenol-2,3,5,6-d ₄).....	148
Figura 7.46- Representação gráfica da sensibilidade para cada composto em estudo	151
Figura 7.47- Recuperações obtidas através do método sem padrão interno para amostras de água de consumo humano.....	158
Figura 7.48- Recuperação média dos compostos em estudo em diferentes extratos da amostra analisadas ao longo do tempo.....	161
Figura 7.49- Concentração dos compostos em estudo em diferentes extratos analisados ao longo do tempo	163
Figura C.1- Representação gráfica da concentração do 4-etilfenol sem padrão interno em função dos resíduos	190
Figura C.2- Representação gráfica da concentração do 4-etilfenol com padrão interno em função dos resíduos	191
Figura C.3- Representação gráfica da concentração do 4-terc-butilfenol sem padrão interno em função dos resíduos.....	191
Figura C.4- Representação gráfica da concentração do 4-terc-butilfenol com padrão interno em função dos resíduos.....	192
Figura C.5- Representação gráfica da concentração do 2,6-di-terc-butil-p-benzoquinona sem padrão interno em função dos resíduos	193
Figura C.6- Representação gráfica da concentração do 2,6-di-terc-butil-p-benzoquinona com padrão interno em função dos resíduos	193
Figura C.7- Representação gráfica da concentração do 2,4-di-terc-butilfenol sem padrão interno em função dos resíduos.....	194
Figura C.8- Representação gráfica da concentração do 2,4-di-terc-butilfenol com padrão interno em função dos resíduos.....	195
Figura C.9- Representação gráfica da concentração do 3,5-di-terc-butil-4-hidroxibenzaldeído sem padrão interno em função dos resíduos.....	195

Figura C.10 -Representação gráfica da concentração do 3,5-di-terc-butil-4-hidroxibenzaldeído com padrão interno em função dos resíduos	196
Figura C.11 -Representação gráfica da concentração do 3,5-di-terc-butil-4-hidroxiacetofenona sem padrão interno em função dos resíduos.....	197
Figura C.12 -Representação gráfica da concentração do 3,5-di-terc-butil-4-hidroxiacetofenona com padrão interno em função dos resíduos	197
Figura C.13 - Representação gráfica da concentração do 3-(3,5-di-terc-butil-4-hidroxifenil) propionato de metilo sem padrão interno em função dos resíduos.....	198
Figura C.14 - Representação gráfica da concentração do 3-(3,5-di-terc-butil-4-hidroxifenil) propionato de metilo com padrão interno em função dos resíduos.....	199
Figura C.15 -Representação gráfica da concentração do 4-etilfenol-d ₁₀ em função dos resíduos	199
Figura C.16 -Representação gráfica da concentração do 4-terc-butil-d ₉ -fenol-2,3,5,6-d ₄ em função dos resíduos	200
Figura D.1 -Representação gráfica dos ajustes linear e polinomial para o 4-etilfenol sem padrão interno	202
Figura D.2 -Representação gráfica dos ajustes linear e polinomial para o 4-etilfenol com padrão interno	204
Figura D.3 -Representação gráfica dos ajustes linear e polinomial para o 4-terc-butilfenol sem padrão interno.....	205
Figura D.4 -Representação gráfica dos ajustes linear e polinomial para o 4-terc-butilfenol com padrão interno.....	207
Figura D.5 -Representação gráfica dos ajustes linear e polinomial para o 2,6-di-terc-butil-p-benzoquinona sem padrão interno.....	208
Figura D.6 - Representação gráfica dos ajustes linear e polinomial para o 2,6-di-terc-butil-p-benzoquinona com padrão interno.....	210
Figura D.7 -Representação gráfica dos ajustes linear e polinomial para o 2,4-di-terc-butilfenol sem padrão interno	211
Figura D.8 - Representação gráfica dos ajustes linear e polinomial para o 2,4-di-terc-butilfenol com padrão interno.....	213
Figura D.9 -Representação gráfica dos ajustes linear e polinomial para o 3,5-di-ter-butil-4-hidroxibenzaldeído sem padrão interno	214
Figura D.10 -Representação gráfica dos ajustes linear e polinomial para o 3,5-di-ter-butil-4-hidroxibenzaldeído com padrão interno.....	216

Figura D.11 -Representação gráfica dos ajustes linear e polinomial para o 3,5-di-ter-butil-4-hidroxiacetofenona sem padrão interno	217
Figura D.12 -Representação gráfica dos ajustes linear e polinomial para o 3,5-di-ter-butil-4-hidroxiacetofenona com padrão interno.....	219
Figura D.13 -Representação gráfica dos ajustes linear e polinomial para o 3-(3,5-di-terc-butil-4-hidroxifenil) propionato de metilo sem padrão interno.....	220
Figura D. 14 -Representação gráfica dos ajustes linear e polinomial para o 3-(3,5-di-terc-butil-4-hidroxifenil) propionato de metilo com padrão interno	222
Figura D.15 -Representação gráfica dos ajustes linear e polinomial para o 4-etilfenol-d ₁₀	223
Figura D.16 -Representação gráfica dos ajustes linear e polinomial para o 4-terc-butil-d ₉ -fenol-2,3,5,6-d ₄	225
Figura E.1 -Representação gráfica do teste de RIKILT para o 4-etilfenol sem padrão interno	228
Figura E.2 -Representação gráfica do teste de RIKILT para o 4-etilfenol com padrão interno	229
Figura E.3 -Representação gráfica do teste de RIKILT para o 4-terc-butilfenol sem padrão interno	230
Figura E.4 -Representação gráfica do teste de RIKILT para o 4-terc-butilfenol com padrão interno	231
Figura E.5 -Representação gráfica do teste de RIKILT para o 2,6-di-terc-butil-p-benzoquinona sem padrão interno	232
Figura E.6 -Representação gráfica do teste de RIKILT para o 2,6-di-terc-butil-p-benzoquinona com padrão interno.....	233
Figura E.7 -Representação gráfica do teste de RIKILT para o 2,4-di-terc-butilfenol sem padrão interno	234
Figura E.8 -Representação gráfica do teste de RIKILT para o 2,4-di-terc-butilfenol com padrão interno	235
Figura E.9 -Representação gráfica do teste de RIKILT para o 3,5-di-terc-butil-4-hidroxibenzaldeído sem padrão interno	236
Figura E.10 -Representação gráfica do teste de RIKILT para o 3,5-di-terc-butil-4-hidroxibenzaldeído com padrão interno.....	237
Figura E.11 -Representação gráfica do teste de RIKILT para o 3,5-di-terc-butil-4-hidroxiacetofenona sem padrão interno.....	238
Figura E.12 -Representação gráfica do teste de RIKILT para o 3,5-di-terc-butil-4-hidroxiacetofenona com padrão interno.....	239

Figura E.13 -Representação gráfica do teste de RIKILT para o 3-(3,5-di-terc-butil-4-hidroxifenil) propionato de metilo sem padrão interno	240
Figura E.14 -Representação gráfica do teste de RIKILT para o 3-(3,5-di-terc-butil-4-hidroxifenil) propionato de metilo com padrão interno.....	241
Figura F.1 - Representação gráfica da concentração em função dos valores normalizados para o 4-etilfenol sem padrão interno	244
Figura F.2 -Representação gráfica da concentração em função dos valores normalizados para o 4-etilfenol com padrão interno	245
Figura F.3 -Representação gráfica da concentração em função dos valores normalizados para o 4-terc-butilfenol sem padrão interno	246
Figura F.4 -Representação gráfica da concentração em função dos valores normalizados para o 4-terc-butilfenol com padrão interno.....	247
Figura F.5 -Representação gráfica da concentração em função dos valores normalizados para o 2,6-di-terc-butil-p-benzoquinona sem padrão interno.....	248
Figura F.6 -Representação gráfica da concentração em função dos valores normalizados para o 2,6-di-terc-butil-p-benzoquinona com padrão interno	249
Figura F.7 -Representação gráfica da concentração em função dos valores normalizados para o 2,4-di-terc-butilfenol sem padrão interno.....	250
Figura F.8 -Representação gráfica da concentração em função dos valores normalizados para o 2,4-di-terc-butilfenol com padrão interno	251
Figura F.9 -Representação gráfica da concentração em função dos valores normalizados para o 3,5-di-terc-butil-4-hidroxibenzaldeído sem padrão interno	252
Figura F.10 -Representação gráfica da concentração em função dos valores normalizados para o 3,5-di-terc-butil-4-hidroxibenzaldeído com padrão interno.....	253
Figura F.11 -Representação gráfica da concentração em função dos valores normalizados para o 3,5-di-terc-butil-4-hidroxiacetofenona sem padrão interno	254
Figura F.12 -Representação gráfica da concentração em função dos valores normalizados para o 3,5-di-terc-butil-4-hidroxiacetofenona com padrão interno.....	255
Figura F.13 -Representação gráfica da concentração em função dos valores normalizados para o 3-(3,5-di-terc-butil-4-hidroxifenil) propionato de metilo sem padrão interno	256
Figura F.14 -Representação gráfica da concentração em função dos valores normalizados para o 3-(3,5-di-terc-butil-4-hidroxifenil) propionato de metilo com padrão interno.....	257

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1.1 - Propriedades físico-químicas e aplicações dos agentes estabilizantes	5
Tabela 1.2 - Propriedades físico químicas dos produtos de degradação	10
Tabela 1.3 -Métodos analíticos aplicados na identificação dos compostos em estudo	16
Tabela 1.4 - Padrões internos usados na análise dos compostos em estudo	22
Tabela 1.5 - Mecanismos de formação possíveis dos produtos de degradação	26
Tabela 1.6 - Limites de referência dos produtos de degradação.....	28
Tabela 3.1 -Tipos de detetores associados ao GC	48
Tabela 6.1 - Concentração das soluções padrão primárias individuais	89
Tabela 6.2 - Concentração das soluções padrão primárias individuais dos padrões internos ..	90
Tabela 6.3 - Concentração das soluções intermédias individuais.....	90
Tabela 6.4 - Concentração da solução padrão conjunta e das soluções intermédias I e II usadas na validação do SPE-GC/MS.....	91
Tabela 6.5 -Concentrações das soluções padrão de trabalho usadas na validação do SPE-GC/MS	92
Tabela 6.6 -Concentração das soluções padrão de trabalho em matriz ajustada usadas na validação do SPE-GC/MS.....	93
Tabela 6.7 - Concentração da solução de fortificação usada na validação do SPE-GC/MS.....	94
Tabela 6.8 - Concentração da solução padrão conjunta e intermédia I usadas na validação do LLE-GC/MS	95
Tabela 6.9 -Concentração da solução conjunta dos padrões internos.....	96
Tabela 6.10 - Concentração das soluções padrão de trabalho usadas na validação do LLE-GC/MS.....	96
Tabela 6.11 - Concentração das soluções padrão de trabalho com padrões internos usadas na validação do LLE-GC/MS	97
Tabela 6.12 -Concentração da solução de fortificação usadas na validação do LLE-GC/MS.....	98
Tabela 6.13 -Concentração da solução de fortificação dos padrões internos usadas na validação do LLE-GC/MS.....	98
Tabela 6.14 - Concentração das soluções padrão de trabalho dos padrões internos.....	99
Tabela 6.15 - Condições do injetor	100
Tabela 6.16 - Condições da coluna cromatográfica	100

Tabela 6.17- Condições operacionais do forno sem padrões internos	100
Tabela 6.18- Condições operacionais do forno com padrões internos.....	101
Tabela 6.19- Condições da interface.....	102
Tabela 6.20- Condições do detetor	102
Tabela 6.21- Modo de pesquisa no MS	103
Tabela 6.22- Iões característicos escolhidos para modo SIM e tempos de retenção.....	103
Tabela 6.23- Concentração da amostra fortificada para o nível baixo e para o nível alto usada na validação do LLE-GC/MS	106
Tabela 6.24- Concentração dos padrões internos na amostra fortificada para o nível baixo e para o nível alto usada na validação do LLE-GC/MS	106
Tabela 6.25- Condições da extração usadas em SPE	107
Tabela 6.26- Características das provetes utilizadas nos ensaios a materiais.....	109
Tabela 6.27- Características dos tubos utilizados nos ensaios a materiais.....	110
Tabela 7.1- Recuperações médias de diferentes tipos de amostras de águas de consumo humano, usando a calibração em matriz ajustada	124
Tabela 7.2- Recuperações médias de uma amostra de água de consumo humano	125
Tabela 7.3- Sinais cromatográficos obtidos nos solventes de lavagem e no ensaio em branco (água ultrapura) obtido por <i>manifold</i>	128
Tabela 7.4- Concentração estimada dos compostos presentes no solvente em contacto com o cartucho	129
Tabela 7.5- Resumo dos resultados da aplicação do método dos mínimos quadrados para os compostos em estudo	136
Tabela 7.6- Resumo dos resultados obtidos da aplicação do teste de Mandel para os compostos em estudo	136
Tabela 7.7- Resumo dos resultados obtidos da aplicação do Teste de RIKILT e do Teste das áreas normalizadas para os compostos em estudo	137
Tabela 7.8- Intensidade relativa entre o sinal de cada um dos iões de qualificação e o ião de quantificação	138
Tabela 7.9- Propriedades dos padrões internos deuterados dos compostos I e II	139
Tabela 7.10- Área relativa dos compostos na solução padrão de trabalho P5 e no extrato de uma amostra de água de consumo humano em relação ao 4-etilfenol-d ₁₀	142
Tabela 7.11- Área relativa dos compostos na solução padrão de trabalho P5 e no extrato de uma amostra de água de consumo humano em relação ao 4-terc-butil-d ₉ -fenol-2,3,5,6-d ₄	142

Tabela 7.12- Resumo dos resultados da aplicação do método dos mínimos quadrados para os padrões internos.....	144
Tabela 7.13- Resumo dos resultados de teste de Mandel para os padrões internos deuterados	144
Tabela 7.14- Resumo dos resultados da aplicação do método dos mínimos quadrados para os compostos em estudo com padrão interno.....	149
Tabela 7.15- Resumo dos resultados da aplicação do teste de Mandel para os compostos em estudo com padrão interno.....	149
Tabela 7.16- Resumo dos resultados obtidos da aplicação do Teste de RIKILT e do Teste das áreas normalizadas para os compostos em estudo com padrão interno.....	150
Tabela 7.17- Resumo dos resultados obtidos da aplicação do teste da homogeneidade de variâncias para os compostos em estudo	150
Tabela 7.18- Limiares analíticos obtidos para cada composto em estudo com padrão interno pela primeira e segunda abordagem.....	152
Tabela 7.19- Limiares analíticos determinados para o padrão com concentração mais baixa da gama de trabalho pela razão sinal/ruído	152
Tabela 7.20- Resumo dos resultados obtidos para a confirmação experimental do LOQ	153
Tabela 7.21- Resultados obtidos para a repetibilidade para a gama baixa dos compostos em estudo com padrão interno.....	154
Tabela 7.22- Resultados obtidos para a repetibilidade para a gama média dos compostos em estudo com padrão interno.....	154
Tabela 7.23- Resultados obtidos para a repetibilidade para a gama alta dos compostos em estudo com padrão interno.....	155
Tabela 7.24- Resultados obtidos para a precisão intermédia para a gama baixa dos compostos em estudo com padrão interno	155
Tabela 7.25- Resultados obtidos para a precisão intermédia para a gama média dos compostos em estudo com padrão interno	156
Tabela 7.26- Resultados obtidos para a precisão intermédia para a gama alta dos compostos em estudo com padrão interno	156
Tabela 7.27- Níveis de fortificação testados para cada composto no extrato das amostras..	158
Tabela 7.28- Percentagens de recuperação obtidas em águas de consumo humano, com padrão interno	159
Tabela 7.29- Percentagens de recuperação obtidas em águas superficiais, com padrão interno	159

Tabela 7.30- Percentagens de recuperação obtidas em águas subterrâneas, com padrão interno	160
Tabela 7.31- Percentagens de recuperação média global.....	160
Tabela 7.32- Resumo dos resultados obtidos no estudo da estabilidade da amostra	162
Tabela 7.33- Resumo dos resultados obtidos no estudo da estabilidade do extrato	163
Tabela 7.34- Limite de quantificação do método para os compostos com padrão interno ...	164
Tabela 7.35- Estimativa da incerteza expandida do método pela metodologia <i>bottom-up</i> . 164	
Tabela 7.36- Estimativa da incerteza expandida do método pela metodologia <i>top-down</i> pelo ISO 11352	165
Tabela 7.37- Estimativa da incerteza expandida do método pela metodologia <i>top-down</i> pelo Guia Nordtest.....	165
Tabela 7.38- Expressão de resultados da gama de trabalho usando 1 algarismo significativo na incerteza.....	166
Tabela 7.39- Expressão de resultados da gama de trabalho usando 2 algarismos significativos na incerteza.....	166
Tabela 7.40- Parâmetros necessários à realização dos ensaios a materiais.....	167
Tabela 7.41- Concentração dos compostos em estudo na amostra de migração com água clorada e não clorada	169
Tabela 7.42- Taxa de migração e concentração estimada na torneira do consumidor dos compostos no ensaio sem cloro e no ensaio com cloro.....	171
Tabela 8.1- Resumo final dos estudos de linearidade instrumentais para os compostos em estudo com padrão interno.....	175
Tabela 8.2- Resumo dos resultados obtidos do método de ensaio	175
Tabela A.1- Propriedades Físico-químicas dos produtos de degradação dos agentes estabilizantes.....	183
Tabela A.2- Propriedades Físico-químicas dos agentes estabilizantes.....	184
Tabela C.1- Desvios relativamente à concentração-alvo para o 4-etilfenol sem padrão interno	190
Tabela C.2- Desvios relativamente à concentração-alvo para o 4-etilfenol com padrão interno	190
Tabela C.3- Desvios relativamente à concentração-alvo para o 4-terc-butilfenol sem padrão interno	191
Tabela C.4- Desvios relativamente à concentração-alvo para o 4-terc-butilfenol com padrão interno	192

Tabela C.5- Desvios relativamente à concentração-alvo para o 2,6-di-terc-butil-p-benzoquinona sem padrão interno	192
Tabela C.6- Desvios relativamente à concentração-alvo para o 2,6-di-terc-butil-p-benzoquinona com padrão interno.....	193
Tabela C.7- Desvios relativamente à concentração-alvo para o 2,4-di-terc-butilfenol sem padrão interno.....	194
Tabela C.8- Desvios relativamente à concentração-alvo para o 2,4-di-terc-butilfenol com padrão interno.....	194
Tabela C.9- Desvios relativamente à concentração-alvo para o 3,5-di-terc-butil-4-hidroxibenzaldeído sem padrão interno	195
Tabela C.10- Desvios relativamente à concentração-alvo para o 3,5-di-terc-butil-4-hidroxibenzaldeído com padrão interno.....	196
Tabela C.11- Desvios relativamente à concentração-alvo para o 3,5-di-terc-butil-4-hidroxiacetofenona sem padrão interno.....	196
Tabela C.12- Desvios relativamente à concentração-alvo para o 3,5-di-terc-butil-4-hidroxiacetofenona com padrão interno.....	197
Tabela C.13- Desvios relativamente à concentração-alvo para o 3-(3,5-di-terc-butil-4-hidroxifenil) propionato de metilo sem padrão interno.....	198
Tabela C.14- Desvios relativamente à concentração-alvo para o 3-(3,5-di-terc-butil-4-hidroxifenil) propionato de metilo com padrão interno	198
Tabela C.15- Desvios relativamente à concentração-alvo para o composto 4-etilfenol-d ₁₀ ...	199
Tabela C.16- Desvios relativamente à concentração-alvo para o composto 4-terc-butil-d ₉ -fenol-2,3,5,6-d ₄	200
Tabela D.1- Áreas calculadas para os ajustes linear e polinomial para o 4-etilfenol sem padrão interno	202
Tabela D.2- Erros quadráticos obtidos para cada ajuste e respetivo desvio padrão residual para o 4-etilfenol sem padrão interno	203
Tabela D.3- Áreas calculadas para os ajustes linear e polinomial para o 4-etilfenol com padrão interno	203
Tabela D.4- Erros quadráticos obtidos para cada ajuste e respetivo desvio padrão residual para o 4-etilfenol com padrão interno.....	204
Tabela D.5- Áreas calculadas para os ajustes linear e polinomial para o 4-terc-butilfenol sem padrão interno.....	205

Tabela D.6- Erros quadráticos obtidos para cada ajuste e respectivo desvio padrão residual para o 4-terc-butilfenol sem padrão interno.....	206
Tabela D.7- Áreas calculadas para os ajustes linear e polinomial para o 4-terc-butilfenol com padrão interno.....	206
Tabela D.8- Erros quadráticos obtidos para cada ajuste e respectivo desvio padrão residual para o 4-terc-butilfenol com padrão interno.....	207
Tabela D.9- Áreas calculadas para os ajustes linear e polinomial para o 2,6-di-terc-butil-p-benzoquinona sem padrão interno.....	208
Tabela D.10- Erros quadráticos obtidos para cada ajuste e respectivo desvio padrão residual para o 2,6-di-terc-butil-p-benzoquinona sem padrão interno.....	209
Tabela D.11- Áreas calculadas para os ajustes linear e polinomial para o 2,6-di-terc-butil-p-benzoquinona com padrão interno.....	209
Tabela D.12- Erros quadráticos obtidos para cada ajuste e respectivo desvio padrão residual para o 2,6-di-terc-butil-p-benzoquinona com padrão interno.....	210
Tabela D.13- Áreas calculadas para os ajustes linear e polinomial para o 2,4-di-terc-butilfenol sem padrão interno.....	211
Tabela D.14- Erros quadráticos obtidos para cada ajuste e respectivo desvio padrão residual para o 2,4-di-terc-butilfenol sem padrão interno.....	212
Tabela D.15- Áreas calculadas para os ajustes linear e polinomial para o 2,4-di-terc-butilfenol com padrão interno.....	212
Tabela D.16- Erros quadráticos obtidos para cada ajuste e respectivo desvio padrão residual para o 2,4-di-terc-butilfenol com padrão interno.....	213
Tabela D.17- Áreas calculadas para os ajustes linear e polinomial para o 3,5-di-ter-butil-4-hidroxibenzaldeído sem padrão interno.....	214
Tabela D.18- Erros quadráticos obtidos para cada ajuste e respectivo desvio padrão residual para o 3,5-di-ter-butil-4-hidroxibenzaldeído sem padrão interno.....	215
Tabela D.19- Áreas calculadas para os ajustes linear e polinomial para o 3,5-di-ter-butil-4-hidroxibenzaldeído com padrão interno.....	215
Tabela D.20- Erros quadráticos obtidos para cada ajuste e respectivo desvio padrão residual para o 3,5-di-ter-butil-4-hidroxibenzaldeído com padrão interno.....	216
Tabela D.21- Áreas calculadas para os ajustes linear e polinomial para o 3,5-di-ter-butil-4-hidroxiacetofenona sem padrão interno.....	217
Tabela D.22- Erros quadráticos obtidos para cada ajuste e respectivo desvio padrão residual para o 3,5-di-ter-butil-4-hidroxiacetofenona sem padrão interno.....	218

Tabela D.23 –Áreas calculadas para os ajustes linear e polinomial para o 3,5-di-ter-butil-4-hidroxiacetofenona com padrão interno.....	218
Tabela D.24 –Erros quadráticos obtidos para cada ajuste e respectivo desvio padrão residual para o 3,5-di-ter-butil-4-hidroxiacetofenona com padrão interno.....	219
Tabela D.25 –Áreas calculadas para os ajustes linear e polinomial para o 3-(3,5-di-terc-butil-4-hidroxifenil) propionato de metilo sem padrão interno.....	220
Tabela D.26 –Erros quadráticos obtidos para cada ajuste e respectivo desvio padrão residual para o 3-(3,5-di-terc-butil-4-hidroxifenil) propionato de metilo sem padrão interno	221
Tabela D.27 –Áreas calculadas para os ajustes linear e polinomial para o 3-(3,5-di-terc-butil-4-hidroxifenil) propionato de metilo com padrão interno	221
Tabela D.28 –Erros quadráticos obtidos para cada ajuste e respectivo desvio padrão residual para o 3-(3,5-di-terc-butil-4-hidroxifenil) propionato de metilo com padrão interno.....	222
Tabela D.29 –Áreas calculadas para os ajustes linear e polinomial para 4-etilfenol-d ₁₀	223
Tabela D.30 –Erros quadráticos obtidos para cada ajuste e respectivo desvio padrão residual para o 4-etilfenol-d ₁₀	224
Tabela D.31 –Áreas calculadas para os ajustes linear e polinomial para o 4-terc-butil-d ₉ -fenol-2,3,5,6-d ₄	225
Tabela D.32 –Erros quadráticos obtidos para cada ajuste e respectivo desvio padrão residual para o 4-terc-butil-d ₉ -fenol-2,3,5,6-d ₄	226
Tabela E.1 –Cálculo das razões para o teste de RIKILT para o 4-etilfenol sem padrão interno	228
Tabela E.2 –Cálculo das razões para o teste de RIKILT para o 4-etilfenol com padrão interno	229
Tabela E.3 –Cálculo das razões para o teste de RIKILT para o 4-terc-butilfenol sem padrão interno	230
Tabela E.4 –Cálculo das razões para o teste de RIKILT para o 4-terc-butilfenol com padrão interno	231
Tabela E.5 –Cálculo das razões para o teste de RIKILT para o 2,6-di-terc-butil-p-benzoquinona sem padrão interno	232
Tabela E.6 –Cálculo das razões para o teste de RIKILT para o 2,6-di-terc-butil-p-benzoquinona com padrão interno.....	233
Tabela E.7 –Cálculo das razões para o teste de RIKILT para o composto 2,4-di-terc-butilfenol sem padrão interno	234

Tabela E.8 -Cálculo das razões para o teste de RIKILT para o composto 2,4-di-terc-butilfenol com padrão interno.....	235
Tabela E.9 -Cálculo das razões para o teste de RIKILT para o 3,5-di-terc-butil-4-hidroxibenzaldeído sem padrão interno	236
Tabela E.10 -Cálculo das razões para o teste de RIKILT para o 3,5-di-terc-butil-4-hidroxibenzaldeído com padrão interno.....	237
Tabela E.11 -Cálculo das razões para o teste de RIKILT para o 3,5-di-terc-butil-4-hidroxiacetofenona sem padrão interno	238
Tabela E.12 -Cálculo das razões para o teste de RIKILT para o 3,5-di-terc-butil-4-hidroxiacetofenona com padrão interno.....	239
Tabela E.13 -Cálculo das razões para o teste de RIKILT para o 3-(3,5-di-terc-butil-4-hidroxifenil) propionato de metilo sem padrão interno	240
Tabela E.14 -Cálculo das razões para o teste de RIKILT para o 3-(3,5-di-terc-butil-4-hidroxifenil) propionato de metilo com padrão interno.....	241
Tabela F.1 - Cálculo dos valores normalizados para o 4-etilfenol sem padrão interno	244
Tabela F.2 -Cálculo dos valores normalizados para o 4-etilfenol com padrão interno	245
Tabela F.3 -Cálculo dos valores normalizados para o 4-terc-butilfenol sem padrão interno .	246
Tabela F.4 -Cálculo dos valores normalizados para o 4-terc-butilfenol com padrão interno.	247
Tabela F.5 -Cálculo dos valores normalizados para o 2,6-di-terc-butil-p-benzoquinona sem padrão interno.....	248
Tabela F.6 -Cálculo dos valores normalizados para o 2,6-di-terc-butil-p-benzoquinona com padrão interno.....	249
Tabela F.7 -Cálculo dos valores normalizados para o 2,4-di-terc-butilfenol sem padrão interno	250
Tabela F.8 -Cálculo dos valores normalizados para o 2,4-di-terc-butilfenol com padrão interno	251
Tabela F.9 -Cálculo dos valores normalizados para o 3,5-di-terc-butil-4-hidroxibenzaldeído sem padrão interno.....	252
Tabela F.10 -Cálculo dos valores normalizados para o 3,5-di-terc-butil-4-hidroxibenzaldeído com padrão interno.....	253
Tabela F.11 -Cálculo dos valores normalizados para o 3,5-di-terc-butil-4-hidroxiacetofenona sem padrão interno	254
Tabela F.12 -Cálculo dos valores normalizados para o 3,5-di-terc-butil-4-hidroxiacetofenona com padrão interno.....	255

Tabela F.13 -Cálculo dos valores normalizados para o 3-(3,5-di-terc-butil-4-hidroxifenil) propionato de metilo sem padrão interno.....	256
Tabela F.14 -Cálculo dos valores normalizados para o 3-(3,5-di-terc-butil-4-hidroxifenil) propionato de metilo com padrão interno.....	257
Tabela G.1 -Áreas obtidas nas duas gamas de concentração para o 4-etilfenol sem padrão interno	260
Tabela G.2 -Áreas obtidas nas duas gamas de concentração para o 4-terc-butilfenol sem padrão interno	261
Tabela G.3 -Áreas obtidas nas duas gamas de concentração para o 2,6-di-terc-butil-p-benzoquinona sem padrão interno.....	262
Tabela G.4 -Áreas obtidas nas duas gamas de concentração para o 2,4-di-terc-butilfenol sem padrão interno.....	263
Tabela G.5 -Áreas obtidas nas duas gamas de concentração para o 3,5-di-terc-butil-4-hidroxibenzaldeído sem padrão interno	264
Tabela G.6 -Áreas obtidas nas duas gamas de concentração para o 3,5-di-terc-butil-4-hidroxiacetofenona sem padrão interno	265
Tabela G.7 -Áreas obtidas nas duas gamas de concentração para o 3-(3,5-di-terc-butil-4-hidroxifenil) propionato de metilo sem padrão interno.....	266
Tabela H.1 -Limiares analíticos calculados pela reta de calibração dos compostos sem e com padrão interno.....	267
Tabela H.2 -Áreas e concentrações estimadas para o padrão de menor concentração do 4-etilfenol sem padrão interno.....	268
Tabela H.3 -Áreas e concentrações estimadas para o padrão de menor concentração do 4-etilfenol com padrão interno	269
Tabela H.4 -Limiares analíticos calculados pela razão sinal ruído para o 4-etilfenol	269
Tabela H.5 -Áreas e concentrações estimadas para o padrão de menor concentração do 4-terc-butilfenol sem padrão interno.....	270
Tabela H.6 -Áreas e concentrações estimadas para o padrão de menor concentração do 4-terc-butilfenol com padrão interno	271
Tabela H.7 -Limiares analíticos calculados pela razão sinal ruído para o 4-terc-butilfenol.....	271
Tabela H.8 -Áreas e concentrações estimadas para o padrão de menor concentração do 2,6-di-terc-butil-p-benzoquinona sem padrão interno	272
Tabela H.9 -Áreas e concentrações estimadas para o padrão de menor concentração do 2,6-di-terc-butil-p-benzoquinona com padrão interno.....	273

Tabela H.10 -Limiars analíticos calculados pela razão sinal ruído para o 2,6-di-terc-butil-p-benzoquinona.....	273
Tabela H.11 -Áreas e concentrações estimadas para o padrão de menor concentração do 2,4-di-terc-butilfenol sem padrão interno.....	274
Tabela H.12 -Áreas e concentrações estimadas para o padrão de menor concentração do 2,4-di-terc-butilfenol com padrão interno	275
Tabela H.13 -Limiars analíticos calculados pela razão sinal ruído para o 2,4-di-terc-butilfenol	275
Tabela H.14 -Áreas e concentrações estimadas para o padrão de menor concentração do 3,5-di-terc-butil-4-hidroxibenzaldeído sem padrão interno	276
Tabela H.15 -Áreas e concentrações estimadas para o padrão de menor concentração do 3,5-di-terc-butil-4-hidroxibenzaldeído com padrão interno.....	277
Tabela H.16 -Limiars analíticos calculados pela razão sinal ruído para o 3,5-di-terc-butil-4-hidroxibenzaldeído	277
Tabela H.17 -Áreas e concentrações estimadas para o padrão de menor concentração do 3,5-di-terc-butil-4-hidroxiacetofenona sem padrão interno.....	278
Tabela H.18 -Áreas e concentrações estimadas para o padrão de menor concentração do 3,5-di-terc-butil-4-hidroxiacetofenona com padrão interno	279
Tabela H.19 -Limiars analíticos calculados pela razão sinal ruído para o 3,5-di-terc-butil-4-hidroxiacetofenona.....	279
Tabela H.20 -Áreas e concentrações estimadas para o padrão de menor concentração do 3-(3,5-di-terc-butil-4-hidroxifenil) propionato de metilo sem padrão interno	280
Tabela H.21 -Áreas e concentrações estimadas para o padrão de menor concentração do 3-(3,5-di-terc-butil-4-hidroxifenil) propionato de metilo com padrão interno.....	281
Tabela H.22 -Limiars analíticos calculados pela razão sinal ruído para o 3-(3,5-di-terc-butil-4-hidroxifenil) propionato de metilo.....	281
Tabela I.1 -Ensaio de repetibilidade para a gama baixa dos compostos em estudo sem padrão interno	283
Tabela I.2 -Ensaio de repetibilidade para a gama média dos compostos em estudo sem padrão interno	283
Tabela I.3 -Ensaio de repetibilidade para a gama alta dos compostos em estudo sem padrão interno	284
Tabela I.4 -Ensaio de repetibilidade dos padrões internos.....	284

Tabela J.1 -Resumo dos resultados obtidos da aplicação do método dos mínimos quadrados para a gama de trabalho entre 5-50 µg/L.....	285
Tabela J.2 -Resumo dos resultados obtidos da aplicação dos testes de linearidade para a gama de trabalho entre 5-50 µg/L.....	285
Tabela J.3 -Limites de deteção e quantificação obtidos para cada composto para a gama de trabalho entre 5-50 µg/L.....	286
Tabela J.4 -Resumo dos resultados obtidos para a confirmação experimental do LOQ para a gama de trabalho entre 5-50 µg/L.....	286
Tabela J.5 -Resultados obtidos nos estudos de precisão em condições de repetibilidade para a gama baixa entre 5-50 µg/L.....	287
Tabela J.6 -Resultados obtidos nos estudos de precisão em condições de repetibilidade para a gama média entre 5-50 µg/L.....	287
Tabela J.7 - Resultados obtidos nos estudos de precisão em condições de repetibilidade para a gama alta entre 5-50 µg/L.....	288
Tabela K.1 -Concentração de cloro nas águas cloradas utilizadas nos ensaios a materiais	289
Tabela K.2 -Fatores de conversão aplicados nos diferentes grupos de produtos.....	290

SIGLAS, ACRÓNIMOS E ABREVIATURAS

I	4-etilfenol
I-d₁₀	4-etilfenol-d ₁₀
II	4-terc-butilfenol
II-d₉-d₄	4-terc-butil-d ₉ -fenol-2,3,5,6-d ₄
III	2,6-di-terc-butil-p-benzoquinona
IV	2,4-di-terc-butilfenol
V	2,6-di-terc-butil-4-vinilfenol
VI	3,5-di-terc-butil-4- hidroxibenzaldeído
VII	3,5-di-terc-butil-4- hidroxiacetofenona
VIII	7,9-di-terc-butil-1-oxaspiro (4,5) deca-6,9-dieno-2,8-diona
IX	3-(3,5-di-terc-butil-4- hidroxifenil) propionato de metilo
X	Ácido 3-(3,5-di-terc-butil-4- hidroxifenil) propiónico
4MSI	<i>4 Member States Initiative</i>
CPVC	Policloreto de vinilo clorado
DL	Decreto-Lei
ECHA	Agência Europeia das Substâncias Químicas
EI	Eletroionização
EMA	Erro Máximo Admissível
EPAL	Empresa Portuguesa das Águas Livres, S.A.
EPDM	Borracha de Etileno-Propileno-Dieno
ERSAR	Entidade Reguladora dos Serviços de Águas e Resíduos
FC	Fator de concentração
FID	Detetor de Ionização de Chama (<i>Flame Ionization Detector</i>)
GC/MS	Cromatografia gasosa acoplada à Espectrometria de massas (<i>Gas Chromatography / Mass Spectrometry</i>)
HPLC	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (<i>High Performance Liquid Chromatography</i>)
IPAC	Instituto Português de Acreditação
IRMM	<i>Institute for Reference Materials and Measurements</i>

ISO	Organização Mundial de Normalização (<i>International Organization for Standardization</i>)
LC/MS	Cromatografia líquida acoplada à Espectrometria de massas (<i>Liquid Chromatography / Mass Spectrometry</i>)
LLE	Extração líquido-líquido (<i>Liquid Liquid Extraction</i>)
LOD	Limite de detecção (<i>Limit of detection</i>)
LOQ	Limite de quantificação (<i>Limit of quantification</i>)
MRC	Material de referência certificado (<i>Certified reference material</i>)
MTC_{tap}	Concentração máxima tolerável na torneira dos consumidores
m/z	Razão massa/carga
NIST	<i>National Institute of Standards and Technology</i>
OD	<i>Olfactory Detection</i>
OMS	Organização Mundial de Saúde
SA	Sociedade Anónima
SBSE	Extração Sorptiva de Barra de Agitação (<i>Stir Bar Sorptive Extraction</i>)
SIM	Monitorização Seletiva de Iões (<i>Selected Ion Monitoring</i>)
SPE	Extração em fase sólida (<i>Solid Phase Extraction</i>)
SPME	Microextração em fase sólida (<i>Solid Phase Microextraction</i>)
PB	Polibutileno
PBT	Polibutileno Tereftalato
PE-HD	Poetileno de alta densidade
PE-LD	Poetileno de baixa densidade
PE-MD	Poetileno de média densidade
PE-RT	Polietileno resistente à temperatura
PE-Xa	Polietileno reticulado com peróxidos orgânicos
PE-Xb	Polietileno reticulado com silanos
PE-Xc	Polietileno reticulado por processos de irradiação
PG	Valor de Teste
PI	Padrão interno
PP	Polipropileno
PU	Poliuretano

PVDF	Difluoreto de vinilideno
RSD	Desvio padrão relativo (<i>Relative Standard Deviation</i>)
S/V	Razão área superficial do material/volume de água

SIMBOLOGIA

A_{100}	Área do pico cromatográfico correspondente ao ponto experimental com melhor correlação
$[A]_{adsorvente}$	Concentração do analito A no adsorvente ($\mu\text{g/L}$)
$[A]_{amostra}$	Concentração do analito A na amostra ($\mu\text{g/L}$)
A_i	Área do pico cromatográfico correspondente a determinada concentração
$[A]_M$	Concentração do analito A na fase móvel ($\mu\text{g/L}$)
a_n^T	Concentração medida do composto na água de migração ($\mu\text{g/L}$)
$[A]_s$	Concentração do analito A na fase estacionária ($\mu\text{g/L}$)
b	Ordenada na origem
b_n^T	Concentração medida do composto no ensaio em branco ($\mu\text{g/L}$)
C_{100}	Concentração correspondente ao ponto experimental com melhor correlação ($\mu\text{g/L}$)
C_{fortif}	Concentração de referência do composto na amostra fortificada ($\mu\text{g/L}$)
C_i	Concentração correspondente à área A_i ($\mu\text{g/L}$)
c_n^T	Concentração do composto libertado para as águas de ensaio ($\mu\text{g/L}$)
C_{obs}	Concentração experimental obtida para um determinado composto na amostra fortificada, após quantificação pelo método de ensaio ($\mu\text{g/L}$)
C_{tap}	Concentração estimada na torneira do consumidor ($\mu\text{g/L}$)
CV_r	Coefficiente de variação de repetibilidade
d_f	Espessura média do filme da fase estacionária (μm)
D_G	Coefficiente de difusão do soluto no gás de arraste
D_S	Coefficiente de difusão do soluto na fase estacionária
F	Valor tabelado da distribuição de Fisher-Snedecor
F_c	Caudal ao longo da coluna cromatográfica (mL/min)
FR	Fator de retardamento
H	Altura de um prato teórico (mm)
K_D	Coefficiente de distribuição

k_d	Coeficiente de repartição
k	Fator de retenção
L	Comprimento da coluna (m)
M_n^T	Taxa de migração no período de migração n ($\text{mg dm}^{-2} \text{ d}^{-1}$)
m	Declive da reta de calibração
N	Número de pratos teóricos
n	Número de medições
R	Coeficiente de correlação da reta
R^2	Coeficiente de determinação da reta
r	Limite de repetibilidade
r_c	Raio da coluna cromatográfica (mm)
R_s	Resolução da coluna
s	Desvio padrão
s^2	Variância
Sensib	Sensibilidade
S/N	Razão sinal ruído obtida do pico cromatográfico
S_b	Desvio padrão da ordenada na origem
S_m	Desvio padrão do declive
$S_{\text{método}}$	Desvio padrão do método
S_r	Desvio padrão da repetibilidade
$S_{y/x}$	Desvio padrão residual da função de calibração linear
S_{y2}	Desvio padrão residual da função de calibração não linear
S_{x0}	Desvio padrão correspondente a várias leituras da solução com concentração mais baixa da gama de linearidade
t_m	Tempo morto (min)
t_r	Tempo de retenção (min)
t'_r	Tempo de retenção ajustado (min)
$\bar{u}$	Velocidade linear média da fase móvel (m/min)

$U(C)$	Incerteza padrão expandida
$u_c(C)$	Incerteza padrão combinada
u_{exat}	Incerteza padrão associada à exatidão
u_{inter}	Incerteza associada à interpolação da leitura da amostra na curva de calibração
$u_{\text{padrão}}$	Incerteza associada à preparação de soluções padrão
$u_{\text{prec int}}$	Incerteza associada à precisão intermédia
V_B	Volume de breakthrough (mL)
V_M	Volume da fase móvel (mL)
V_S	Volume da fase estacionária (mL)
V_R	Volume de retenção (mL)
V'_R	Volume de retenção ajustado (mL)
$\bar{x}$	Média aritmética do número de medições
x_i	Valor individual de uma medição
y_i	Valor individual do sinal instrumental
W_b	Largura na base do pico cromatográfico
W_h	Largura do pico cromatográfico a metade da altura máxima
μ	Velocidade linear média do soluto na coluna cromatográfica (m/min)
ΔC	Variação da concentração do soluto
ΔS	Variação do sinal cromatográfico obtido

INTRODUÇÃO

1.1 Motivação e enquadramento

A água é o elemento de toda a vida. A sobrevivência e bem-estar da humanidade estão intimamente relacionados com este bem precioso. A disponibilidade deste recurso em grandes quantidades é essencial ao desenvolvimento das civilizações desde o início dos tempos.

Na antiga Grécia e Roma, a qualidade da água era apurada pelo aspeto, olfato, paladar e temperatura. Idealmente a água desejável para consumo seria sem cor, sem cheiro, sem sabor e a uma baixa temperatura. Alcmeão de Crotona (510 a.C) foi dos primeiros filósofos e médicos gregos a concluir que a saúde da população dependia da qualidade da água à sua disposição. Algumas técnicas para melhorar a qualidade da água foram nessa altura implementadas, como a utilização de tanques, peneiras ou filtros ou até mesmo a fervura da água.[1]

No entanto, foi a partir do século XIX que suscitaram mais preocupações com este assunto sendo descobertas novas fontes de contaminação da água como microrganismos e químicos nocivos. A urbanização e industrialização levaram ao desenvolvimento de novas tecnologias como o abastecimento e saneamento público de modo a responder às necessidades de saúde da população. Técnicas de tratamento da água como o processo de cloração, floculação, sedimentação, filtração e retificação do pH vieram responder às necessidades da população em crescimento.[2]

Nos dias de hoje, a humanidade enfrenta um grande desafio face ao aumento da escassez de água impulsionada pela crise climática e pelos períodos de seca mais frequentes. Numa tentativa para solucionar este problema, os governos e as entidades competentes fazem um esforço conjunto de modo a resolver a situação. [2]

A manutenção da qualidade da água continuou a ser um ponto fulcral que deve ser rigorosamente controlado. A qualidade da água é estimada pelas suas características físicas, químicas e biológicas. A Organização Mundial de Saúde (OMS) redigiu uma Diretriz em 1984 e 1985 que estabelece critérios mínimos de aceitação da qualidade da água para consumo humano, que devem ser considerados nas políticas dos países. [3] A Diretiva 2020/2184 de Água para Consumo Humano também transpõe as necessidades de proteção da saúde humana, estabelecendo padrões para a qualidade da água para consumo humano para os países da União Europeia. [4] Deste modo, atualmente, existem inúmeros parâmetros regulamentados que avaliam a presença e os níveis de contaminantes em águas. [5]

Existem infinitas fontes de contaminação desde químicos naturalmente presentes na natureza ou até mesmo impurezas associadas a práticas de agricultura, processos industriais e atividades domésticas. A qualidade da água também pode ser comprometida caso esta seja armazenada e transportada por um sistema que seja constituído por materiais inadequados, que possibilitem a migração de contaminantes para as águas. Este tema será abordado em mais detalhe de seguida.[6]

1.2 Sistema de distribuição de água

O sistema de distribuição de água é um segmento da rede de abastecimento de águas que tem como função transportar água para consumo humano desde a estação de tratamento até ao consumidor final. [7] É composto por uma série de componentes que incluem tubagens de diferentes tamanhos e materiais, acessórios, tanques de armazenamento, reservatórios de distribuição, tintas e revestimentos entre outros.[8]

As primeiras tubagens utilizadas para transporte da água de consumo humano eram feitas de metal (figura 1.1). O aço com ligas de zinco chegou a ser o tipo de material utilizado mais comum, no entanto devido ao seu difícil manuseamento e instalação deixou de ter tanta relevância sendo apenas utilizado em aplicações comerciais de grande escala. Para além disso, estes materiais também apresentavam níveis de corrosão consideráveis quando em contacto com a água, libertando concentrações elevadas de metais. [9]

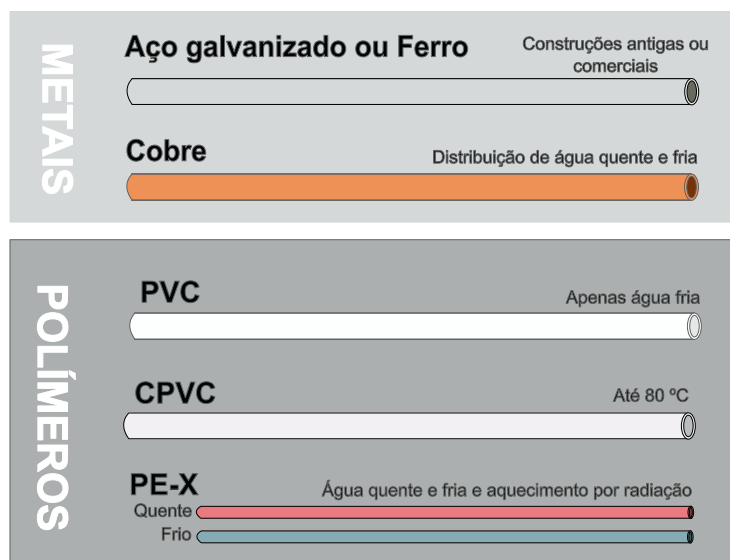


Figura 1.1- Diferentes tipos de tubos utilizados no sistema de distribuição de água.

Adaptado de [9].

Por esse motivo, atualmente os materiais poliméricos são os mais utilizados no fabrico de tubagens. Os materiais mais comuns são o polietileno (PE) e o policloreto de vinilo (PVC) sendo o primeiro mais

utilizado. Mais especificamente o polietileno reticulado (PE-X) para além de ser de baixo custo e fácil transporte, é facilmente dobrável devido à sua flexibilidade, exigindo menos acessórios e ligações. Podem ainda ser utilizados diferentes classes do polietileno: baixa, média e alta densidade. [9]

Já os reservatórios de água existem em diferentes materiais, formatos e tamanhos e permitem o armazenamento de grandes quantidades de água. O polietileno é usualmente um dos materiais escolhidos para a construção dos tanques dada a elevada resistência à corrosão e fácil limpeza.[10]

Visto que a água pode permanecer no sistema de distribuição durante vários dias antes de chegar ao consumidor final, existe um risco acrescido de contaminação por parte dos materiais de construção utilizados. Dependendo do fabricante, existem evidências de que determinados materiais plásticos libertam quantidades consideráveis de produtos químicos nocivos que alteram a qualidade da água.

No caso dos polímeros, estas têm frequentemente na sua composição antioxidantes, também conhecidos como agentes estabilizantes, que são constituídos por estruturas fenólicas. Estas substâncias podem assim migrar para as águas de consumo humano.

1.3 Agentes estabilizantes

Durante o processo de produção dos polímeros, estes são submetidos a condições de operação severas que podem causar a sua degradação através do calor, do cisalhamento mecânico ou pela presença de impurezas. A degradação caracteriza-se pela formação de radicais livres que reagem com o oxigénio formando hidroperóxidos que comprometem a estabilidade do material, tal como se observa na figura 1.2. [11]

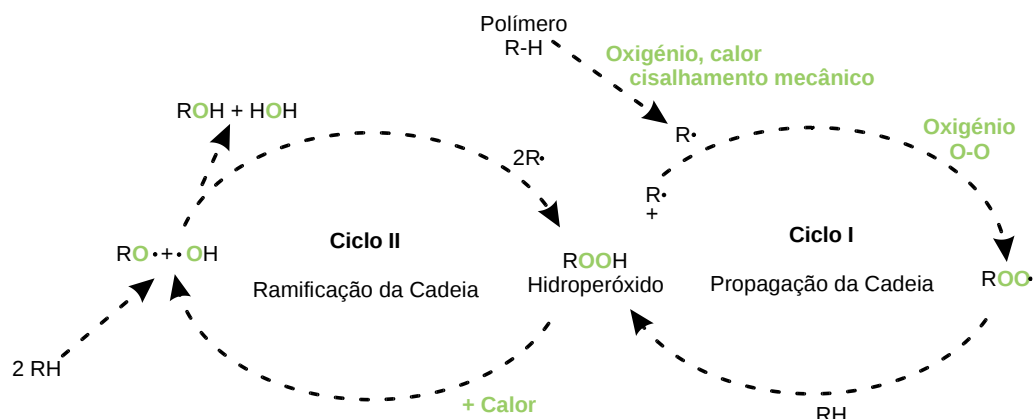


Figura 1.2- Mecanismo de degradação dos polímeros. Adaptado de [12]

Torna-se assim necessária a aditivação destes produtos, de modo a prolongar a sua vida útil, visto que é necessário que os sistemas de tubagens sejam operacionais durante longos períodos. [13] Para tal, utilizam-se antioxidantes que têm como função retardar o processo de degradação dos polímeros orgânicos, aumentando a durabilidade e a resistência dos materiais conferindo-lhes uma gama de aplicabilidade mais vasta. Estes aditivos compõem 0,05 a 0,5% (p/p) da concentração dos polímeros.[14]

Os antioxidantes primários reagem com os radicais livres impedindo a propagação da degradação dos polímeros. Na maioria dos casos, o fenol faz parte destes agentes estabilizantes devido à sua capacidade de proteger o material do oxigénio. Os antioxidantes secundários são usados em conjunto com os antioxidantes primários e têm como função a eliminação dos hidroperóxidos instáveis.[11]

Deste modo, os agentes estabilizantes com estruturas fenólicas são adicionados aos polímeros para prevenir a sua oxidação durante o processo de produção e durante a sua vida útil. Os agentes estabilizantes indicados na tabela 1.1 constam da Regulação (EU) N.º 10/2011 e entram na formulação de materiais poliméricos comercializados no mercado europeu. No anexo A, encontram-se ainda outras propriedades relevantes.

Tabela 1.1 - Propriedades físico-químicas e aplicações dos agentes estabilizantes [15–17] parte 1/4

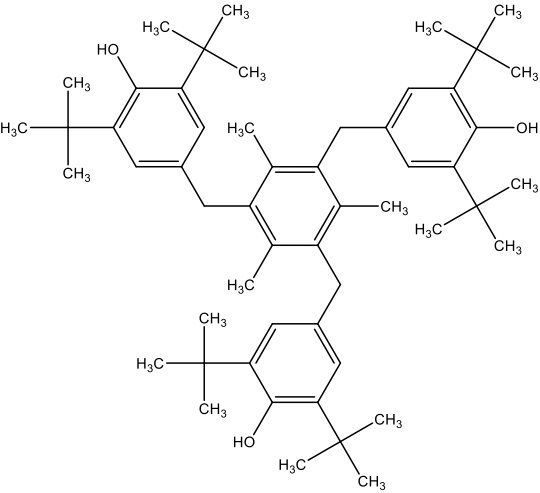
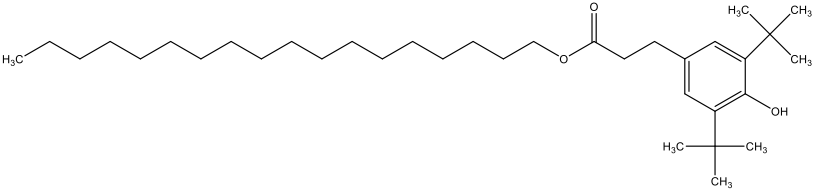
Nome (Nome Comercial)	Estrutura	Massa molecular	Ponto de ebulição (°C) a 101,3 kPa	Usos
1,3,5-Trimetil-2,4,6-tris(3,5-di-terc-butil-4-hidroxifenil)benzeno (Ionox 330)		775,22	325	Agente estabilizante em PE, PP, PB, PVC, PU, elastômeros, adesivos, poliésteres lineares, poliamidas, e copolímeros de estireno
3-(3,5-Di-terc-butil-4-hidroxifenil)propionato de octadecilo (Irganox 1076)		530,86	323	Agente estabilizante em PE, PP, PB, copolímeros de estireno, poliuretanos, fibras sintéticas, elastômeros, adesivos, ceras, óleos e gorduras

Tabela 1.1 - Propriedades físico-químicas e aplicações dos agentes estabilizantes [15–17] parte 2/4

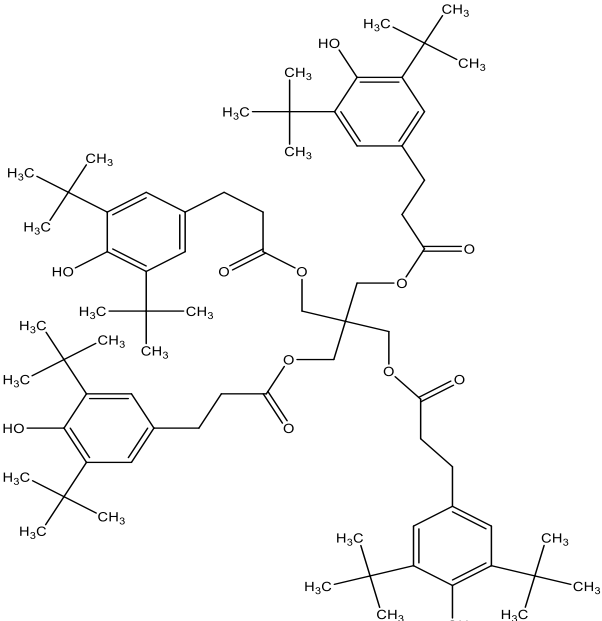
Nome (Nome Comercial)	Estrutura	Massa molecular	Ponto de ebulição (°C) a 101,3 kPa	Usos
Tetrakis [3-(3,5-di-terc-butil-4-hidroxifenil) propionato] de Pentaeritritol (Irganox 1010)		1 177,63	281	Agente estabilizante em PE, PP, PB, copolímeros de etileno-vinilacetato, poliacetals, poliamidas, poliuretanos, poliésteres, PVC, copolímeros com estireno, ABS, elastômeros como o SBS, SEBS, EPM, EPDM, revestimentos, adesivos, selantes, lubrificantes, vernizes, ceras

Tabela 1.1 - Propriedades físico-químicas e aplicações dos agentes estabilizantes [15–17] parte 3/4

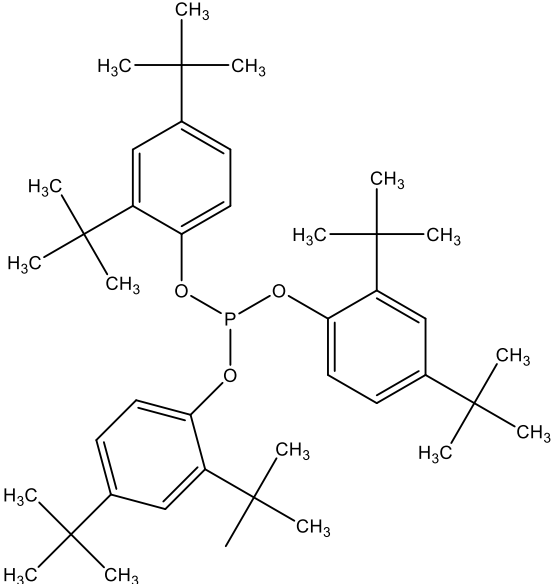
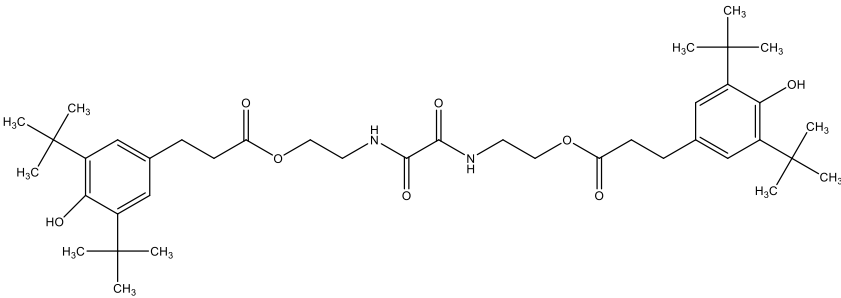
Nome (Nome Comercial)	Estrutura	Massa molecular	Ponto de ebulição (°C) a 101,3 kPa	Usos
Fosfito de tris (2,4-di-terc-butilfenilo) (Irgafos 168)		646,92	400	Antioxidante secundário que prolonga o desempenho dos antioxidantes primários em polímeros como o PE, PP, etc. Utilização em adesivos, selantes, revestimentos, tintas e <i>toners</i> .

Tabela 1.1 - Propriedades físico-químicas e aplicações dos agentes estabilizantes [15–17] parte 4/4

Nome (Nome Comercial)	Estrutura	Massa molecular	Ponto de ebulição (°C) a 101,3 kPa	Usos
2,2'-Oxamido-bis [etil-3- (3,5-di-terc-butil-4-hidroxifenil) propionato] (Naugard XL-1)		696,91	425	Agente estabilizante em adesivos, emulsificantes, PE-X, selantes, polímeros, resinas e modificadores de impacto.

Os alquilfenóis têm em comum o composto orgânico fenol, que é constituído por um anel aromático ligado a um grupo funcional hidroxilo (figura 1.3). O anel aromático concede propriedades ácidas ao grupo hidroxilo.

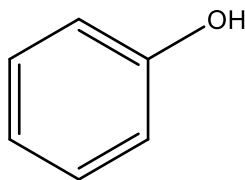


Figura 1.3- Estrutura química do fenol

Estes compostos sofrem polialquilação por substituição de um hidrogénio por um grupo alquilo ou adição de um grupo alquilo de modo a obter propriedades antioxidantes. Esta ligação de um grupo alquilo a um carbono, denomina-se de C-alquilação e possui imensas aplicações industriais. [18][19]

As propriedades destes compostos são influenciáveis pelo grupo alquilo e pela sua posição, no entanto irão ter sempre características físicas semelhantes ao fenol. À temperatura ambiente são sólidos, brancos ou sem cor, mas a sua forma e tamanho é afetada pelo grupo alquilo. A solubilidade em água dos alquilfenóis diminui com o aumento do número de carbonos ligados ao anel aromático. No que toca a solventes, estes solubilizam facilmente em acetona, álcoois, hidrocarbonetos e tolueno.

1.4 Produtos de degradação

Os materiais orgânicos de natureza plástica possibilitam ainda a hipótese do aparecimento de outros produtos de degradação, graças à ocorrência de reações de hidrólise e de oxidação ou até mesmo por processos de corrosão, dissolução e difusão.[18]

A migração de diferentes contaminantes provenientes de materiais poliméricos pode ocorrer de 2 maneiras: por difusão dos componentes do material ou através da decomposição de constituintes do material. Este último caso verifica-se com os agentes estabilizantes referidos anteriormente, visto que estes reagem em contacto com a água e formam produtos de degradação.[20]

Os produtos de degradação comparados com os seus agentes estabilizantes de origem possuem propriedades físico-químicas diferentes e por esse motivo vão ter comportamentos migratórios distintos. Já foi comprovado em alguns estudos que os agentes estabilizantes são mais hidrofóbicos, o que leva a crer que quando em contacto com a água hidrolisam de modo a formar moléculas mais pequenas e mais solúveis como é o caso de diversos produtos de degradação. Sabe-se ainda que a solubilidade dos agentes estabilizantes supramencionados é muito inferior à solubilidade dos seus produtos de degradação que é cerca de 1000 vezes superior.[20]

Tendo em conta as estruturas moleculares mais relevantes para os ensaios a materiais plásticos, tais como as tubagens, selecionaram-se para este estudo 10 produtos de degradação, que constam no documento “4MSI Draft Approach on Organic Materials – Part C.” redigido pelo grupo de trabalho de ensaios a materiais orgânicos (SG-OM) do grupo “4 Member States – Joint Management Committee”. Na tabela 1.2 observa-se que as nomenclaturas IUPAC dão origem a nomes extensos e por esse motivo opta-se pela designação utilizada no documento do mesmo grupo (I a X).[21] No anexo A, encontram-se ainda outras propriedades relevantes.

Tabela 1.2- Propriedades físico químicas dos produtos de degradação [22–31] parte 1/3

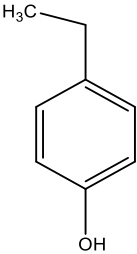
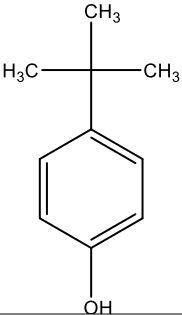
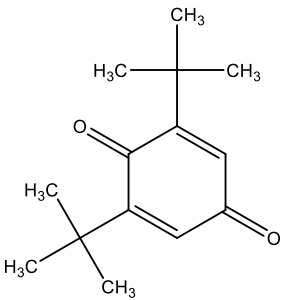
Nome	Designação	Estrutura química	Massa molecular	Ponto de ebulição (°C) a 101,3 kPa
4-etilfenol	I		122,16	215
4-terc-butilfenol	II		150,22	238
2,6-di-terc-butil-p-benzoquinona	III		220,31	285 ± 15

Tabela 1.2 - Propriedades físico químicas dos produtos de degradação [22–31] parte 2/3

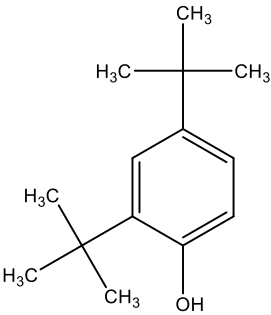
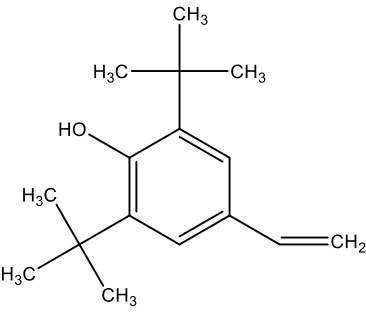
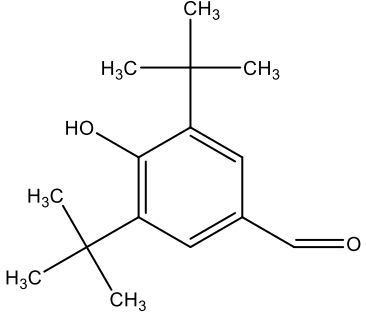
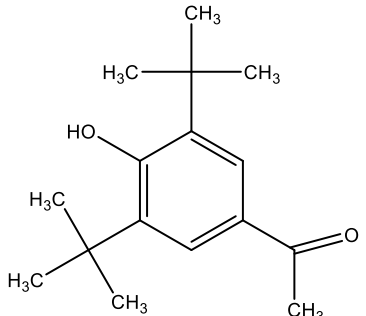
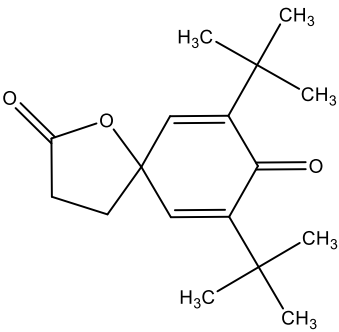
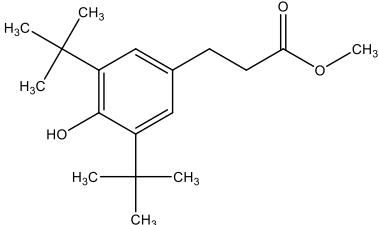
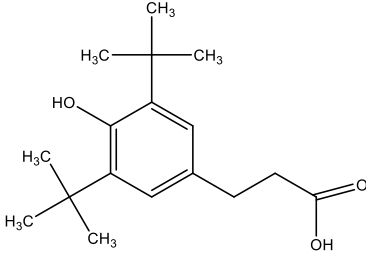
Nome	Designação	Estrutura química	Massa molecular	Ponto de ebulição (°C) a 101,3 kPa
2,4-di-terc-butilfenol	IV		206,32	264
2,6-di-terc-butil-4-vinilfenol	V		232,26	288 ± 9 (previsto)
3,5-di-terc-butil-4-hidroxibenzaldeído	VI		234,33	337 (previsto)
3,5-di-terc-butil-4-hidroxiacetofenona	VII		248,36	308

Tabela 1.2 - Propriedades físico químicas dos produtos de degradação [22–31] parte 3/3

Nome	Designação	Estrutura química	Massa molecular	Ponto de ebulição (°C) a 101,3 kPa
7,9-di-terc-butil-1-oxaspiro (4,5) deca-6,9-dieno-2,8-diona	VIII		276,37	426 ± 45 (previsto)
3-(3,5-di-terc-butil-4-hidroxifenil) propionato de metilo	IX		292,41	341
Ácido 3-(3,5-di-terc-butil-4-hidroxifenil) propiônico	X		278,39	364 ± 37 (previsto)

Existem evidências de que estas substâncias contribuem significativamente para a deterioração do sabor e odor da água de consumo e conseqüentemente têm um impacto negativo na saúde humana.

Torna-se assim necessário o desenvolvimento de um método analítico capaz de proceder à identificação e quantificação destes compostos de risco em análises de rotina. [32] Dado que os agentes estabilizantes possuem propriedades significativamente diferentes, não serão implementados no método analítico em conjunto com os produtos de degradação, sendo necessária uma alternativa para monitorizar estes compostos.

Por outro lado, será efetuada a monitorização de diversos materiais orgânicos através de ensaios de migração que averiguam se ocorre ou não lixiviação destes compostos para a água, permitindo avaliar o seu impacto na qualidade da água.

1.5 Estado de arte

A lixiviação de compostos orgânicos, presentes nos materiais poliméricos, para a água de consumo humano é uma realidade que tem vindo a ser investigada ao longo do tempo. Atualmente, na literatura disponível, existem alguns artigos que avaliam as concentrações e o tipo de substância orgânica presente na água de consumo humano, proveniente da migração a partir de materiais usados nos sistemas de abastecimento. No entanto, o verdadeiro efeito destes compostos na saúde humana permanece ainda desconhecido. [13][33]

Mais especificamente, a lixiviação de subprodutos de degradação dos plásticos para as águas de consumo humano é um tópico pouco abordado e consolidado na comunidade científica. No entanto, existem fontes que afirmam esclarecer a origem dos compostos em estudo, identificando quais os materiais de risco que libertam estes subprodutos. Na figura 1.4, é possível conferir quais os materiais onde foram detetados os alquilfenóis.[13,34,35]

Produtos de Degradação	PE-HD	PE-MD	PE-LD	PE-Xa	PE-Xb	PE-Xc	PE-RT	PP	PB	Grânulos de PE
4-etilfenol			✓							
p-terc-butilfenol		✓	✓							✓
2,6-di-terc-butil-p-benzoquinona	✓	✓	✓			✓	✓			
2,4-di-terc-butilfenol	✓	✓		✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
2,6-di-terc-butil-4-vinilfenol		✓	✓							✓
3,5-di-terc-butil-4-hidroxibenzaldeído		✓	✓			✓	✓	✓		
3,5-di-terc-butil-4-hidroxiafetofenona		✓	✓							
7,9-di-terc-butil-1-oxaspiro[4.5]deca-6,9-dieno-2,8-diona		✓	✓	✓	✓	✓			✓	✓
3-(3,5-di-terc-butil-4-hidroxifenil) propionato de metilo		✓	✓	✓	✓				✓	✓
Ácido 3-(3,5-di-terc-butil-4-hidroxifenil) propiónico		✓	✓		✓	✓			✓	

Figura 1.4- Materiais onde foram detetados produtos de degradação [13,34,35]

Adams et al. (2011), *Brocca et al.* (2002), *Skjevraak et al* (2003) e *Walter et al.* (2011) [13] partilham todos a mesma opinião acerca da origem dos produtos de degradação. Mais especificamente em relação aos contaminantes de tubos poliméricos. A sua migração pode ocorrer diretamente, por difusão dos componentes do material para a água, ou indiretamente, através da decomposição de constituintes do material, nomeadamente os aditivos, que reagem em contacto com a água e formam subprodutos.

Hametner et al. (1999) [36] estudaram a influência dos antioxidantes fenólicos na qualidade da água. Utilizaram cinco tipos de tubos de polietileno comercializáveis. Através dos ensaios de migração efetuados de acordo com as normas ÖNORM B 5014/1, ISO/FDIS 8795 e EN 1420/1, chegaram à conclusão de que as condições a que a água se encontrava influenciavam a lixiviação dos compostos. Água mais quente e mais alcalina levava ao aparecimento de uma maior quantidade de fenóis. O composto IV foi detetado nos extratos, e apenas foram encontrados vestígios de antioxidantes com uma massa molecular elevada.

Arvin et al. (2002) [13] estabeleceram algumas hipóteses sobre a origem dos compostos fenólicos. Foram analisadas 4 classes diferentes de polietileno em contacto com a água por ensaios de migração. Foram detetados cerca de 30 compostos orgânicos, sendo que neste grupo se incluíam alguns dos produtos de degradação em estudo. Foi a partir deste artigo que se criou a designação “*Arvin I to X*”, referente aos 10 compostos representativos dos produtos de degradação. Os compostos VI, VII e VIII foram encontrados em todas as amostras de água que estiveram em contacto com os diferentes tubos poliméricos. A maioria dos compostos acreditava-se que decorriam de algum tipo de degradação durante o processo de extrusão dos tubos ou mesmo após o processo de síntese dos aditivos fenólicos. De maneira a confirmar que os resultados no laboratório eram fiáveis, foram recolhidas amostras em diferentes pontos de um sistema de distribuição de água construído com material PE-X e foi possível concluir a presença dos mesmos produtos de degradação.

Bertoldo et al. (2004) [37] estudaram a degradação do antioxidante *Irganox 1010*, através da extração líquido-líquido das águas de migração colocadas em contacto com diferentes classes de PP, seguida de análise em HPLC. Concluiu que a existência de processos de degradação levava ao decaimento da concentração do antioxidante ao longo do tempo nas águas de migração.

Löschner et al. (2011) [35] utilizaram o método indicado na norma EN 15768 e avaliaram 5 classes diferentes de PE, PP, PB e CPVC. O composto IV foi encontrado em todas as amostras em elevadas concentrações exceto nos tubos de PVC. Os compostos III, VI, VIII, IX e X também foram identificados em muitos dos materiais poliméricos. Mais ainda, para comprovar que a degradação dos produtos apenas ocorria nas águas de migração, analisaram-se aditivos *Irganox* comuns, que podiam sofrer degradação térmica na coluna cromatográfica, não tendo sido detetados quaisquer produtos de degradação durante a análise efetuada por GC. No entanto, é importante referir que não foi possível identificar uma grande parte dos aditivos por GC. Especula-se que a razão tenha a ver com o elevado tamanho destas moléculas e o facto de serem fortemente polares. Recomenda-se, por isso, o uso de outros métodos suplementares como LC-MS.

Lützhøft et al. (2012) [20] estabeleceram mais tarde um método analítico capaz de detetar e medir estes produtos de degradação fazendo uso de HS-SPME-GC-MS. O critério de qualidade da água de consumo humano que foi tomado como referência para estes compostos foi um máximo de 20 µg L⁻¹. Este valor foi recomendado pela Agência de Proteção Ambiental da Dinamarca. Para confirmar a sua implementação, testaram-se tubos de PE-X e PE com este método, onde foi possível quantificar a libertação do composto III. É importante também referir que apesar dos compostos I a X serem representativos dos produtos de degradação, existem outros produtos possíveis que são listados neste

artigo tais como: 2-terc-butil-fenol, 2-terc-butil-4-metoxifenol, 2,6-di-terc-butil-4-metilfenol e o n-pentilfenol.

Finalmente, *Connell et al.* (2019) [34] ao avaliarem diferentes marcas de tubos de PE-X e PP conseguiram isolar os compostos VIII e IX.

Em 2021, o grupo já referido anteriormente como *The 4MSI Initiative*, publicou um documento inicial com o objetivo de definir as listas positivas europeias para materiais e produtos, neste caso orgânicos, em contacto com a água de consumo humano. O mesmo consiste numa série de critérios que têm de ser cumpridos para manter a qualidade da água de consumo humano. [21]

Na tabela 1.3, é possível observar as conclusões obtidas em diferentes estudos efetuados em diferentes materiais, onde foi possível identificar os compostos em estudo através de ensaios de migração.

Tabela 1.3-Métodos analíticos aplicados na identificação dos compostos em estudo parte 1/6

Estudo	Métodos de análise	Amostra	Equipamento	Condições	Compostos identificados	Gama de trabalho (µg/L)	LOD (µg/L)	LOQ (µg/L)	Concentração máxima encontrada (µg/L)
Hametner et al., (1999) [36]	LLE	Amostras de água em contacto com	GC: Hewlett Packard HP 5890	Solvente = n-hexano Duração = 30 min FC = 400	IV	-	0,8	-	-
	GC-MS/FID	tubos de PP comercializados	Coluna: silicone fenil-metil	T _{forno} = 100 – 200 °C T _{injeção} = 300 °C					
Arvin et al., (2002) [13]	LLE sequencial	Amostras de água em contacto com tubos de PEX, PE-MD, PE-LD	GC: Hewlett-Packard 6890 GC	PI: Solução de 2-naftol em pentano	I	-	-	-	-
					IV	-	-	-	-
				Solvente: Clorofórmio	VI	-	-	-	-
	GC-MS/EI	Amostras de água para consumo humano em diferentes pontos da rede de distribuição	MS: Hewlett-Packard 5973	Duração = 3 min	VII	-	-	-	-
				<i>Split-splitless</i>	IX	-	-	-	-
			Coluna: HP-MS5 Hewlett-Packard	T _{forno} = 45 – 300 °C	X	-	-	-	-

Tabela 1.3- Métodos analíticos aplicados na identificação dos compostos em estudo parte 2/6

Estudo	Métodos de análise	Amostra	Equipamento	Condições	Compostos identificados	Gama de trabalho (µg/L)	LOD (µg/L)	LOQ (µg/L)	Concentração máxima encontrada (µg/L)
Remberger et al., (2003) [38]	SPE	Amostras de águas superficiais	GC: Agilent Technologies 6890N	Cartucho: ENV+ Derivatização com 4-DMAP	II IV	-	-	-	≈ 0,025
			MS: Agilent Technologies 5973N	Solventes: Tetrahydrofurano, Diclorometano		-	-	-	≈ 0,045
	GC-MS		Coluna: VF-5MS (Varian)	<i>Splitless</i> T _{injeção} = 250 °C T _{forno} = 50 - 300 °C	II III IV	-	-	-	-
			GC: GCQ instrument ThermoFinnigan	Fibra: PDMS/DVB 65 (Supelco) T _{extração} = 80 °C T _{dessorção} = 250 °C		-	-	-	-
Esper et al., (2004) [39]	HS-SPME	Amostras de água em contacto com PP/EVA comercializado	Coluna: CP SIL 8 e CP WAX 52CB (Varian)	<i>Splitless</i> T _{forno} = 50 – 250 °C		-	-	-	-
	GC-MS					-	-	-	-

Tabela 1.3- Métodos analíticos aplicados na identificação dos compostos em estudo parte 3/6

Estudo	Métodos de análise	Amostra	Equipamento	Condições	Compostos identificados	Gama de trabalho (µg/L)	LOD (µg/L)	LOQ (µg/L)	Concentração máxima encontrada (µg/L)
Löschner et al., (2011) [35]	LLE sequencial GC-MS/EI	Amostras de água em contacto com tubos PE-Xa, PE-Xb, PE-Xc, PE-HD, PE-RT, PB, PVC e PVC-C	GC: Agilent 6890 MS: Agilent 5973 Coluna: Agilent J&W DB-5 MS	PI: Mistura isotópica com 9 padrões deuterados diferentes					
				PI de injeção: d ₁₀ -metilnaftaleno	II	-	-	-	<2,0
					III	-	-	-	8,3
				Solvente: Diclorometano	IV	-	-	-	>368
				pH: 2 e 10	VI	-	-	-	4,8
				FC= 100	VIII	-	-	-	>136
					IX	-	-	-	31
				Splitless	X	-	-	-	17,3
				T _{forno} = 35 - 300 °C					
				T _{injeção} = 250 °C					
				T _{fonte} = 230 °C					
				T _{quadrupolo} = 280 °C					

Tabela 1.3- Métodos analíticos aplicados na identificação dos compostos em estudo parte 4/6

Estudo	Métodos de análise	Amostra	Equipamento	Condições	Compostos identificados	Gama de trabalho (µg/L)	LOD (µg/L)	LOQ (µg/L)	Concentração máxima encontrada (µg/L)
Lützhøft et al., (2012) [20]	HS-SPME GC-MS/EI	Amostras de água em contacto com tubos de PE-X comercializados	CTC PAL autosampler	PI: N-pentil fenol					
			GC: Agilent Technologies 6890	Fibra: PDMS/DVB $T_{\text{dessorção}}=250\text{ }^{\circ}\text{C}$ <i>Splitless</i>	I	0,338 - 8,10	0,34	0,90	-
					II	0,112 - 6,72	0,17	0,25	-
					III	0,100 - 6,00	0,25	0,41	>15
			MS: Agilent Technologies 5973	$T_{\text{forno}} = 50\text{-}360\text{ }^{\circ}\text{C}$ $T_{\text{fonte}} = 230\text{ }^{\circ}\text{C}$ $T_{\text{quadrupolo}} = 150\text{ }^{\circ}\text{C}$	IV	0,124 - 7,44	0,14	0,30	-
					VI	0,122 - 7,32	0,19	0,30	-
					VII	0,114 - 6,84	0,16	0,29	-
					IX	0,110 - 6,60	0,26	0,36	-
			Coluna: Zebron ZB-5 HT						

Tabela 1.3- Métodos analíticos aplicados na identificação dos compostos em estudo parte 5/6

Estudo	Métodos de análise	Amostra	Equipamento	Condições	Compostos identificados	Gama de trabalho (µg/L)	LOD (µg/L)	LOQ (µg/L)	Concentração máxima encontrada (µg/L)
Rodil et al., (2010) [40]	SPE GC-MS	Amostras de águas residuais e águas fluviais	SPE: Visiprep manifold (Supelco) GC: Agilent Technologies HP 7890A MS: MSD 5975C 7693 autosampler Coluna: HP-5MS	Cartucho: Oasis HLB Waters Solventes: Acetato de etilo, Metanol, água ultrapura pH=2,5	III VI	2-2000 2-2000	0,6 0,9	2,1 2,9	0,871 0,144
				Derivatização com MTBSTFA do composto VI					
				PI: BHT-d ₇ , PrP-d ₄					
				T _{forno} = 90 – 290 °C T _{injeção} = 270 °C T _{quadrupolo} = 150 °C T _{fonte} = 230 °C					

Tabela 1.3- Métodos analíticos aplicados na identificação dos compostos em estudo parte 6/6

Estudo	Métodos de análise	Amostra	Equipamento	Condições	Compostos identificados	Gama de trabalho (µg/L)	LOD (µg/L)	LOQ (µg/L)	Concentração máxima encontrada (µg/L)
<i>Kalweit et al.; (2019)</i> [32]	SBSE GC-MS/OD	Amostras de água em contacto com tubos de PE-HD, PE-RT, PE-Xa, PE-Xb, PE-Xc, PP, PB e PVC	SBSE: Twisters (PDMS)	$T_{\text{dessorção}} = 40 - 220\text{ }^{\circ}\text{C}$ <i>Splitless</i>		-	-	-	-
			GC: Agilent Technologies 7890		II	-	-	-	0,1
					III	-	-	-	23
					IV	-	-	-	0,2
			MS: MSD 5975	$T_{\text{forno}} = 40 - 300\text{ }^{\circ}\text{C}$	VI	-	-	-	-
					VII	-	-	-	-
					VIII	-	-	-	0,2
			Coluna: VF-5MS (Varian)						

Na literatura são ainda implementados diferentes padrões internos de modo a conseguir quantificar os compostos em estudo (tabela 1.4). A utilização de um “surrogate” ao invés de um padrão interno de injeção garante que são contabilizadas todas as perdas dos analitos durante o processo de preparação da amostra.

Tabela 1.4- Padrões internos usados na análise dos compostos em estudo

Estudo	Método implementado	Padrão interno	Derivatização	Composto identificado
Brocca et al., (2002) [13]	LLE sequencial	100 µL de uma solução de 2-naftol (50 ppm) em pentano	-	I, IV, VI, VII, IX, X
Fries et al., (2001) [41]	SPE	40 mg de Esqualano em 20 mL de n-hexano	-	VI
Rodil et al., (2010) [40]	SPE	2,6-di-(terc-butil-d1)-4-metil-d3-fenol-3,5-d2 (III) / n-propil 4-hidroxibenzoato-2,3,5,6-d4 (VI)	MTBSTFA BSTFA MSTFA	III, VI
Löschner et al., (2011) [35]	LLE sequencial	Solução com d6-benzeno, d5-clorobenzeno, d21-BHT, d34-hexadecano, d8-naftaleno, d10-fenantreno, d5-fenol, d10-p-xileno e d62-esqualano	-	III, IV, VI, IX
Lützhøft et al., (2012) [20]	HS-SPME	N-pentil fenol	-	I, II, III, IV, VI, VII, IX

Existem dois critérios importantes para a escolha do padrão interno: tem de ser semelhante aos compostos em estudo e não deve estar presente nas amostras em análise.

Observa-se que os métodos definidos na tabela 1.4 utilizam padrões internos que possuem um comportamento analítico diferente dos compostos em análise. Esta hipótese é normalmente adotada devido à dificuldade em garantir um padrão interno específico para cada composto. Deste modo, muitas vezes opta-se por uma solução com vários padrões internos para garantir uma vasta gama de volatilidades, que se adequa aos compostos em estudo.

Os agentes estabilizantes foram ainda identificados por outros métodos, nos seguintes materiais da figura 1.5. [42]

Agentes Estabilizantes	PE	PE-HD	PE-LD	PP	PU	PBT
<i>Ionox 330</i>	✓					
<i>Irganox 1076</i>	✓		✓	✓	✓	✓
<i>Irganox 1010</i>		✓	✓	✓	✓	✓
<i>Irgafos 168</i>	✓	✓	✓	✓		
<i>Naugard XL-1</i>						

Figura 1.5- Materiais com antioxidantes na sua constituição [42]

1.6 Mecanismos de degradação

Existem algumas reações e mecanismos propostos de degradação que possivelmente explicam o aparecimento dos subprodutos de *Arvin* nas águas de consumo humano.

O 2,4-di-terc-butilfenol (IV) é um importante intermediário na formação do antioxidante Irgafos 168. Este é obtido através de uma reação com tricloreto de fósforo (figura 1.6). [14]

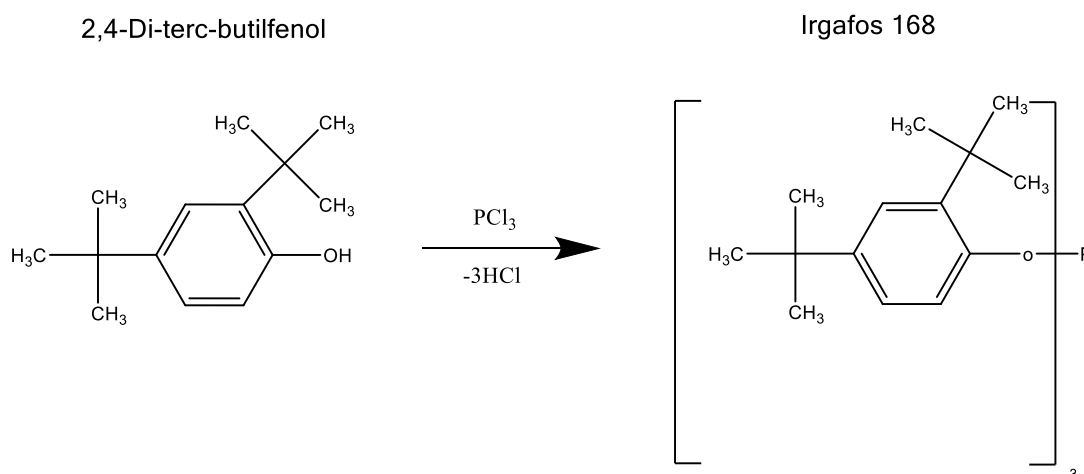


Figura 1.6- Mecanismo de formação do *Irgafos 168*. Adaptado de [14].

Por outro lado o composto IV, pode também ser formado por hidrólise do mesmo antioxidante como se pode ver pela figura 1.7:

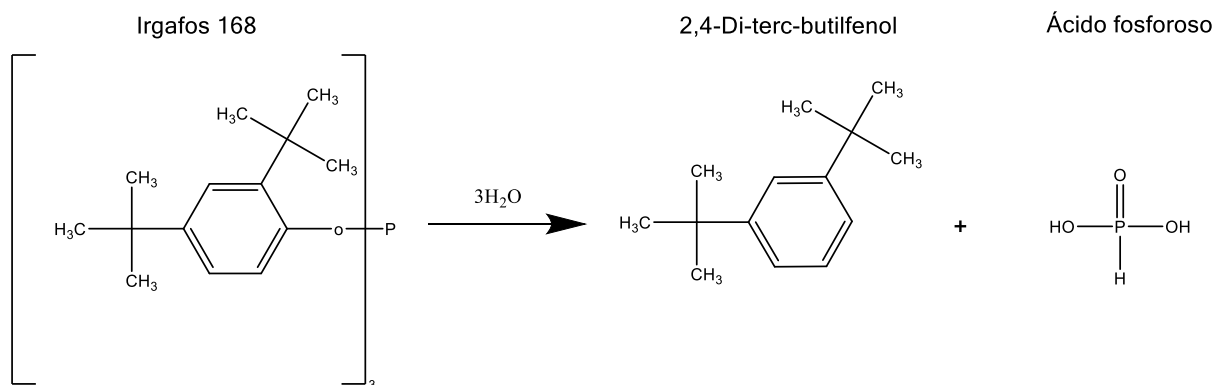


Figura 1.7- Mecanismo de degradação do *Irgafos 168*. Adaptado de [35]

Por sua vez, *Löschner et al.* (2011) [35] concluem que o 4-terc-butil-fenol (II), foi quase sempre encontrado com o composto IV, o que leva a crer que este possa ser um produto de decomposição do mesmo, provavelmente pela perda do grupo terc-butilo.

Pitteloud e Dubs (1994) [14] explicam ainda que a partir do composto 3-(3,5-di-terc-butil-4-hidroxifenil) propionato de metilo (IX), mais conhecido como *Metilox*, é possível através duma reação de transesterificação originar os antioxidantes *Irganox 1076* e *Irganox 1010* (figura 1.8).

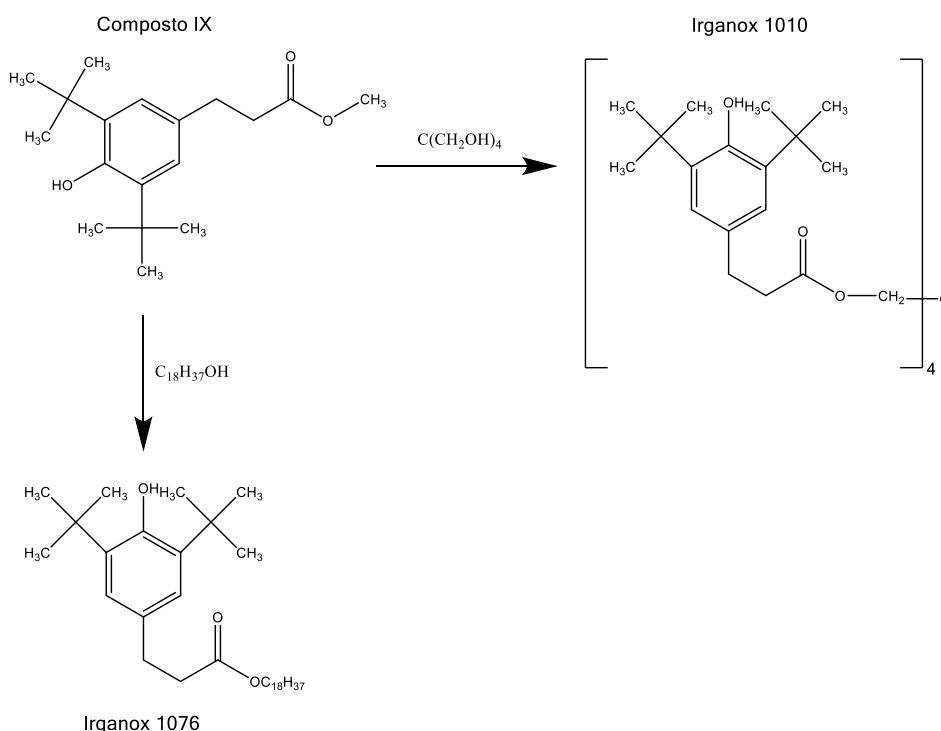


Figura 1.8- Mecanismo de formação do *Irganox 1010* e do *Irganox 1076*. Adaptado de [14]

Bertoldo *et al.* (2004), deduzem ainda que o antioxidante *Irganox 1010* sofre degradação de modo a originar o composto X que por sua vez origina o composto III e o VIII (figura 1.9 e 1.10). [37]

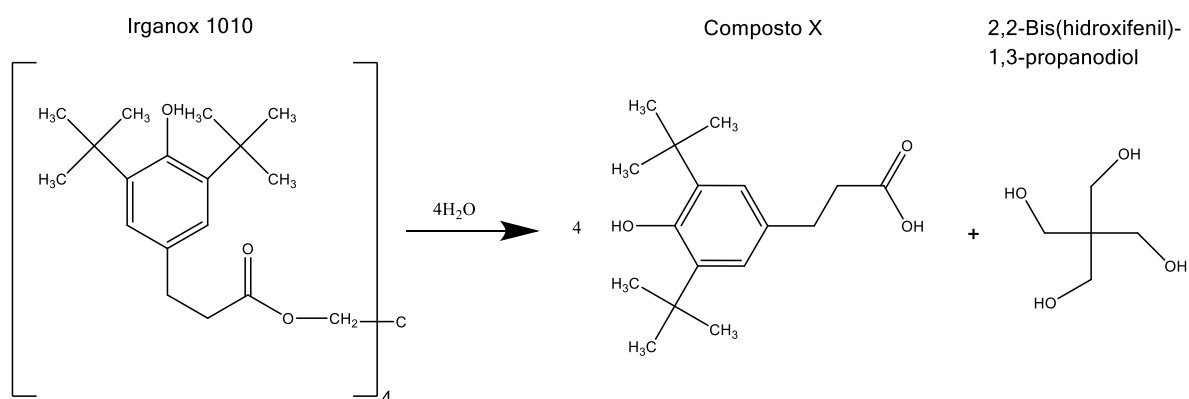


Figura 1.9- Mecanismo de degradação do *Irganox 1010*. Adaptado de [35]

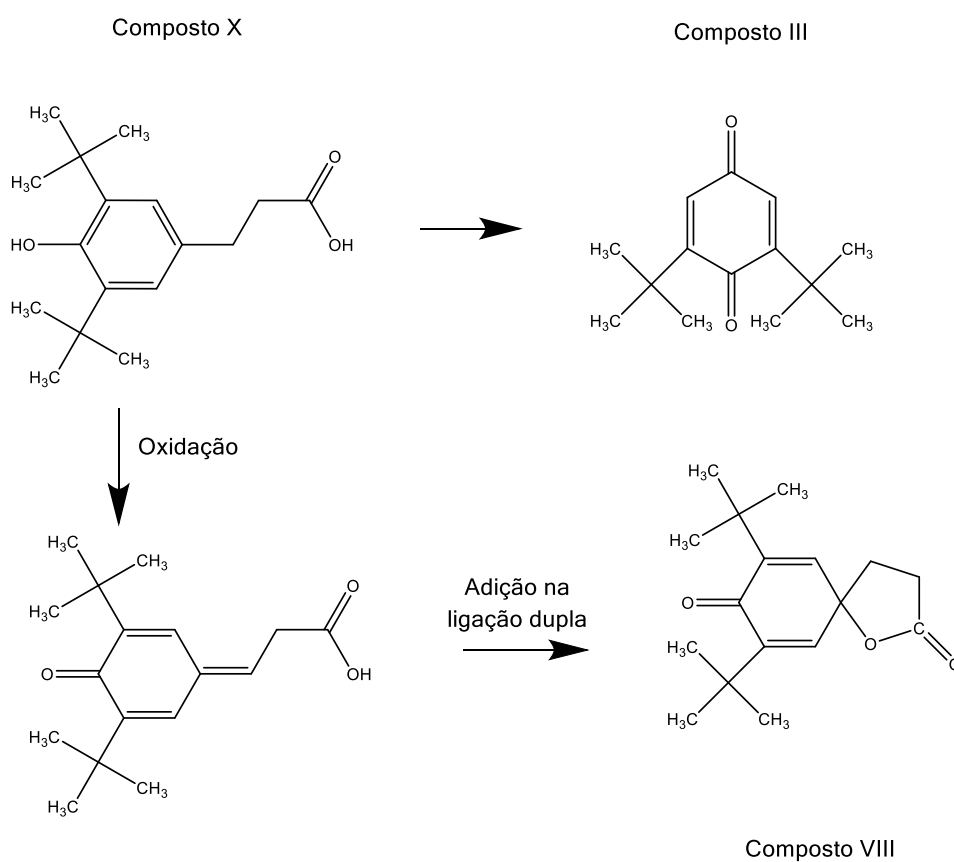


Figura 1.10-Mecanismo de degradação do composto X. Adaptado de [35]

Na tabela 1.5, é possível depreender algumas das alternativas que explicam o aparecimento dos subprodutos de degradação em estudo, tendo em conta diferentes dados da literatura.

Tabela 1.5- Mecanismos de formação possíveis dos produtos de degradação [13, 35, 43]

Produto de degradação	Possível formação ou surgimento
I	Aditivo na produção de PE
II	Aditivo na produção de PE Degradação do IV
III	Degradação do <i>Irganox 1010</i> e do <i>Irganox 1076</i> Degradação do VI e do X
IV	Aditivo na produção de PE Degradação por hidrólise do <i>Irgafos 168</i>
V	Degradação do <i>Irganox 1035</i> e do <i>Irganox 1010</i>
VI	Degradação do antioxidante BHT, <i>Irganox 1035</i> e <i>Irganox 1010</i>
VII	-
VIII	Degradação do <i>Irganox 1035</i> e do <i>Irganox 1010</i> Degradação do X
IX	Intermediário na produção do <i>Irganox 1076</i> e do <i>Irganox 1010</i> Degradação do <i>Irganox 1035</i>
X	Degradação do <i>Irganox 1010</i> e do <i>Irganox 1076</i> Degradação do IX

1.7 Legislação

A legislação associada aos materiais em contacto com água destinada ao consumo humano teve sempre um carácter ambíguo ao longo dos anos. A existência de vários sistemas de aprovação nacionais para este tipo de materiais impossibilitava a uniformidade na avaliação dos efeitos dos produtos comercializados. [4]

O cumprimento dos valores paramétricos na qualidade da água associados à migração de compostos de risco era de difícil comprovação, dada a variedade de produtos existentes no mercado. A documentação dos produtos apresentada pelos fornecedores apresentava-se na maioria dos casos pouco esclarecedora para avaliar o seu impacto na qualidade da água.[44]

Houve tentativas por parte do Comité Europeu de Normalização para criar um sistema de aprovação único, mas a pressão incumbida por parte da indústria dos plásticos na Europa levou a que este nunca tenha sido concretizado.

A 1ª referência feita a substâncias ou materiais em contacto com água para consumo humano, aparece na Diretiva 98/83/CE no artigo 10.º. Neste artigo é abordada a questão da garantia de qualidade do tratamento, do equipamento e dos materiais por parte dos estados-membros. É definida a obrigatoriedade da manutenção do nível de proteção da saúde humana face à utilização de substâncias ou materiais em contacto com a água para consumo humano. Indica ainda que a concentração das substâncias ou dos materiais nessa água não deve superar a necessária para a sua aplicação. [45]

Porém, a revisão da legislação é imperativa, de modo a continuar sempre atualizada com os avanços da ciência. O Decreto-Lei atualmente em vigor em Portugal é o Decreto-Lei n.º 152/2017 que transpõe para a ordem jurídica interna a Diretiva n.º 2015/1787, de 6 de outubro de 2015 e a Diretiva n.º 2013/51/EUROATOM, de 22 de outubro de 2013. [46]

No artigo 21.º deste Decreto-Lei é descrita a necessidade de aprovação de um regulamento, por parte da ERSAR (Entidade Reguladora dos Serviços de Água e Resíduos), de modo a criar um esquema de aprovação nacional para os materiais em contacto com a água para consumo humano. Assim, após a publicação deste regulamento, a utilização dos materiais em contacto com a água seria dependente da aprovação da ERSAR. [46]

No entanto, estava ainda em falta um registo de como deveriam ser feitas as metodologias remetentes para os testes a aplicar e os ensaios a executar na avaliação dos materiais e das substâncias.

Posto isto, a Comissão Europeia procedeu a uma análise da eficácia da Diretiva 98/83/CE através de uma consulta pública à escala da União, chegando à conclusão de que existiam assuntos sujeitos a possíveis melhorias. Um deles, remetia para a questão dos sistemas de aprovação de materiais que entram em contacto com a água destinada ao consumo humano. [4]

Surge assim a Diretiva 2020/2184 de 16 de dezembro de 2020 tem como objetivo dar continuidade ao quadro jurídico estabelecido pela Diretiva 98/83/CE que garantia a salubridade e a limpeza da água para consumo humano através do estudo de possíveis contaminantes. Todos os estados-membros da União Europeia têm 2 anos para efetuar a transposição para o direito nacional, ou seja, até ao final de 2022. [47]

Desde 1998, que o grupo *The 4MSI Initiative*, constituído inicialmente por 4 membros-chave sendo eles a Alemanha, a França, a Holanda e o Reino Unido, teve como objetivo o desenvolvimento de um esquema europeu de aprovação dos materiais em contacto com a água destinada ao consumo humano. Mais especificamente, o seu subgrupo (SG-OM) destinado a trabalhos de ensaios a materiais orgânicos desenvolveu várias propostas que foram submetidas à Comissão Europeia e que foram utilizadas na Diretiva 2020/2184 como referência para um esquema de aprovação europeu. [48] Este subgrupo tinha ainda como funções a identificação de substâncias de risco que podiam surgir na água a partir dos materiais usados no sistema de abastecimento. [21]

No documento redigido por esta entidade, intitulado de “*Requirements and test methods for products made of organic materials in contact with drinking water – 4MSI Draft Common Approach on Organic Materials – Part C*”, que tem como objetivo desenvolver dados para a construção do esquema de aprovação europeu de materiais em contacto com a água, são descritos os limites máximos toleráveis na água para consumo dos compostos de degradação dos antioxidantes.[21]

Tabela 1.6- Limites de referência dos produtos de degradação [20, 21, 49]

Composto	Valor paramétrico (µg/L) (DL-152/2017)	Valor guia (µg/L) (4MSI Initiative)	Valor guia (µg/L) (The Danish Environmental Protection Agency (EPA))	Valor guia (µg/L) (NSF International)
I	s/limite	0,1	s/limite	s/limite
II	s/limite	2,5	20	500
III	s/limite	2,5	s/limite	3
IV	s/limite	250	20	100
V	s/limite	0,1	s/limite	s/limite
VI	s/limite	2,5	1	3
VII	s/limite	2,5	20	s/limite
VIII	s/limite	2,5	s/limite	3
IX	s/limite	50	1	20
X	s/limite	50	s/limite	20

No artigo 11.º da Diretiva 2020/2184 surge a necessidade de estabelecer requisitos mínimos de higiene que fossem adequados aos materiais que entram em contacto com a água para consumo humano. Foram estabelecidas datas-limite para proceder à especificação das metodologias e dos procedimentos para testar e aceitar substâncias utilizadas num material fabricado a incluir nas listas positivas europeias e as respetivas condições de utilização e limites de migração. [1] Mais especificamente, os materiais orgânicos devem ser submetidos a testes que analisam os seguintes critérios: avaliação organolética, lixiviação do carbono orgânico total, concentração máxima tolerável à saída da torneira de substâncias enumeradas nas listas positivas, substâncias imprevistas (GC-MS), aumento do crescimento microbiano e potencial para diminuição da concentração de cloro usado como desinfetante da água de consumo humano. [4]

Por outro lado, as substâncias inicializadoras de alguns materiais orgânicos também devem ser incluídas nas listas positivas europeias que se encontram em fase de elaboração pela ECHA (Agência Europeia das Substâncias Químicas). Sempre que as substâncias ou os seus produtos de reação não tenham valor de referência, pelo princípio da precaução, a sua concentração não deve ser superior a 0,1 µg/l na água de consumo humano. [4]

Na tabela 1.6, apresentam-se ainda alguns valores guia referentes aos limites máximos toleráveis na água para consumo dos alquilfenóis em estudo.

1.8 Empresa Portuguesa das Águas Livres, S.A.

A Empresa Portuguesa das Águas Livres mais conhecida como EPAL, fornece água de consumo a mais de 3,5 milhões de habitantes do território português. A sua criação remonta ao ano de 1868 quando a CAL-Companhia das Águas de Lisboa deu início às funções de abastecimento de água da cidade. Atualmente é uma sociedade anónima, do setor público, detida pelo Grupo Águas de Portugal SGPS.[50]

Antes de 1935, o abastecimento e distribuição de água cingia-se ao concelho de Lisboa. No entanto, ao longo dos anos a lista expandiu-se atingindo hoje 87 municípios diferentes.

As fontes de água principais, com origem superficial, são a albufeira de Castelo de Bode e em Valada (rio Tejo) que asseguram assim o processo de captação. Existem ainda captações subterrâneas nas Lezírias, OTA e Alenquer. Já a produção e o transporte de água são garantidos por 3 subsistemas: Castelo de Bode (1987), Tejo (1940) e Alviela (1880). Destaca-se o subsistema de Castelo de Bode que alberga cerca de 63% de toda a capacidade de produção da EPAL. No total, a rede de distribuição da empresa distribui-se ao longo de mais de 1400 km.[51][52]

Um dos principais valores da empresa relaciona-se com a garantia da qualidade da água ao longo de todo o sistema de abastecimento. Este requisito é garantido pela Direção de Laboratórios que elabora todos os anos um plano de controlo da qualidade da água. Localizados em Lisboa e em Vale da Pedra, os laboratórios da EPAL realizam técnicas submetidas a critérios de controlo da qualidade analítica rigorosos. Desde 1999, que têm o estatuto de laboratório de ensaio acreditado pela norma NP EN ISO/IEC 17025 - “Requisitos gerais de competência para laboratórios de ensaio e calibração”. As operações existentes passam pela colheita de vários tipos de amostras de água e pela análise de 110 parâmetros da qualidade da água e 135 métodos analíticos cientificamente seguros.[53]

Para além disto, o laboratório possui uma área de Ensaio a Materiais em contacto com a água que permite avaliar em que medida os materiais, sejam de origem orgânica ou cimentícia, conseguem modificar as propriedades físico-químicas da água. Os ensaios de migração permitem o estudo organolético da água assim como a análise de possíveis compostos que possam migrar para a água a partir dos materiais em contacto, tendo sempre em consideração a legislação em vigor.[54]

MÉTODO DE PREPARAÇÃO DA AMOSTRA

2.1 Extração em fase sólida (SPE)

2.1.1 Introdução

A Extração em Fase Sólida (SPE) tornou-se uma técnica aceite na comunidade científica nos finais da década de 60. Em 1968, surgem as primeiras publicações que utilizavam polímeros sintéticos como o estireno-divinilbenzeno. No entanto, o que veio a revolucionar esta técnica foi a introdução de colunas de enchimento descartáveis compostas por sílica ligada, em 1977. O crescente desenvolvimento dos mecanismos de extração e da estabilidade dos adsorventes levou à aclamação do método e à sua expansão. No início dos anos 80, os enchimentos à base de sílica seletivos para analitos não polares, tornaram-se reconhecidos começando a ser normalmente utilizados em técnicas laboratoriais que analisavam amostras líquidas. Em 1989, o aparecimento de discos de SPE surgiu como uma alternativa ao típico cartucho em coluna. [55]

Inicialmente, a expansão do SPE deu-se graças à indústria clínica e farmacêutica que manuseavam volumes de amostras pequenos. No entanto, a partir dos anos 90 outras indústrias como a área alimentar, agricultura, água, ambiente, entre outros, começaram a utilizar esta técnica graças ao aumento de escala dos cartuchos e devido à sua fácil aplicabilidade e automação. [55]

2.1.2 Princípios gerais

A extração em fase sólida permite o enriquecimento ou concentração dos analitos de interesse e a simplificação da matriz em estudo. Para além disso, permite a transferência dos componentes presentes na matriz da amostra para um solvente adequado. [56]

É um processo altamente seletivo e atualmente tem aplicabilidade numa vasta gama de compostos, graças às tecnologias avançadas presentes nos enchimentos existentes no mercado.

Este método consiste em colocar a amostra em estudo, que se encontra em fase líquida, em contacto com uma superfície sólida. Os compostos são transferidos e retidos na fase sólida, sendo que esta é isolada da amostra permitindo a recuperação dos analitos de interesse por eluição. [57] Os adsorventes estabelecem ligações intermoleculares com os analitos tais como ligações de Keesom (apolar-apolar), ligações de Debye (polar-apolar), ligações de London, ligações de hidrogénio (polar) ou de forças de Coulomb (troca iónica). [55]

A junção deste processo com GC/MS, permite que o detetor garanta uma elevada sensibilidade e seletividade. É importante compreender que uma amostra aquosa não pode ser diretamente analisada no cromatógrafo visto que a matriz em questão é incompatível com este equipamento. Percebe-se assim a necessidade de implementar um método como o SPE que permita transferir os analitos de interesse para um solvente compatível com o GC/MS.

2.1.3 Etapas

2.1.3.1 Pré-tratamento da amostra

Dependendo da amostra em estudo pode ser necessário recorrer a um pré-tratamento que permite uma melhor retenção dos analitos de interesse. Já que a eficiência da retenção pode ser comprometida quando a amostra contém demasiadas partículas, utilizam-se por vezes diferentes técnicas de filtração e centrifugação. [58]

Deste modo, é possível garantir o pH ou a força iónica ideal da amostra, necessária para os passos seguintes.

2.1.3.2 Condicionamento

O adsorvente, antes de ser condicionado, possui uma estrutura aleatoriamente orientada à superfície. Ao colocar diretamente a amostra aquosa em contacto com a fase sólida cria-se um ambiente altamente polar que seria incompatível com o adsorvente. A formação de agregados moleculares por parte do adsorvente e a tensão superficial sentida na amostra iriam reduzir a probabilidade de contacto entre as duas fases.[55]

Como tal, o condicionamento tem como objetivo preparar a fase sólida de forma a aumentar a eficiência das interações com os analitos alvo. Deste modo, utilizam-se um ou mais solventes que, através da sua adsorção, são capazes de ativar os ligandos da superfície sólida. [58] O adsorvente acaba por adquirir propriedades hidrofílicas que garantem um contacto eficaz entre a amostra aquosa e a fase sólida.

O último solvente adicionado deve permitir um pré-equilíbrio da coluna, pelo que é utilizado um solvente que possua uma matriz semelhante à amostra. Neste caso o solvente escolhido é a água ultrapura.

É de extrema importância que o adsorvente não seque durante este passo, pois caso isso se verifique o equilíbrio entre as fases pode ser destabilizado. [58]

2.1.3.3 Retenção

A amostra é forçada por ação de vácuo ou através de uma corrente de azoto a atravessar a coluna de SPE com um fluxo constante apropriado (tipicamente 1 mL/min).

A escolha apropriada do enchimento é bastante importante de modo a reter os analitos de interesse. Caso isto não se suceda, há probabilidade dos compostos de interesse atravessarem o enchimento, sem serem retidos, sendo recolhidos enquanto os interferentes ficam retidos no adsorvente.

À medida que a amostra vai sendo colocada em contacto com o sólido, estabelece-se um equilíbrio entre as duas fases. Este equilíbrio é descrito pelo coeficiente de distribuição (K_D) que descreve a distribuição do analito entre a amostra e a fase estacionária [55]

$$K_D = \frac{[A]_{adsorvente}}{[A]_{amostra}} \quad (2.1)$$

$[A]_{adsorvente}$ - Concentração do analito na fase estacionária ($\mu\text{g/L}$)

$[A]_{amostra}$ - Concentração do analito na amostra ($\mu\text{g/L}$)

2.1.3.4 Lavagem

Devido à complexidade das amostras em estudo é necessário adicionar passos de lavagem entre a retenção e a eluição de forma a minimizar as interferências da matriz.

Podem surgir juntamente com os compostos de interesse, outros analitos que são também retidos na fase sólida. Por sua vez, estes podem co-eluir com os compostos de interesse durante o passo de lavagem.

Assim, torna-se necessário escolher um solvente de lavagem que seja forte e seletivo o suficiente para eliminar os interferentes, mas não os compostos de interesse retidos. Este também deve ter em conta o tipo de adsorvente e o respetivo mecanismo de retenção assim como as propriedades dos analitos alvo.

2.1.3.5 Secagem

O cartucho deve ser sempre seco antes da eluição devido à incompatibilidade do sistema cromatográfico com a água, quando a análise é efetuada por cromatografia gasosa. A presença de água num extrato pode levar a interações com a fase estacionária da coluna durante a análise em GC, levando ao comprometimento dos resultados.

2.1.3.6 Eluição

O procedimento de remoção dos compostos de interesse do suporte sólido através de um líquido denomina-se de eluição. O solvente garante uma maior afinidade com os analitos, promovendo a desorção dos mesmos da superfície sólida. No final, a recolha dos analitos no líquido é feita à saída da coluna de SPE. Para melhores resultados, retiram-se várias alíquotas mais pequenas ao invés de

apenas uma. A escolha do solvente de eluição depende dos mecanismos de retenção usados e da matriz da amostra [59].

Na figura 2.1 encontram-se ilustradas as etapas principais do SPE.

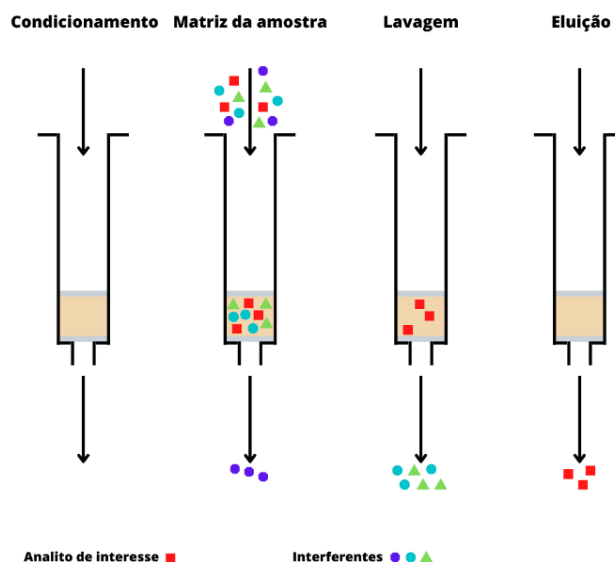


Figura 2.1-Etapas referentes ao SPE. Adaptado de [60]

2.1.4 Mecanismos de extração

A escolha do adsorvente deve sempre ter em conta as propriedades do composto em análise, como a polaridade e a sua capacidade de ionização. Existem diversos mecanismos que garantem a eficácia da extração:

- ❖ Fase reversa (apolar)- O adsorvente é apolar e a matriz da amostra é polar ou ligeiramente polar. Estabelecem-se forças de *Van der Waals* ou forças de dispersão entre o analito e a superfície do adsorvente que garantem a atração entre as ligações carbono-hidrogénio no analito e os grupos funcionais do enchimento. A utilização de uma matriz da amostra polar facilita esta interação, repelindo o analito da solução e aproximando-o da fase sólida. No caso do GC também é aconselhável o uso de solventes apolares para separar os compostos da coluna. Exemplos de grupos funcionais: C18, C8, C6, C4, C2, fenil, ciclohexil e cianopropil.[61]
- ❖ Fase normal (polar)- Neste caso, o adsorvente é polar e a matriz da amostra é apolar. As ligações dipolo-dipolo e as pontes de hidrogénio garantem a retenção dos analitos polares na fase estacionária. De modo a separar os compostos da coluna, utilizam-se solventes polares. Exemplos grupos funcionais: diol, aminopropil, cianopropil, sílica, alumina e florisil. [62]
- ❖ Troca iónica- O princípio desta interação baseia-se na atração eletrostática entre o grupo funcional básico ou ácido do composto e os grupos funcionais à superfície do adsorvente. Caso os grupos funcionais da fase estacionária sejam negativos ocorrem trocas catiónicas e

caso sejam positivos ocorrem trocas aniónicas. Estes podem ainda ser classificados como ácidos/bases fortes ou fracos. Para quebrar as interações existem vários métodos como utilizar uma solução tampão com elevada força iónica ou alterando o pH.

- ❖ Mixo- Neste caso, os adsorventes possuem 2 ou mais mecanismos diferentes de retenção. O mais comum é o adsorvente ter grupos funcionais hidrofóbicos e de troca iónica, sendo que o rácio entre os dois pode ser adaptado de acordo com as propriedades de retenção desejadas. A vantagem deste mecanismo reside na possibilidade de extrair matrizes de amostras mais complexas. A eluição faz uso de solventes apolares com soluções tampão adequadas.

Finalmente no que toca a matrizes aquosas, devem ser utilizados adsorventes com fase reversa dado que a água é polar. Nesta molécula o oxigénio representa o polo negativo enquanto os hidrogénios os polos positivos.

Na figura 2.2 é possível ver um esquema que facilita a escolha do tipo de adsorvente que deve ser utilizado.

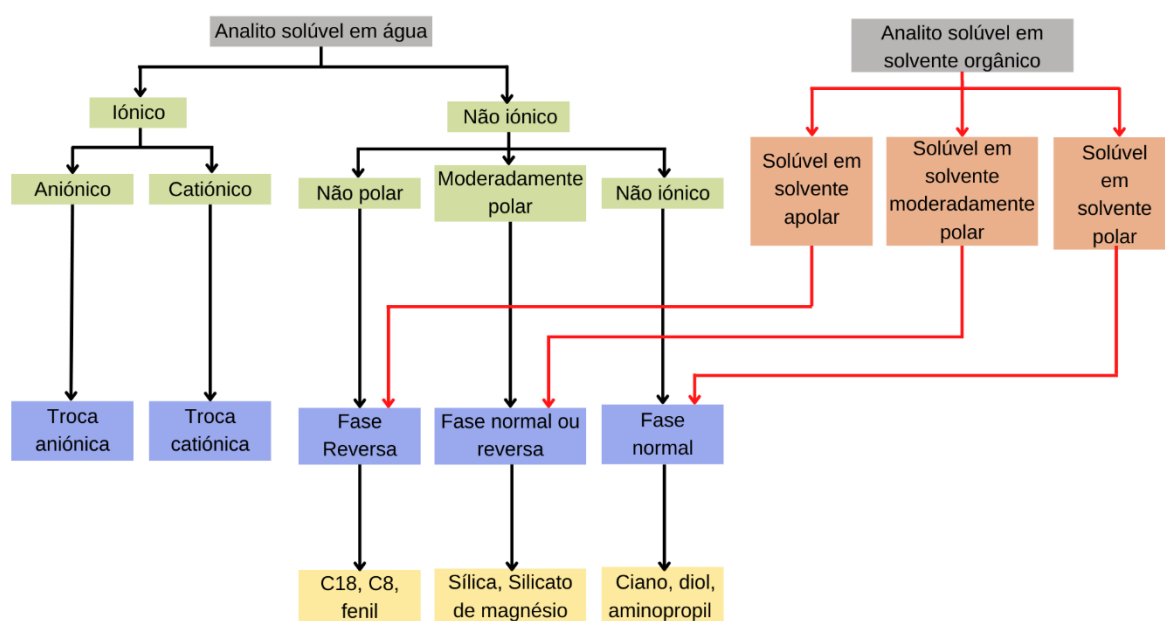


Figura 2.2- Seleção do melhor tipo de enchimento. Adaptado de [62]

No entanto deve ser sempre tida em conta a necessidade de estabelecer um equilíbrio entre a escolha do adsorvente e do solvente de eluição. Por exemplo, quando o adsorvente garante uma retenção elevada, é importante também compreender que a eluição por sua vez é dificultada devido às interações que os compostos estabeleceram com a fase sólida. Já ao extrair mais do que um composto de uma vez, não é possível encontrar um adsorvente ideal para todos sendo também necessário um compromisso.

2.1.5 Enchimentos

Existem 2 formatos possíveis usados em SPE: cartuchos ou discos. Apesar de reduzir o tempo de processamento e de garantir resultados melhores para grandes volumes de amostra, os discos reservam-se para aplicações mais específicas. Os cartuchos são quase sempre a primeira escolha, dado que não são tão dispendiosos e a variedade de materiais que compõem o enchimento é superior.

Os cartuchos, que podem também ser apelidados de colunas, possuem um enchimento que ocupa aproximadamente um terço do volume de extração (figura 2.3). Este componente fulcral para a extração é composto por partículas de 20 a 60 μm e é retido por minidisco porosos de plástico (polietileno) ou metal que filtram a amostra durante a sua passagem. O volume restante da coluna serve para a amostra ou solvente. [56]

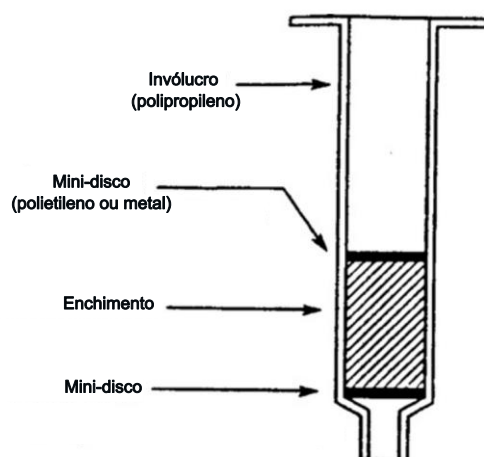


Figura 2.3- Constituintes do cartucho de SPE. Adaptado de [56]

Os enchimentos existentes no mercado são os de carvão grafitizado, terra de diatomáceas, sílica, sílica ligada, alumina, florisil e polímeros porosos. [63]

O uso mais proeminente da sílica relaciona-se com a sua estrutura complexa composta por vários grupos funcionais relevantes: siloxano, silanol, água adsorvida e grupos livres e ligados. Estes interagem com os analitos polares por adsorção forte (silanóis), intermédia (grupos livres) e fraca (siloxanos). [63] No caso da sílica ligada, esta permite ainda a remoção de compostos hidrofóbicos presentes na amostra aquosa.

2.1.6 Otimização do processo SPE

De maneira a obter extratos com recuperações elevadas sem compostos indesejados existem vários fatores determinantes que devem ser tidos em conta.

- ❖ **Nível do pH** – O pH na passagem da amostra, no uso de soluções tampão e na eluição é determinante para o método. Este pode ser manipulado para otimizar a retenção ou a eluição dos analitos, dado que o cartucho apenas se utiliza uma vez. O pH ideal deve favorecer trocas iónicas que possibilitem a eficiência da recuperação dos analitos. No caso destes serem ácidos, um solvente neutro dificilmente elui os mesmos se estes tiverem em contacto com um adsorvente básico. No entanto, quando se usa um SPE de fase normal, o pH não é tão relevante dado que os solventes usados são normalmente apolares. [55][58]
- ❖ **Volume de eluição** – É importante que o solvente de eluição tenha em conta as propriedades do analito de modo a maximizar a recuperação dos analitos que foram retidos. O volume de solvente necessário à eluição depende do volume interparticular do enchimento e do fator de retenção do analito na coluna de SPE.
- ❖ **Solvente de lavagem** – Este deve ser cuidadosamente escolhido de modo a garantir a remoção dos compostos indesejados sem a perda dos analitos de interesse, que devem ter uma melhor afinidade com o adsorvente do que com o solvente de lavagem. O passo da concentração só é relevante caso não existam também compostos indesejados retidos no cartucho. Assim, a lavagem é indispensável visto que garante a eliminação dos interferentes, a redução do ruído ou a presença de picos interferentes no cromatograma.
- ❖ **Volume de *breakthrough*** – É o volume a partir do qual se deteta a amostra à saída da coluna, enquanto se vai inserindo amostra à entrada do adsorvente. Por outras palavras, é o volume de amostra que pode ser depositado na coluna sem perder os compostos de interesse, representando assim a capacidade do enchimento. Desta maneira, esta medida avalia a magnitude da interação entre o volume da amostra e a massa de adsorvente. Segundo *Werkhoven-Gowie et al.* (1981) [55], o volume de *breakthrough* pode ser calculado através do volume de retenção e do desvio padrão:

$$V_B = V_R - 2\sigma_v \quad (2.2)$$

V_B - Volume de *breakthrough*

V_R – Volume de retenção

σ_v - Desvio padrão da dispersão axial dos analitos ao longo do enchimento

Por sua vez, o desvio padrão dependerá do volume interparticular do enchimento, do fator de retenção e do número de pratos teóricos. [64]

- ❖ **Tamanho do cartucho**- Este vai depender do tamanho de adsorvente necessário para extrair os analitos pretendidos. Uma consideração aproximada, revela que a quantidade do analito não deve ser superior a 5% do peso do adsorvente.
- ❖ **Área de superfície do adsorvente**- Esta deve ser elevada de maneira a maximizar a retenção do solutos pelos poros da camada do adsorvente.

- ❖ **Distribuição do tamanho das partículas do adsorvente** – Deve ser uniforme para garantir a passagem do fluxo e impedir que os extratos possam vir a ter partículas do adsorvente.

2.2 Extração Líquido-Líquido (LLE)

2.2.1 Introdução

A extração líquido-líquido (LLE) é uma técnica amplamente utilizada em análises qualitativas e quantitativas, sendo também uma das mais antigas. A indústria petrolífera introduziu a LLE em 1909 quando foi implementado comercialmente um processo capaz de separar hidrocarbonetos aromáticos a partir do dióxido de enxofre, utilizado como solvente.[65] A partir dos anos 30, a técnica continuou a evoluir até aos dias de hoje em outras áreas como a metalúrgica, farmacêutica e nuclear. [66]

2.2.2 Princípios Gerais

A extração líquido-líquido é um processo de transferência de massa que consiste na adição de um solvente adequado a uma mistura líquida de modo a formar 2 fases imiscíveis. Normalmente, envolve uma fase aquosa (amostra) e uma fase orgânica extrativa.

Num passo inicial a amostra que contém o soluto de interesse é adicionada a uma ampola de decantação e de seguida adiciona-se o solvente. A agitação da mistura garante a dispersão das gotículas de um líquido no outro e a convecção em ambas as fases. [67] O analito de interesse tem uma maior solubilidade no extrato do que na amostra tornando possível a extração. Após a coalescência das gotas é possível separar as duas fases tirando partido da sua diferença de densidades (figura 2.4). Opcionalmente, adiciona-se à fase orgânica um agente químico para a remoção de moléculas de água. Por fim, o extrato resultante pode ainda ser concentrado num sistema de evaporação. [68]

Existem vários modelos matemáticos que descrevem este processo, mas a teoria do duplo filme de Whitman é a mais conhecida.[69] Em cada uma das fases forma-se uma fina camada que confere resistência à transferência de massa. Estes dois filmes estão assim adjacentes a uma interface que separa as duas fases.[70] A transferência de massa ocorre apenas no duplo filme por difusão molecular.

Quando considerado um sistema fechado existem três parâmetros-chave: a temperatura, a concentração do soluto A no extrato (y_A) e a concentração do soluto A na amostra (x_A). O equilíbrio termodinâmico do sistema relaciona-se de acordo com a equação 2.3 [69]:

$$y_A = f(x)_{t=const} = k_d \cdot x_A \quad (2.3)$$

Esta relação conhecida como a Lei de Nernst, exige a imiscibilidade total das fases e uma concentração de soluto baixa. O coeficiente de partição (k_d) fornece uma medida da partição do soluto entre as duas fases. [69]

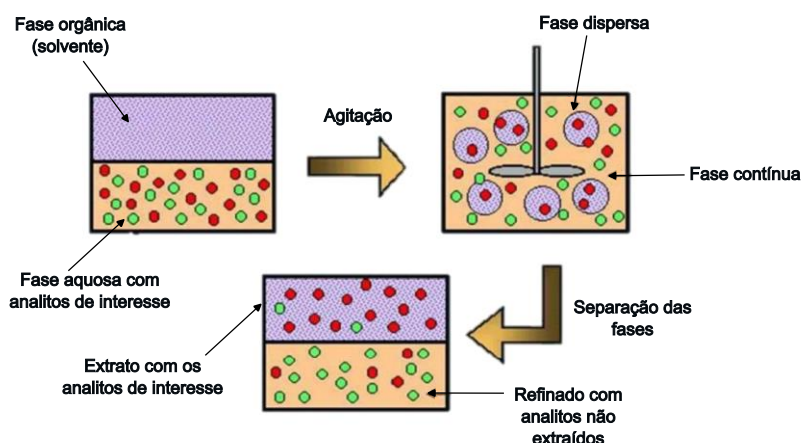


Figura 2.4- Etapas da LLE. Adaptado de [71]

2.2.3 Otimização do processo LLE

Para maximizar a eficiência do processo LLE, é preciso ter em conta os seguintes pontos:

2.2.3.1 Solvente

É necessário estabelecer um equilíbrio entre as propriedades do solvente de modo a tornar a extração um processo eficaz. Existem assim diversos atributos a ter em conta: [68]

- ❖ **Seletividade** – Mede a eficácia que o solvente possui em separar os diferentes constituintes da amostra. Deve ser elevada (superior a 1) de modo a garantir a separação do analito de interesse.
- ❖ **Coeficiente de repartição** – É a razão entre a concentração do soluto no extrato e na amostra, em equilíbrio. Quando o seu valor é alto, consegue-se extrair o soluto de um grande volume de amostra para um pequeno volume de extrato dado que existe uma maior afinidade com o solvente. Se o seu valor for baixo, é requerido um maior volume de solvente. O seu valor é sempre fixo para um determinado composto.
- ❖ **Densidade**– A diferença de densidades entre a amostra e o extrato deve ser maximizada.

- ❖ **Insolubilidade-** As duas fases líquidas devem ser o mais imiscíveis possíveis, ou seja, o solvente não deve solubilizar na amostra.
- ❖ **Tensão superficial-** Deve haver um equilíbrio entre a coalescência e a dispersão de um líquido no outro e por esse motivo a tensão superficial não deve ser muito elevada. Quanto maior a tensão superficial, mais difícil se torna a dispersão.
- ❖ **Estabilidade-** O solvente deve ter uma natureza inerte para não interferir quimicamente com os compostos no sistema.
- ❖ **Viscosidade-** Deve ser baixa para possibilitar a dispersão do líquido.
- ❖ **Perigo-** Quando possível o solvente não deve ser tóxico, inflamável ou corrosivo.

2.2.3.2 Nível do pH

Numa simples extração líquido-líquido, a distribuição do analito em ambas as fases, não depende da constituição das mesmas, o que significa que a mudança de pH não tem impacto. No entanto, caso o soluto sofra uma ou mais reações adicionais de equilíbrio numa das fases, a sua razão de distribuição passa a depender da composição da fase aquosa ou orgânica mais especificamente das suas propriedades ácido-base. Nestes casos, uma mudança de pH da amostra pode levar a uma eficiência superior da extração. Caso algumas espécies iônicas não sejam solúveis no extrato, o coeficiente de distribuição pode ser alterado de modo a favorecer a transferência de massa para o extrato. [72][73] As soluções-tampão escolhidas devem ter no mínimo duas unidades de pH acima ou abaixo do pKa do soluto de interesse.

2.2.3.3 Extração Fracionada

Quando o coeficiente de partição é baixo, torna-se necessária a extração múltipla sucessiva que consiste em extrair mais que uma vez a mesma amostra e no final juntar as frações obtidas dos extratos. Este método é mais eficiente dada a sua capacidade de maximização do contacto turbulento entre as fases. Após a primeira extração, a primeira fração de solvente é separada uma vez que o equilíbrio entre as fases já foi atingido. De seguida é introduzida na ampola uma nova fração de solvente fresco e é feita uma nova extração (figura 2.5). Este processo pode ser repetido 2 ou mais vezes dependendo do grau de solubilização do analito na fase orgânica. [73] Na realidade, a extração fracionada é mais eficiente do que uma extração simples com elevado volume de solvente.

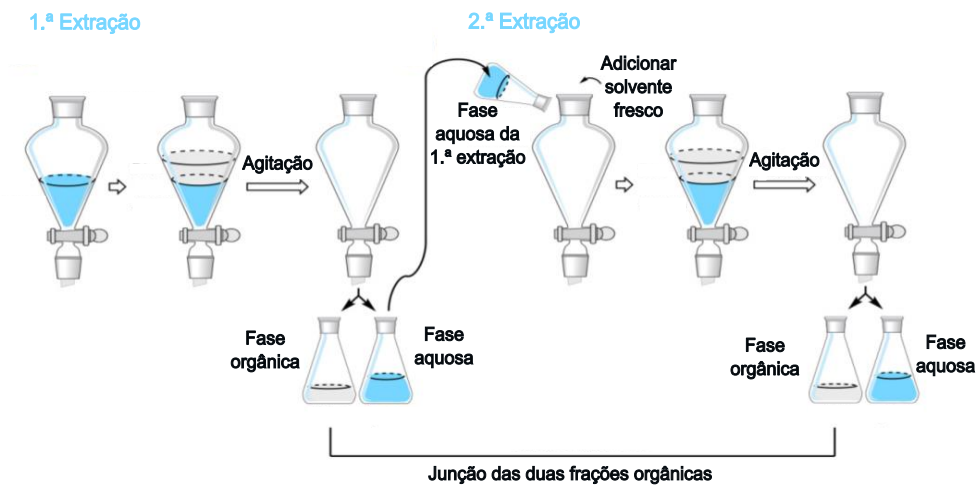


Figura 2.5- Etapas da LLE fracionada. Adaptado de [73]

CROMATOGRAFIA GASOSA / ESPETROMETRIA DE MASSA (GC/MS)

3.1 Cromatografia gasosa

3.1.1 Introdução

A cromatografia tem a capacidade de realizar a separação de uma mistura complexa, identificando e quantificando os compostos presentes na mesma.

Em 1903, esta técnica foi primeiramente desenvolvida na separação de pigmentos das plantas por Mikhail S. Tswett, um botânico russo.[74]

Mais tarde, surge a cromatografia gasosa, desenvolvida pelos cientistas Archer J. P. Martin e Anthony T. James, que ganharam o prémio Nobel da Química em 1952 face a esta invenção.[75]

Pouco depois, entre 1955 e 1956, Fred McLafferty e Roland Gohlke implementaram uma das técnicas analíticas mais utilizada nos dias de hoje, a Cromatografia Gasosa associada à Espectrometria de Massa (GC/MS).[76]

A cromatografia gasosa (figura 3.1) é um método muito usado graças à sua fácil implementação e reduzido tempo de análise. O tipo de análise depende sempre da natureza da amostra e do que se quer examinar. A elevada resolução, sensibilidade e reprodutibilidade são parâmetros-chave que fazem com que esta técnica seja das mais utilizadas na indústria. [77][78]

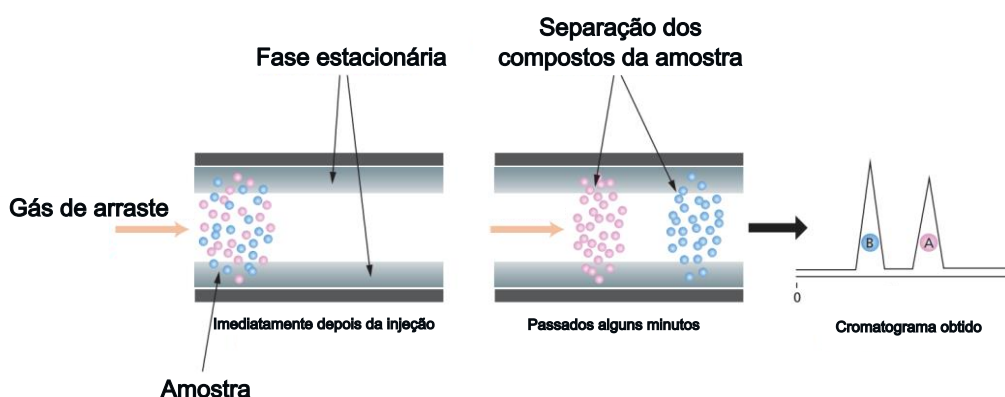


Figura 3.1- Etapas da separação dos compostos numa amostra em GC. Adaptado de [75]

O objetivo da cromatografia gasosa é separar diferentes compostos, através da sua vaporização e separação com base na volatilidade e na estrutura química das diferentes moléculas presentes na amostra.

Porém, o modo de operação desta técnica apenas permite a análise de compostos voláteis com baixa massa molecular, com um ponto de ebulição abaixo dos 400 °C, que não sofram decomposição à temperatura de vaporização e que sejam quimicamente estáveis.[79]

Os fatores críticos associados aos compostos de uma amostra que determinam a separação por cromatografia gasosa são:

- ❖ **Polaridade** – A afinidade que os compostos têm para com a fase estacionária influencia a sua migração ao longo da coluna. A existência de ligações intermoleculares como ligações de Keesom, Debye e London ou o aparecimento de pontes de hidrogénio estabelecem as interações entre o composto e a fase estacionária. Quanto maior a polaridade das moléculas, maior será o tempo necessário para percorrer a coluna, eluindo mais lentamente.
- ❖ **Ponto de ebulição** – As substâncias com o menor ponto de ebulição são eluídas da coluna primeiro. Quanto maior a volatilidade, maior a probabilidade do composto percorrer a coluna em conjunto com a fase móvel na forma gasosa.

3.1.2 Componentes de um cromatógrafo gasoso

Um cromatógrafo gasoso engloba vários elementos diferentes, cada um com a sua devida função e importância.

3.1.2.1 Gás de arraste

A função deste gás é transportar os compostos ao longo da coluna de modo a que estes atinjam o detetor e sejam identificados, atuando como fase móvel.

O gás tem de ser inerte para não interferir com os compostos a analisar. Para além disso, não deve ser inflamável, deve ter boa difusividade ao longo da coluna e deve apresentar velocidades lineares. A escolha do gás de arraste também tem impacto na seletividade visto que o mesmo pode competir com as moléculas dos analitos pela adsorção à fase estacionária.

O fluxo e a pureza da fase móvel são determinantes para a separação dos compostos e por esse motivo utilizam-se válvulas reguladoras e filtros de gases que permitem a obtenção das condições ideais de operação. Estes componentes permitem a redução do consumo de gás de arraste. Quanto maior a pureza do gás, maior a sensibilidade do método. O fluxo desempenha um papel determinante na eficiência da coluna e na análise qualitativa e quantitativa visto que a velocidade linear do gás é dependente da variação do fluxo. [75]

3.1.2.2 Injetor

A introdução de uma amostra no cromatógrafo gasoso é realizada através de uma porta de injeção ou de válvulas de amostragem. Dependendo do tipo de matriz do analito (líquida, gasosa ou sólida) existem diferentes modos de emprego. No caso dos sólidos, estes devem ser dissolvidos num solvente adequado e posteriormente inseridos com uso de uma seringa, através de um septo, no fluxo do gás de arraste. A injeção pode ainda ser feita manualmente ou através de um amostrador automático.

O injetor (figura 3.2), que também funciona como um vaporizador para amostras líquidas com temperaturas entre 50 °C e 450 °C, deve conseguir introduzir a amostra quase instantaneamente. O fator crítico deste elemento relaciona-se com o tamanho da amostra que é injetada. Para obter o melhor formato do pico e a máxima resolução deve-se optar quando possível por um volume de injeção pequeno na ordem dos μL . [75]

Diferentes tipos de coluna necessitam de diferentes modos de injeção sendo que para uma coluna capilar os mais comuns são o *Split*, o *Splitless* ou *On-Column*. [80]

- ❖ *Split* – Apenas uma pequena porção da amostra vaporizada é introduzida na coluna sendo a restante enviada para ventilação (válvula de *split*). É utilizada quando existe elevadas concentrações dos analitos na amostra.
- ❖ *Splitless* – A amostra vaporizada é inserida na totalidade na coluna, de maneira a que os picos dos compostos que se queiram identificar tenham uma maior sensibilidade sendo possível a sua análise. Neste caso, a amostra fica retida no início da coluna enquanto o vapor residual do solvente é ventilado. É utilizada em concentrações vestigiais dos analitos numa amostra.
- ❖ *On-Column* – A amostra completa é enviada diretamente para a coluna cromatográfica, não tendo contacto com a porta de injeção. É utilizada em analitos termicamente instáveis, com baixa volatilidade e alta reatividade.

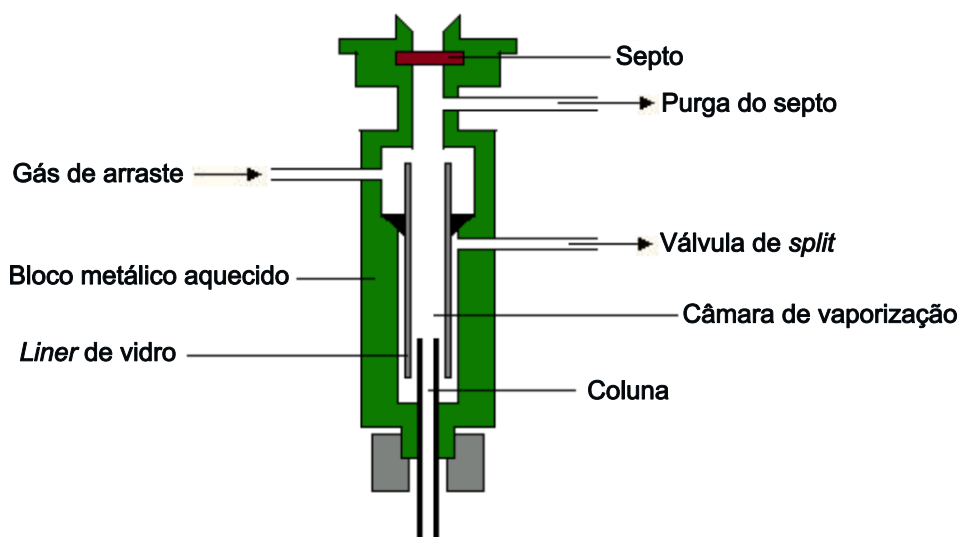


Figura 3.2- Constituintes do injetor. Adaptado de [81]

3.1.2.3 Coluna cromatográfica

O tipo de coluna a utilizar nas análises GC/MS subdivide-se em 2 grupos principais: colunas de enchimento e colunas capilares.

Dadas as limitações das colunas de enchimento, a utilização de colunas capilares tornou-se a regra, promovendo uma eficiência de separação superior graças à alta velocidade de operação, maior resolução e melhor processamento de misturas complexas. No entanto, quando as amostras são relativamente concentradas têm de ser diluídas antes da injeção ou divididas (*split*) quando inseridas na coluna.

Estas colunas caracterizam-se por diâmetros internos pequenos e comprimentos elevados (cerca de 30 a 60 m) de maneira a otimizar a separação. Existem 3 tipos de colunas capilares: *Wall-Coated Open Tubular* (WCOT), *Porous-Layer Open Tubular* (PLOT) ou *Support-Coated Open Tubular* (SCOT). Os tubos mais comuns (figura 3.3) são feitos de sílica fundida devido ao seu caráter inerte que garante a inexistência de interações com os componentes da amostra. No entanto devido à sua fragilidade, este material é ainda revestido com um polímero, a poliimida, de modo a conferir flexibilidade e resistência mecânica ao tubo. Nas paredes internas do tubo, encontra-se a fase estacionária onde a separação ocorre. A fase estacionária é habitualmente composta por polisiloxano que confere estabilidade e robustez. Para além disso, este material é versátil dado que a sua cadeia principal de polisiloxano pode conter substituintes distintos que conferem diferentes propriedades à fase estacionária.[82][83]

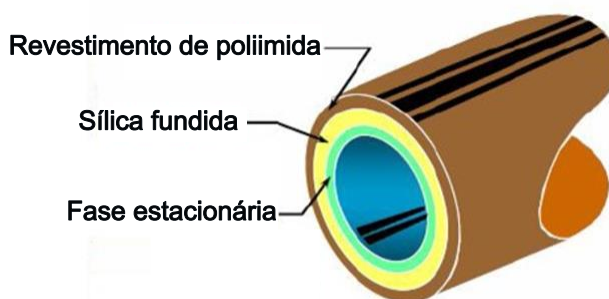


Figura 3.3-Constituintes da coluna capilar. Adaptado de [84]

A espessura do filme escolhido dá a indicação da quantidade de fase estacionária a utilizar. A fase estacionária tem uma temperatura máxima única de operação que não deve ser ultrapassada pelo forno para evitar danos na coluna.

Os parâmetros que afetam a separação são as dimensões da coluna e a composição e espessura da fase estacionária. Relativamente à composição, é possível alterar a polaridade e as interações da coluna pela escolha do material da fase estacionária.

Os compostos presentes no fluxo de gás que percorrem a coluna, são adsorvidos pela fase estacionária e desadsorvidos de volta para a corrente de gás de arraste.

3.1.2.4 Forno

Este elemento torna possível a existência de várias zonas de temperatura ao longo da coluna cromatográfica de maneira a facilitar a separação dos compostos e a sua deteção.

A temperatura na porta de injeção deve ser alta o suficiente para permitir a rápida vaporização da amostra mas sem atingir valores que possam levar à ocorrência de decomposição térmica.

Por outro lado, dentro da coluna, a temperatura deve também ser alta o suficiente para permitir uma velocidade de passagem do fluxo aceitável. Para além disso, a temperatura deve ser mantida acima do ponto de orvalho da amostra, mas não acima do seu ponto de ebulição.

Outro ponto importante a referir é que apesar dos tempos de retenção diminuir com o aumento da temperatura, a resolução piora dificultando a deteção dos compostos, sendo necessário assim atingir um equilíbrio.

Apesar de existir a possibilidade de operar a coluna a temperatura constante (coluna isotérmica) o mais usual é utilizar um programa de temperaturas visto que é mais adequado para misturas com uma vasta gama de pontos de ebulição. Durante o programa de temperaturas, observa-se um aumento da temperatura que resulta numa diminuição da velocidade linear do gás de arraste.[85]

Por outro lado, a condensação da amostra deve ser evitada no detetor que está situado depois da coluna e que deve ser operado a uma temperatura elevada o suficiente. Caso não seja cumprido este requisito pode haver diminuição da resolução dos picos ou o total desaparecimento dos mesmos.

3.1.2.5 Detetor

Os detetores têm a capacidade de deteção e quantificação dos compostos presentes numa amostra à medida que estes vão sendo eluídos e expelidos pela coluna. Este dispositivo funciona como um transdutor que converte propriedades físico-químicas de um analito num sinal elétrico que é registado através de um cromatograma. [75]

Existem dois componentes principais: um sensor e um equipamento eletrónico. O primeiro garante a deteção à saída da coluna e o segundo codifica o sinal obtido de modo a poder ser analisado num software específico que compara graficamente a área/altura do pico com o tempo de retenção do composto.

O detetor ideal tem uma elevada sensibilidade e linearidade, não é afetado por variações externas e opera de uma maneira fácil e estável permitindo quantificar com clareza.

Os detetores podem ser agrupados em dois grupos distintos (tabela 3.1), conforme o que detetam. Podem apenas medir a concentração dos analitos que está presente na fase móvel ou então medir a massa dos analitos na amostra. A diferença entre os dois grupos, é que o sinal obtido pelo primeiro depende da quantidade de gás de *make-up* ou gás auxiliar. [75]

Outra maneira de classificar os detetores diz respeito à detecção universal dos compostos, que deteta todos os compostos presentes numa amostra ou então a detecção seletiva/específica que apenas deteta grupos específicos de compostos. [86]

Tabela 3.1-Tipos de detetores associados ao GC

Detetor de concentrações	Detetor de massas
TCD (<i>Thermal Conductivity Detector</i>)	MS (<i>Mass Spectrometry</i>)
ECD (<i>Electron Capture Detector</i>)	FID (<i>Flame Ionization Detector</i>)
	BID (<i>Barrier Discharge Ionization Detector</i>)
	FPD (<i>Flame Photometric Detector</i>)
	FTD (<i>Flame Thermionic Detector</i>)
	SCD (<i>Sulfur Chemiluminescence Detector</i>)

3.1.2.6 Sistema de Dados

O objetivo principal do sistema de dados passa pelo controlo instrumental e pelo processamento e armazenamento dos dados associados à análise cromatográfica através de um sistema de software complexo. Para além disso, permite a medição do sinal através de velocidades de análise rápidas.

Os parâmetros de instrumentação associados ao modo de injeção, ao programa de temperaturas, à velocidade de fluxo do gás de arraste e ao modo de detecção podem ser controlados a partir de um único método instrumental definido no sistema de dados.

A aquisição dos dados fornecidos pelo detetor começa a partir do início da injeção da amostra. De seguida, é feito o processamento automático dos dados que inclui a identificação, integração dos picos e calibração reduzindo o erro humano inerente. Podem ainda ser associadas bases de dados de referência como é o caso da biblioteca de espectro de massas do *NIST*. [87]

3.1.3 Aspectos teóricos sobre cromatografia

3.1.3.1 Coeficiente de partição

Quando os compostos apresentam uma melhor distribuição na fase móvel, estes são transportados mais rapidamente ao longo da coluna cromatográfica em comparação com outros compostos que tenham afinidades superiores com a fase estacionária.

Posto isto, existe uma constante de equilíbrio que exprime a atratividade de um composto para a fase estacionária, com o nome de constante de distribuição ou coeficiente de partição, k_d .

É definido como a razão entre a concentração do analito A na fase estacionária e a concentração do mesmo analito na fase móvel.[88][89]

$$k_d = \frac{[A]_S}{[A]_M} \quad (3.1)$$

$[A]_S$ – Concentração do analito A na fase estacionária ($\mu\text{g/mL}$)

$[A]_M$ – Concentração do analito A na fase móvel ($\mu\text{g/mL}$)

Esta propriedade adimensional exprime a tendência que determinado soluto tem em ser adsorvido pela fase estacionária, sendo que diferentes coeficientes originam diferentes velocidades de eluição na coluna. O cálculo deste coeficiente assume alguns pressupostos como o equilíbrio da coluna cromatográfica e a inexistência de interações entre os compostos.

O coeficiente de partição pode ainda ser subdividido em 2 parcelas:

$$K_c = k \times \beta \leftrightarrow K_c = k \times \frac{V_M}{V_S} \quad (3.2)$$

k – Fator de retenção

β – Razão entre os volumes das 2 fases

V_M – Volume da fase móvel (mL)

V_S – Volume da fase estacionária (mL)

3.1.3.2 Razão entre fases

A razão entre o volume das 2 fases define a dinâmica entre o diâmetro da coluna e o filme. Pode ser calculada pela equação 3.3, quando se sabe a espessura do filme:[88]

$$\beta = \frac{(r_c - d_f)^2}{2r_c d_f} \quad (3.3)$$

r_c – Raio da coluna cromatográfica (μm)

d_f – Espessura do filme (μm)

3.1.3.3 Tempo de retenção

O tempo de retenção é o tempo entre a injeção da amostra e o registo máximo do pico cromatográfico do soluto no detetor.[90] Pode ser definido com base no tempo de retenção ajustado (t'_r) e no tempo morto (t_m).

$$t_r = t'_r + t_m \quad (3.4)$$

O tempo de retenção ajustado é o tempo estimado que o analito permanece adsorvido na fase estacionária. Já o tempo de retenção morto ou tempo de retenção do composto não-retido é o tempo mínimo que, um composto que não é retido pela fase estacionária, demora a atravessar a coluna. Este comportamento é habitualmente característico do metano. [88][91]

Na figura 3.4, é possível ver representado o tempo de retenção num cromatograma e os seus componentes.

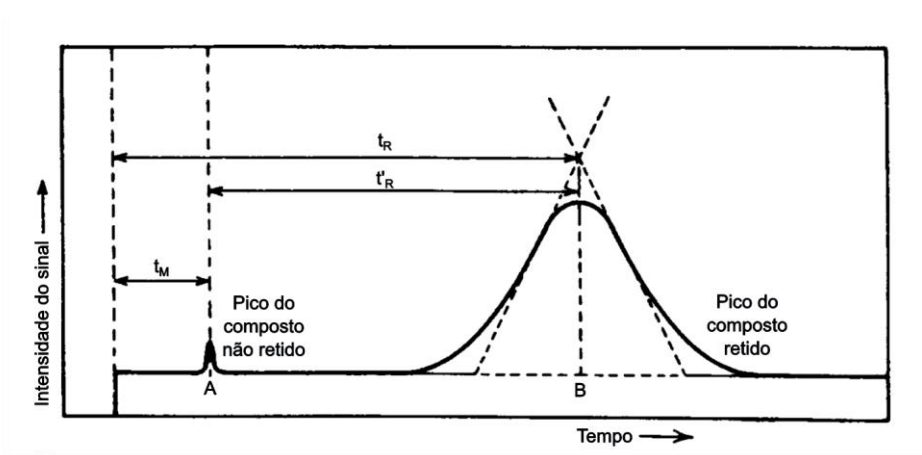


Figura 3.4-Representação de um cromatograma típico. Adaptado de [88]

3.1.3.4 Fator de retenção

O fator de retenção define-se como a razão entre a quantidade de soluto na fase móvel e a quantidade de soluto na fase estacionária.[88][92]

$$k = \frac{[M_A]_S}{[M_A]_M} \quad (3.5)$$

$[M_A]_S$ – Quantidade do soluto A na fase estacionária

$[M_A]_M$ – Quantidade do soluto A na fase móvel

O tempo de retenção de um analito pode ser aferido pelo fator de retenção, visto que quanto maior o seu valor, maior será a retenção do composto na fase estacionária.

$$k = \frac{t'_r}{t_m} \quad (3.6)$$

t'_r – Tempo de retenção ajustado (min)

t_m – Tempo morto (min)

3.1.3.5 Volume de retenção

Os analitos podem também ser caracterizados pelo volume de retenção, que é o volume de gás de arraste necessário para eluir determinado soluto na coluna. Caso se considere o caudal na coluna constante, o volume de retenção é proporcional ao tempo de retenção como se pode confirmar pela equação 3.7. [88]

$$V_R = t_r \times F_c \quad (3.7)$$

t_r – Tempo de retenção (min)

F_c – Caudal ao longo da coluna (mL/min)

O volume de retenção também pode ser relacionado com o coeficiente de partição, K_c . O volume de retenção é assim expresso através da soma de 2 termos: o volume da fase móvel (V_M) e o volume de gás que percorre a coluna enquanto o soluto está a interagir com a fase estacionária ($K_c V_S$). [93]

$$V_R = V_M + K_c V_S \quad (3.8)$$

V_M – Volume de *hold up* ou volume vazio (mL)

V_S – Volume da fase estacionária (mL)

3.1.3.6 Volume de retenção ajustado

O volume de retenção ajustado (V'_R) é dado pela equação 3.9. Este parâmetro é ainda diretamente proporcional ao fator de retenção.[88]

$$V'_R = V_R - V_M = K_c V_S \quad (3.9)$$

$$k = \frac{V'_R}{V'_M} = \frac{V_R}{V_M} - 1 \quad (3.10)$$

3.1.3.7 Velocidade linear média da fase móvel

A velocidade média do soluto (μ) pode ser calculada por: [88]

$$\mu = \frac{L}{t_R} \quad (3.11)$$

L – Comprimento da coluna (m)

t_R – Tempo de retenção do soluto (min)

Por outro lado, a velocidade linear média da fase móvel ($\bar{u}$) é calculada a partir do tempo de retenção em relação a um pico não retido:

$$\bar{u} = \frac{L}{t_M} \quad (3.12)$$

Considera-se a média desta velocidade, pois como o gás de arraste é compressível, a velocidade linear da fase móvel varia ao longo da coluna.

3.1.3.8 Fator de retardamento

O fator de retardamento (FR) expressa o adiamento ou atraso de determinado soluto durante a sua passagem na coluna. O seu valor é sempre igual ou inferior a 1. Através das velocidades definidas anteriormente, é possível compará-las através deste parâmetro: [88]

$$FR = \frac{\mu}{\bar{u}} \quad (3.13)$$

Também se pode definir como:

$$FR = \frac{V_M}{V_R} \quad (3.14)$$

$$FR = \frac{1}{(1+k)} \quad (3.15)$$

Quanto maior for este parâmetro, maior o tempo de retenção dentro da coluna. Por exemplo, se determinado soluto tiver um fator de retenção igual a 5, significa que este fica retido na coluna 5 vezes mais tempo que o pico não retido.

3.1.3.9 Forma dos picos

Cada soluto diferente que é analisado, origina uma distribuição ou pico cromatográfico que pode ter diferentes formas como se observa na figura 3.5. Idealmente o pico obtido deve aproximar-se a uma curva gaussiana, visto que picos não simétricos podem significar interações indesejadas com a fase estacionária ou entre compostos. [88]

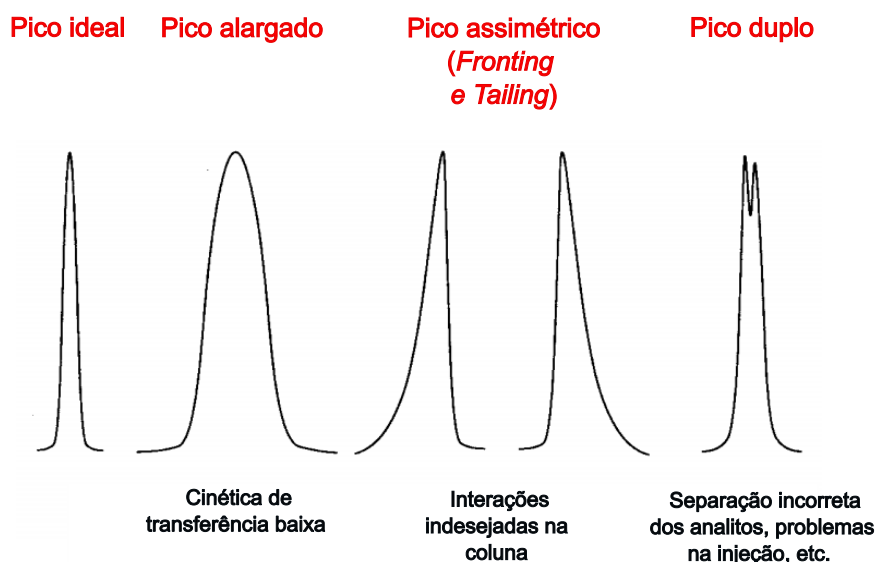


Figura 3.5- Formas possíveis dos picos cromatográficos. Adaptado de [88]

3.1.3.10 Fator de *Tailing*

Pode-se exprimir a assimetria de uma curva através do fator de *Tailing* que é definido pelas distâncias *a* e *b* que são medidas a 10% da altura total do pico em estudo, como se pode observar pela figura 3.6. Caso a razão obtida seja inferior a 1 ocorre o fenómeno de *Fronting*. Por outro lado, se o fator de *Tailing* for superior a 1 ocorre o fenómeno de *Tailing*. [88]

$$TF = \frac{b}{a} \quad (3.16)$$

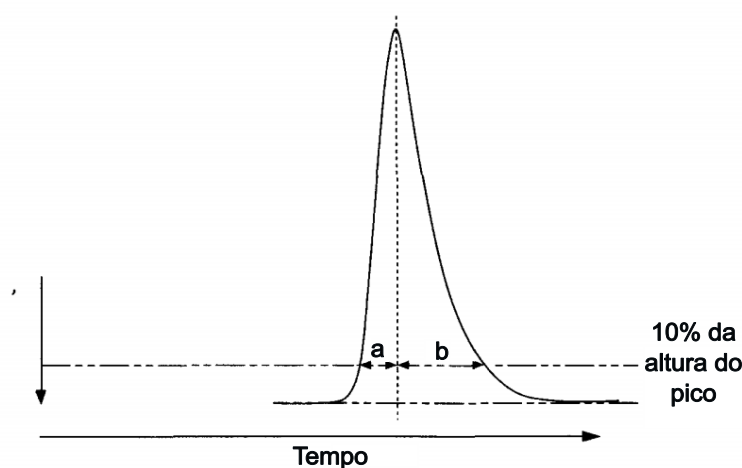


Figura 3.6- Pico cromatográfico com fenômeno de *Tailing*. Adaptado de [88]

3.1.3.11 Fator de separação

O fator de separação é o quociente entre as razões de distribuição de dois analitos diferentes com picos adjacentes em condições idênticas e é definido pela equação 3.17. Está intimamente relacionado com a seletividade da fase estacionária com os analitos e tem a capacidade de expressar a dificuldade de separação de dois solutos. [88][92]

$$\alpha = \frac{(t'_R)_2}{(t'_R)_1} = \frac{k_2}{k_1} = \frac{(K_C)_2}{(K_C)_1} \quad (3.17)$$

$(t'_R)_2$ – Tempo de retenção ajustado do segundo pico a eluir

$(t'_R)_1$ – Tempo de retenção ajustado do primeiro pico a eluir

Quanto maior o valor do fator de separação, mais fácil é a separação. Se o seu valor for igual a 1 significa que não ocorre separação dos solutos.

3.1.3.12 Número de pratos teóricos

O número de pratos teóricos é utilizado para avaliar o alargamento dos picos. Considera-se que a coluna é composta por uma série de pratos com determinada altura (H) onde existe um equilíbrio perfeito entre as 2 fases. Este parâmetro adimensional está relacionado com a eficiência da coluna. Quanto maior o número de pratos (N), maior o potencial de separação e consequentemente maior será a eficiência da coluna. [88]

$$N = \left(\frac{t_r}{\sigma}\right)^2 \quad (3.18)$$

Como a largura da base do pico (W_b) num pico com distribuição normal é dada por 4σ (figura 3.7), pode-se reescrever a equação anterior de acordo com a equação 3.19:

$$N = 16 \left(\frac{t_r}{L}\right)^2 \quad (3.19)$$

Visto que a largura do pico a metade da altura do mesmo (W_h) é dada por $2,354\sigma$ pode ainda definir-se o número de pratos teóricos efetivo:

$$N_{ef} = 5,54 \left(\frac{t_r}{W_h}\right)^2 \quad (3.20)$$

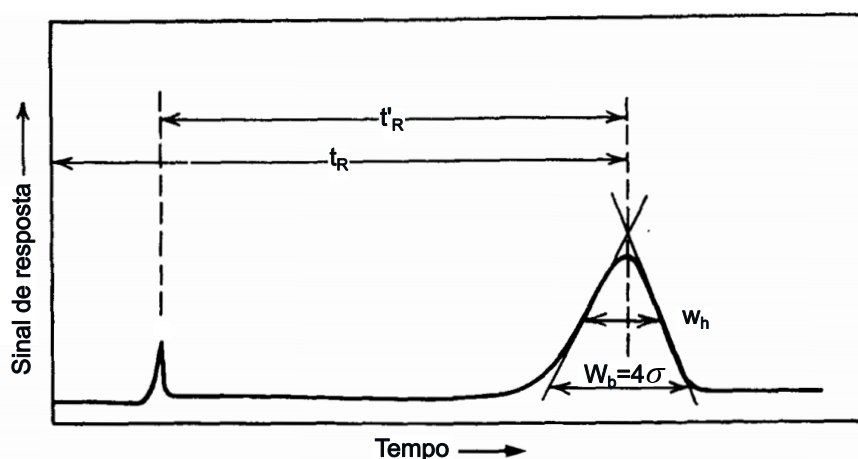


Figura 3.7- Representação da largura da base do pico cromatográfico. Adaptado de [88]

3.1.3.13 Altura do prato

A altura equivalente de um prato teórico (HETP) ou simplesmente altura de um prato (H) é um parâmetro importante capaz de comparar eficiências entre diferentes colunas. Quanto menor a altura do prato teórico, melhor a eficiência. [88]

$$H = \frac{L}{N} \quad (3.21)$$

L – Comprimento da coluna (m)

N – Número de pratos

❖ Equação de Van Deemter

Este modelo cinético descreve a altura de um prato como sendo inversamente proporcional à velocidade linear média da fase móvel ($\bar{u}$). Defende que numa coluna de enchimento a dispersão ou alargamento dos picos da amostra depende de 3 efeitos:

- Difusão de Eddy (A)
- Difusão longitudinal molecular (B)
- Transferência de massa na fase líquida estacionária (C)

$$H = A + \frac{B}{\bar{u}} + C\bar{u} \quad (3.22)$$

A condição desejável é diminuir a altura do prato teórico de modo a garantir uma melhor eficiência. Para isso, uma das 3 constantes referidas acima deve ser minimizada. [88][93]

❖ Equação de Golay

No caso das colunas tubulares, o termo A não existe devido à inexistência de um enchimento. Nestes casos o termo C divide-se em transferência de massa na fase estacionária (C_S) e transferência de massa na fase móvel (C_M):

$$H = \frac{B}{\bar{u}} + (C_S + C_M)\bar{u} \quad (3.23)$$

O termo B é definido pela equação 3.24 através do coeficiente de difusão do soluto no gás de arraste (D_G):

$$B = 2D_G \quad (3.24)$$

Um coeficiente de difusão desejável deve ser baixo, de modo a minimizar a difusão das moléculas ao longo de um gradiente de concentrações. Para diminuir a sua contribuição, a velocidade linear do gás de arraste pode ser aumentada ou então pode-se optar por um gás com um peso molecular mais alto. [88][93]

O termo correspondente à transferência de massa na fase estacionária define-se de acordo com a equação 3.25. A condição desejável é que a espessura média do filme seja pequena e o coeficiente de difusão (D_S) seja elevado.

$$C_S = \frac{2kd_f^2}{3(1+k)^2D_S} \quad (3.25)$$

d_f – Espessura média do filme da fase estacionária (μm)

D_S – Coeficiente de difusão do soluto na fase estacionária

k – Fator de retenção

O termo correspondente à transferência de massa na fase móvel define-se como na equação 3.26.

$$C_M = \frac{(1+6k+11k^2)r_c^2}{24(1+k)^2 D_G} \quad (3.26)$$

r_c – Raio da coluna (μm)

D_G – Coeficiente de difusão do soluto no gás de arraste

Graficamente, a equação de Van Deemter é representada por uma hipérbole assimétrica onde consta um mínimo que confere a altura do prato mínima, a velocidade ótima de operação e consequentemente a eficiência mais alta e o menor alargamento do pico. Pela figura 3.8, é possível observar que a partir do ponto ótimo, o declive positivo da equação de Van Deemter é explicado pelo comportamento crescente dos termos relativos à transferência de massa. [88]

No entanto, caso a velocidade seja aumentada face a este ponto, é possível diminuir o tempo de análise requerido. Assim, é necessária escolher se a otimização deve ser feita em relação à eficiência da coluna ou ao tempo de análise.

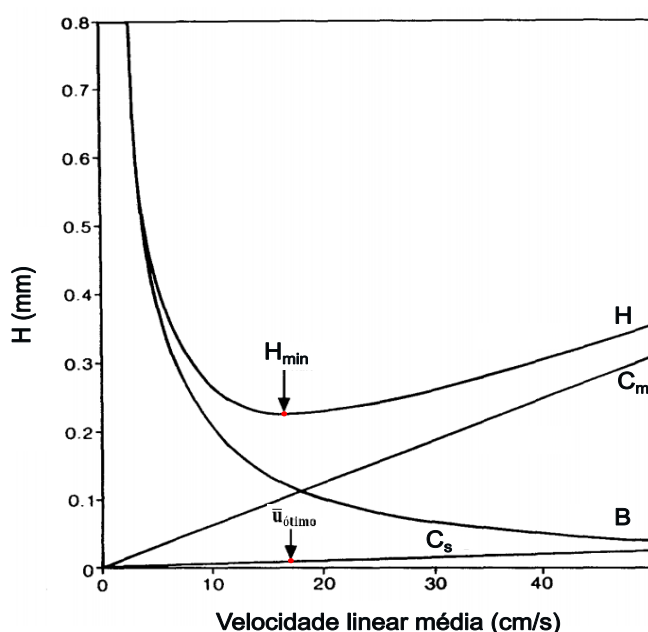


Figura 3.8- Representação dos termos relevantes da equação de Van Deemter. Adaptado de [88]

Também é possível comparar o impacto dos diferentes gases de arraste pelo gráfico de Van Deemter (figura 3.9). O azoto tem o valor da altura do prato mais baixo, logo garante uma melhor eficiência em comparação com outros gases. No entanto exige um maior tempo de análise devido à sua velocidade linear reduzida. Por esse motivo este gás não é o mais indicado em colunas com programas de temperatura associados visto que o aumento da temperatura resulta numa diminuição da velocidade linear. [75]

Já o hidrogénio, tratando-se do gás mais leve, apresenta o declive mais baixo de todos. O que significa que ao aumentar a velocidade linear do gás, a perda de eficiência da coluna não é tão substancial conseguindo-se assim reduzir o tempo de análise com alturas do prato pequenas. No entanto, o hidrogénio não é usado habitualmente devido aos riscos associados. Daí que na cromatografia gasosa se opte pelo uso do hélio como gás de arraste.

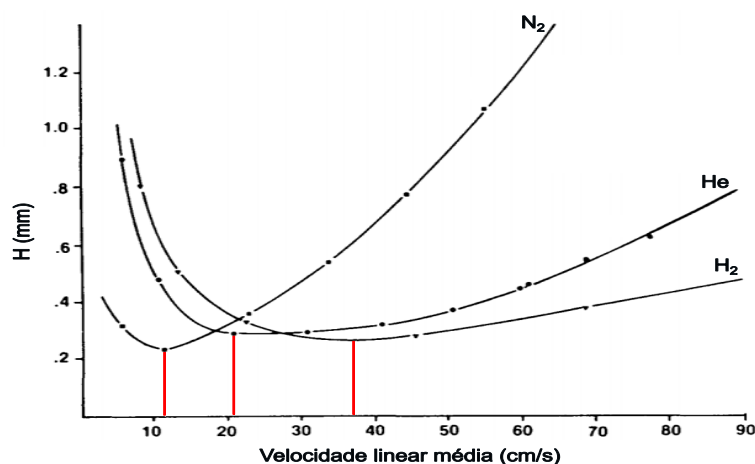


Figura 3.9-Efeito do gás de arraste na equação de Van Deemter.

Adaptado de [88]

3.1.3.14 Resolução

Este parâmetro é capaz de quantificar quão separados estão picos adjacentes num mesmo cromatograma. Esta separação é dependente das retenções dos picos cromatográficos e das suas larguras. Quanto maior a resolução, maior a separação entre os compostos. [88]

$$R_s = \frac{(t_r)_B - (t_r)_A}{\frac{(W_b)_A + (W_b)_B}{2}} = \frac{2d}{(W_b)_A + (W_b)_B} \quad (3.27)$$

$(W_b)_A$ – Largura do pico respetivo ao soluto A

$(W_b)_B$ – Largura do pico respetivo ao soluto B

d – Distância entre os picos máximos dos 2 solutos

Caso os picos adjacentes tenham a mesma área, significa que vão ter a mesma largura o que leva à simplificação da equação anterior:

$$R_s = \frac{d}{W_b} \quad (3.28)$$

Quando as tangentes dos picos se tocam, significa que a distância entre os picos é igual à largura dos picos e a resolução é 1 (figura 3.10). Quando a resolução é 1,5 significa que a separação na linha de base é completa.

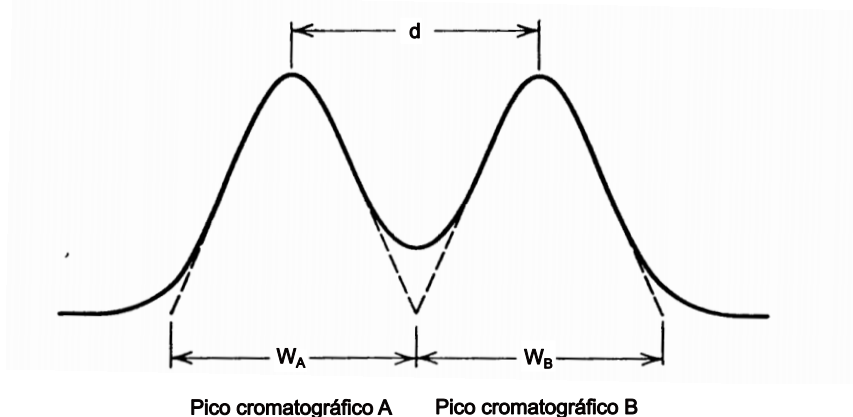


Figura 3.10-Separação incompleta de dois picos cromatográficos.

Adaptado de [88]

3.2 Espectrometria de massa

3.2.1 Introdução

As vantagens da espectrometria de massa (MS) são claras, sendo possível obter resultados com elevada sensibilidade e especificidade. A associação da espectrometria de massa à cromatografia permite efetuar análises qualitativas e quantitativas através da separação de amostras complexas e da identificação dos compostos aí existentes.[75]

No entanto, tem algumas limitações no que toca à implementação de um método de ensaio para análise de compostos pouco voláteis e/ou instáveis.

O princípio do espectrómetro de massa baseia-se na ionização dos analitos no seu estado gasoso. Como a formação destes iões origina moléculas instáveis, dá-se a fragmentação das mesmas, originando diferentes iões m/z com diferentes intensidades. A intensidade dos iões irá depender da estabilidade dos mesmos. [94]

O MS funciona de acordo com os seguintes passos:

- ❖ Geração de iões na fonte de ionização
- ❖ Separação dos iões no analisador de massas
- ❖ Detecção e/ou quantificação dos iões

3.2.2 Componentes do Espectrômetro de Massas

3.2.2.1 Interface

A interface é o elo de ligação entre o GC e o MS. Torna-se necessária a separação entre os dois, visto que o GC atua à pressão atmosférica e o MS necessita de vácuo. Já a interface é mantida a baixas pressões e a altas temperaturas que permitem a permanência da volatilidade dos analitos. [75]

3.2.2.2 Sistema de vácuo

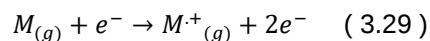
O sistema de vácuo é necessário de maneira a diminuir a probabilidade de colisão entre os iões na fonte de ionização e impedir descargas de energia elevadas. As condições de operação aproximam-se dos 10^{-3} a 10^{-4} Pa. [75]

Deste modo, o percurso dos iões consegue ser assegurado sem reações ou mecanismos de dispersão indesejados com a atmosfera do sistema (ar, água ou gases de arraste). Ou seja, a distância média do ião sem colisão é superior à distância entre a fonte de ionização e o detetor. Assim, a veracidade do espectro de massas obtido é superior.

3.2.2.3 Fonte de ionização

A ocorrência de iões é possibilitada pela colisão ou reação dos compostos em análise com moléculas de gás. Fontes de ionização como a eletroionização (EI) e a ionização química (CI) têm vindo a ser vastamente aplicadas em GC-MS.

A eletroionização foi uma das primeiras fontes em operação (figura 3.11). Neste caso, os eletrões, que são emitidos por um filamento feito de tungsténio ou rénio, atingem um potencial elétrico de 70 eV. O sentido do feixe de iões é assegurado pelo ânodo. De seguida, estes entram em colisão com as moléculas gasosas que consequentemente fragmentam e adquirem uma carga positiva sendo assim enviadas para o analisador de massas. Esta colisão consiste em diversos mecanismos vibracionais e rotacionais, podendo-se expressar pela equação 3.29: [75][94]



O que acontece é a remoção de um eletrão do composto para formar um ião. Devido à elevada energia sentida, dá-se a fragmentação sucessiva dando origem a fragmentos mais pequenos com uma diversa distribuição de energias internas. As moléculas podem ainda sofrer rearranjos para formar agregados mais estáveis.

Alguns fatores que influenciam este processo são: [75][95]

- ❖ Estabilidade dos compostos a ionizar
- ❖ Pressão da fonte de ionização ($< 10^{-2}$ Pa)

- ❖ Energia dos eletrões
- ❖ Temperatura (50 – 350 °C)
- ❖ Design da câmara iónica (No caso da EI, utiliza-se uma câmara iónica aberta)

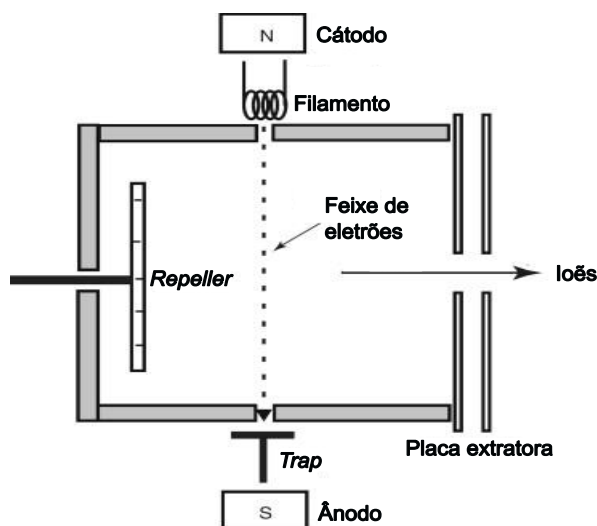


Figura 3.11- Representação de uma fonte de ionização EI. Adaptado de [95]

3.2.2.4 Analisador de massas – quadrupolo

Atualmente, existe uma variedade de analisadores de massas capazes de separar partículas com carga pelas respetivas massas associadas aos iões. O modo como a introdução dos iões, no analisador de massas, é feita origina duas classes. Os analisadores de massa contínuos mantêm um fluxo constante de iões no analisador, como é o caso do quadrupolo. Já os analisadores de massa com ionização pulsada operam através da acumulação de iões que são posteriormente introduzidos no analisador sob a forma de ondas pulsadas, como é o caso do *Ion Trap*. [96]

Pelo esquema da figura 3.12, é possível observar as vantagens dos diferentes tipos de analisadores:

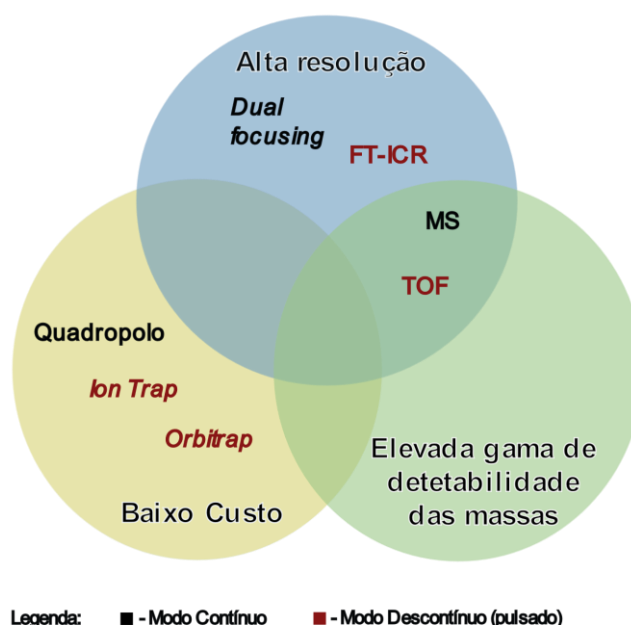


Figura 3.12- Vantagens dos diferentes tipos de analisadores de massas.

Para os efeitos pretendidos, vai se entrar em mais detalhe no analisador de quadrupolo. Este é constituído por quatro hastes metálicas e cilíndricas ligadas a um circuito elétrico, numa disposição quadrangular. [75] As hastes diagonalmente opostas tem a mesma polaridade.

Estas atuam como elétrodos enquanto a energia elétrica é transmitida alternadamente e vai sendo adaptada consoante a passagem de iões, gerando radio frequências em simultâneo com uma corrente alternada ou direta. A seletividade deste procedimento é garantida pela capacidade do analisador seleccionar apenas os iões escolhidos para análise. Os iões são acelerados em direção ao detetor. Na figura 3.13, é possível observar a vermelho o trajeto dos iões não seleccionados, que entram em colisão com as hastes e afastam-se do campo elétrico.

O modo de operação em *Full Scan* permite a análise de desconhecidos, visto que proporciona uma deteção completa numa determinada gama definida de massas. Durante o modo de operação em SIM (*Selected Ion Monitoring*), apenas os iões m/z definidos no método analítico são detetados. Logo, é de esperar que a sensibilidade aumente dada a focalização do analisador. Deste modo, os iões são transmitidos sequencialmente ao longo do analisador de massas, sendo que as massas mais baixas são detetadas em primeiro lugar.[97]

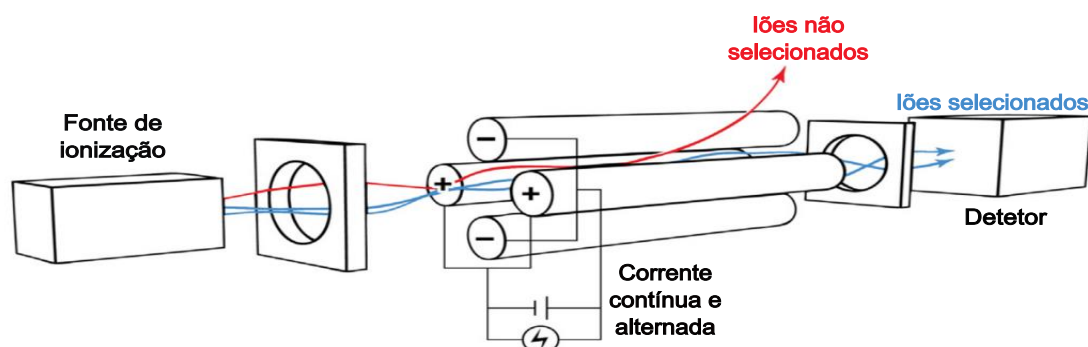


Figura 3.13- Representação de um analisador do tipo quadrupolo. Adaptado de [97]

3.2.2.5 Detetor de íons

Os detetores de íons identificam o sinal gerado pela passagem dos íons filtrados que provêm do analisador de massas. Na realidade, os íons quando chegam a este componente do MS possuem uma carga muito diminuta. Por isso, é necessária uma amplificação da sua carga de modo a aumentar a sensibilidade do espectrômetro de massa.

Um dos detetores existente é o multiplicador de elétrons em que se irá entrar em mais detalhe. O seu princípio de funcionamento baseia-se na emissão de elétrons secundários, que são libertados quando um ião embate com uma superfície.[98]

Esta colisão dos íons ou elétrons numa superfície eletro-emissiva provoca uma transdução que converte o impacto dos íons numa corrente de elétrons amplificada.

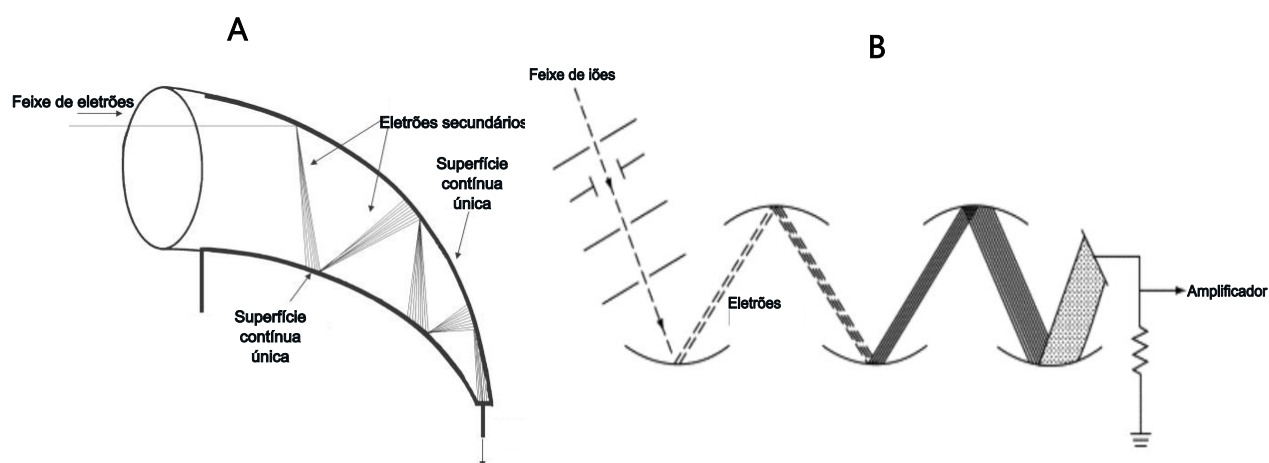


Figura 3.14- Tipos de multiplicadores de elétrons: A- Multiplicador contínuo; B- Multiplicador discreto. Adaptado de [99]

Os dínodos têm a capacidade de transduzir o sinal, podendo ser de dois tipos: contínuos ou discretos (figura 3.14). O primeiro assume um canal único com um percurso fixo entre o início e o fim do dispositivo. O segundo já tem na sua constituição 12 a 20 superfícies de metal compósito ligadas em série por resistências, por onde é garantida a passagem de iões. [94][99]

Os eletrões que são libertados pela colisão, têm um movimento em direção ao potencial positivo mais elevado. É sentido ainda um efeito em cascata devido ao aumento de energia dos eletrões em cada dínodo, levando à libertação de mais eletrões.

3.3 Cromatografia gasosa acoplada a Espetrometria de Massa

A possibilidade de acoplar duas técnicas analíticas distintas é usualmente implementada. A junção do GC e do MS garante uma combinação eficaz e popularmente adotada.

Apesar da elevada resolução e reduzido tempo de análise, o GC não consegue confirmar a identidade ou estrutura de nenhum pico, visto que apenas fornece os tempos de retenção dos analitos que não são características inerentes e únicas dos compostos. Por outro lado, a espectrometria de massa garante a identificação quantitativa dos compostos analisados. Quando acoplado ao GC, o MS consegue medir a intensidade dos iões através da ionização dos compostos gasosos eluídos, separando os iões tendo em conta as razões m/z .

Na figura 3.15, é possível observar um esquema referente à associação das duas técnicas.

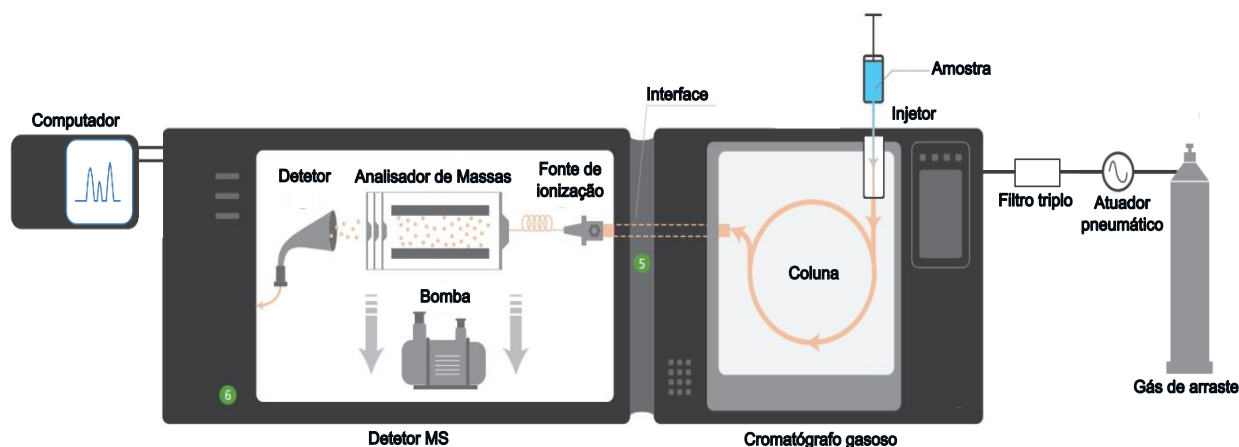


Figura 3.15- Representação dos componentes do GC/MS. Adaptado de [75]

ENSAIOS A MATERIAIS

4.1 Introdução

A migração de compostos e a oxidação da superfície dos materiais pode originar mudanças organoléticas que alteram a qualidade da água. [100] Posto isto, é necessário existir um controlo dos materiais que são utilizados no sistema de abastecimento de água, de modo a garantir a proteção da saúde humana.

Os métodos de ensaio de migração a materiais orgânicos têm como objetivo determinar a capacidade de um material alterar as características da água, averiguar a capacidade de lixiviação de substâncias dos materiais para a água e apurar a sua capacidade para remoção do cloro da água.

Estes métodos obedecem a normas nacionais e europeias em vigor. As normas adotadas para ensaios em materiais orgânicos que descrevem a influência da migração de substâncias de materiais não metálicos e não cimentícios de origem fabril e para aplicação no local na água de consumo humano são a EN 12873-1 e a EN 12873-2, respetivamente. Estas normas de ensaio são usadas em rotina no laboratório de análises de água da EPAL, tendo sido acreditadas pelo IPAC. [101]

No âmbito deste estudo, os materiais de relevância são plásticos e borrachas que são aplicados, em diferentes condições, no transporte e armazenamento de água para consumo humano, incluindo água bruta.

4.2 Etapas

Os materiais utilizados podem ser pequenas amostras no formato de provetes ou então as próprias tubagens. No início dos ensaios de migração é necessário um pré-tratamento dos materiais antes de serem colocados em contacto com as águas de ensaio. São efetuados 3 ensaios de migração distintos obtendo-se águas de migração que são depois analisadas para avaliação da qualidade da água, nomeadamente, na pesquisa de compostos orgânicos que possam ter migrado dos materiais para a água. Os passos aplicados nestes ensaios são apresentados em detalhe na figura 4.1, assim como as temperaturas e os períodos de tempo adotados. [102]

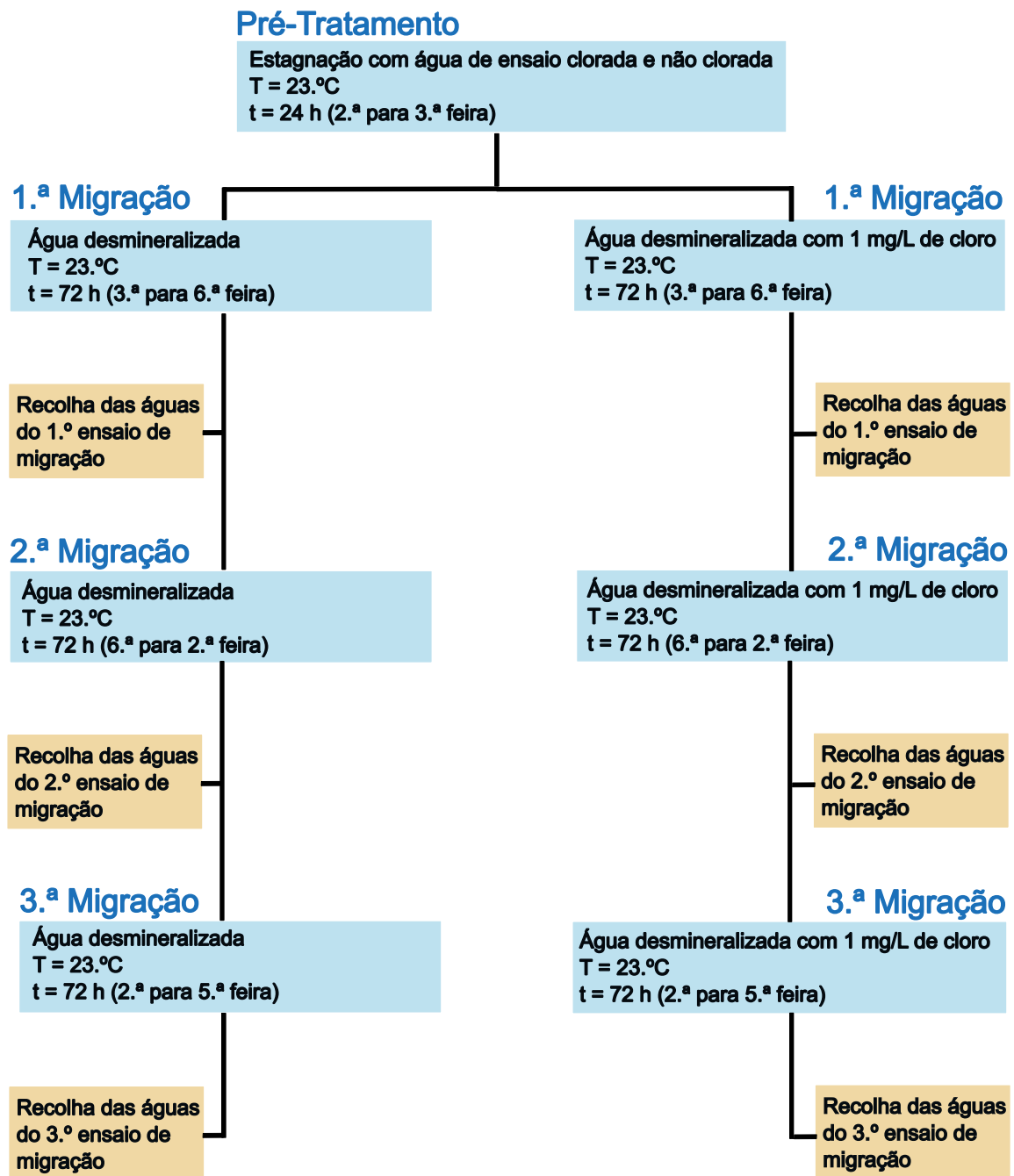


Figura 4.1- Esquema do procedimento de ensaio a 23 °C, com águas de ensaio cloradas e não cloradas. Adaptado de [102]

Para além dos ensaios com amostra, são sempre realizados ensaios em branco de modo a avaliar a presença de interferências possíveis. O ensaio químico sem cloro deve ser realizado com água desmineralizada com uma condutividade inferior a 2 mS/m e um conteúdo de carbono orgânico total inferior a 0,2 mg/L. Já o ensaio químico com cloro é realizado com água desmineralizada com um conteúdo de cloro livre de $1 \pm 0,2$ mg/L que é adicionado a partir de uma solução de hipoclorito de sódio a 0,1% (m/m). [102]

4.3 Expressão dos resultados

Tendo em conta a temperatura de ensaio (T) e o número do período de migração (n), a concentração dos compostos libertados para as águas de ensaio (c_n^T) é dada pela equação 4.1, que é composta pela concentração dos compostos medida na água de migração (a_n^T) e pela concentração dos compostos medida no ensaio em branco (b_n^T). [102]

$$c_n^T = a_n^T - b_n^T \quad (4.1)$$

É fundamental garantir um volume de água de migração suficiente para efetuar as análises necessárias. Deste modo, a razão entre a área superficial do material em contacto com a água (S) e o volume da água de ensaio (V) tem de ser cuidadosamente selecionada. Idealmente, a razão S/V deve estar compreendida entre 5 e 40 dm⁻¹.

Definida a concentração das substâncias na água de migração e a razão S/V , é possível calcular a taxa de migração de determinada substância (M_n^T), numa água de migração, pela equação 4.2.

$$M_n^T = \frac{c_n^T}{t \times S/V} \quad (4.2)$$

M_n^T - Taxa de migração no período de migração n (mg dm⁻² d⁻¹)

c_n^T - Concentração do composto em estudo (mg/L)

t - Período do ensaio de migração (3 dias)

S/V - Razão área superficial/volume (dm⁻¹)

De maneira a obter uma concentração média que seja representativa da água que chega à torneira do consumidor (C_{tap}), é necessário converter a taxa de migração com um fator de concentração (FC). Este parâmetro quantifica o impacto que cada tipo de produto tem na qualidade da água. Os materiais que tenham um contacto mais direto com as águas têm um fator de concentração mais elevado como é o caso das tubagens. No anexo K, é possível verificar os diferentes fatores de concentração (dia.dm⁻¹), relevantes para os estudos em questão.

$$C_{tap} = M_3^T \times FC \quad (4.3)$$

A taxa de migração considerada para este cálculo é referente ao terceiro período de migração (M_3^T). O valor do C_{tap} é comparado com a concentração máxima tolerável na torneira do consumidor (MTC_{tap}), de modo a avaliar o impacto do uso do material na qualidade da água.

VALIDAÇÃO DE MÉTODOS DE ENSAIO

5.1 Introdução

A avaliação de uma ou várias características de uma amostra através de um método de ensaio garante a obtenção de resultados fidedignos no ambiente laboratorial. Assim sendo, torna-se necessária a criação de métodos de ensaio que podem ou não seguir determinada norma previamente estabelecida por um organismo certificado. [103]

A validação destes métodos garante a avaliação do desempenho dos mesmos de modo a comprovar que as suas características são ótimas e adequadas ao uso pretendido. O grau de exigibilidade deste processo irá depender da situação em questão.

As imposições para a validação de métodos internos de ensaio exigem a análise dos seguintes parâmetros de modo a fazer uma caracterização completa do método [104]:

- ❖ Seletividade
- ❖ Precisão
- ❖ Linearidade
- ❖ Gama de trabalho
- ❖ Limites de deteção e quantificação
- ❖ Sensibilidade
- ❖ Exatidão

Caso o método seja quantitativo e avalie gamas vestigiais, é necessária uma análise completa tendo em conta todos os pontos referidos anteriormente. Estes podem ser estudados por avaliação direta ou indireta.

5.2 Avaliação Indireta

5.2.1 Seletividade (Especificidade)

A seletividade é um fator que relaciona o grau de interferência entre o composto de interesse e outras impurezas presentes na amostra. Este parâmetro tem a capacidade de influenciar a resolução obtida durante a separação e o tempo de análise. [105][106]

A ausência de picos interferentes e a homogeneidade dos picos de interesse são critérios essenciais para garantir que o composto tem um comportamento único tributável a determinado componente.

Um método específico tem a capacidade de identificar o analito de interesse numa amostra complexa sem que exista interferência dos outros compostos. Diz-se que um método é específico quando possui elevada seletividade. [104] Por sua vez, a seletividade é dependente da interação entre o analito de interesse e a fase estacionária.

Por outro lado, um método seletivo deve conseguir distinguir e identificar cada um dos compostos presentes numa amostra.

O gás ao passar pelo injetor, pode arrastar consigo contaminantes para dentro da coluna. Com o passar do tempo, estas impurezas vão se acumulando no interior da coluna como consequência da baixa temperatura e da afinidade que estas partículas possuem com a fase estacionária, controlando assim a sua retenção. Quando a coluna é aquecida, os contaminantes eluem ao longo da coluna sendo detetados resultando em picos de interferência. [107]

Este parâmetro pode ser avaliado pela utilização de várias matrizes com diferentes níveis de complexidade permitindo assim perceber o peso das interferências. Estas amostras são submetidas a ensaios de recuperação que permitem avaliar a aplicabilidade do método. [104]

5.2.2 Precisão

A precisão tem a capacidade de medir a dispersão de resultados referentes a diferentes ensaios em condições semelhantes, com base na mesma amostra ou solução padrão. Pode também ser estudado em amostras semelhantes. Depende exclusivamente de erros aleatórios não estando relacionada com a aproximação ao valor verdadeiro de um analito numa amostra. [104]

Este conceito pode ser subdividido em três noções: repetibilidade, reprodutibilidade e precisão intermédia. A última é uma medida intermédia entre as primeiras.

É necessário um mínimo de 10 réplicas da mesma amostra de modo a calcular a percentagem do coeficiente de variação das mesmas. Outros parâmetros importantes são a variância e o desvio padrão. Quanto maior o desvio padrão, menor a precisão.

O Teste de Grubbs pode também ser aplicado de forma a eliminar a existência de outliers.

5.2.2.1 Repetibilidade

Medida da precisão de um método de ensaio realizado sobre a mesma amostra, em condições análogas. O método de ensaio deve ser de preferência realizado pelo mesmo analista, com o mesmo equipamento, no mesmo laboratório e no mesmo intervalo de tempo.

A partir de uma solução padrão ou amostra contendo uma determinada concentração do analito de interesse, realizam-se no mínimo 10 ensaios independentes em condições de repetibilidade. Este processo deve ser realizado em vários níveis de concentração, podendo ser tomado como referência o início da gama de trabalho (ISO 5725-2).

A diferença absoluta entre dois dos resultados de ensaio sucessivos deve ser inferior ou igual ao limite de repetibilidade (r) com determinada probabilidade específica (95%). Caso esta condição se verifique, os resultados dos dois testes diferentes podem ser aceites.

$$|x_i - x_{i-1}| \leq r \quad (5.1)$$

O desvio padrão da repetibilidade (S_r) pode ser calculado tendo em conta a média aritmética das estimativas das diferentes variações dos diferentes testes ($\bar{x}$) e tendo em conta o número de medições (n).

$$S_r = \sqrt{\frac{\sum (x_i - \bar{x})^2}{n-1}} \quad (5.2)$$

O limite de repetibilidade (r) pode ser calculado segundo a equação 5.3, para um nível de confiança de 95%.

$$r = 2,8 \sqrt{S_r^2} \quad (5.3)$$

Já o coeficiente de variação de repetibilidade é dado em percentagem para cada um dos níveis de concentração.

$$CV_r(\%) = \frac{S_r}{\bar{x}} \times 100 \quad (5.4)$$

5.2.2.2 Reprodutibilidade

A diferença entre a repetibilidade e a reprodutibilidade está relacionada com as condições do método analítico. Ao invés de ter condições idênticas, o objetivo desta medida é estudar diferentes laboratórios, analistas, equipamentos e/ou períodos. O seu objetivo é a criação de um modelo padronizado para determinada metodologia a partir de ensaios interlaboratoriais.

5.2.2.3 Precisão Intermédia

Finalmente a precisão intermédia, como medida intermediária, tem como base condições que possibilitam a realização do método sobre uma amostra ou padrões, no mesmo laboratório, mas por diferentes analistas, equipamentos ou dias.

A precisão intermédia garante uma melhor aproximação da variabilidade autêntica dos resultados e por isso o seu estudo é fulcral na validação do método. Mais uma vez, o nível de concentração influencia os resultados obtidos.

O desvio padrão e o coeficiente de variação da precisão intermédia são calculados de modo idêntico às equações 5.2 e 5.4, respetivamente.

A utilização de cartas de controlo é outra ferramenta para avaliar este conceito, que pode ser útil em determinados casos (ISO 5725-3).

5.2.3 Quantificação

5.2.3.1 Curvas de calibração

As curvas de calibração são modelos de regressão usados para determinar concentrações desconhecidas dos compostos de interesse numa amostra, através das respostas relativas aos padrões de calibração.

De maneira a converter a área de um pico cromatográfico ou a altura de um pico em quantidade absoluta ou valores de concentração, é necessário proceder à calibração analítica antes da análise quantitativa.

Assim, é necessário preparar diferentes soluções padrão com concentrações conhecidas e avaliar o seu sinal num equipamento analítico. Caso existam pontos de calibração considerados *outliers*, estes podem ser removidos visto que a sua presença causa perda de sensibilidade e influencia os resultados obtidos. No final, obtém-se uma representação gráfica da resposta instrumental em função da concentração.

O estabelecimento de critérios de aceitação para as curvas de calibração relativos à linearidade e estabilidade entre calibrações é obrigatório podendo ser tomado como referência a norma ISO 8466-1. [108]

Caso a curva de calibração seja uma regressão linear, utiliza-se o método dos mínimos quadrados (Anexo B), que possibilita a criação de uma relação entre a concentração (variável independente) e a resposta (variável dependente) que é usada para descobrir concentrações desconhecidas de um analito de interesse numa matriz complexa. Neste caso, admite-se que existe homogeneidade de variâncias em relação à reta e que os erros têm uma distribuição normal.

Ainda pode ser avaliada a utilização do fator de resposta ao invés de efetuar uma nova curva de calibração para cada sequência de análise. Os testes de RIKILT (Anexo E) e das áreas normalizadas (Anexo F), avaliam a possibilidade de se usar o fator de resposta numa calibração analítica.

As curvas de calibração dependem ainda da exatidão das concentrações dos padrões analisados e também se a matriz das soluções padrão de calibração se assemelha à matriz das amostras a analisar.

5.2.3.2 Gama de trabalho

Intervalo entre a concentração mássica mais baixa e mais alta, de um determinado composto, que foi experimentalmente definido e estatisticamente provado pela calibração do método. A precisão, a exatidão e a linearidade do procedimento analítico têm de ser conferidas, dentro da gama de trabalho escolhida.

A concentração mais baixa possível da gama de trabalho corresponde normalmente ao limite de quantificação do método cromatográfico.

A escolha da gama de trabalho depende de vários parâmetros (ISO 8466-1) [108][109]:

- ❖ **Objetivo da calibração** – A concentração esperada da amostra deve estar incluída na gama de trabalho.
- ❖ **Viabilidade técnica** – Os valores obtidos perto do limite mais baixo da gama de trabalho devem ser distinguíveis dos brancos do método. Assim, a concentração mais baixa da gama de trabalho deve ser superior ou igual ao limite de quantificação.
- ❖ **Independência** – A variância dos resultados obtidos deve ser independente da concentração.

Posto isto, a gama de trabalho pode ser avaliada quanto à homogeneidade de variâncias (anexo G). As variâncias são testadas de modo a averiguar diferenças significativas no limite máximo e mínimo da gama de trabalho.

5.2.3.3 Linearidade

Depois de estabelecer a gama de trabalho são medidos os valores do sinal no equipamento analítico. A linearidade é observada quando se garante uma relação diretamente proporcional entre a resposta e a concentração. As concentrações das soluções de calibração normalmente são equidistantes ao longo da gama de trabalho.

A reta obtida deve, no entanto, cumprir determinados critérios de aceitação através da aplicação de modelos estatísticos. O Teste de Mandel (Anexo D) e o teste de análise de resíduos (Anexo C), pela norma ISO 8466, permitem averiguar se a gama de trabalho está situada numa zona de linearidade.

Uma função de calibração linear é característica da qualidade de um ensaio numa determinada gama de trabalho. [109]

5.2.3.4 Limiares analíticos (LOQ e LOD)

❖ Limite de Detecção (LOD)

A concentração mínima através da qual é possível verificar a presença de um analito numa amostra com uma certeza estatística razoável, denomina-se de limite de detecção. Pode também ser definido como a concentração mínima do analito a partir da qual se consegue distinguir do branco.

- Quando o método envolve a aplicação de uma **função linear** tem-se que:

$$LOD = \frac{3,3 \times S_{y/x}}{m} \quad (5.5)$$

$S_{y/x}$ – Desvio padrão residual da reta de calibração

m – Declive da reta de calibração

- Pela análise de uma série de amostras de **brancos de matriz fortificados** com a concentração mais baixa do analito, utiliza-se a fórmula simplificada da equação 5.6:

$$LOD = 3 \times S_{X0} \quad (5.6)$$

S_{X0} – Desvio padrão correspondente a várias leituras da solução com concentração mais baixa da gama de linearidade

- Uma outra forma de avaliação pode ser feita através da **razão sinal ruído** do cromatograma. Neste caso, é injetada uma solução padrão do analito a determinada concentração vestigial e é determinada a razão sinal ruído (S/N). É sabido que a razão sinal ruído do limite de detecção é 3, e por esse motivo estabelece-se a relação da equação 5.7:

$$LOD = \frac{3 \times [C]}{S/N} \quad (5.7)$$

$[C]$ – Concentração conhecida da solução padrão

S/N – Razão sinal ruído do pico cromatográfico

❖ Limite de Quantificação (LOQ)

A concentração mínima através da qual é possível quantificar um analito numa amostra com uma determinada exatidão e precisão, denomina-se de limite de quantificação.

O limite de quantificação deve ser testado fazendo-se a análise de soluções padrão com uma concentração do analito perto do limite de quantificação de forma a que a exatidão e a precisão resultem num desvio padrão relativo favorável (inferior a 25%).

- Mais uma vez, quando o método envolve a aplicação de uma **função linear** tem-se que:

$$LOQ = \frac{10 \times S_{y/x}}{m} \quad (5.8)$$

$S_{y/x}$ – Desvio padrão residual da reta de calibração

m – Declive da reta de calibração

Quando determinado desta maneira, é necessário garantir que o seu valor é inferior ou igual ao padrão de calibração com a concentração mais baixa. Caso isto não se verifique a linearidade da gama de trabalho não é cumprida.

- Pela análise de uma série de **amostras de brancos fortificados** com várias concentrações do composto perto do limite de deteção, utiliza-se a fórmula simplificada da equação 5.9:

$$LOQ = 10 \times S_{x0} \quad (5.9)$$

S_{x0} – Desvio padrão correspondente a várias leituras da solução com concentração mais baixa da gama de linearidade

- A **razão sinal ruído** que corresponde à concentração do limite de quantificação é 10. E como tal é possível estabelecer a seguinte relação da equação 5.10:

$$LOQ = \frac{10 \times [C]}{S/N} \quad (5.10)$$

$[C]$ – Concentração conhecida da solução padrão

S/N – Razão sinal ruído do pico cromatográfico

Finalmente, os dois limiares analíticos podem relacionar-se entre si pela equação 5.11:

$$LOD = \frac{LOQ}{3} \quad (5.11)$$

5.2.3.5 Sensibilidade

O quociente entre a diferença de sinal e a diferença de concentração obtida num determinado intervalo quantifica a sensibilidade de um método:

$$Sensib = \frac{\Delta S}{\Delta C} \quad (5.12)$$

ΔS – Variação do sinal cromatográfico obtido

ΔC – Variação da concentração

No caso de uma regressão linear, a sensibilidade é representada pelo declive da reta de calibração. Posto isto, o seu valor é constante ao longo de toda a gama de trabalho. Caso o modelo usado não seja linear, pode ser definida como a derivada de primeira ordem da curva de calibração.

Esta característica é dependente da magnitude do sinal. Quanto maior a sensibilidade, mais fácil é a distinção entre diferentes concentrações do mesmo analito, visto que as alterações no sinal cromatográfico obtido são superiores.

5.3 Avaliação Direta

5.3.1 Exatidão

Os erros sistemáticos e aleatórios de um método analítico podem ser determinados pelo estudo da exatidão que compara o resultado obtido do ensaio e o valor de referência tomado como guia.

Esta propriedade pode ser medida de diferentes formas e o método a aplicar deve depender da matriz utilizada.[110] Para além disso, deve ser testada em diferentes concentrações, visto que a exatidão pode variar com o nível de fortificação.

Os procedimentos habitualmente usados para a avaliação desta medida num método de ensaio são apresentados de seguida.

5.3.1.1 Materiais de Referência Certificados

Os materiais de referência certificados (MRC) desempenham um papel fulcral no controlo de qualidade durante um método de ensaio. Estes diferenciam-se devido às suas propriedades uniformes e rigorosas que podem ser utilizadas para avaliar a prestação do laboratório. O valor de concentração para cada parâmetro e a incerteza associada são características inerentes ao MRC que foram certificadas por uma entidade reconhecida (IRMM, NIST, etc.).

O seu uso tem como finalidade a comparação dos resultados obtidos pelo laboratório com os valores do certificado de análise do MRC, de modo a calcular o erro e a exatidão da análise. Caso o valor

conseguido não se encontre incluído no intervalo de incerteza, considera-se que existe um desvio considerável. Nesta situação, as causas inerentes a este desvio devem ser investigadas.[103]

5.3.1.2 Ensaios Interlaboratoriais

Os laboratórios podem ser avaliados através dos resultados obtidos nos ensaios interlaboratoriais. Dependendo do efeito a atingir, estes ensaios podem subdividir-se em:[111]

- Ensaio de Aptidão – Realiza a apreciação dos laboratórios em estudo devendo estar sempre associado a um ou mais ensaios a um MRC. Os resultados obtidos são avaliados quanto à precisão e exatidão. O método aplicado fica ao critério de cada laboratório.
- Ensaio Interlaboratorial de Normalização - Realiza a apreciação da reprodutibilidade e repetibilidade de um método de análise desempenhado por vários participantes. O método aplicado tem de ser o mesmo em todos os laboratórios.
- Ensaio Comparativo – Submete a comparação os resultados obtidos entre dois métodos diferentes executados pelo mesmo protocolo, sendo que um deles é um método de referência. Possibilita o estudo da exatidão ao avaliar a proximidade dos resultados. Os métodos aplicados ficam ao critério de cada laboratório.
- Ensaio de consenso ou conformidade – São compilados diversos resultados, de diferentes laboratórios, referentes às propriedades de determinado material. Esta caracterização permite que o material possa depois ser utilizado em ensaios interlaboratoriais.
- Ensaio de certificação – Neste caso, laboratórios especializados têm como função caracterizar determinado material obtendo-se valores certificados das suas propriedades de modo a instituí-lo como um MRC.

Por fim pode ainda ser feita uma análise do desempenho do laboratório pelo cálculo do fator de desempenho Z (z-score) que avalia o desvio dos resultados obtidos em relação ao valor considerado como verdadeiro. Outra medida de desempenho é a incerteza dos resultados.

5.3.1.3 Ensaios de recuperação

Os ensaios de recuperação têm uma aplicação predominante na validação de métodos analíticos, dado que são aplicados quando os MRC ou os ensaios interlaboratoriais não existem para determinado composto.

Uma amostra fortificada com uma concentração conhecida de analito, é submetida ao ensaio de recuperação. A fortificação tem de respeitar sempre as propriedades físico-químicas da amostra, não as alterando, de modo a replicar condições reais o melhor possível. Após o ensaio, a concentração final obtida é comparada com a concentração de referência atuando assim como medida de exatidão. A exatidão depende do grau de recuperação, de possíveis interferências na amostra e da precisão das medidas volumétricas.

É importante referir que o passo de preparação da amostra também pode ser avaliado quanto à sua eficiência, que é tanto mais alta quanto maior for a recuperação obtida nos ensaios.

O cálculo da percentagem de recuperação atingida com sucesso, para diferentes níveis de concentração, é efetuado pela equação 5.13:

$$\text{Recuperação (\%)} = \frac{C_{obs}}{C_{fortif}} \times 100 \quad (5.13)$$

C_{obs} – Concentração experimental obtida para determinado composto na amostra fortificada, após quantificação pelo método de ensaio ($\mu\text{g/L}$)

C_{fortif} – Concentração de referência do composto na amostra fortificada ($\mu\text{g/L}$)

A percentagem de recuperação ideal depende da concentração que é fortificada, mas pode ser diferente consoante o laboratório. Como referência podem ser aceites valores entre 70 e 120%. Para além disso também é tomado como critério de aceitação um desvio padrão relativo inferior a 25%.

5.3.1.3.1 Efeito de Matriz

O efeito de matriz trata-se do efeito que os componentes de uma determinada amostra têm no analito que queremos analisar. As consequências deste fenómeno são o aumento ou a diminuição da resposta, produzindo um resultado comprometido. [112]

Num espectrómetro de massa, acredita-se que esta oscilação é causada pela alteração da eficiência de ionização dos compostos de interesse. A eficiência da ionização depende das propriedades físico-químicas do composto e das condições definidas no método analítico. A presença, na mesma matriz, de compostos que co-eluem com os analitos de interesse pode explicar o efeito de matriz. [113]

Em cromatografia gasosa, pode existir uma intensificação do pico de resposta devido à complexidade da matriz da amostra. O bloqueio dos sítios ativos no injetor por parte dos componentes da matriz da amostra, acaba por evitar a degradação térmica e a adsorção do analito de interesse. [114] Para além disso, os compostos de interesse podem eluir mais rapidamente, apresentando picos cromatográficos mais intensos e definidos, quando a coluna estabelece uma maior afinidade com outros compostos interferentes mais abundantes.

Existem várias estratégias que podem ser implementadas de modo a contornar este fenómeno. Para tal podem ser usados métodos de calibração em matriz ajustada ou então pode ser adicionado um “surrogate” ou um padrão interno de injeção. Pode ainda ser realizada uma prévia limpeza à amostra com uso ou não de derivatização.

5.3.1.3.2 Padrão Interno

Existem diferentes modos para controlar o efeito de matriz, sendo que um deles remete para a adição de um padrão interno. Este permite diminuir a variabilidade de sinal que é provocada pela matriz.

Na realidade o efeito de matriz vai ser sentido de igual forma nos compostos de interesse e nos padrões internos. No entanto a razão obtida entre o sinal cromatográfico do composto e o sinal cromatográfico

do padrão interno não é afetada, permitindo assim a quantificação dos compostos de interesse em diferentes amostras.

O método de calibração é assim utilizado em conjunto com o padrão interno. Ao adicionar uma concentração constante do padrão interno a uma amostra ou a um extrato da amostra é possível corrigir as variações do detetor em ensaios consecutivos. [114]

Caso o pretendido seja a correção de erros de injeção, a utilização de um padrão interno adicionado ao extrato é o mais indicado. Porém, caso a situação remeta para erros na preparação da amostra, o mais indicado será a utilização de um padrão interno adicionado à amostra antes da preparação da mesma.

Idealmente o padrão interno deve ser semelhante ao composto de interesse, mas não deve estar contido na amostra a analisar. Em análises quantitativas o uso de isótopos é a maneira mais eficaz de amenizar as variações do efeito de matriz, dado que é possível escolher um isótopo com a mesma estrutura química que o composto em análise. Habitualmente, os isótopos são marcados com o deutério (^2H) ou com o carbono-13 (^{13}C).

Existem algumas desvantagens, como o número de recursos e o tempo necessário às análises ser superior. Os padrões deuterados também são dispendiosos e por vezes inexistentes, visto que têm de ser criados em laboratório. A sua formação implica a substituição de um átomo de uma molécula, por exemplo, por um deutério. O que se verifica é o aumento da massa molecular do composto podendo assim ser distinguido do analito de interesse. Todavia, o comportamento analítico e a hidrofobicidade da molécula permanecem inalterados. [115]

Visto que pode haver trocas entre o deutério e os átomos de hidrogénio do solvente, deve também ser tido em consideração o solvente a utilizar com estes padrões internos.

Caso não seja possível a utilização do isótopo correspondente ao composto de interesse, podem ser utilizados outros compostos semelhantes mas a análise passa a ser semi-quantitativa e apenas é possível fazer uma estimativa da concentração dos analitos em estudo.

5.3.1.3.3 Matriz ajustada

A calibração em matriz ajustada é normalmente utilizada quando o efeito de matriz tem de ser compensado. Neste caso, os extratos da matriz das amostras são utilizados na calibração ao invés de um solvente. Fortificam-se estes extratos com os analitos de interesse de modo a obter curvas de calibração para a quantificação.[116]

No entanto, esta metodologia pode ser um processo moroso visto que cada amostra é diferente tendo de ser feita a calibração consoante a mesma. Para além disso possíveis erros durante a preparação de amostra ou durante a injeção não são compensados.

Existe uma alternativa que consiste em realizar a calibração em relação a uma matriz representativa de um determinado tipo de amostra. Por exemplo assumir que a água da torneira é representativa de todas as águas de consumo humano. No entanto, a precisão deste método é inferior do que no caso em que se faz a calibração individual de cada uma das amostras.

5.4 Estimativa das Incertezas

A confiança e segurança dos resultados obtidos pode ser estimada pela quantificação da incerteza associada a determinada medição. A não conformidade com os limites regulatórios, impossibilita a aceitação dos resultados. [117]

O procedimento de quantificação da incerteza explicitado tem por base o Guia 31 elaborado pela Relacre. As principais abordagens de quantificação de incertezas em ambiente intralaboratorial são a metodologia passo a passo (*Bottom-up*) e a metodologia *Top-down*. [118]

Metodologia passo a passo (*Bottom-up*)

Primeiramente, é importante compreender que todos os fatores capazes de manifestar o impacto das fontes de incerteza no valor obtido, devem ser identificados e quantificados:

❖ Componente de incerteza associada à interpolação da leitura da amostra na curva de calibração

Quando a função de calibração é linear e é utilizado o método dos mínimos quadrados pode ser estimada a incerteza associada à interpolação do sinal cromatográfico obtido em relação à regressão linear pela equação 5.14.

$$u_{inter} = \frac{s_{y/x}}{m} \times \sqrt{\frac{1}{N} + \frac{1}{n} + \frac{(\bar{y}_a - \bar{y})^2}{m^2 \times \sum (x_i - \bar{x})^2}} \quad (5.14)$$

$s_{y/x}$ – Desvio-padrão residual da reta de calibração

m – Declive da reta de calibração;

N – Número de padrões utilizados no traçado da reta de calibração

n – Número de leituras utilizadas para determinar a concentração da amostra

$\bar{y}_a$ – Valor médio das “n” leituras da amostra

$\bar{y}$ – Valor médio das “N” leituras dos padrões de calibração

x_i – Concentração de cada um (i) dos N padrões de calibração

$\bar{x}$ – Valor médio das concentrações dos padrões de calibração

O desvio padrão residual, $S_{y/x}$, é dado por:

$$S_{y/x} = \sqrt{\frac{\sum (y_i - mx_i - b)^2}{N-2}} \quad (5.15)$$

❖ **Componente de incerteza associada à precisão intermédia**

A incerteza padrão relacionada com os efeitos aleatórios denomina-se de incerteza de precisão/fidelidade. Para obter uma representatividade considerável da variabilidade dos resultados dos ensaios, este componente deve ser caracterizado em condições de precisão intermédia. Para tal, devem ser analisados pelo menos 10 ensaios independentes em replicado, realizados sobre uma mesma amostra. A incerteza para os padrões de controlo pode assim ser calculada:

$$u_{prec\ int} = \frac{S_{precisão}}{\sqrt{N}} \quad (5.16)$$

$S_{precisão}$ – Desvio padrão da média de N ensaios independentes sobre a mesma amostra

N – Número de ensaios independentes em replicado

❖ **Componente de incerteza associada à preparação de soluções padrão**

A etapa de preparação de soluções padrão é afetada por diferentes fontes de incerteza da mesma natureza. Deste modo, a incerteza padrão combinada permite quantificá-las em conjunto pela equação 5.17: [119]

$$u_{padrão} = C_a \times \sqrt{\left(\frac{u_m}{m}\right)^2 + \left(\frac{u_{pur}}{pur}\right)^2 + \left(\frac{u_{V_b}}{V_b}\right)^2} \quad (5.17)$$

u_m – Incerteza padrão associada à pesagem do padrão comercial (g)

m – Massa do padrão comercial (g)

u_{pur} – Incerteza associada à pureza do padrão

pur – Pureza do padrão comercial

u_{V_b} – Incerteza associada ao volume do balão volumétrico (mL)

V_b – Volume do balão volumétrico (mL)

- Incerteza padrão associada à pesagem do padrão comercial (u_m)

A incerteza associada à pesagem contabiliza a incerteza associada a uma pesagem por diferença, dado que m representa a diferença entre a massa bruta e a massa da tara. Como ambas estas medições são independentes, as componentes de incerteza têm de ser contabilizadas duas vezes, tal como se pode observar pela equação 5.18:

$$u_{m(u)} = \sqrt{2(u_{bal}^{calib})^2} = \sqrt{2\left(\frac{EMA}{\sqrt{3}}\right)^2} \quad (5.18)$$

$u_{m(u)}$ - Incerteza associada à pesagem unitária

u_{bal}^{calib} - Incerteza associada à calibração da balança

EMA – Erro máximo admissível

A incerteza descrita anteriormente pode ser estimada pelo Erro Máximo Admissível (EMA) da pesagem que é estabelecido pelo laboratório internamente. O EMA tem associada uma distribuição retangular uniforme.

- Incerteza padrão associada à pureza do padrão comercial (u_{pur})

A incerteza padrão associada à pureza do padrão comercial rege-se por uma distribuição retangular e é descrita pela equação 5.19:

$$u_{pur} = \frac{u_{cert}}{\sqrt{3}} \quad (5.19)$$

u_{pur} - Incerteza associada à pureza do padrão comercial

u_{cert} - Incerteza dada pelo certificado de análise associada à pureza do padrão comercial

- Incerteza padrão associada à medição de volume (u_v)

A incerteza relativa à calibração do material volumétrico utilizado (u_v^{calib}) é estimada pela tolerância associada ao valor nominal do seu volume fornecida pelo fabricante. Considera-se mais uma vez uma distribuição retangular.

$$u_v = \sqrt{u_v^{calib^2}} = \frac{Tolerância}{\sqrt{3}} \quad (5.20)$$

Tolerância – Tolerância do balão volumétrico

❖ Incerteza padrão combinada

Os diferentes componentes de incerteza podem ter um efeito conjunto no impacto que têm no método analítico. Por esse motivo, é conveniente quantificá-los simultaneamente. A precisão de medição e outras fontes de incerteza são agrupadas na equação 5.21, onde se calcula a incerteza padrão combinada, $u_c(C)$.

$$u_c(C) = \sqrt{u_{interp}^2 + u_{prec\ int}^2 + u_{padrão}^2} \quad (5.21)$$

Metodologia *Top-down*

Este tipo de abordagem é construída com base na validação interna de um método de ensaio feita por um laboratório ou através de ensaios interlaboratoriais. As componentes de incerteza principais a ter em conta são:

❖ Incerteza de precisão

Este componente é de elevada relevância para a estimativa da incerteza do método de ensaio. Tal como anteriormente, o modo de cálculo é semelhante para esta metodologia.

❖ Incerteza de exatidão

A componente de incerteza da exatidão de um método de ensaio pode ser estimada usando como referência o Guia Nordtest e a norma ISO 11352.

- Guia Nordtest

A exatidão é avaliada pela disparidade entre um valor medido e um valor de referência. O erro de medição observado é a junção dos erros sistemáticos com os erros aleatórios. Os erros sistemáticos exprimem a veracidade dos resultados e neste caso podem ser avaliados através de dados obtidos em ensaios de recuperação em amostras reais. Para tal calcula-se a recuperação média obtida, $\bar{R}$, com base na concentração média do analito após a recuperação, $\bar{C}_{obs}$, e na concentração inicial fortificada na amostra, C_{fortif} .

$$\bar{R} = \frac{\bar{C}_{obs}}{C_{fortif}} \quad (5.22)$$

A incerteza-padrão da exatidão de medição, pode ser estimada pela equação 5.23:

$$u_{exat}(\bar{R}) = \bar{R} \times \sqrt{\left(\frac{s_{obs}^2}{N \times \bar{C}_{obs}^2}\right) + \left(\frac{u(C_{fortif})}{C_{fortif}}\right)^2} \quad (5.23)$$

s_{obs} – Desvio padrão do conjunto de “n” resultados de ensaios de amostras fortificadas

N – Número de ensaios de amostras fortificadas

- Norma ISO 11352

A incerteza padrão associada exatidão de medição com base na análise de amostras fortificadas pode ser calculada tendo em conta a diferença entre os valores obtidos e os valores de referência das amostras fortificadas e a incerteza padrão da concentração dos compostos adicionados. A incerteza padrão estimada pelos ensaios de recuperação é dada por:

$$u'_{exat} = \sqrt{b_{RMS}^2 + u_{adic}^2} \quad (5.24)$$

Em que

$$b_{RMS} = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (b'_i)^2}{n}} \quad (5.25)$$

$$b' = \frac{C_{lab} - C_{ref}}{C_{ref}} \times 100 \quad (5.26)$$

b'_i - Diferença relativa entre o valor obtido pelo laboratório (C_{lab}) e o valor de referência (C_{ref}).

n - Número de ensaios de recuperação considerados

Já a incerteza associada à concentração do analito adicionado é dada por:

$$u_{adic} = \sqrt{\left(\frac{u_{spike}}{C_{spike}}\right)^2 + \left(\frac{u_V}{V}\right)^2 + \left(\frac{u_{V'}}{V'}\right)^2} \quad (5.27)$$

u_{spike} – Incerteza associada à preparação da solução de fortificação

C_{spike} – Concentração do composto na solução de fortificação

u_V – Incerteza associada à medição do volume da amostra no balão volumétrico

V – Volume da amostra no ensaio de recuperação

$u_{V'}$ – Incerteza associada à medição do volume da solução de fortificação que é adicionada à amostra

V' – Volume da solução de fortificação que é adicionada à amostra

❖ Incerteza padrão combinada

As componentes de incerteza devem ser agrupadas, segundo esta metodologia, pela equação 5.28.

$$u_c(C) = \sqrt{u_{prec\ int}^2 + u_{exatidão}^2} \quad (5.28)$$

❖ Incerteza padrão expandida

Um elevado número de ensaios experimentais aumenta os exemplares de estudo dos valores obtidos, sendo possível calcular a incerteza expandida para um nível de confiança de 95%. O coeficiente de expansão, k , toma o valor de 2:

$$U(C) = 2 \times u_c(C) \quad (5.29)$$

Expressão dos resultados

Todos os resultados alcançados com uma incerteza associada devem ser apresentados tal como na equação 5.30, tendo sempre em consideração o fator de expansão e o nível de confiança aplicados:

$$\textit{Resultado} = C + U(C) \quad (5.30)$$

São tomados como referência, no máximo, dois algarismos significativos para exibir a incerteza de medição. Contudo, o número de casas decimais do resultado deve ser dependente do número de casas decimais da incerteza.

MATERIAIS E MÉTODOS

6.1 Equipamento e Material

- ❖ Cromatógrafo gasoso *Thermo Scientific Trace 1300* equipado com:
 - Coluna cromatográfica capilar *HP-5MS* (5% fenil-metilpolisiloxano), 60 m comprimento x 0,250 mm diâmetro interno x 0,25 µm espessura do filme, *Agilent*
 - Software de tratamento de dados *Thermo Scientific Dionex Chromeleon* versão 7.3
 - Biblioteca de Espectros *NIST MS Search*, versão 2.0
 - Programa de análise de mecanismos de degradação *Mass Frontier* versão 7.0
- ❖ Espectrômetro de massa *Thermo Scientific ISQ 700*
- ❖ Sistema de água ultrapura, *Milli Q, Milipore*
- ❖ Balança analítica *Mettler Toledo XS 204*
- ❖ Sistema automatizado de SPE, *Dionex, AutoTrace 280, Thermo Fisher Scientific*
- ❖ Cartuchos de SPE Waters Oasis HLB, 6 mL, 200 mg; fase estacionária: copolímero de divinilbenzeno e N-vinilpirrolidona
- ❖ Sistema de evaporação, sob fluxo de azoto, *Turbovap II Concentration Workstation, Zymark*
- ❖ Tubos de concentração de 200 mL graduados para 0,5 e 1 mL, *Biotage*
- ❖ Agitador Vortex *IKA MS3 Digital*
- ❖ Ampolas de extração de 250 mL, *Normax*
- ❖ Micropipeta automática, *SGE eVol® XR*
- ❖ Seringas de vidro de 100 e 500 µL, *eVol®*
- ❖ Pipetas graduadas de 2 e 5 mL, *Volac Fortuna*
- ❖ Vials de vidro em âmbar de 1,5 mL, *Macherey-Nagel*
- ❖ Pipetas Pasteur, *Normax*
- ❖ Balões volumétricos de vidro de 10, 20, 50, 100, 500 e 2000 mL
- ❖ Fotômetro *Palintest 1000 Chlorometer-Duo*

6.2 Reagentes

- ❖ Padrões certificados dos compostos em estudo
 - 4-etilfenol, 99,8%, $C_8H_{10}O$, N.º CAS 123-07-9, *Sigma-Aldrich*;
 - 4-terc-butilfenol, 99,6%, $C_{10}H_{14}O$, N.º CAS 98-54-4, *Sigma-Aldrich*;

- 2,6-di-terc-butil-p-benzoquinona, $C_{14}H_{20}O_2$, 98%, N.º CAS 719-22-2, *Sigma-Aldrich*;
- 2,4-di-terc-butilfenol, $C_{14}H_{22}O$, 99,8%; N.º CAS 96-76-4, *Sigma-Aldrich*;
- 2,6-di-terc-butil-4-vinilfenol, $C_{16}H_{24}O$, 95%, N.º CAS 19263-36-6, *BLD pharm*;
- 3,5-di-terc-butil-4-hidroxibenzaldeído, $C_{15}H_{22}O_2$, 98%, N.º CAS 1620-98-0, *Thermoscientific*;
- 3,5-di-terc-butil-4-hidroxiacetofenona, $C_{16}H_{24}O_2$, 98%, N.º CAS 14035-33-7, *Alfa Aesar*;
- 7,9-di-terc-butil-1-oxaspiro (4,5) deca-6,9-dieno-2,8-diona, $C_{17}H_{24}O_3$, 99%, N.º CAS 82304-66-3, *Sigma-Aldrich*;
- 3-(3,5-di-terc-butil-4-hidroxifenil) propionato de metilo, $C_{18}H_{28}O_3$, 97%, N.º CAS 6386-38-5, *BLD pharm*;
- Ácido 3-(3,5-di-terc-butil-4- hidroxifenil) propiónico, $C_{17}H_{26}O_3$, 99,91%, N.º CAS 20170-32-5, *BLD pharm*;

❖ Padrões internos deuterados

- 4-etilfenol- d_{10} , $CD_3CD_2C_6D_4OD$, 98,4%, N.º CAS 352431-18-6, *CDN Isotopes*
- 4-terc-butil- d_9 -fenol-2,3,5,6- d_4 , $(CD_3)_3CC_6D_4OH$, 99%, N.º CAS 225386-58-3 *CDN Isotopes*

❖ Gerais

- Diclorometano, CH_2Cl_2 , 99,95%, N.º CAS 75-09-2, grade RS-atrasol, *Carlo Erba*
- Metanol, CH_3OH , 99,9%, N.º CAS 67-56-1, grade HPLC PLUS Gradient, *Carlo Erba*
- Acetona, C_3H_6O , 99,9%, N.º CAS 67-64-1, grade HPLC-Isocratic, *Carlo Erba*
- Água ultrapura (Millipore)
- Tiosulfato de sódio pentahidratado, $Na_2S_2O_3 \cdot 5H_2O$, N.º CAS 10102-17-7, 100,3%, *PanReac AppliChem*
- Solução de Hipoclorito de sódio a 14% de cloro ativo, $NaOCl$, N.º CAS 7681-52-9, *Honeywell Fluka*
- Azoto C45 (N_2), 99,9995%, *Gasin*
- Hélio C55 (He), 99,9995%, *Gasin*

❖ Amostras

- Água destinada ao consumo humano proveniente da rede de distribuição da EPAL
- Água superficial (rio Tejo, rio Zêzere, rio Ocreza, Albufeira do caldeirão)
- Água subterrânea (Lezírias, Poços da OTA e Alenquer)

6.3 Preparação das soluções padrão

6.3.1 Soluções padrão primárias individuais

O solvente escolhido para solubilizar os compostos em estudo foi o metanol, tendo em conta a solubilidade dos compostos em estudo.

Pesar aproximadamente 20 mg de cada um dos padrões para os respetivos balões volumétricos de 50 mL. Introduzir, em cada balão, metanol suficiente para solubilizar os compostos e agitar até não existirem partículas suspensas. Aferir o resto do volume com metanol. Cada solução padrão primária tem a validade de 1 ano, sendo guardadas num frigorífico a cerca de 6 °C.

Tendo em conta a pureza de cada padrão, a tabela 6.1, indica as concentrações dos compostos em estudo nas diferentes soluções individuais:

Tabela 6.1- Concentração das soluções padrão primárias individuais

Compostos	Massa pesada (mg)	Concentração (mg/L)
4-etilfenol	26,0	518,96
4-terc-butilfenol	20,3	404,38
2,6-di-terc-butil-p-benzoquinona	38,2	748,72
2,4-di-terc-butilfenol	22,4	447,10
2,6-di-terc-butil-4-vinilfenol	23,1	438,90
3,5-di-terc-butil-4-hidroxibenzaldeído	21,2	415,52
3,5-di-terc-butil-4-hidroxiacetofenona	20,4	399,84
7,9-di-terc-butil-1-oxaspiro (4,5) deca-6,9-dieno-2,8-diona	20,9	413,82
3-(3,5-di-terc-butil-4-hidroxifenil) propionato de metilo	23,2	450,08
Ácido 3-(3,5-di-terc-butil-4-hidroxifenil) propiónico	23,2	459,59

As soluções dos padrões internos selecionados foram realizadas tendo em conta o mesmo procedimento, sendo que na tabela 6.2 é possível ver as concentrações atingidas.

Tabela 6.2- Concentração das soluções padrão primárias individuais dos padrões internos

Padrões internos	Massa pesada (mg)	Concentração (mg/L)
4-etilfenol-d ₁₀	22,9	450,67
4-terc-butil-d ₉ -fenol-2,3,5,6-d ₄	21,9	433,62

6.3.2 Soluções padrão intermédias individuais

Para o estudo individual de cada composto é importante preparar soluções padrão individuais com uma concentração que seja detetável no cromatógrafo gasoso (tabela 6.3).

Transferir diclorometano para um balão volumétrico de 50 mL. Adicionar 1 mL da solução padrão primária do composto de interesse e agitar vigorosamente. Finalmente, aferir o balão com o solvente. O processo é repetido para cada um dos analitos em estudo.

Tabela 6.3- Concentração das soluções intermédias individuais

Compostos	Concentração (mg/L)
4-etilfenol	10,38
4-terc-butilfenol	8,09
2,6-di-terc-butil-p-benzoquinona	14,97
2,4-di-terc-butilfenol	8,94
2,6-di-terc-butil-4-vinilfenol	8,78
3,5-di-terc-butil-4-hidroxibenzaldeído	8,31
3,5-di-terc-butil-4-hidroxiacetofenona	8,00
7,9-di-terc-butil-1-oxaspiro (4,5) deca-6,9-dieno-2,8-diona	8,28
3-(3,5-di-terc-butil-4-hidroxifenil) propionato de metilo	9,19
Ácido 3-(3,5-di-terc-butil-4-hidroxifenil) propiónico	9,00

6.4 Extração em fase sólida

6.4.1 Preparação da solução conjunta e intermédia

Num balão de 20 mL adicionar diclorometano até cerca de um terço. De seguida adicionar os volumes das soluções padrão primárias de forma a obter uma única solução conjunta. Da solução do composto I introduzir 1 mL; 1,3 mL dos compostos II e VII; 0,7 mL do composto III e 1,2 mL dos compostos IV, V, VI e IX. Aferir o restante volume com diclorometano.

A solução padrão intermédia I é preparada por diluição num balão de 10 mL. Adicionar 1 mL da solução padrão conjunta. Preencher o restante volume com diclorometano.

A solução padrão intermédia II é preparada num balão volumétrico de 50 mL. Adicionar o mesmo solvente e acrescentar 1 mL da solução intermédia I. Aferir o restante volume com diclorometano mais uma vez. A solução padrão intermédia II é utilizada para preparar as soluções padrão de trabalho que correspondem às retas de calibração em solvente na primeira gama de trabalho estudada, entre aproximadamente 5 e 50 µg/L.

Preparar ainda a solução intermédia III, por diluição de 1 mL da solução intermédia I em 20 mL de diclorometano. Esta solução é utilizada para preparar as soluções padrão de trabalho em matriz ajustada.

Tabela 6.4- Concentração da solução padrão conjunta e das soluções intermédias I e II usadas na validação do SPE-GC/MS

Compostos	Concentração (mg/L)			
	Solução conjunta	Solução intermédia I	Solução Intermédia II	Solução Intermédia III
4-etilfenol	25,95	2,59	0,26	0,13
4-terc-butilfenol	26,28	2,63	0,26	0,13
2,6-di-terc-butil-p-benzoquinona	26,21	2,62	0,26	0,13
2,4-di-terc-butilfenol	26,83	2,68	0,27	0,13
2,6-di-terc-butil-4-vinilfenol	26,33	2,63	0,26	0,13
3,5-di-terc-butil-4-hidroxibenzaldeído	24,93	2,49	0,25	0,12
3,5-di-terc-butil-4-hidroxiacetofenona	25,99	2,60	0,26	0,13
3-(3,5-di-terc-butil-4-hidroxifenil) propionato de metilo	27,00	2,70	0,27	0,14

6.4.2 Preparação das soluções padrão de trabalho

As soluções padrão de trabalho são preparadas na altura de cada análise em vials usados diretamente nos injetores automáticos da cromatografia gasosa.

Os volumes de solvente e da solução intermédia II, a adicionar a cada vial correspondente a determinado padrão de trabalho, estão apresentados na tabela 6.5.

Tabela 6.5-Concentrações das soluções padrão de trabalho usadas na validação do SPE-GC/MS

		Padrões de trabalho							
		P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	P8
Volume de solvente (μL)		490	485	480	470	460	440	430	410
Volume da solução padrão intermédia II (μL)		10	15	20	30	40	60	70	90
Concentração dos compostos (μg/L)	4-etilfenol	5,19	7,78	10,38	15,57	20,76	31,14	36,33	46,71
	4-terc-butilfenol	5,26	7,89	10,51	15,77	21,03	31,54	36,80	47,31
	2,6-di-terc-butil-p-benzoquinona	5,24	7,86	10,48	15,72	20,96	31,45	36,69	47,17
	2,4-di-terc-butilfenol	5,37	8,05	10,73	16,10	21,46	32,19	37,56	48,29
	2,6-di-terc-butil-4-vinilfenol	5,27	7,90	10,53	15,80	21,07	31,60	36,87	47,40
	3,5-di-terc-butil-4-hidroxibenzaldeído	4,99	7,48	9,97	14,96	19,94	29,92	34,90	44,88
	3,5-di-terc-butil-4-hidroxiacetofenona	5,20	7,80	10,40	15,59	20,79	31,19	36,39	46,78
	3-(3,5-di-terc-butil-4-hidroxifenil) propionato de metilo	5,40	8,10	10,80	16,20	21,60	32,41	37,81	48,61

6.4.3 Preparação de soluções padrão de trabalho em matriz ajustada

As soluções padrão de trabalho em matriz ajustada são preparadas no extrato de diferentes amostras. Como estes extratos são obtidos em pequenas quantidades, são utilizados vials cónicos que possibilitam a análise de volumes inferiores. Preparar as soluções padrão de trabalho tal como descrito na tabela 6.6.

Tabela 6.6-Concentração das soluções padrão de trabalho em matriz ajustada usadas na validação do SPE-GC/MS

		Soluções padrão em matriz ajustada							
		P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	P8
Volume extrato (µL)		240	235	230	220	210	190	180	160
Volume da solução padrão intermédia III (µL)		10	15	20	30	40	60	70	90
Concentração dos compostos (µg/L)	4-etilfenol	5,19	7,78	10,38	15,57	20,76	31,14	36,33	46,71
	4-terc-butilfenol	5,26	7,89	10,51	15,77	21,03	31,54	36,80	47,31
	2,6-di-terc-butil-p-benzoquinona	5,24	7,86	10,48	15,72	20,96	31,45	36,69	47,17
	2,4-di-terc-butilfenol	5,37	8,05	10,73	16,10	21,46	32,19	37,56	48,29
	2,6-di-terc-butil-4-vinilfenol	5,27	7,90	10,53	15,80	21,07	31,60	36,87	47,40
	3,5-di-terc-butil-4-hidroxibenzaldeído	4,99	7,48	9,97	14,96	19,94	29,92	34,90	44,88
	3,5-di-terc-butil-4-hidroxiacetofenona	5,20	7,80	10,40	15,59	20,79	31,19	36,39	46,78
	3-(3,5-di-terc-butil-4-hidroxifenil) propionato de metilo	5,40	8,10	10,80	16,20	21,60	32,41	37,81	48,61

6.4.4 Preparação das soluções de fortificação

As soluções de fortificação são utilizadas durante os ensaios de recuperação. Adicionar 1 mL da solução intermédia II a um balão volumétrico de 20 mL. Aferir o balão com acetona de forma a obter as concentrações descritas na tabela 6.7.

Tabela 6.7- Concentração da solução de fortificação usada na validação do SPE-GC/MS

Compostos	Concentração (µg/L)
4-etilfenol	12,97
4-terc-butilfenol	13,14
2,6-di-terc-butil-p-benzoquinona	13,10
2,4-di-terc-butilfenol	13,41
2,6-di-terc-butil-4-vinilfenol	13,17
3,5-di-terc-butil-4-hidroxibenzaldeído	12,47
3,5-di-terc-butil-4-hidroxiacetofenona	12,99
3-(3,5-di-terc-butil-4-hidroxifenil) propionato de metilo	13,50

6.5 Extração Líquido-Líquido

6.5.1 Solução padrão conjunta e intermédia

Preparar uma solução conjunta dos compostos em estudo, por diluição em diclorometano das soluções padrão primárias individuais (tabela 6.8). Num balão volumétrico adicionar o solvente e as respectivas quantidades de cada solução padrão primária individual. Por fim, afere-se o balão volumétrico até à respetiva marca de 20 mL.

A partir da solução conjunta é possível preparar a solução intermédia I através de uma simples diluição. Adicionar 1 mL da solução conjunta ao solvente diclorometano, perfazendo um volume total de 10 mL.

Tabela 6.8- Concentração da solução padrão conjunta e intermédia I usadas na validação do LLE-GC/MS

Compostos	Volume da solução primária adicionado à solução conjunta (mL)	Concentração (mg/L)	
		Solução conjunta	Solução intermédia I
4-etilfenol	0,1	2,59	0,26
4-terc-butilfenol	3,1	62,50	6,25
2,6-di-terc-butil-p-benzoquinona	1,7	62,50	6,25
2,4-di-terc-butilfenol	2,8	62,50	6,25
3,5-di-terc-butil-4-hidroxibenzaldeído	3,0	62,50	6,25
3,5-di-terc-butil-4-hidroxiacetofenona	3,1	62,50	6,25
3-(3,5-di-terc-butil-4-hidroxifenil) propionato de metilo	2,8	62,50	6,25

Estas soluções foram usadas para preparar as soluções padrão de trabalho que correspondem às retas de calibração em solvente na segunda gama de trabalho estudada, entre aproximadamente 5 e 50 µg/L para o composto I e entre 125 e 1125 µg/L para os restantes compostos.

6.5.2 Solução conjunta dos padrões internos

Preparar uma solução conjunta dos padrões internos, por diluição em diclorometano das soluções padrão primárias individuais de cada PI. A um balão volumétrico de 50 mL adicionar o volume descrito na tabela 6.9, referente a cada uma das soluções padrão primárias individuais. De seguida, aferir o volume total com diclorometano.

Tabela 6.9-Concentração da solução conjunta dos padrões internos

Padrões internos	Volume da solução padrão primária adicionado (mL)	Concentração (mg/L)
4-etilfenol-d ₁₀	0,05	11,27
4-terc-butil-d9-fenol-2,3,5,6-d ₄	1,0	216,81

6.5.3 Soluções padrão de trabalho

As soluções padrão de trabalho foram preparadas por diluição da solução padrão intermédia I. A adição dos diferentes volumes da solução padrão intermédia I está indicada na tabela 6.10, assim como o volume de diclorometano necessário para perfazer o volume. No máximo, estas soluções têm a validade de 1 dia.

Tabela 6.10- Concentração das soluções padrão de trabalho usadas na validação do LLE-GC/MS

		Soluções padrão de trabalho							
		P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	P8
Volume de solvente (µL)		490	480	470	460	450	440	430	410
Volume da solução padrão intermédia I (µL)		10	20	30	40	50	60	70	90
Concentração dos compostos (µg/L)	4-etilfenol	5,18	10,36	15,54	20,72	25,90	31,08	36,26	46,62
	4-terc-butilfenol	125	250	375	500	625	750	875	1125
	2,6-di-terc-butil-p-benzoquinona	125	250	375	500	625	750	875	1125
	2,4-di-terc-butilfenol	125	250	375	500	625	750	875	1125
	3,5-di-terc-butil-4-hidroxibenzaldeído	125	250	375	500	625	750	875	1125
	3,5-di-terc-butil-4-hidroxiacetofenona	125	250	375	500	625	750	875	1125
	3-(3,5-di-terc-butil-4-hidroxifenil) propionato de metilo	125	250	375	500	625	750	875	1125

6.5.4 Soluções padrão de trabalho com padrões internos

As soluções padrão de trabalho com padrões internos são preparadas de acordo com a metodologia indicada na tabela 6.11. A concentração dos padrões internos deve ser constante ao longo da gama de trabalho.

Tabela 6.11- Concentração das soluções padrão de trabalho com padrões internos usadas na validação do LLE-GC/MS

		Soluções padrão de trabalho							
		P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	P8
Volume de solvente (µL)		450	440	430	420	410	400	390	370
Volume da solução padrão intermédia I (µL)		10	20	30	40	50	60	70	90
Volume da solução padrão conjunta dos PI (µL)		40	40	40	40	40	40	40	40
Concentração dos compostos (µg/L)	4-etilfenol	5,18	10,36	15,54	20,72	25,90	31,08	36,26	46,62
	4-terc-butilfenol	125	250	375	500	625	750	875	1125
	2,6-di-terc-butil-p-benzoquinona	125	250	375	500	625	750	875	1125
	2,4-di-terc-butilfenol	125	250	375	500	625	750	875	1125
	3,5-di-terc-butil-4-hidroxibenzaldeído	125	250	375	500	625	750	875	1125
	3,5-di-terc-butil-4-hidroxiacetofenona	125	250	375	500	625	750	875	1125
	3-(3,5-di-terc-butil-4-hidroxifenil) propionato de metilo	125	250	375	500	625	750	875	1125
Concentração do PI (µg/L)	4-etilfenol-d ₁₀					36,05			
	4-terc-butil-d ₉ -fenol-2,3,5,6-d ₄					693,79			

6.5.5 Soluções de fortificação

As soluções de fortificação são utilizadas durante os ensaios de recuperação. Preparar duas soluções de fortificação: uma para os compostos de interesse e outra para os padrões internos.

Preparar a solução de fortificação dos compostos de interesse, por diluição de 1 mL da solução intermédia I em 20 mL de acetona (tabela 6.12). A solução de fortificação dos padrões internos é preparada por diluição de 1 mL da solução conjunta dos PI em 50 mL de acetona (tabela 6.13).

Tabela 6.12-Concentração da solução de fortificação usadas na validação do LLE-GC/MS

Compostos	Concentração (µg/L)
4-etilfenol	12,95
4-terc-butilfenol	312,50
2,6-di-terc-butil-p-benzoquinona	312,50
2,4-di-terc-butilfenol	312,50
3,5-di-terc-butil-4-hidroxibenzaldeído	312,50
3,5-di-terc-butil-4-hidroxiacetofenona	312,50
3-(3,5-di-terc-butil-4-hidroxifenil) propionato de metilo	312,50

Tabela 6.13-Concentração da solução de fortificação dos padrões internos usadas na validação do LLE-GC/MS

Padrões internos	Concentração (µg/L)
4-etilfenol-d ₁₀	9,01
4-terc-butil-d ₉ -fenol-2,3,5,6-d ₄	173,45

6.5.6 Soluções padrão para o estudo da linearidade dos padrões internos

A partir da solução conjunta dos padrões internos preparar as soluções padrão para o estudo da linearidade dos padrões internos. A gama de trabalho selecionada para este estudo está apresentada na tabela 6.14.

Tabela 6.14- Concentração das soluções padrão de trabalho dos padrões internos

		Soluções dos padrões internos							
		P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	P8
Volume solvente (µL)		490	480	470	460	450	440	430	410
Volume da solução padrão conjunta dos PI (µL)		10	20	30	40	50	60	70	90
Concentração do PI (µg/L)	4-etilfenol-d ₁₀	9,01	18,03	27,04	36,05	45,07	54,08	63,09	81,12
	4-terc-butil-d ₉ -fenol-2,3,5,6-d ₄	173,45	346,90	520,34	693,79	867,24	1040,69	1214,14	1561,03

6.6 Condições do método cromatográfico

As condições do método cromatográfico foram sendo ajustadas pela análise dos cromatogramas obtidos. Foram também tidas como referência as condições de alguns métodos encontrados na literatura (tabela 1.3).

Tabela 6.15- Condições do injetor

Condições do injetor	
Temperatura (°C)	280
Modo de injeção	<i>Splitless</i>
Tempo de <i>Splitless</i> (min)	1,5

Tabela 6.16- Condições da coluna cromatográfica

Condições da coluna	
Tipo de coluna	Agilent J&W HP-5ms 60 m x 0,250 mm x 0,25 µm
Modo de operação	Contínuo
Gás de arraste/Fluxo (mL/min)	He/1

A temperatura do forno tem um impacto tremendo na retenção dos analitos visto que quanto maior a temperatura, menor a retenção dos compostos. Para além disso a resolução pode ser aumentada pela diminuição da temperatura, possibilitando uma melhor separação dos compostos.

No início do estudo foi definido um programa de temperaturas capaz de separar os compostos de interesse:

Tabela 6.17- Condições operacionais do forno sem padrões internos

Condições operacionais iniciais do forno			
Início	50 °C	<i>hold</i> 5 min	
Rampa	20 °C/min	300 °C	<i>hold</i> 5 min
Tempo de análise total	22,5 min		

Com a adição dos padrões internos, a separação entre os deuterados e os compostos correspondentes não era total. Nesta situação, surgiram interferências que alteravam a intensidade dos picos adjacentes.

Posto isto, tornou-se necessária uma desaceleração do aumento da temperatura, de modo a aumentar a resolução dos picos. O novo programa de temperaturas definido está indicado na tabela 6.18.

Tabela 6.18- Condições operacionais do forno com padrões internos

Condições operacionais finais do forno			
Início		50 °C	<i>hold</i> 5 min
Rampa 1	10 °C/min	170 °C	<i>hold</i> 2 min
Rampa 2	5 °C/min	260 °C	
Rampa 3	50 °C/min	300 °C	<i>hold</i> 2 min
Tempo de análise total			39,8 min

Nas figuras 6.1 e 6.2, é possível observar a diferença que o programa de temperaturas tem no cromatograma que é obtido.

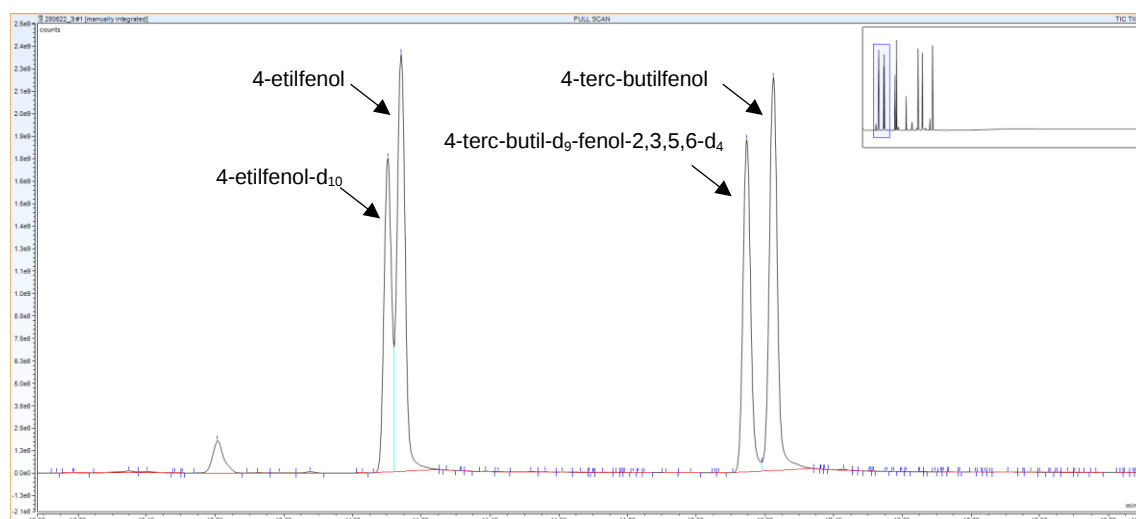


Figura 6.1- Segmento do cromatograma obtido com as condições operacionais iniciais do forno (tabela 6.17)

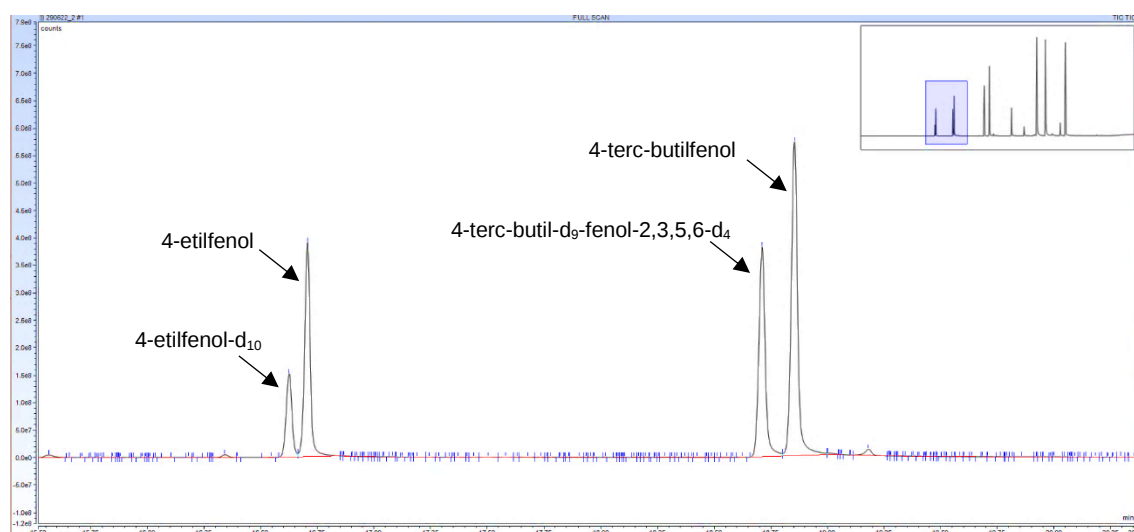


Figura 6.2- Segmento do cromatograma obtido com as condições operacionais finais do forno (tabela 6.18)

Tabela 6.19- Condições da interface

Condições da interface	
Temperatura (°C)	250

Tabela 6.20-Condições do detector

Condições do detector	
Tipo de detector	Espetrômetro de massa
Temperatura da fonte (°C)	230
Temperatura do quadrupolo (°C)	280
Tipo de ionização	EI
Energia de ionização (eV)	70

Tabela 6.21-Modo de pesquisa no MS

Modo	Composto	Intervalo de tempo (min)	lão m/z
Full scan	-	8 – 39,8	50-500
SIM	4-etilfenol-d ₁₀ , 4-etilfenol	11 - 18	77, 107, 112, 113, 122, 131
	4-terc-butil-d ₉ -fenol-2,3,5,6-d ₄ , 4-terc-butilfenol	18 - 21,5	107, 135, 144, 145, 150, 163
	2,6-di-terc-butil-p-benzoquinona, 2,4-di-terc-butilfenol	21,5 – 24,5	163, 177, 191, 205, 206, 220
	2,6-di-terc-butil-4-vinilfenol	24,5 – 27,5	217, 218, 232
	3,5-di-terc-butil-4- hidroxibenzaldeído	27,5 - 29	191, 219, 234
	3,5-di-terc-butil-4- hidroxiacetofenona	29 - 30	205, 233, 248
	3-(3,5-di-terc-butil-4-hidroxifenil) propionato de metilo	30 – 39,8	277, 278, 292

Tabela 6.22-Iões característicos escolhidos para modo SIM e tempos de retenção

Composto	t _r * (min)	lão de quantificação (m/z)	lão de qualificação (m/z)
4-etilfenol-d ₁₀	16,63	113	112 / 131
4-etilfenol	16,7	107	122 / 77
4-terc-butil-d ₉ -fenol-2,3,5,6-d ₄	18,71	145	144 / 163
4-terc-butilfenol	18,85	135	150 / 107
2,6-di-terc-butil-p-benzoquinona	22,36	177	220 / 205
2,4-di-terc-butilfenol	22,97	191	206 / 163
2,6-di-terc-butil-4-vinilfenol	25,54	217	232 / 218
3,5-di-terc-butil-4- hidroxibenzaldeído	28,48	219	234 / 191
3,5-di-terc-butil-4- hidroxiacetofenona	29,49	233	248 / 205
3-(3,5-di-terc-butil-4-hidroxifenil) propionato de metilo	31,82	277	292 / 278

*Os tempos de retenção foram obtidos de acordo com as condições operacionais finais do forno

6.7 Validação do método de ensaio

6.7.1 Estudo de Linearidade

Os estudos de linearidade são efetuados a partir da avaliação das retas de calibração.

- 1- Preparar 8 soluções padrão de trabalho a partir da solução padrão intermédia
- 2- Representar graficamente os resultados, sendo que a concentração é representada no eixo das abcissas e o sinal cromatográfico no eixo das ordenadas.
- 3- Calcular a função de calibração linear sendo que o coeficiente de determinação associado deve ser superior ou igual a 0,99.
- 4- Submeter os resultados obtidos aos testes de linearidade indicados nos Anexos B, C, D, E e F.

6.7.2 Limiares analíticos instrumentais

A confirmação experimental dos limites de quantificação instrumentais obtidos a partir da reta de calibração, é realizada através dos seguintes passos:

- 1- Para cada composto, preparar no mínimo 10 soluções com uma concentração próxima do limite de quantificação.
- 2- Determinar a concentração experimental através da reta de calibração
- 3- Avaliar a precisão (%RSD) e a exatidão (%Erro) dos ensaios que devem ser inferiores a 25%

6.7.3 Precisão

A precisão pode ser dividida em repetibilidade e precisão intermédia. A repetibilidade é estudada da seguinte forma:

- 1- Preparar no mínimo 10 soluções padrão para cada nível de concentração (P1, P5 e P8).
- 2- Calcular o desvio padrão de repetibilidade (S_r), o desvio padrão relativo (%RSD) e o limite de repetibilidade (r)
- 3- Avaliar a precisão (%RSD) que deve ser inferior a 25%

A precisão intermédia é analisada do mesmo modo, no entanto, os 10 ensaios independentes são realizados em dias de trabalho diferentes.

6.7.4 Efeito de Matriz

Para o estudo do efeito de matriz nas amostras estudadas foi necessário implementar os seguintes passos:

- 1- Preparar uma solução padrão no extrato da matriz, de forma a obter uma concentração a meio da gama de trabalho
- 2- Calcular a concentração obtida a partir de uma reta de calibração realizada em solvente
- 3- Comparar a concentração obtida da solução padrão preparada no extrato ($\bar{X}_i$) com a concentração teórica (C_{ref}).
- 4- Considerar a existência de efeito de matriz quando a diferença percentual entre os dois valores (E), calculada pela equação 6.1, é superior a 20%.

$$E(\%) = \frac{|\bar{X}_i - C_{ref}|}{C_{ref}} \times 100 \quad (6.1)$$

6.7.5 Ensaios de recuperação

Os ensaios de recuperação são aplicados de modo a avaliar a exatidão do método analítico e a estudar o método de preparação da amostra. O processo de fortificação da amostra implica a utilização de soluções de fortificação solúveis em água permitindo assim a solubilização dos compostos de interesse.

Quando utilizada a técnica em SPE, fortificar 500 mL de amostra, com 3 mL da solução de fortificação referida na tabela 6.7. Na extração usar apenas um volume de 100 mL desta amostra.

Em LLE, foram testados dois níveis de fortificação, para cada um dos compostos. O nível baixo tem como concentração um valor inferior ao limite legislado pelo grupo 4MSI. O nível alto tem como concentração o ponto a meio da gama de trabalho (P5).

Para o nível baixo, adicionar 0,5 mL da solução de fortificação, descrita na tabela 6.12, a 100 mL de amostra. Para o nível alto, adicionar 1 mL da solução de fortificação a 100 mL de amostra.

Em ambos os níveis, adicionar ainda 2 mL da solução de fortificação dos padrões internos, descrita na tabela 6.13.

Tabela 6.23- Concentração da amostra fortificada para o nível baixo e para o nível alto usada na validação do LLE-GC/MS

Concentração na amostra fortificada (µg/L)		
Compostos	Nível baixo	Nível alto
4-etilfenol	0,065	0,13
4-terc-butilfenol	1,56	3,13
2,6-di-terc-butil-p-benzoquinona	1,56	3,13
2,4-di-terc-butilfenol	1,56	3,13
2,6-di-terc-butil-4-vinilfenol	0,75	1,50
3,5-di-terc-butil-4-hidroxibenzaldeído	1,56	3,13
3,5-di-terc-butil-4-hidroxiacetofenona	1,56	3,13
3-(3,5-di-terc-butil-4-hidroxifenil) propionato de metilo	1,56	3,13

Tabela 6.24- Concentração dos padrões internos na amostra fortificada para o nível baixo e para o nível alto usada na validação do LLE-GC/MS

Concentração na amostra fortificada (µg/L)	
Padrões internos	Nível baixo e nível alto
4-etilfenol-d ₁₀	0,18
4-terc-butil-d ₉ -fenol-2,3,5,6-d ₄	3,47

6.8 Condições de preparação da amostra

6.8.1 Extração em Fase sólida

- 1- Lavar previamente os tubos de recolha e os tubos de concentração com diclorometano.
- 2- Fortificar 500 mL de amostra com 3 mL da solução de fortificação, descrita na tabela 6.7.
- 3- Extrair 100 mL dessa mesma amostra num aparelho automatizado SPE *Dionex AutoTrace 280*.
- 4- Para cada amostra fortificada, realizar pelo menos 3 ensaios independentes.
- 5- Concentrar o volume eluído num sistema de evaporação *TurboVap* até se atingir 0,5 mL de concentrado. A temperatura do banho era de 35 °C, com um fluxo de azoto a 0,2 bar.
- 6- Transferir este extrato para um vial para análise cromatográfica.

Tabela 6.25-Condições da extração usadas em SPE

Condições para o SPE	
Cartucho	Waters Oasis HLB, 6 mL
Condicionamento	6 mL diclorometano + 6 mL metanol + 3 mL água ultrapura
Passagem da amostra	100 mL de amostra fortificada
Lavagem	4 mL de água ultrapura
Secagem	45 min de uma corrente contínua de azoto
Eluição	4 mL + 2 mL + 2 mL diclorometano

Após a extração e concentração dos extratos obtidos por SPE obteve-se um volume de 0,5 mL, o que corresponde a um fator de concentração de 200 vezes.

6.8.2 Extração Líquido-Líquido

- 1- Lavar previamente as ampolas de extração e os tubos de concentração com diclorometano.
- 2- Numa ampola de extração colocou-se 100 mL de amostra fortificada com 1 mL (nível alto) ou 0,5 mL (nível baixo) da solução de fortificação dos compostos (descrita na tabela 6.12) e 2 mL da solução de fortificação dos padrões internos (descrita na tabela 6.13).
- 3- Extrair a amostra com 30 mL de diclorometano.
- 4- Agitar vigorosamente a ampola durante 2 a 3 minutos.
- 5- Após algum tempo em repouso, separar a fase orgânica da fase aquosa.
- 6- Para cada amostra fortificada, realizar pelo menos 3 ensaios independentes.
- 7- Concentrar o volume eluído num sistema de evaporação *TurboVap* até se atingir 0,5 mL de concentrado. A temperatura do banho era de 35 °C, com um fluxo de azoto a 0,2 bar.
- 8- Transferir este extrato para um vial para análise cromatográfica.

Após a extração e concentração dos extratos obtidos por LLE obteve-se um volume de 0,5 mL, o que corresponde a um fator de concentração de 200 vezes.

Adicionalmente, efetuar o procedimento de extração descrito anteriormente para o ensaio em branco e o ensaio com a amostra sem ser fortificada.

6.9 Ensaios de migração a materiais

- 1- Preparar uma solução de hipoclorito de sódio a 0,1% (m/m) em cloro livre num balão volumétrico com 100 mL de água desmineralizada e 1,5 mL de uma solução de hipoclorito de sódio comercial.
- 2- Adicionar 1,8 mL da solução de hipoclorito de sódio a 0,1% (m/m) em cloro livre a um balão volumétrico com 2000 mL de água desmineralizada, obtendo-se a água de ensaio clorada.
- 3- Medir a quantidade de cloro livre, em mg/L, presente na água de ensaio clorada através de um fotómetro. O valor obtido deve ser entre 0,8 - 1,2 mg/L.
- 4- Colocar os materiais de estudo em contacto com água de ensaio não clorada e clorada, durante (24 ± 1) horas a (23 ± 2) °C. Estes devem estar totalmente imersos durante o período de estagnação da amostra.
- 5- Após o período de estagnação das águas, iniciar o ensaio de migração, onde os materiais foram imersos novamente com água de ensaio e com a água de ensaio clorada durante 72 horas a (23 ± 2) °C.
- 6- Preparar ainda 2 ensaios em branco com água de ensaio sem cloro e com água de ensaio com cloro, nas mesmas condições que o ensaio de migração.
- 7- Após o período de migração remover as águas de ensaio e analisar por LLE-GC/MS para pesquisa de compostos que possam ter migrado dos materiais para a água de ensaio.
- 8- Repetir o passo 1,2,3,5,6 e 7 consecutivamente de forma a realizar 3 ensaios de migração distintos.

6.9.1 Condições do ensaio

No âmbito deste estudo, seleccionaram-se 8 materiais orgânicos distintos com diferentes matérias-primas e funções no sistema de abastecimento de águas de modo a investigar a possível existência dos compostos em estudo nestes materiais. É necessário ter conhecimento das dimensões dos materiais a usar, de modo a encontrar as condições ótimas do ensaio aos materiais (tabela 6.26 e 6.27).

Tabela 6.26- Características das provetes utilizadas nos ensaios a materiais

Designação	Composição geral	Forma	Comprimento (mm)	Largura (mm)	Altura / Espessura (mm)	Cor	Opacidade	Uso proposto
A	Poliéster reforçado a fibra de vidro	Provetes	51	49	8	Castanho claro	Opaco	Tubagem utilizada em água potável e água não tratada, esgotos, energia hidroelétrica, irrigação, setor industrial
B	Epóxi-Poliamina	Provetes	46	46	5	Vermelho	Brilhante	Revestimento protetor para tubagens e tanques de água
C	Polietileno de alta densidade	Provetes	45	45	8	Azul	Opaco	Reservatório de armazenamento de água
D	Fluoroplástico (PVDF)	Provetes	45	45	5	Branco	Transparente	Tubagem resistente a elevadas temperaturas
E	Borracha EPDM	Provetes	115	75	10	Preto	Opaco	Produto de reparação em sistemas de abastecimento de água

Tabela 6.27- Características dos tubos utilizados nos ensaios a materiais

Designação	Composição geral	Forma	Comprimento (cm)	Diâmetro interno (mm)	Diâmetro externo (mm)	Cor	Opacidade	Uso proposto
F	Polietileno-1-buteno	Tubo	39,7	43	45	Preto	Opaco	Tubagem utilizada em água potável e água não tratada
G	Polietileno linear de baixa densidade	Tubo	10	9	11	Branco	Transparente	Tubagem resistente às mudanças de temperatura
H	Polietileno de alta densidade	Tubo	50,5	40	45	Preto	Opaco	Tubagem utilizada em água potável

APRESENTAÇÃO E DISCUSSÃO DE RESULTADOS

7.1 Identificação dos compostos em estudo

A espectrometria de massa acoplada à cromatografia gasosa possibilita a identificação direta dos compostos de interesse. O modo de operação em *Full Scan* vai permitir a obtenção do espectro de massa completo dos analitos em estudo, através da pesquisa de todos os fragmentos iônicos de razão m/z entre os 50 e os 500 Da (figura 7.1). É ainda habitualmente utilizado na identificação de compostos desconhecidos existentes numa amostra.

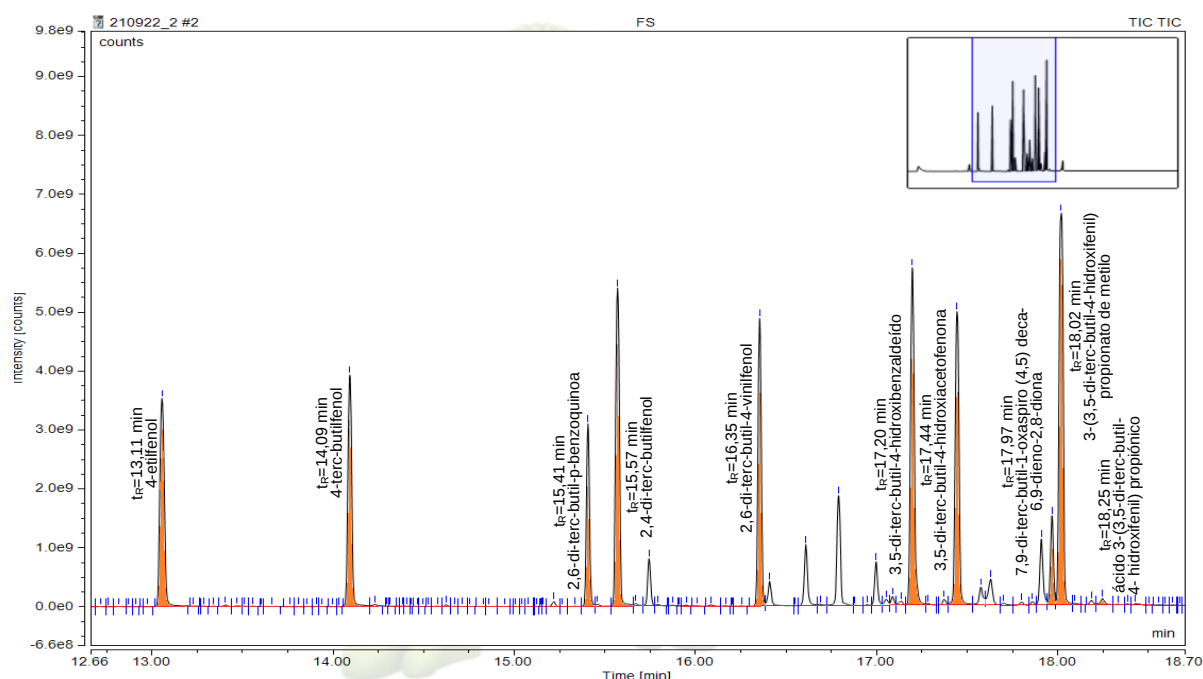


Figura 7.1-Cromatograma com o modo de operação *Full Scan* tendo em conta as condições operacionais iniciais do forno obtido pela análise da solução conjunta

Como se pode observar na figura 7.1, a fragmentação de fenóis aromáticos é caracterizada por picos intensos. Significa assim que a estabilidade dos fragmentos obtidos no espectro é elevada. Os fenóis também são caracterizados como ácidos fracos, o que significa que não ionizam significativamente numa solução. [120]

A partir deste modo de operação, é possível escolher os fragmentos iônicos que dão origem a intensidades de sinal elevadas e que vão ser escolhidas para fazer nova análise, mas desta vez em modo *SIM*. A seleção dos fragmentos iônicos de razão m/z tem sempre o mesmo critério de escolha: os fragmentos iônicos de razão m/z de maior intensidade e com as razões m/z mais altas devem ser os escolhidos. Não se deve optar por fragmentos iônicos de razão m/z muito baixa, visto que se tratam de fragmentos cada vez mais pequenos que podem também fazer parte do espectro de outros compostos que não os analisados. Um exemplo disto é o caso do fragmento iônico de razão m/z igual a 57 que existe no espectro de massa de vários dos compostos analisados. Mais ainda, os picos de menor intensidade também são iões mais instáveis.

Deste modo, escolheu-se como ião de quantificação, o ião de maior intensidade (pico base) que correspondente a 100% da abundância relativa e outros dois iões como iões de qualificação.

A escolha dos fragmentos iônicos de razão m/z para cada um dos compostos em estudo foi efetuada por injeção no modo *Full Scan* das soluções padrão intermédias individuais (tabela 6.3).

O espectro de massa fornece a intensidade relativa do sinal em função de cada massa detetada. O espectro de massa do 4-etilfenol (I) é caracterizado pelos fragmentos iônicos de razão m/z 77, 107 e 122, os mais baixos de todos os compostos em estudo, dado que o 4-etilfenol tem a massa molecular mais baixa (figura 7.2).

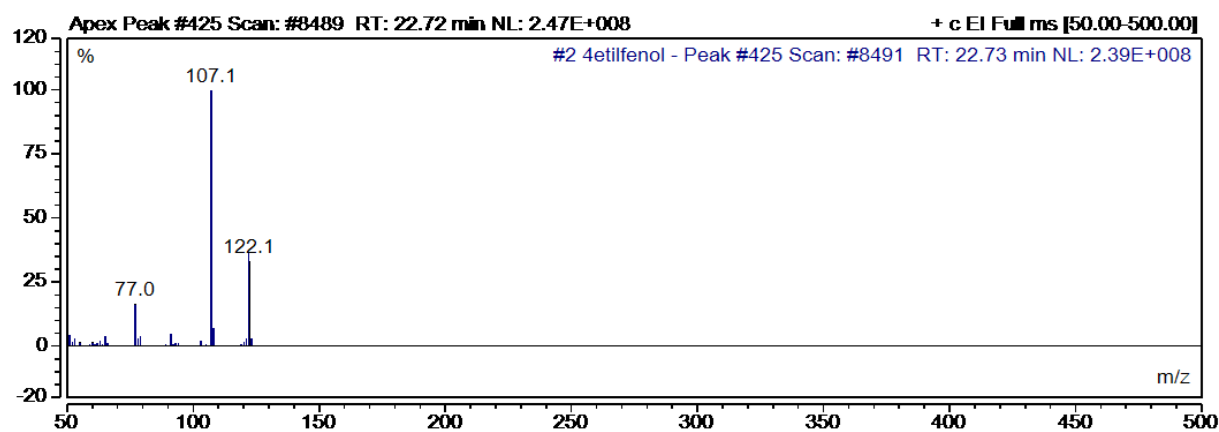


Figura 7.2-Espectro de massa do 4-etilfenol (I)

Quando a amostra é vaporizada, existe energia de ionização suficiente, de modo a que seja retirado um eletrão da molécula orgânica em estudo, formando assim um ião positivo conhecido como ião molecular (M^+). No caso do composto I observa-se que o fragmento iônico de razão $m/z=122$ é o ião molecular visto que o valor obtido corresponde à massa molecular do analito.

O *software Mass Frontier* possibilita ainda a obtenção dos mecanismos de fragmentação que por sua vez dão origem aos iões que compõem a “impressão digital” que é o espectro de massa. O ião 107 provavelmente é derivado da perda do grupo metilo, tal como é possível observar pelo mecanismo de fragmentação da figura 7.3. A biblioteca de dados permitiu ainda confirmar que o espectro obtido na figura 7.2, corresponde ao espectro do composto em estudo com 63% de *match*.

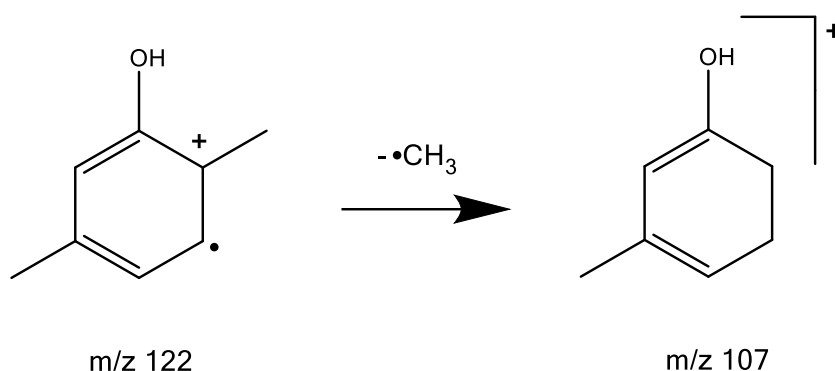


Figura 7.3-Mecanismo de fragmentação proposto do 4-etilfenol (I)

No caso do 4-terc-butilfenol (II), os fragmentos iónicos de razão m/z 107, 135 e 150 foram os escolhidos (figura 7.4). A biblioteca de dados confirmou o espectro do composto com um *match* de 51%.

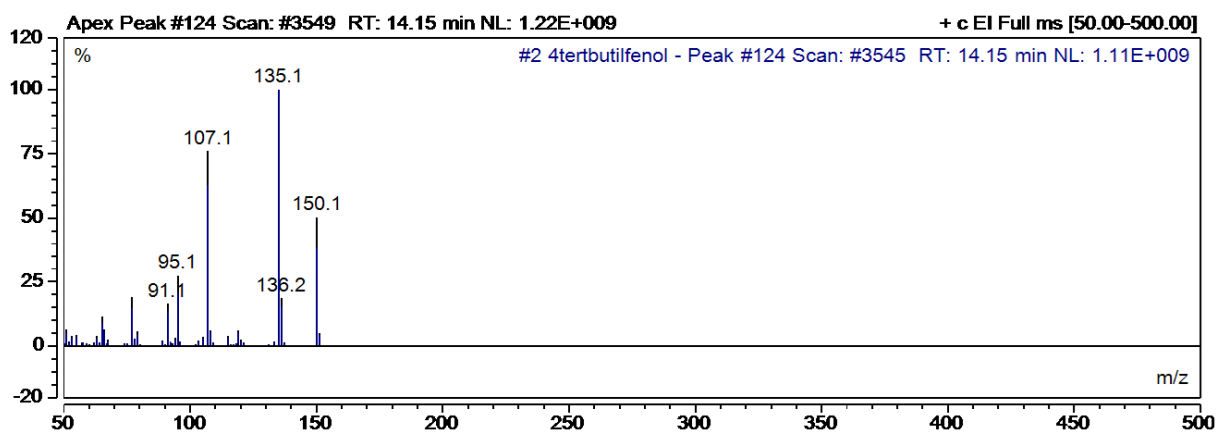


Figura 7.4- Espectro de massa do 4-terc-butilfenol (II)

Já o composto 2,6-di-terc-butil-p-benzoquinona (III) tem como fragmentos iónicos de razão m/z o 177, o 205 e o 220 (figura 7.5). Mais uma vez o ião molecular aparece no espectro como o segundo ião mais intenso. O pico correspondente ao ião 205 tem como possível origem o mecanismo da figura 7.6. A biblioteca de dados confirmou o espectro do composto com um *match* de 78%.

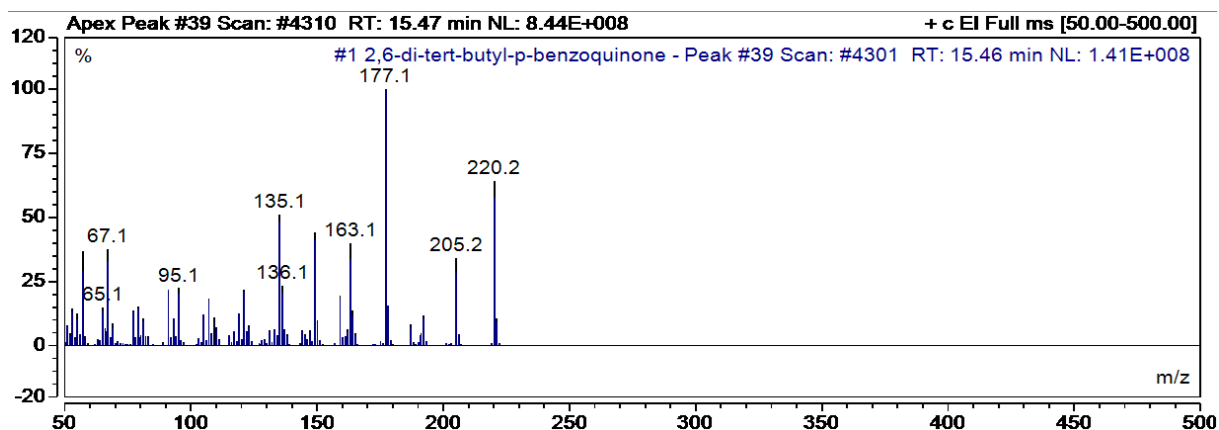


Figura 7.5-Espetro de massa do 2,6-di-terc-butil-p-benzoquinona (III)

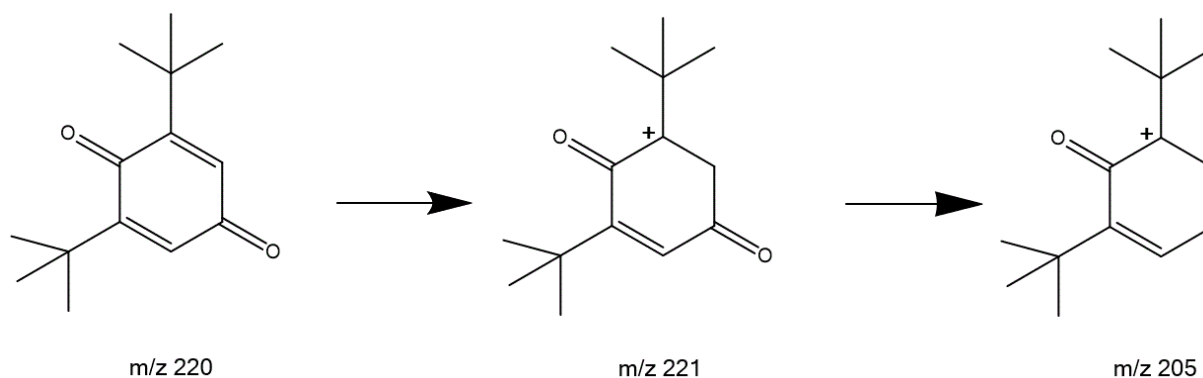


Figura 7.6-Mecanismo de fragmentação proposto do 2,6-di-terc-butil-p-benzoquinona (III)

O 1º passo descreve a ionização que consiste na remoção de elétrons numa das ligações π e o 2º passo trata-se de uma decomposição que ocorre deslocalizada do sítio com carga (*charge remote rearrangement*). [5]

O espectro de massa do 2,4-di-terc-butilfenol (IV) tem como iões mais abundantes (para valores de m/z elevados) os fragmentos iónicos de razão m/z 163, 191 e 206 (figura 7.7). A biblioteca de dados confirmou o espectro do composto com um match de 62%. Já o espectro do 2,6-di-terc-butil-4-vinilfenol (V) é definido pelos fragmentos iónicos de razão m/z 217, 218 e 232 (figura 7.8).

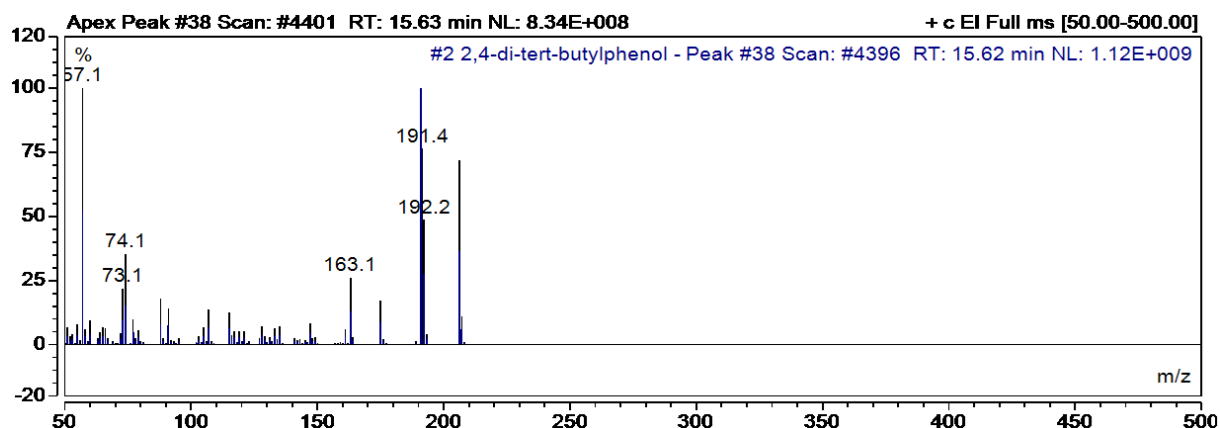


Figura 7.7-Espetro de massa do 2,4-di-terc-butilfenol (IV)

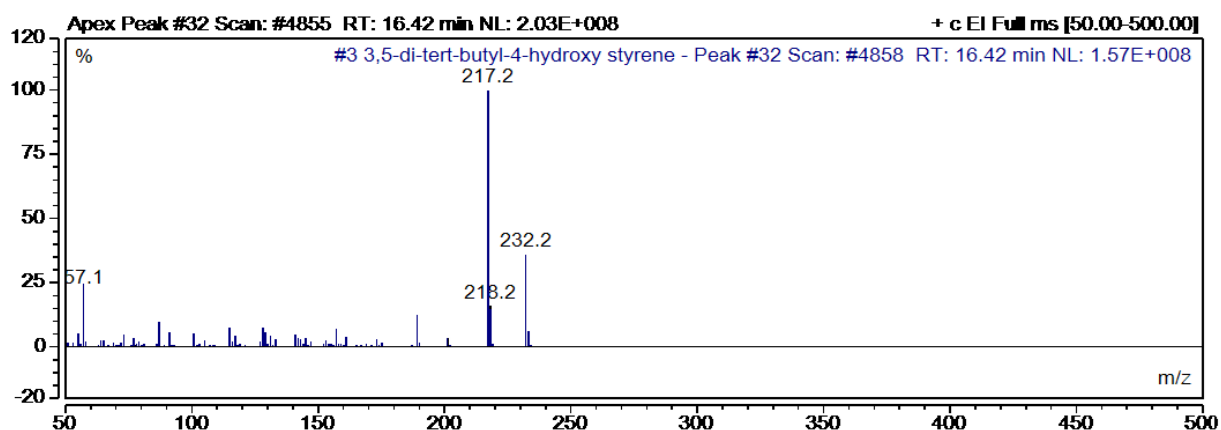


Figura 7.8-Espetro de massa do 2,6-di-terc-butil-4-vinilfenol (V)

O 3,5-di-terc-butil-4-hidroxibenzaldeído (VI) tem como ião característico um fragmento iônico de razão m/z igual a 219 (figura 7.9). Mais uma vez, o mecanismo de dissociação da ligação π origina o ião 235 que por sua vez perde o ião O^{2-} e sofre um rearranjo dos hidrogénios dando origem ao ião característico do 3,5-di-terc-butil-4-hidroxibenzaldeído (figura 7.10). Os iões de qualificação são os fragmentos iónicos de razão m/z 191 e 234. A biblioteca de dados confirmou o espectro do composto com um *match* de 75%.

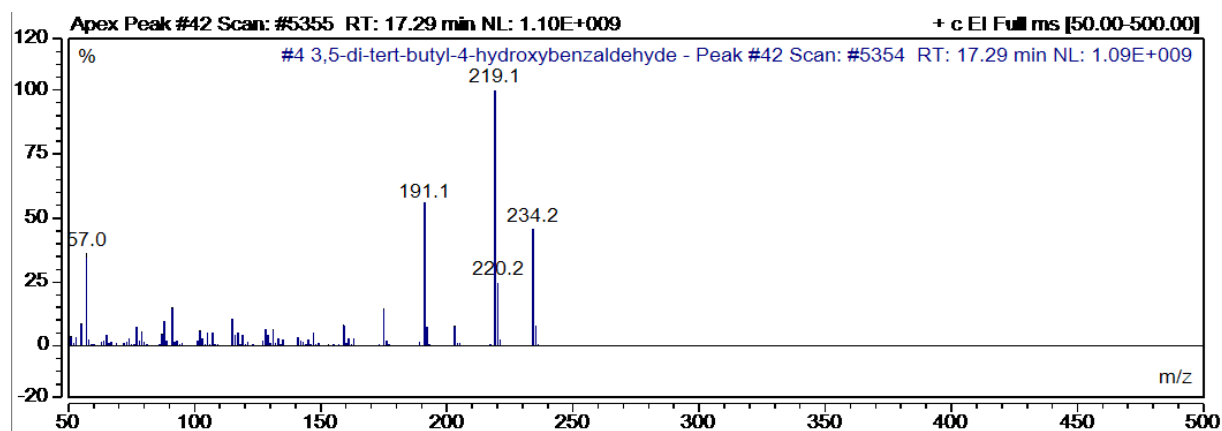


Figura 7.9-Espectro de massa do 3,5-di-terc-butil-4-hidroxibenzaldeído (VI)

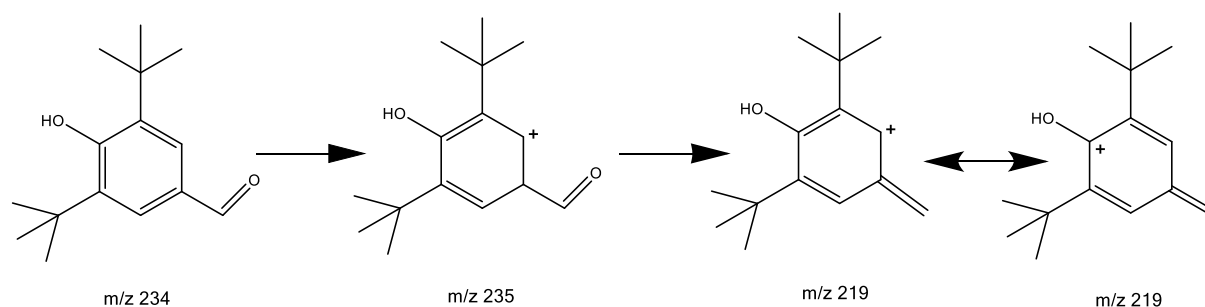


Figura 7.10-Mecanismo de fragmentação proposto do 3,5-di-terc-butil-4-hidroxibenzaldeído (VI)

Já no caso do 3,5-di-terc-butil-4-hidroxiacetofenona (VII), o mecanismo que pode dar origem ao fragmento iônico de razão m/z 233, pode ser derivado de um rearranjo do sítio com carga da molécula, após o composto ter sido protonado (figura 7.12). Os fragmentos iônicos de razão m/z 205 e 248 correspondem aos iões de qualificação (figura 7.11). A correspondência com a biblioteca de dados garante um *match* de 95%.

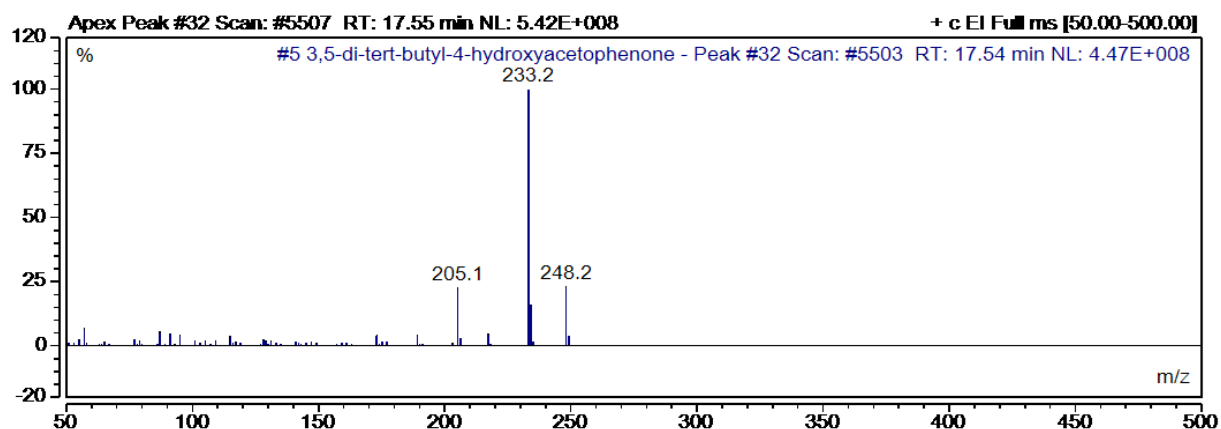


Figura 7.11-Espectro de massa do 3,5-di-terc-butil-4-hidroxiacetofenona (VII)

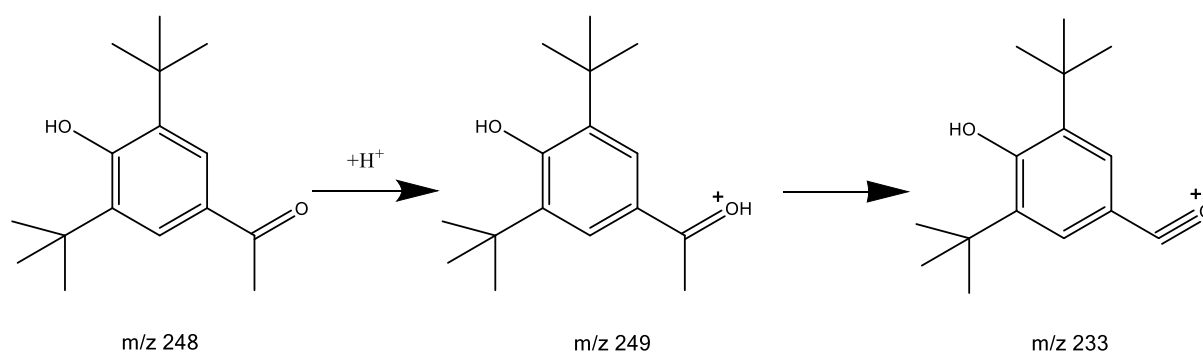


Figura 7.12-Mecanismo de fragmentação proposto do 3,5-di-terc-butil-4-hidroxiacetofenona (VII)

Finalmente o 3-(3,5-di-terc-butil-4-hidroxifenil) propionato de metilo (IX), pode ainda sofrer fragmentações, que dão origem aos fragmentos iônicos de razão m/z 277, 292 e 278 (figura 7.13). A biblioteca de dados confirmou o espectro do composto com um *match* de 97%.

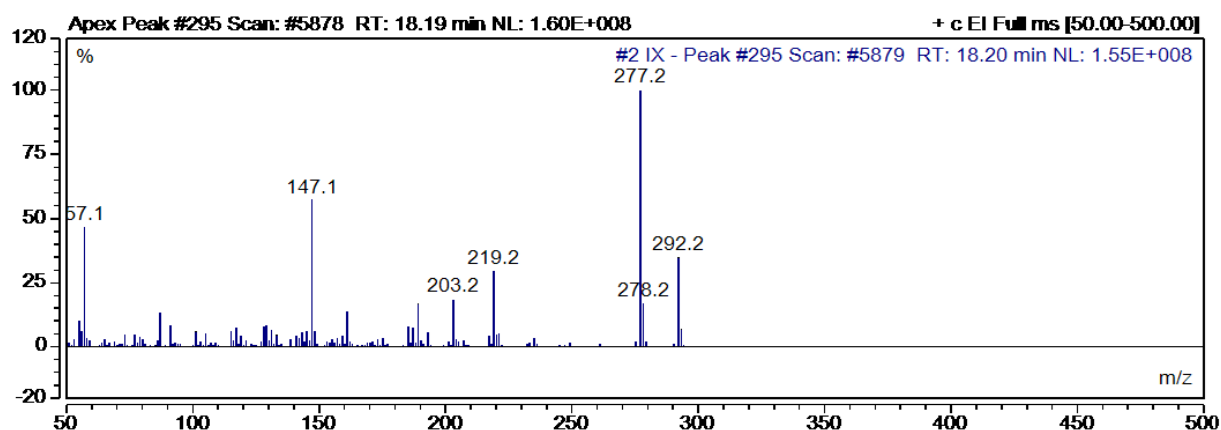


Figura 7.13-Espectro de massa do 3-(3,5-di-terc-butil-4-hidroxifenil) propionato de metilo (IX)

Na análise por GC-MS em modo *Full Scan* do composto 7,9-di-terc-butil-1-oxaspiro (4,5) deca-6,9-dieno-2,8-diona (VIII), obteve-se um cromatograma com a presença de 3 picos cromatográficos com tempos de retenção de 16,41; 16,47 e 18,14 min (figura 7.14).

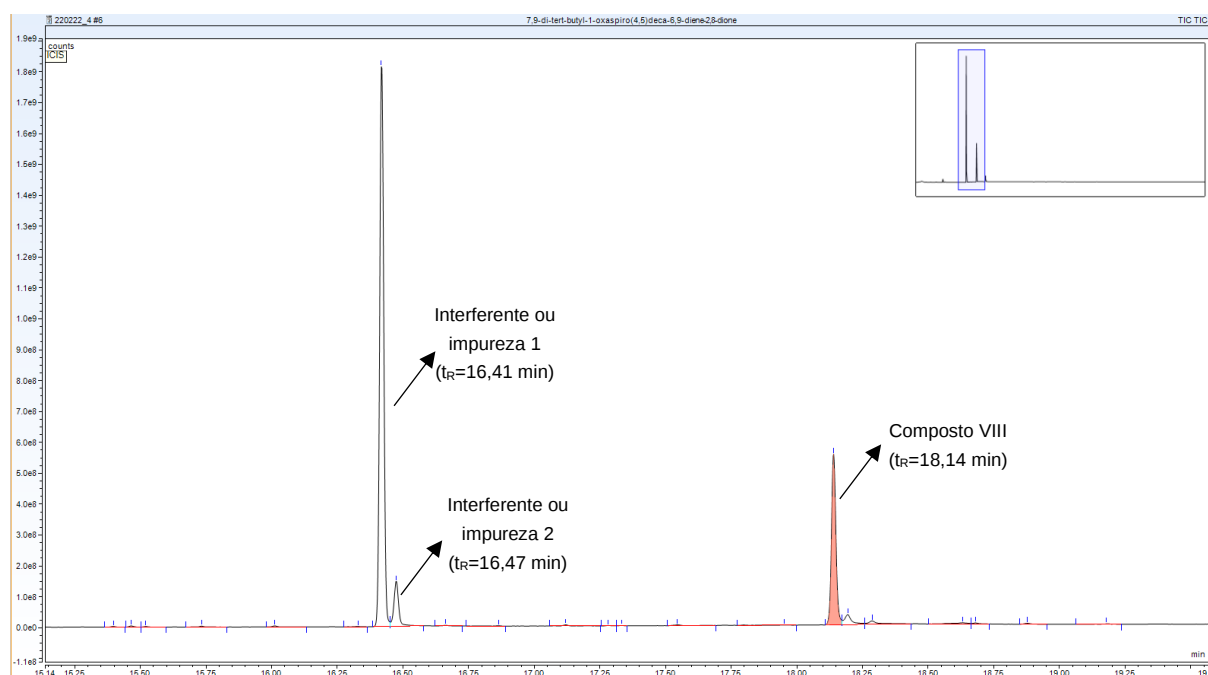


Figura 7.14-Segmento do cromatograma obtido na análise do 7,9-di-terc-butil-1-oxaspiro (4,5) deca-6,9-dieno-2,8-diona (VIII) em modo *Full scan*

O espectro de massa obtido indicou que o composto VIII tinha um tempo de retenção de 18,14 min (figura 7.15). A comparação do espectro de massas com a biblioteca de espectros permitiu a identificação do composto VIII com um *match* de 94%.

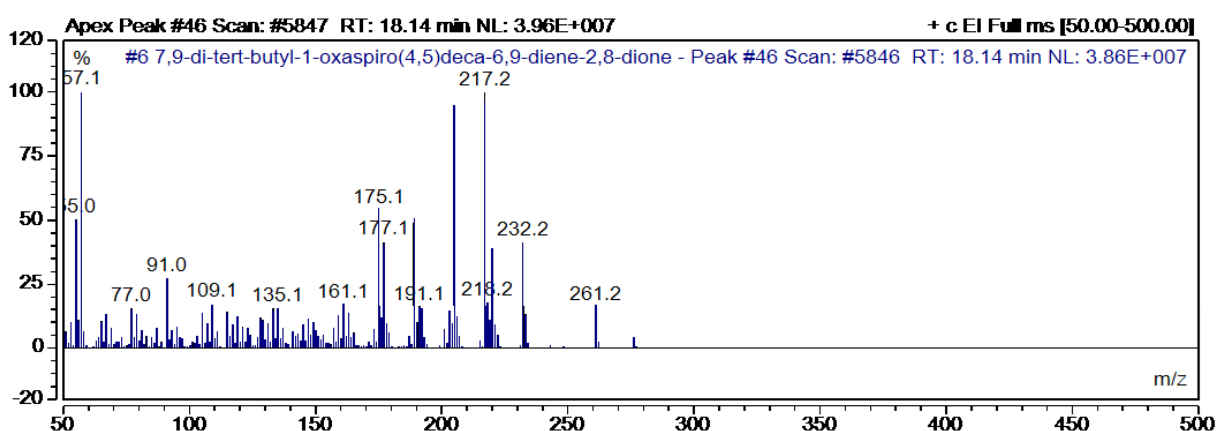


Figura 7.15-Espectro de massa do 7,9-di-terc-butil-1-oxaspiro (4,5) deca-6,9-dieno-2,8-diona (VIII) ao $t_R=18,14$ min

O espectro de massas do pico cromatográfico ao tempo de retenção 16,41 min correspondia a uma possível impureza do composto ou a uma interferência. A tentativa de identificação desta impureza, não foi possível através da comparação do seu espectro de massas com a biblioteca de espectros, dada a baixa probabilidade dos compostos sugeridos, assim como, a indicação de estruturas químicas completamente diferentes do composto em estudo. No entanto, esta impureza tinha como fragmentos iônicos de maior intensidade os iões m/z 217,218 e 232 (figura 7.16) idênticos aos iões selecionados para o 2,6-di-terc-butil-4-vinilfenol (V), ao mesmo tempo de retenção.

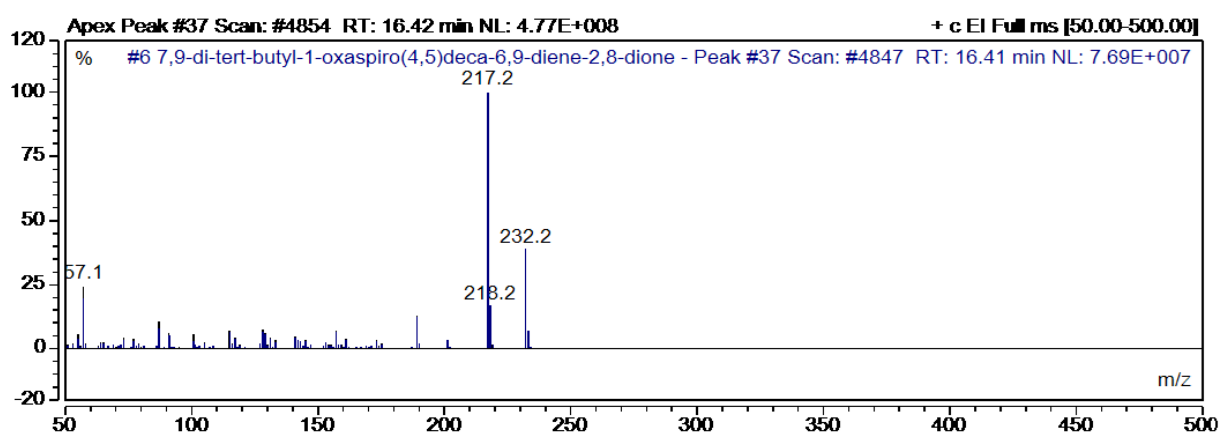


Figura 7.16-Espectro de massa do pico cromatográfico da impureza 1 ao $t_R=16,41$ min

Por este motivo, a análise do 7,9-di-terc-butil-1-oxaspiro (4,5) deca-6,9-dieno-2,8-diona (VIII) iria sempre interferir com a análise do 2,6-di-terc-butil-4-vinilfenol (V). Assim, não foi possível efetuar a validação do método de ensaio para este composto, tendo este sido excluído da lista de compostos a estudar.

Já na análise por GC-MS em modo *Full-scan* do ácido 3-(3,5-di-terc-butil-4- hidroxifenil) propiônico (X), obteve-se um cromatograma com a presença de vários picos cromatográficos, como se pode observar pela figura 7.17, sendo que a maioria diz respeito a produtos de degradação da coluna e outras impurezas do solvente. Por outro lado, existem 4 picos cromatográficos com tempos de retenção de 16,42; 18,19; 18,45 e 19,67 min em que foram identificadas outras impurezas.

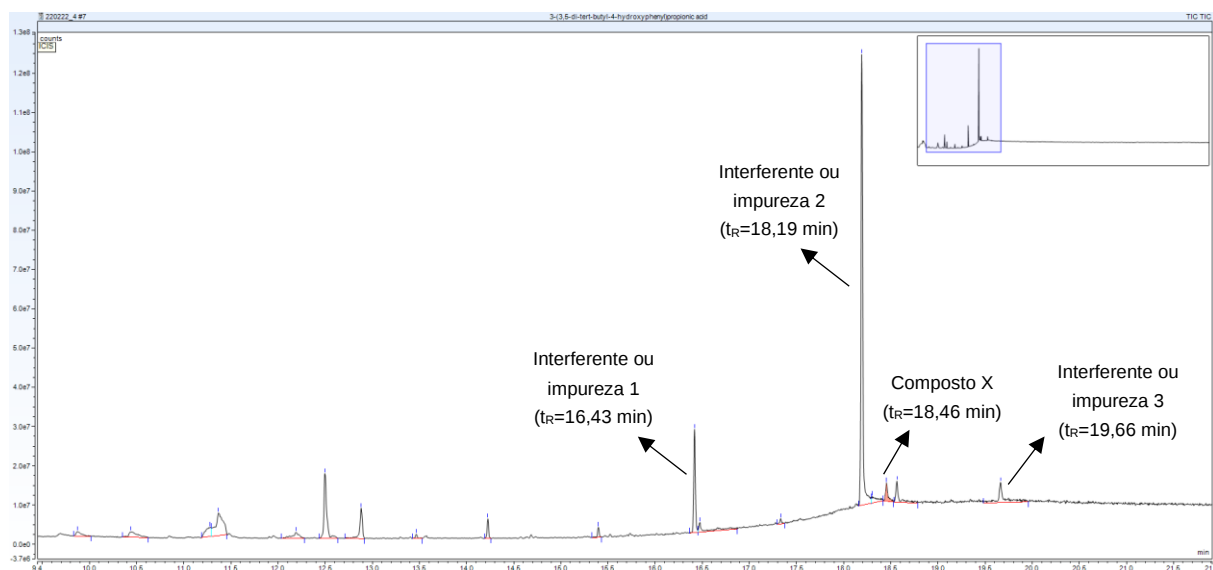


Figura 7.17-Segmento do cromatograma obtido do composto Ácido 3-(3,5-di-terc-butil-4- hidroxifenil) propiónico (X) em modo *Full scan*

O espectro de massa obtido indicou que o ácido 3-(3,5-di-terc-butil-4-hidroxifenil) propiónico (X) tinha um tempo de retenção de 18,46 min (figura 7.18). A comparação do espectro de massas com a biblioteca de espectros permitiu a identificação do composto X com um *match* de 65%. No entanto, o sinal obtido para este pico foi muito inferior ao sinal obtido para os picos com tempo de retenção igual a 16,41 min e 18,19 min.

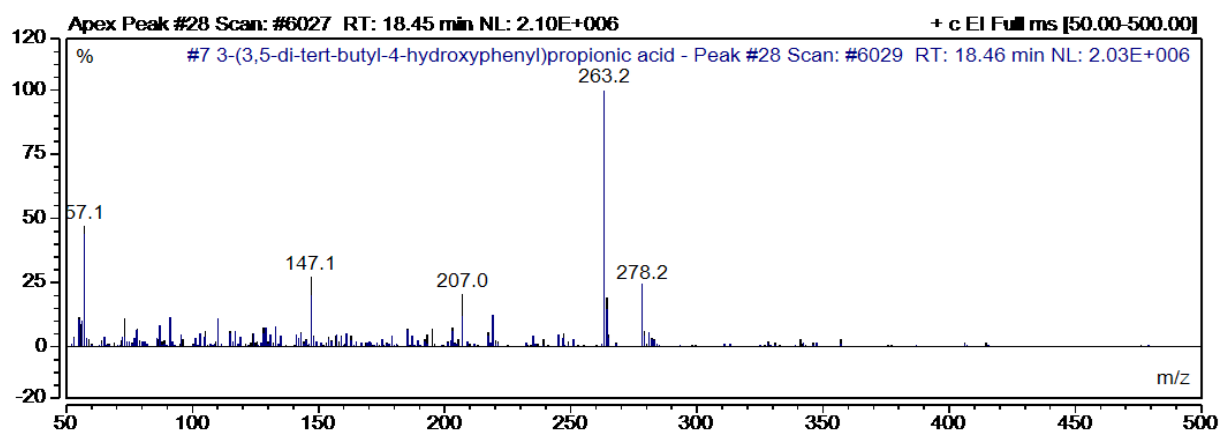


Figura 7.18-Espectro de massa do ácido 3-(3,5-di-terc-butil-4- hidroxifenil) propiónico (X) ao $t_R=18,46$ min

O espectro de massas do pico cromatográfico ao tempo de retenção 16,43 min tinha como fragmentos iônicos de maior intensidade os íons m/z 217,218 e 232, mais uma vez idênticos aos íons selecionados para o 2,6-di-*tert*-butil-4-vinilfenol (V) (figura 7.19). Para além disso, o espectro de massas do pico cromatográfico ao tempo de retenção 18,19 min, tinha como fragmentos iônicos os íons 277,278 e 292 idênticos aos íons selecionados para o 3-(3,5-di-*tert*-butil-4-hidroxifenil) propionato de metilo (IX), como se pode observar pela figura 7.20.

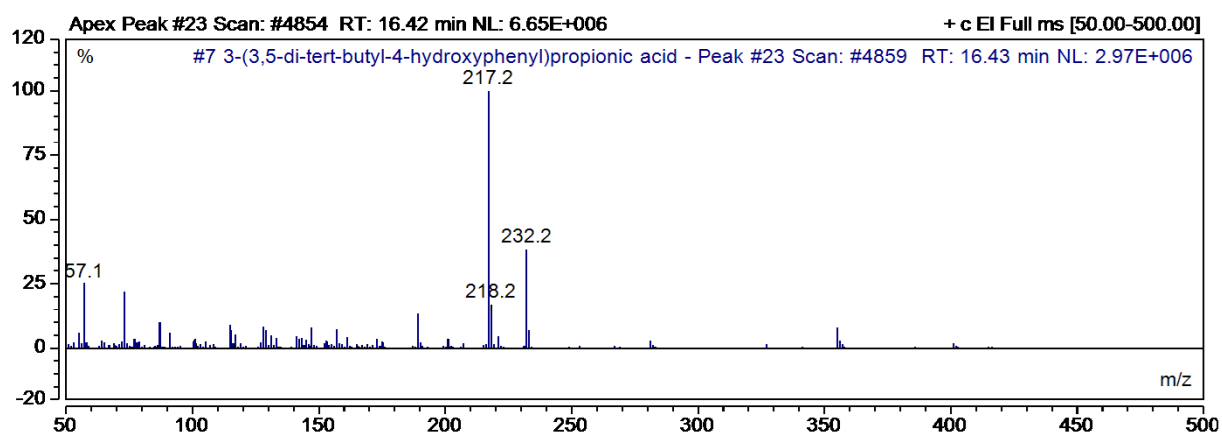


Figura 7.19- Espectro de massa do pico cromatográfico da impureza 1 ao t_R =16,43 min

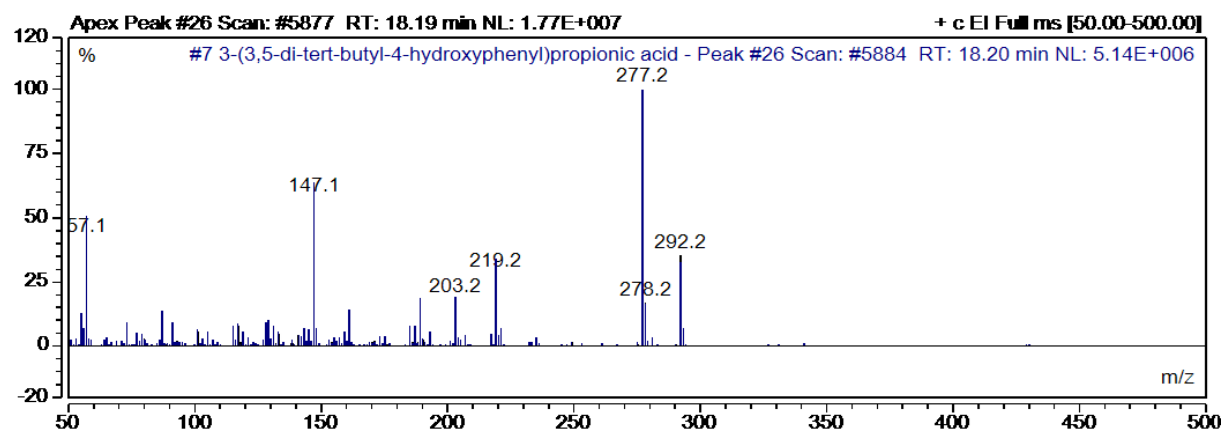


Figura 7.20-Espectro de massa do pico cromatográfico da impureza 2 ao t_R =18,19 min

A análise do ácido 3-(3,5-di-*tert*-butil-4- hidroxifenil) propiónico (X) iria sempre interferir com a análise do 2,6-di-*tert*-butil-4-vinilfenol (V) e do 3-(3,5-di-*tert*-butil-4-hidroxifenil) propionato de metilo (IX). Assim, também não foi possível efetuar a validação do método de ensaio para este composto, tendo este sido excluído da lista de compostos a estudar.

7.2 Validação do Método de Ensaio - SPE-GC/MS

Tendo em conta o estudo de *Rodil et al.* (2010) [40] que suporta o uso de SPE, apresentando uma gama de trabalho entre 2 e 2000 µg/L e um LOQ de 2,1 e 2,9 para o composto III e VI, respetivamente, decidiu-se inicialmente implementar esta técnica de preparação de amostra.

Optou-se por uma gama de trabalho semelhante para todos os compostos de interesse, visto que o método analítico fica mais simples e é menos suscetível a erros e uma vez que a sensibilidade cromatográfica dos compostos assim o permite. O intervalo da gama de trabalho foi escolhido tendo em conta o fator de concentração e o valor limite mais baixo para os compostos em estudo (0,1 µg/L) correspondente à concentração máxima tolerável em água de consumo humano, segundo o documento “4MSI Draft Common Approach on Organic Materials – Part C”. Os testes de linearidade, assim como o estudo da precisão e dos limiares analíticos são apresentados no anexo J.

7.2.1 Efeito de matriz

A aplicação de um método de preparação de amostras líquidas, neste caso o SPE, torna necessário o estudo do efeito de matriz. Para tal usaram-se várias matrizes incluindo 2 amostras de água ultrapura, 4 de consumo humano e 2 amostras de água superficial que foram submetidas ao processo de SPE descrito no subcapítulo 6.8.1, até à obtenção do respetivo extrato orgânico. De seguida efetuou-se o estudo do efeito de matriz de acordo com o descrito no subcapítulo 6.7.4. Os resultados obtidos estão apresentados na figura 7.21.

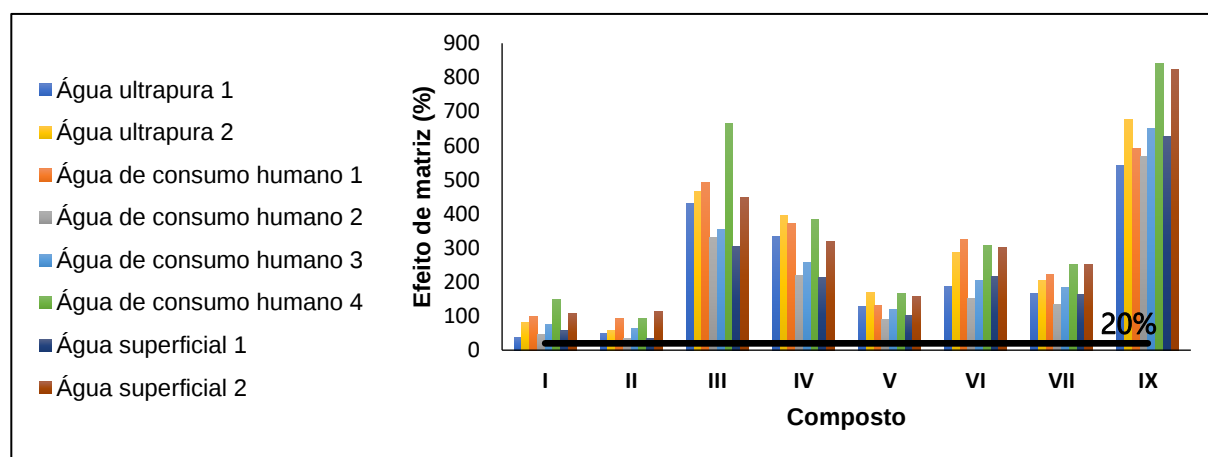


Figura 7.21-Efeito de matriz em diferentes matrizes por SPE

Neste cenário concluiu-se que existia um efeito de matriz que amplificava o sinal cromatográfico do equipamento. Foram obtidas diferenças percentuais do valor médio muito superiores a 20% o que significa que ocorre efeito de matriz. Os compostos I e II são os que apresentam menor efeito de matriz, o que significa que a intensidade do sinal não está tão comprometida como para os outros compostos.

No entanto, é importante compreender que as percentagens são irregularmente elevadas, questionando-se assim a veracidade dos resultados.

Dada a existência do efeito de matriz, não é possível efetuar uma calibração dos compostos em estudo em soluções preparadas em solvente, de modo a quantificar os compostos numa matriz de água sujeita ao processo de preparação por SPE.

Deste modo, uma das soluções para eliminar o efeito de matriz é efetuar uma calibração em matriz ajustada. Nesta situação, as soluções padrão de calibração são preparadas no extrato orgânico da matriz da amostra que foi submetida ao processo de SPE.

Averiguou-se se seria possível implementar a calibração em matriz ajustada usando uma matriz representativa de várias amostras do mesmo tipo. Neste caso, os padrões de trabalho utilizados na preparação da reta de calibração foram realizados em extratos de água da torneira em vez de diclorometano. Adicionou-se previamente 300 mg de tiosulfato de sódio a 1 L de água da torneira para remoção do cloro da água. De seguida analisou-se os extratos de 4 amostras diferentes de água de consumo humano e comparou-se com a reta de calibração ajustada preparada em água da torneira para ver se existia alguma concordância.

Como se pode observar pela figura 7.22, ocorreu uma descida geral do valor percentual do efeito de matriz para perto de metade. Apesar da matriz da água da torneira se assemelhar à matriz das amostras, o efeito de matriz sentido continua a ser considerável concluindo assim a inviabilidade desta alternativa.

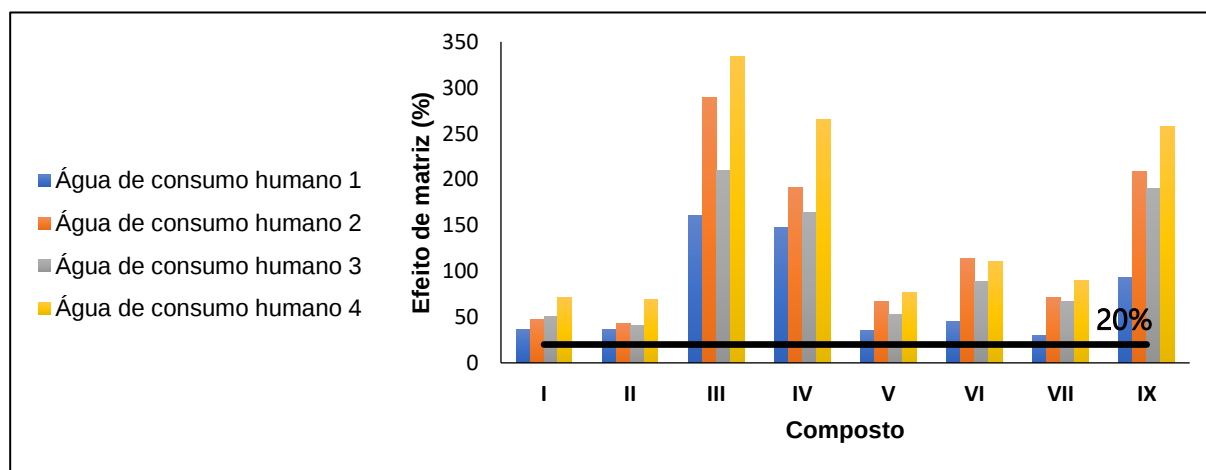


Figura 7.22- Efeito de matriz em águas de consumo humano por SPE em matriz ajustada

Desta forma, os resultados obtidos indicam que deve ser efetuada a preparação de uma reta de calibração individual em matriz ajustada por amostra, não sendo possível usar uma matriz representativa de diversas amostras, pelo menos para as águas de consumo humano.

7.2.2 Ensaios de recuperação

Após a confirmação da gama de trabalho escolhida e do estudo do efeito de matriz, procedeu-se à análise da exatidão através de ensaios de recuperação. Os ensaios de recuperação permitem saber a quantidade de determinado composto, recuperado pelo processo de preparação da amostra, em relação à quantidade real. Além disso, possibilitam a deteção de possíveis interferentes que possam estar presentes nas diferentes matrizes analisadas, avaliando assim o potencial efeito de matriz.

Foram analisadas 8 amostras de água de consumo humano da rede de distribuição da EPAL. Utilizou-se as soluções de fortificação descritas no capítulo 6.4.4, para fortificar as diferentes amostras. Após o processo extrativo, foi efetuada a análise dos compostos em estudo por GC-MS em modo *SIM*.

Tal como descrito no capítulo 5.3.1.3, procedeu-se ao cálculo da percentagem de recuperação dos compostos de interesse, usando a calibração em matriz ajustada. Os resultados estão apresentados na tabela 7.1.

Tabela 7.1-Recuperações médias de diferentes tipos de amostras de águas de consumo humano, usando a calibração em matriz ajustada

Compostos	Recuperação média (%)	RSD (%) n=18
4-etilfenol (I)	76,1	8,4
4-terc-butilfenol (II)	77,6	7,5
2,6-di-terc-butil-p-benzoquinona (III)	52,7	74,7
2,4-di-terc-butilfenol (IV)	86,5	39,6
2,6-di-terc-butil-4-vinilfenol (V)	44,2	23,2
3,5-di-terc-butil-4-hidroxibenzaldeído (VI)	78,0	15,2
3,5-di-terc-butil-4-hidroxiacetofenona (VII)	70,0	11,8
3-(3,5-di-terc-butil-4-hidroxifenil) propionato de metilo (IX)	53,7	53,1

Verificou-se que a recuperação média obtida apresentou valores inferiores a 60% para os analitos III, V e IX. Para além disso, o desvio padrão relativo obtido para os compostos III, IV e IX foi superior a 25%, o que reflete uma má precisão dos ensaios de recuperação em condições de precisão intermédia. Em alguns compostos, também se comprovou uma baixa repetibilidade dos ensaios de recuperação da mesma amostra, como se pode observar pela tabela 7.2, onde os desvios padrão relativos da recuperação média do 2,6-di-terc-butil-p-benzoquinona (III) e do 2,4-di-terc-butilfenol (IV) são superiores a 30%.

Tabela 7.2-Recuperações médias de uma amostra de água de consumo humano

Compostos	Recuperação média (%)	RSD (%) n=4
4-etilfenol (I)	70,7	5,2
4-terc-butilfenol (II)	81,0	6,9
2,6-di-terc-butil-p-benzoquinona (III)	55,8	49,4
2,4-di-terc-butilfenol (IV)	122,6	33,1
2,6-di-terc-butil-4-vinilfenol (V)	58,0	8,8
3,5-di-terc-butil-4-hidroxibenzaldeído (VI)	83,0	8,7
3,5-di-terc-butil-4-hidroxiacetofenona (VII)	80,6	8,2
3-(3,5-di-terc-butil-4-hidroxifenil) propionato de metilo (IX)	81,8	23,0

7.2.3 *Troubleshooting* – Contaminação do branco

Dada a variabilidade dos resultados obtidos em matriz ajustada, questionou-se a possibilidade da ocorrência de interferentes nas amostras analisadas. Assim decidiu-se avaliar apenas o extrato de uma das amostras sem fortificação tendo sido encontradas provas de uma possível contaminação. Foi possível identificar os picos cromatográficos dos compostos em estudo, pelos tempos de retenção e pelas intensidades relativas entre o sinal de cada um dos íões de qualificação e o íão de quantificação.

A contaminação pode ser proveniente da amostra ou do processo de extração. Caso, o extrato do ensaio em branco também possua os compostos em estudo, o mais provável é que a contaminação provenha do processo de extração, visto que a probabilidade de o branco já ter os compostos em estudo é reduzida. A água ultrapura foi escolhida como ensaio em branco do sistema.

Os resultados obtidos do extrato do branco em SPE em 6 ensaios independentes estão representados na figura 7.23. Para não ser considerada uma contaminação, o sinal obtido dos compostos em estudo no ensaio em branco não deve ser superior a um terço do sinal do primeiro ponto da gama de trabalho (P1). Por outras palavras, o sinal obtido no branco dos compostos em estudo não deve ser superior ao limite de deteção.

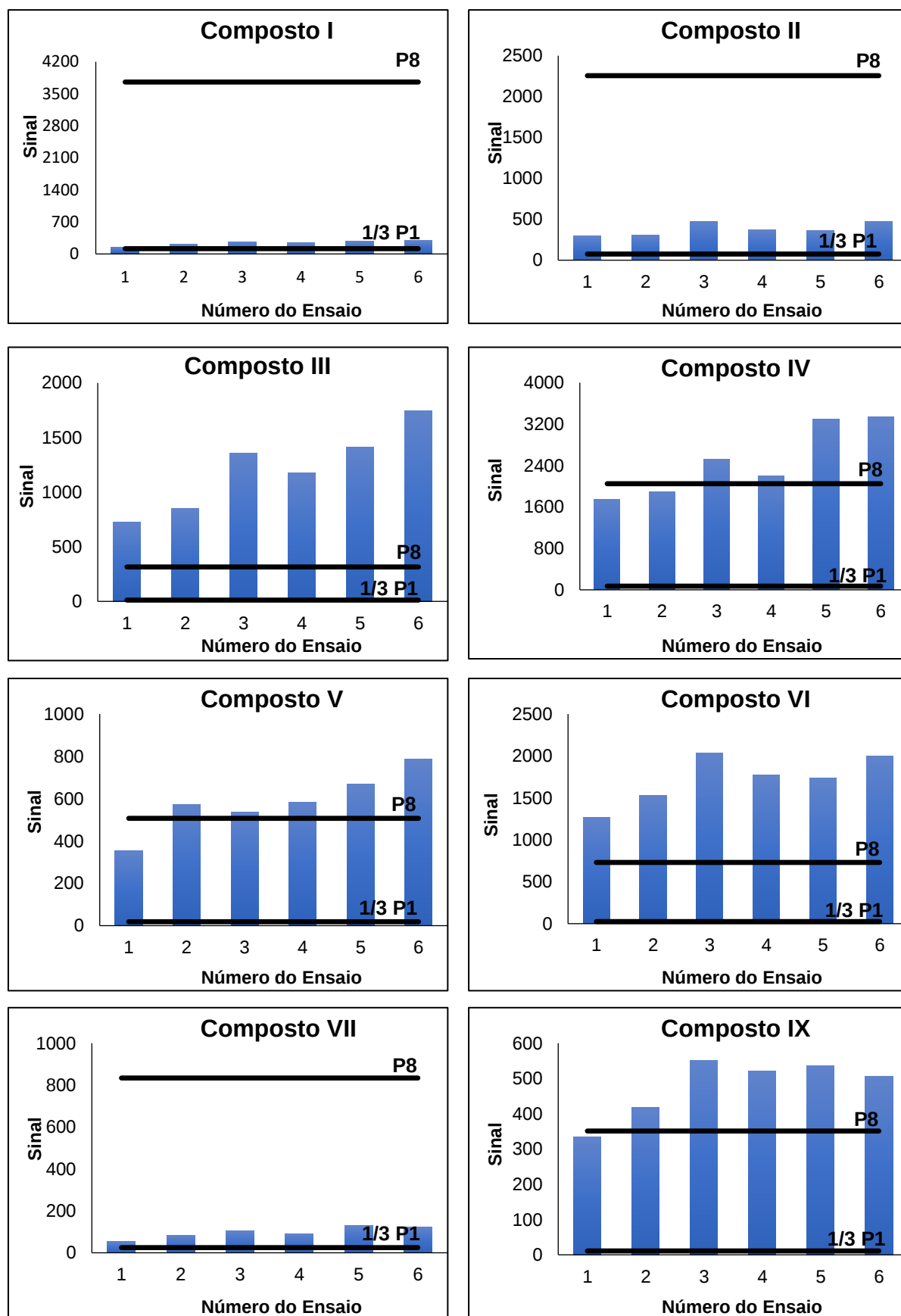


Figura 7.23-Intensidade do sinal cromatográfico dos compostos em estudo no extrato do ensaio em branco

Para além de não ser cumprido o requisito especificado anteriormente, é de realçar que muitos dos valores obtidos estão acima do limite máximo da gama de trabalho (P8). Além disso, os ensaios não apresentam coerência entre si, apresentando uma variabilidade elevada de ensaio para ensaio.

Tentou-se perceber a causa ou as causas deste problema estando algumas possibilidades no diagrama de espinha de peixe representado na figura 7.24.

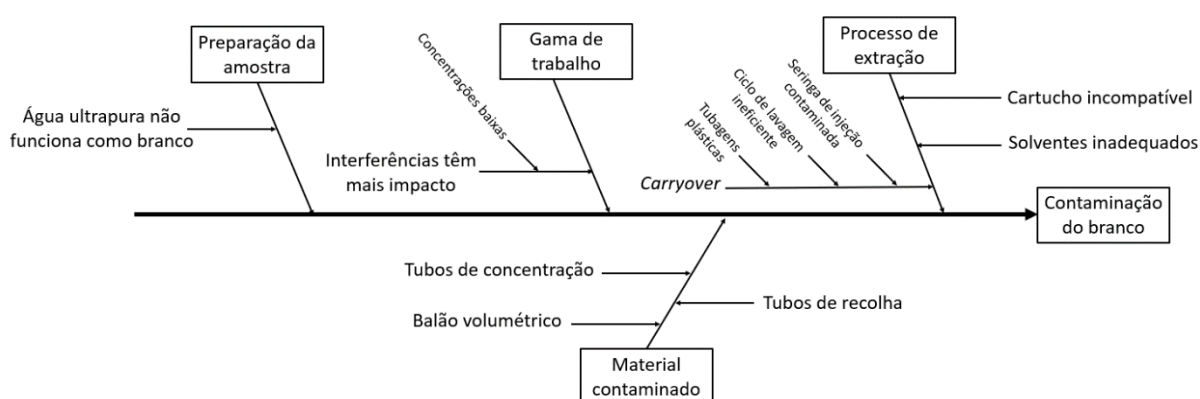


Figura 7.24-Diagrama causa-efeito referente à contaminação do branco

Sabe-se que o problema não seria do GC/MS porque ao realizar injeções de solvente não é detetado nenhum dos compostos. Logo o problema seria causado pelo processo de preparação da amostra: material volumétrico ou sistema de SPE (cartuchos).

❖ Material volumétrico contaminado

Primeiro foi avaliado se os interferentes eram provenientes do material volumétrico usado no processo de preparação da amostra. Para tal, usaram-se tubos de recolha de SPE novos e o balão volumétrico e os tubos de concentração do *Turbovap* foram lavados várias vezes com diclorometano. Procedeu-se de novo à execução do ensaio em branco e verificou-se que os contaminantes continuavam a surgir pelo que será expectável que a fonte de contaminação seja o sistema de SPE.

❖ Extração em fase sólida com recurso ao manifold

Dada a existência no laboratório de um equipamento semiautomático (*manifold*), que não possui as tubagens de transferência da amostra e dos solventes do sistema automático (*Dionex, AutoTrace 280*), foi efetuado um ensaio em branco nas mesmas condições neste equipamento. Os resultados obtidos foram também insatisfatórios, dado que o sinal nos ensaios em branco registou valores superiores ao limite de deteção (tabela 7.3). No entanto, é difícil excluir por completo o plástico, visto que o *manifold* também possui alguns materiais dessa natureza: a tampa do *manifold* que assegura a posição dos cartuchos é feita de polipropileno.

Desta forma, o uso do manifold (SPE) no processo de preparação da amostra não é aconselhável.

❖ Estudo aos solventes usados no SPE

No método utilizado em SPE utilizam-se 2 solventes no passo de condicionamento do cartucho: diclorometano e metanol. No passo de eluição, o solvente utilizado é o diclorometano. Em contacto com os cartuchos de SPE, estes solventes podem eluir compostos indesejados deixando impurezas no extrato que podem dificultar a quantificação dos compostos.

Posto isto, a etapa de condicionamento foi recriada no *manifold* e os solventes envolvidos foram recolhidos. Procedeu-se à evaporação destes solventes num *Turbovap* e a posterior análise por GC/MS. Os sinais cromatográficos obtidos foram os mais altos até à altura, suspeitando-se assim que a fonte dos interferentes possa ser do cartucho de SPE utilizado.

Tabela 7.3-Sinais cromatográficos obtidos nos solventes de lavagem e no ensaio em branco (água ultrapura) obtido por *manifold*

Compostos	Sinal cromatográfico			
	Metanol	Diclorometano	Ensaio em branco no <i>manifold</i>	LOD
4-etilfenol (I)	18 160	45 722	245	116
4-terc-butilfenol (II)	20	748	375	75
2,6-di-terc-butil-p-benzoquinona (III)	2 533	15 584	447	12
2,4-di-terc-butilfenol (IV)	7 181	24 961	771	71
2,6-di-terc-butil-4-vinilfenol (V)	1 115	2 644	246	18
3,5-di-terc-butil-4-hidroxibenzaldeído (VI)	284	2 496	265	25
3,5-di-terc-butil-4-hidroxiacetofenona (VII)	79	599	25	25
3-(3,5-di-terc-butil-4-hidroxifenil) propionato de metilo (IX)	360	2 243	271	11

Sabe-se que o cartucho de SPE é feito de polipropileno o que pode estar a resultar na contaminação dos extratos. O aditivo *Irganox 1010* é comumente utilizado em poliolefinas, mais particularmente no polipropileno, visto que as suas propriedades antioxidantes desaceleram a degradação do polímero.[121][122] É sabido pelo capítulo 1.6, que os compostos III, V, VI e IX são produtos de degradação deste aditivo. Para além disso na figura 1.4, é possível concluir pela literatura que pelo menos o composto IV e VI foram encontrados em ensaios de migração ao polipropileno.

Posto isto, apesar de *Rodil et al* (2010) [40] utilizarem este cartucho para a extração da amostra, identificando o composto III e VI, não é possível determinar se o material do invólucro do cartucho OASIS HLB utilizado seria de polipropileno ou vidro. Para além disso, este artigo fazia uso de derivatização.

❖ Pesquisa de interferentes do cartucho usado em SPE

O cartucho tem três componentes principais: a fase estacionária, os mini-discos e o invólucro. De modo a averiguar quais os compostos contidos no cartucho, introduziu-se separadamente os diferentes componentes em *goblets* com 100 mL de diclorometano. Caso exista migração de compostos para o solvente, confirma-se a inadequabilidade do cartucho. De seguida estas amostras foram concentradas até se obter um volume de 0,5 mL. As concentrações obtidas para cada um dos compostos foram estimadas com base nas respetivas retas de calibração de cada composto (tabela 7.4).

Tabela 7.4-Concentração estimada dos compostos presentes no solvente em contacto com o cartucho

Composto	Concentração (µg/L)		
	Fase estacionária	Mini-discos	Invólucro
4-etilfenol (I)	-	-	-
4-terc-butilfenol (II)	-	-	-
2,6-di-terc-butil-p-benzoquinona (III)	-	-	-
2,4-di-terc-butilfenol (IV)	53,64 *	69,43 *	566,49
3,5-di-terc-butil-4-hidroxibenzaldeído (VI)	-	79,72 *	189,95
3,5-di-terc-butil-4-hidroxiacetofenona (VII)	-	-	135,66
3-(3,5-di-terc-butil-4-hidroxifenil) propionato de metilo (IX)	-	-	953,56

*Estas concentrações encontram-se abaixo do primeiro padrão da gama de trabalho sendo extrapoladas na equação da reta

Pela tabela 7.4, confirma-se que os compostos IV, VI, VII e IX foram detetados em diferentes componentes do cartucho. Provou-se ainda que a principal fonte de contaminação é efetivamente o invólucro que registou concentrações significativas dos compostos de interesse.

Finalmente, foi possível concluir que não seria possível avançar com a técnica de preparação de amostra em SPE dado todos os fatores listados anteriormente. Desta forma, considerou-se face aos resultados obtidos, que os estudos seguintes seriam efetuados utilizando como método de preparação da amostra a Extração Líquido-Líquido (LLE), dado minimizar a presença de material plástico.

7.3 Validação do Método de Ensaio - LLE-GC/MS

Após a conclusão de que o método em extração em fase sólida com o cartucho de SPE de plástico, é incompatível com os compostos em estudo, optou-se pela extração Líquido-Líquido como método de preparação da amostra. Esta técnica reduz o contacto das amostras com componentes plásticos que a possam contaminar, dado que o material utilizado é maioritariamente em vidro.

Os estudos iniciais efetuados com a LLE incidiram nos ensaios em branco efetuados com água ultrapura. Estes ensaios em branco por LLE foram realizados nas mesmas condições que os ensaios em branco por SPE (mesmo solvente (diclorometano) e mesmo fator de concentração). Os sinais cromatográficos médios dos 6 ensaios em branco por SPE foram comparados com os sinais cromatográficos dos ensaios em branco por LLE. Os resultados podem ser examinados na figura 7.25.

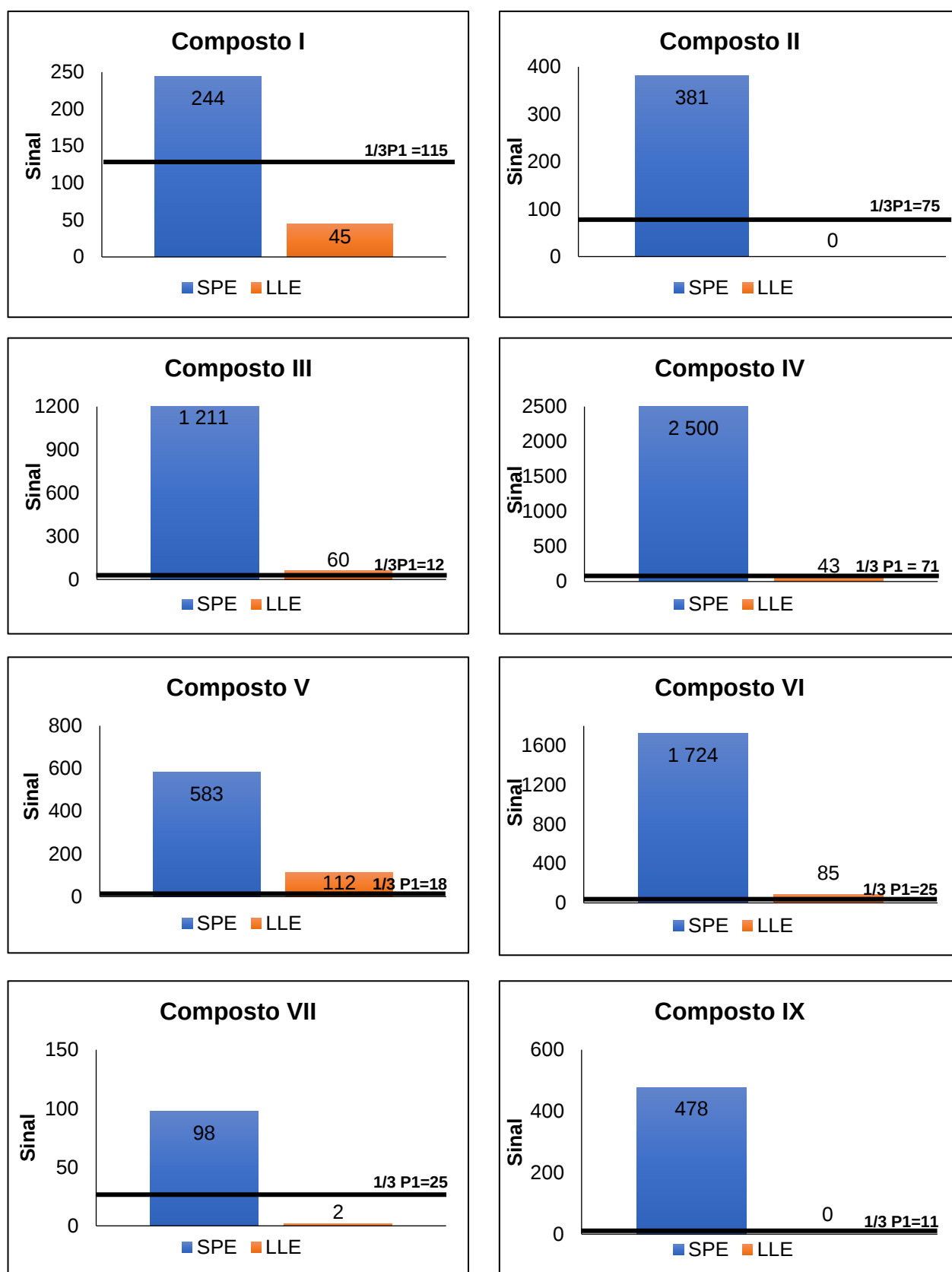


Figura 7.25- Diferença entre a intensidade do sinal cromatográfico obtido nos extratos dos brancos em SPE e LLE

Observa-se que existe uma grande diferença no sinal obtido entre o ensaio em branco de LLE e o obtido de SPE. Para os compostos I, II, IV, VII e IX, o ensaio em branco de LLE representa menos de um terço do primeiro ponto da gama de trabalho, podendo assim ser considerada uma quantidade vestigial aceitável cumprindo o critério de aceitação de um ensaio em branco (sinal < LOD).

Apesar da técnica LLE apresentar reduções significativas na contaminação, ainda existiam interferências nos ensaios em branco dos compostos III, V e VI.

Como não existe nenhum valor paramétrico para os compostos em estudo assumiu-se inicialmente uma gama de trabalho que incluísse a concentração de 0,1 µg/L (valor limite dos compostos I e V tal como indicado no documento *"4MSI Draft Common Approach on Organic Materials – Part C"*). As gamas de trabalho inicialmente estudadas (Anexo J) eram para valores de concentração muito baixos. Apesar dos estudos de linearidade permitirem a aplicação destas gamas de trabalho, os ensaios em branco efetuados por LLE não cumpriram o critério de aceitação exigível (sinal < LOD) para os compostos III, V e VI.

Dado que os valores limite dos compostos II, III, VI, VII e IX, indicados no documento *"4MSI Draft Common Approach on Organic Materials – Part C"*, são mais elevados, optou-se então por gamas de trabalho a concentrações mais altas. As novas gamas de trabalho estudadas não foram suficientes para corrigir o peso das interferências com a preparação da amostra em SPE, mas ao utilizar a LLE as interferências encontradas no branco foram tidas como irrisórias para todos os compostos, tendo sido finalmente obtido um ensaio em branco com sinal inferior ao LOD para os compostos em estudo.

No entanto, para o composto V, não foi possível encontrar uma gama de trabalho que não resultasse na contaminação do branco. Posto isto, a validação do método para o mesmo não pode ser feita em conjunto com os restantes compostos tendo de ser aplicada outro tipo de metodologia.

7.3.1 Estudo de linearidade dos compostos

Tendo em conta as novas gamas de trabalho, numa fase inicial foi estudada a linearidade instrumental dos compostos de interesse, por GC/MS. Para tal, foram analisadas 8 soluções padrão de trabalho com diferentes concentrações tal como descrito no capítulo 6.5.3. De seguida, com os resultados obtidos efetuou-se a representação gráfica que relaciona o sinal obtido (variável y) e a concentração de cada um dos compostos (variável x). Tendo em conta o método dos mínimos quadrados (Anexo B) obtiveram-se as retas de calibração das figuras 7.26 a 7.32:

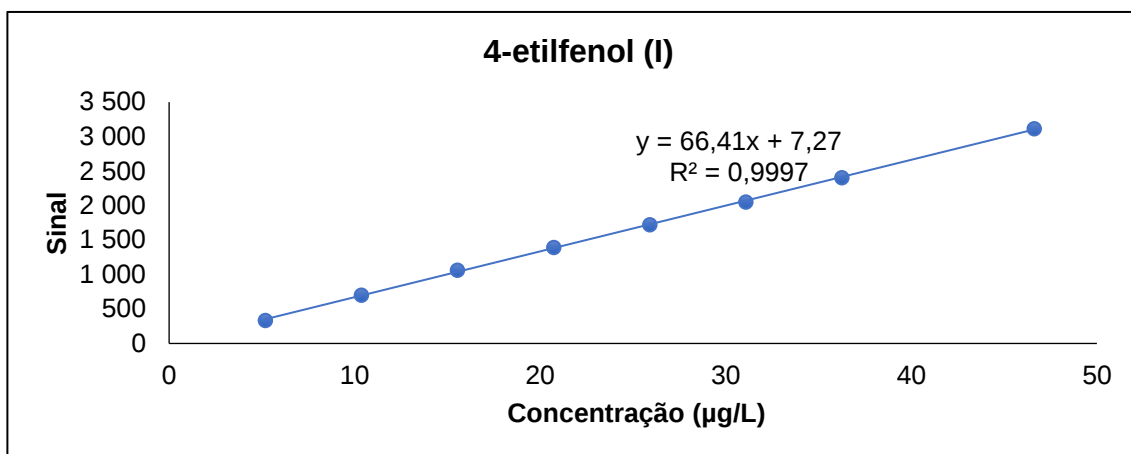


Figura 7.26-Representação gráfica da reta de calibração do 4-etilfenol (I)

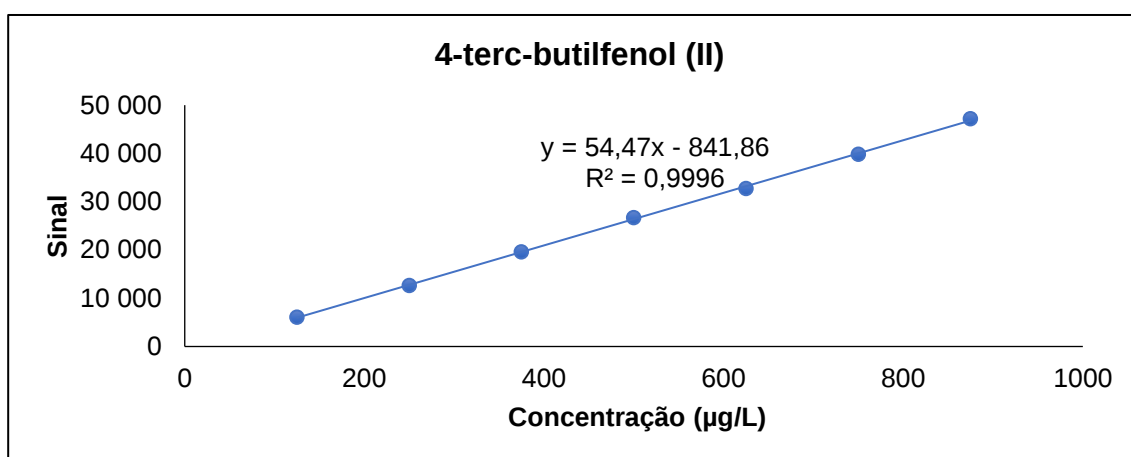


Figura 7.27-Representação gráfica da reta de calibração do 4-terc-butilfenol (II)

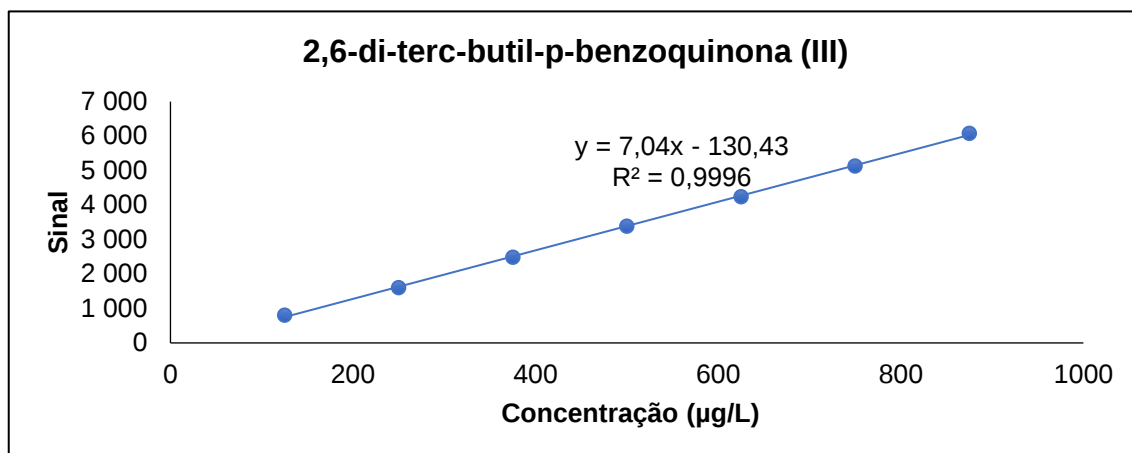


Figura 7.28-Representação gráfica da reta de calibração do 2,6-di-terc-butil-p-benzoquinona (III)

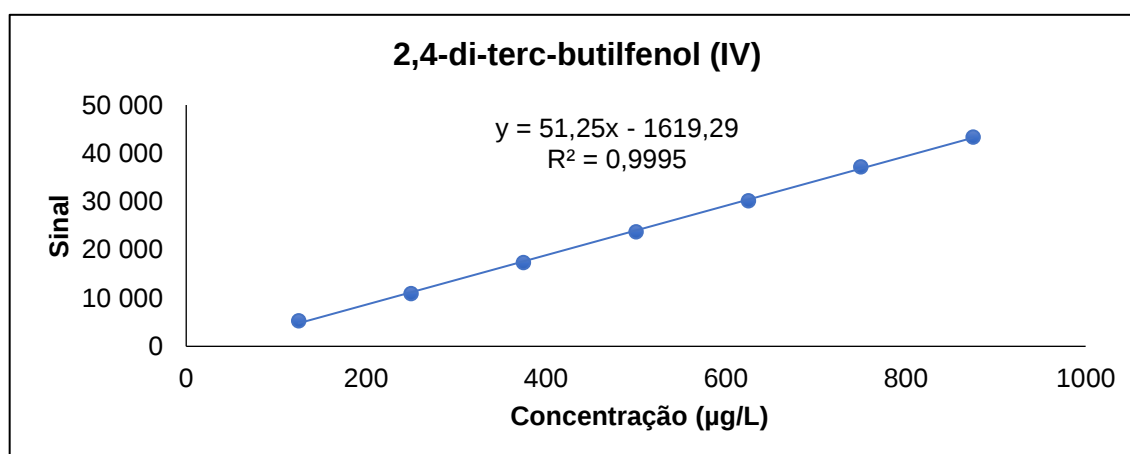


Figura 7.29-Representação gráfica da reta de calibração do 2,4-di-terc-butilfenol (IV)

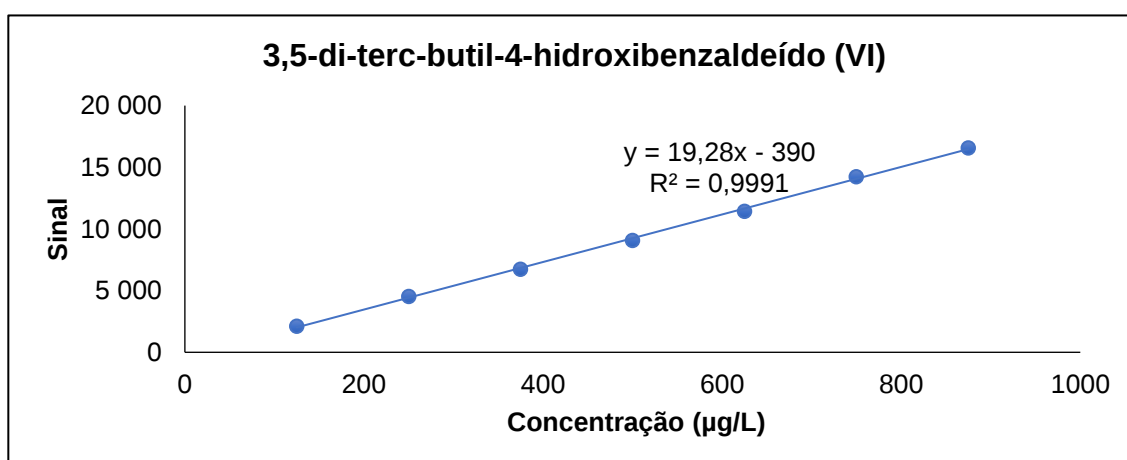


Figura 7.30- Representação gráfica da reta de calibração do 3,5-di-terc-butil-4-hidroxibenzaldeído (VI)

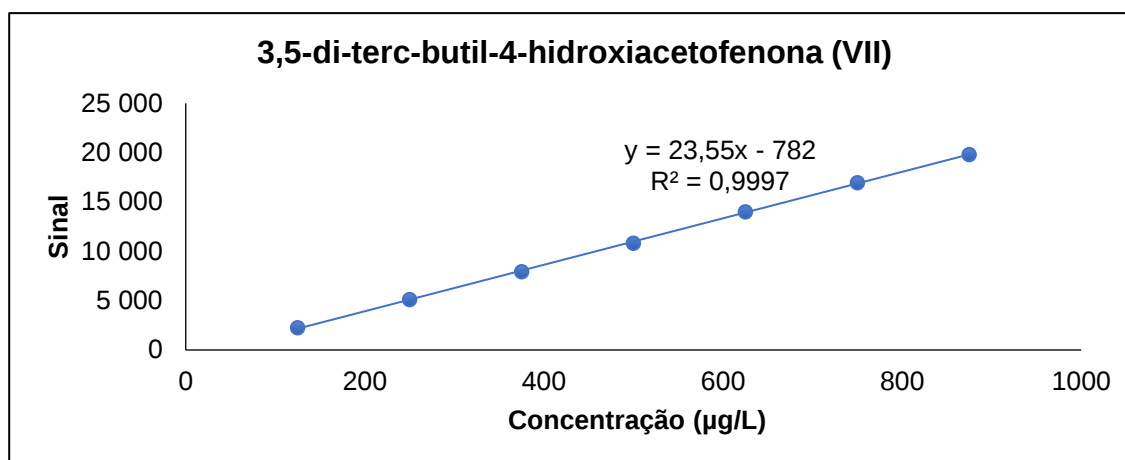


Figura 7.31-Representação gráfica da reta de calibração do 3,5-di-terc-butil-4-hidroxiacetofenona (VII)

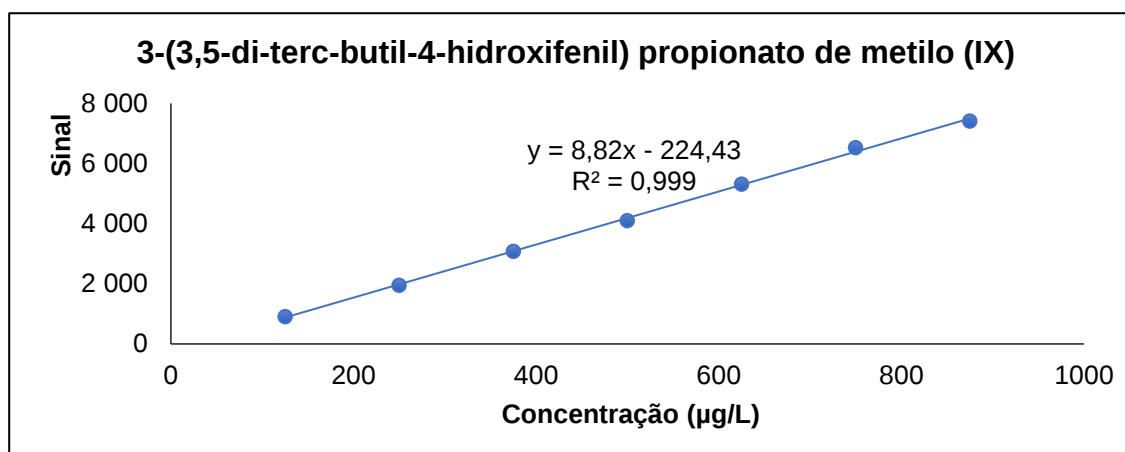


Figura 7.32-Representação gráfica da reta de calibração do 3-(3,5-di-terc-butil-4-hidroxifenil) propionato de metilo (IX)

É possível depreender que existe uma clara zona de linearidade em todos os compostos para as gamas de trabalho escolhidas. Pela tabela 7.5, verifica-se que os coeficientes de correlação, r , são superiores a 0,995 e que o limite de quantificação instrumental, calculado a partir do desvio padrão residual da reta de calibração, é inferior à menor concentração da gama em estudo.

Tabela 7.5-Resumo dos resultados da aplicação do método dos mínimos quadrados para os compostos em estudo

Composto	Gama de linearidade (µg/L)	Coeficiente de correlação	Limite de Quantificação instrumental (µg/L)
4-etilfenol (I)	5,2-46,6	0,9999	2,51
4-terc-butilfenol (II)	125-875	0,9998	56,06
2,6-di-terc-butil-p-benzoquinona (III)	125-875	0,9998	56,76
2,4-di-terc-butilfenol (IV)	125-875	0,9997	69,04
3,5-di-terc-butil-4-hidroxibenzaldeído (VI)	125-875	0,9995	89,00
3,5-di-terc-butil-4-hidroxiacetofenona (VII)	125-875	0,9999	50,17
3-(3,5-di-terc-butil-4-hidroxifenil) propionato de metilo (IX)	125-875	0,9995	94,69

No entanto, sabe-se que um coeficiente de correlação perto de 1 também pode ser obtido quando se trata de uma função não linear. Por esse motivo, a análise de resíduos (Anexo C) e o teste de Mandel (Anexo D) são imprescindíveis para a determinação da existência de linearidade.

O modelo linear está bem ajustado, dado que os valores dos resíduos estão dispersos aleatoriamente em torno de zero, com variância constante (Anexo C). Pelo teste de Mandel, foi possível comprovar que o valor de teste é inferior ao valor crítico e por esse motivo confirma-se a linearidade da calibração como se pode observar pelos resultados obtidos na tabela 7.6. De notar, que o valor crítico foi calculado com base nos graus de liberdade dos ajustes linear e polinomial (Anexo D).

Tabela 7.6- Resumo dos resultados obtidos da aplicação do teste de Mandel para os compostos em estudo

Composto	Valor de Teste	Valor Crítico
4-etilfenol (I)	0,001	6,61
4-terc-butilfenol (II)	0,77	7,71
2,6-di-terc-butil-p-benzoquinona (III)	5,68	7,71
2,4-di-terc-butilfenol (IV)	5,52	7,71
3,5-di-terc-butil-4-hidroxibenzaldeído (VI)	5,25	7,71
3,5-di-terc-butil-4-hidroxiacetofenona (VII)	1,25	7,71
3-(3,5-di-terc-butil-4-hidroxifenil) propionato de metilo (IX)	0,001	7,71

A quantificação pelo fator de resposta pode ser ainda aplicada caso a gama de linearidade cumpra os requisitos do teste de RIKILT (Anexo E) e do teste das áreas normalizadas (Anexo F). A decisão de aceitação destes testes é apresentada na tabela 7.7.

No caso do composto IV, este não cumpre o critério de aceitação do teste das áreas normalizadas, visto que um dos valores normalizados é superior a 115%. Já o composto VII não cumpre ambos os testes. No teste de RIKILT, o valor percentual da razão entre o sinal instrumental e o valor da concentração de um dos pontos de calibração não está compreendido entre 90 e 110%. Já no teste das áreas normalizadas, uma das alturas normalizadas tem um desvio de cerca de 25%, ultrapassando o critério de aceitação (15%). Deste modo, não é possível o uso do fator de resposta num ponto da gama de trabalho para quantificar estes dois compostos em rotina, sendo necessário recorrer a uma reta de calibração. Uma solução para contornar esta situação, seria seleccionar outra zona de linearidade através da alteração da gama de trabalho, de modo a conseguir cumprir os critérios destes dois testes.

Tabela 7.7- Resumo dos resultados obtidos da aplicação do Teste de RIKILT e do Teste das áreas normalizadas para os compostos em estudo

Composto	Teste de RIKILT	Teste das áreas normalizadas
4-etilfenol	☑	☑
4-terc-butilfenol	☑	☑
2,6-di-terc-butil-p-benzoquinona	☑	☑
2,4-di-terc-butilfenol	☑	☒
3,5-di-terc-butil-4-hidroxibenzaldeído	☑	☑
3,5-di-terc-butil-4-hidroxiacetofenona	☒	☒
3-(3,5-di-terc-butil-4-hidroxifenil) propionato de metilo	☑	☑

7.3.2 Confirmação da identidade dos compostos em estudo

De modo a confirmar a identificação dos compostos em estudo, pode ser averiguada a intensidade relativa entre o sinal de cada um dos iões de quantificação e o sinal do ião de qualificação. Esta razão é característica de cada composto e é um dos critérios usados para a confirmação de um composto numa amostra real. Na tabela 7.8, estão representados os rácios em questão, em valor percentual, para cada um dos compostos e os respetivos desvios padrão relativos que foram calculados tendo por base os padrões de calibração.

Tabela 7.8-Intensidade relativa entre o sinal de cada um dos íões de qualificação e o íão de quantificação

Rácio entre o sinal do íão de qualificação e do íão de quantificação				
Composto	Íão de qualificação n.º 1 (%)	RSD (%) n=8	Íão de qualificação n.º 2 (%)	RSD (%) n=8
4-etilfenol (I)	33	1,7	16	0,5
4-terc-butilfenol (II)	22	0,1	41	0,5
2,6-di-terc-butil-p-benzoquinona (III)	48	1,5	28	2,5
2,4-di-terc-butilfenol (IV)	16	0,1	7	0,1
3,5-di-terc-butil-4-hidroxibenzaldeído (VI)	25	0,2	39	0,3
3,5-di-terc-butil-4-hidroxiacetofenona (VII)	22	0,4	24	0,8
3-(3,5-di-terc-butil-4-hidroxifenil) propionato de metilo (IX)	24	1,1	33	0,4

7.3.3 Efeito de matriz

Torna-se novamente necessário o estudo do efeito de matriz desta vez fazendo uso da LLE. Para tal, usaram-se 8 amostras diferentes de água de consumo humano que foram submetidas ao processo de LLE descrito no subcapítulo 6.8.2, até à obtenção do respetivo extrato orgânico. De seguida, efetuou-se o estudo do efeito de matriz de acordo com o descrito no subcapítulo 6.7.4. Os resultados obtidos estão apresentados na figura 7.33.

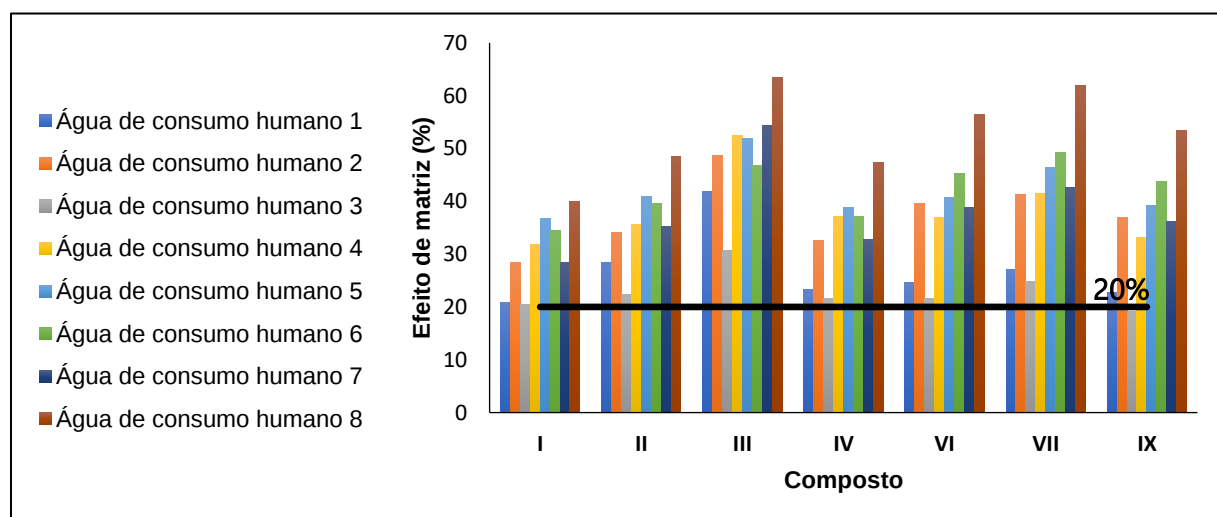


Figura 7.33- Efeito de matriz em águas de consumo humano por LLE

Desta vez, os valores obtidos do efeito de matriz apresentam-se mais perto do valor esperado. O seu valor percentual varia entre 19% e 64% dependendo do composto em estudo. Deste modo, é possível confirmar que existe um efeito de matriz que intensifica o sinal cromatográfico dos analitos. O composto I de um modo geral apresenta menor efeito de matriz, visto que o valor mais elevado registado foi de 40%. Já o composto III, é o que apresenta maior efeito de matriz visto que o valor mais elevado registado foi de 64%.

A implementação do método em matriz ajustada em rotina laboratorial é um método extremamente laborioso em termos do volume de amostra necessário, assim como de tempo de análise, pelo que foi explorada uma opção mais viável que pudesse resolver o efeito de matriz, através do estudo do método de padrão interno.

7.3.4 Identificação dos padrões internos

O uso de padrões deuterados permite efetuar uma análise quantitativa dos compostos em estudo em amostras. A quantificação é realizada com base na área relativa dos picos cromatográficos. Ou seja, o sinal do composto A é sempre referido em relação ao sinal do padrão interno correspondente (Y_A/Y_{PI}). A concentração de cada composto identificado na amostra é calculada pela equação 7.1.

$$C \text{ (}\mu\text{g/L)} = \frac{Y_A \times I}{Y_{PI}} \times \frac{V_{extracto}}{V_0} \times 1000 \quad (7.1)$$

Y_A – Área do pico do composto na amostra

I – Concentração de padrão interno no extrato ($\mu\text{g/L}$)

Y_{PI} – Área do pico do padrão interno na amostra

V_0 – Volume de água extraído (mL)

$V_{extracto}$ – Volume do extrato orgânico no vial (mL)

Foi realizada uma pesquisa dos isótopos disponíveis comercialmente, visto que estes têm um comportamento análogo aos compostos de interesse. Foram encontrados no mercado isótopos do 4-etilfenol e do 4-terc-butilfenol (tabela 7.9).

Tabela 7.9-Propriedades dos padrões internos deuterados dos compostos I e II

Padrões deuterados	Fórmula Química	Massa molar (g/mol)	Ponto de ebulição (°C)
4-etilfenol-d ₁₀	C ₈ D ₁₀ O	132,23	218 - 219
4-terc-butil-d ₉ -fenol-2,3,5,6-d ₄	C ₁₀ HD ₁₃ O	163,3	236 - 238

Para este estudo, injetou-se soluções individuais dos padrões internos (com uma concentração aproximada de 10 mg/L) por GC-MS em modo *Full scan* obtendo-se os espectros de massa das figuras 7.34 e 7.35.

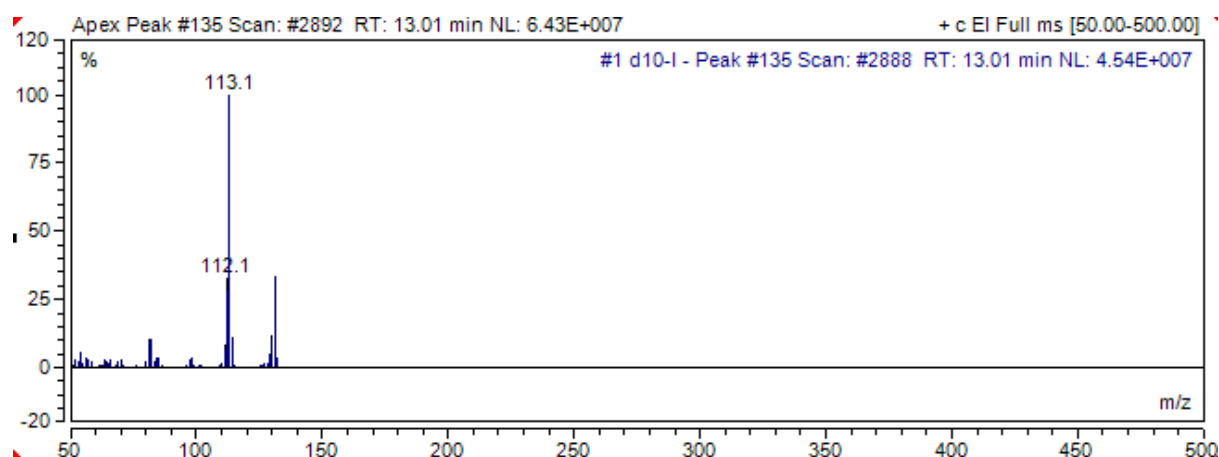


Figura 7.34-Espectro de massa do 4-etilfenol-d₁₀

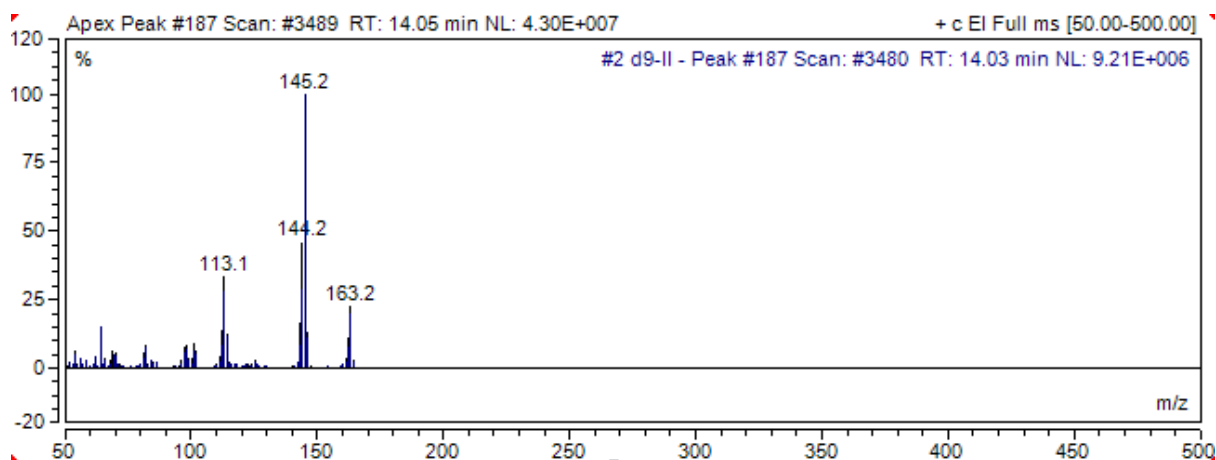


Figura 7.35-Espectro de massa do 4-terc-butil-d₉-fenol-2,3,5,6-d₄

Na análise por GC-MS em modo *Full scan*, da mistura dos compostos em estudo e dos padrões internos deuterados, optou-se pelo programa de temperaturas otimizado referido na tabela 6.18, de modo a obter um cromatograma com uma ótima separação dos picos cromatográficos, como é possível verificar na figura 7.36 onde se apresentam os tempos de retenção dos compostos em estudo e dos padrões internos deuterados.

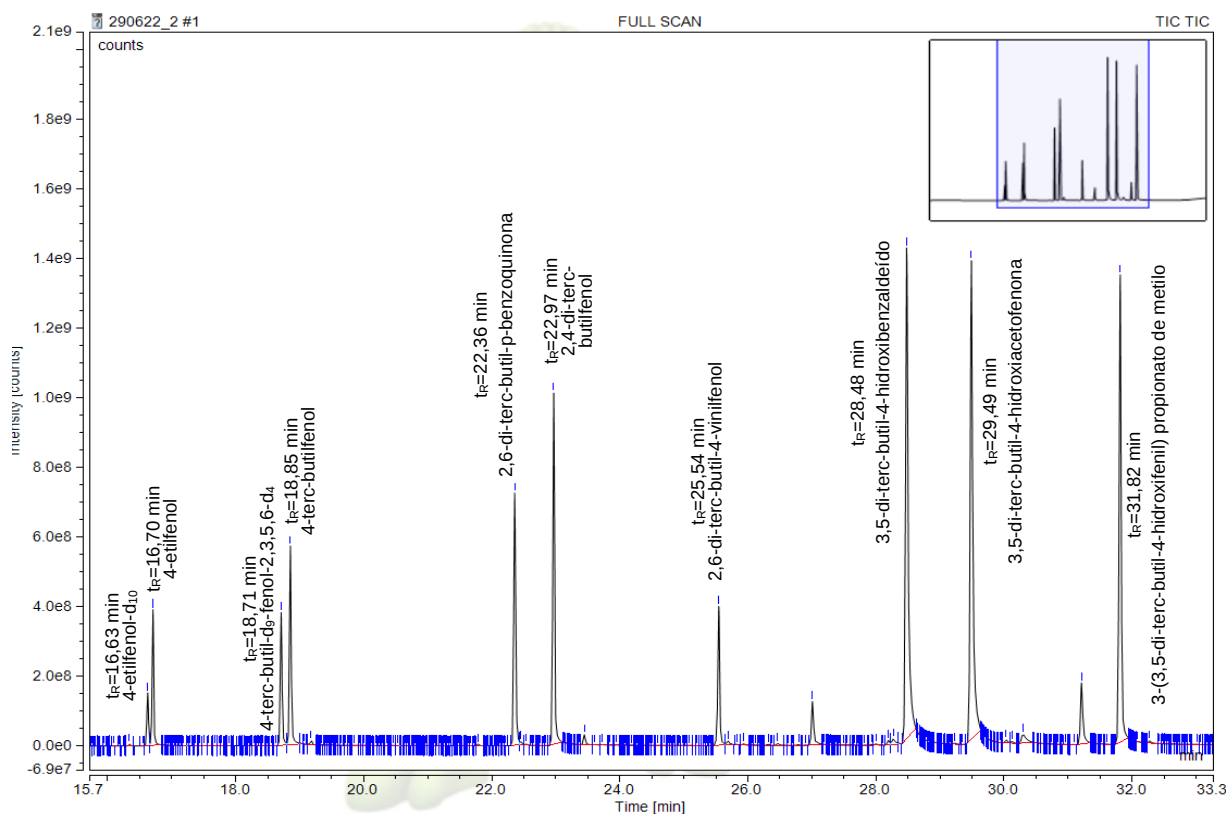


Figura 7.36-Cromatograma da mistura de compostos em estudo e dos padrões internos deuterados obtido após análise por GC-MS em modo *Full Scan*

7.3.5 Escolha do padrão interno para cada um dos compostos em análise

Num estudo inicial, foram adicionados os dois padrões internos (4-etilfenol- d_{10} e o 4-terc-butil- d_9 -fenol-2,3,5,6- d_4) a uma solução padrão de trabalho da gama de linearidade (padrão de calibração P5) e a uma amostra de água de consumo humano fortificada com os compostos em estudo, a qual foi efetuada uma extração líquido-líquido. Posteriormente, a solução padrão e o extrato orgânico da amostra foram analisados por GC-MS. As condições do método cromatográfico foram adaptadas, de modo a conseguir identificar os padrões internos com o modo de operação *SIM* (tabela 6.22).

Para determinar a adequação destes padrões internos, comparou-se a razão Y_A/Y_{PI} no extrato da amostra com o da solução padrão de trabalho (tabelas 7.10 e 7.11).

Tabela 7.10–Área relativa dos compostos na solução padrão de trabalho P5 e no extrato de uma amostra de água de consumo humano em relação ao 4-etilfenol-d₁₀

Composto	Padrão interno (C=36,1 µg/L)	Razão Y _A /Y _{PI} no P5	Razão Y _A /Y _{PI} no extrato	Erro relativo (%)
4-etilfenol	4-etilfenol-d ₁₀	1,17	1,16	1
4-terc-butilfenol	4-etilfenol-d ₁₀	39,83	38,06	4
2,6-di-terc-butil-p-benzoquinona	4-etilfenol-d ₁₀	11,03	11,28	2
2,4-di-terc-butilfenol	4-etilfenol-d ₁₀	39,79	41,22	4
3,5-di-terc-butil-4-hidroxibenzaldeído	4-etilfenol-d ₁₀	35,42	41,52	17
3,5-di-terc-butil-4-hidroxiacetofenona	4-etilfenol-d ₁₀	42,03	44,22	5
3-(3,5-di-terc-butil-4-hidroxifenil) propionato de metilo	4-etilfenol-d ₁₀	7,92	9,38	18

Tabela 7.11–Área relativa dos compostos na solução padrão de trabalho P5 e no extrato de uma amostra de água de consumo humano em relação ao 4-terc-butil-d₉-fenol-2,3,5,6-d₄

Composto	Padrão interno (C=693,8 µg/L)	Razão Y _A /Y _{PI} no P5	Razão Y _A /Y _{PI} no extrato	Erro relativo (%)
4-etilfenol	4-terc-butil-d ₉ - fenol-2,3,5,6-d ₄	0,052	0,051	2
4-terc-butilfenol	4-terc-butil-d ₉ - fenol-2,3,5,6-d ₄	1,78	1,66	7
2,6-di-terc-butil-p-benzoquinona	4-terc-butil-d ₉ - fenol-2,3,5,6-d ₄	0,49	0,49	0
2,4-di-terc-butilfenol	4-terc-butil-d ₉ - fenol-2,3,5,6-d ₄	1,78	1,80	1
3,5-di-terc-butil-4-hidroxibenzaldeído	4-terc-butil-d ₉ - fenol-2,3,5,6-d ₄	1,59	1,82	14
3,5-di-terc-butil-4-hidroxiacetofenona	4-terc-butil-d ₉ - fenol-2,3,5,6-d ₄	1,88	1,93	3
3-(3,5-di-terc-butil-4-hidroxifenil) propionato de metilo	4-terc-butil-d ₉ - fenol-2,3,5,6-d ₄	0,35	0,41	17

Para os compostos 4-etilfenol e para o 4-terc-butilfenol, o padrão interno deuterado selecionado foi o seu isótopo correspondente. Para os restantes compostos, o padrão interno com uma razão Y_A/Y_{PI} no extrato que melhor se aproximou da razão Y_A/Y_{PI} das soluções padrão de trabalho foi o 4-terc-butil-d₉-fenol-2,3,5,6-d₄.

7.3.6 Estudo de Linearidade dos padrões internos

Após a escolha dos padrões internos, torna-se fulcral compreender o comportamento dos mesmos, para perceber a sua adequação aos compostos em estudo. Nas figuras 7.37 e 7.38, estão representadas as curvas de calibração do 4-etilfenol-d₁₀ e do 4-terc-butil-d₉-fenol-2,3,5,6-d₄. É possível verificar que a concentração do *surrogate* adicionada à amostra, representada no gráfico com uma cor diferente, se situa aproximadamente a meio da gama de trabalho escolhida.

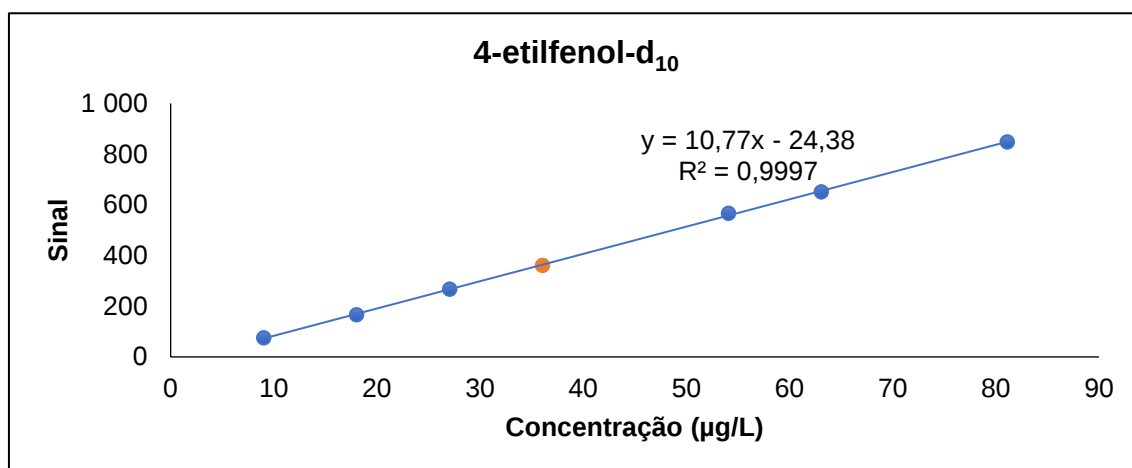


Figura 7.37- Representação gráfica da reta de calibração do 4-etilfenol-d₁₀

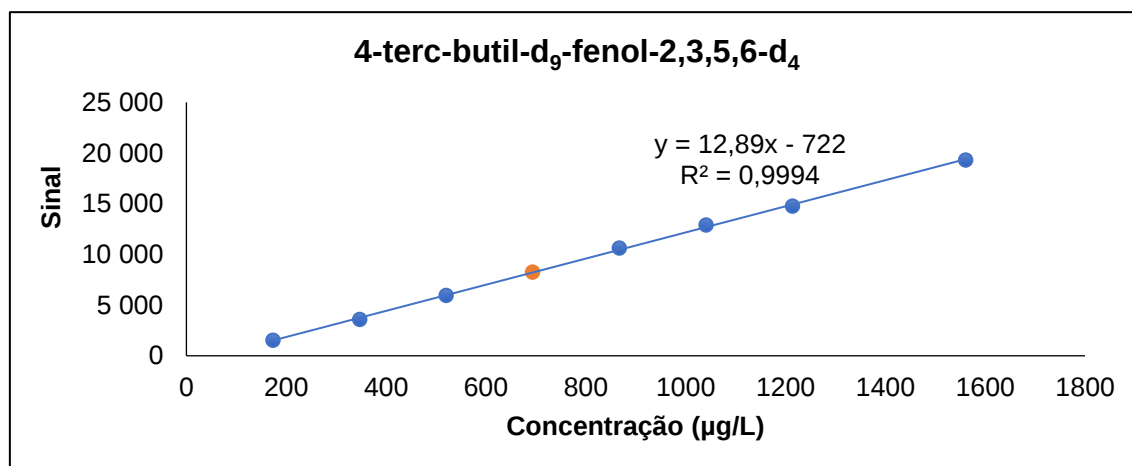


Figura 7.38-Representação gráfica da reta de calibração 4-terc-butil-d₉-fenol-2,3,5,6-d₄

Confirma-se a linearidade dos padrões internos na gama de trabalho estudada, visto que os resíduos estão distribuídos aleatoriamente e pelo teste de Mandel, o valor de teste é inferior ao valor da distribuição F de Fisher (Anexo C e D). Os resultados obtidos estão apresentados nas tabelas 7.12 e 7.13.

Tabela 7.12- Resumo dos resultados da aplicação do método dos mínimos quadrados para os padrões internos

Composto	Gama de linearidade (µg/L)	Coeficiente de correlação	Limite de Quantificação instrumental (µg/L)
4-etilfenol-d ₁₀	9,0 – 81,1	0,9999	4,82
4-terc-butil-d ₉ -fenol-2,3,5,6-d ₄	173,4 – 1561	0,9997	121,41

Tabela 7.13-Resumo dos resultados de teste de Mandel para os padrões internos deuterados

Composto	Valor de Teste	Valor Crítico
4-etilfenol-d ₁₀	0,041	7,71
4-terc-butil-d ₉ -fenol-2,3,5,6-d ₄	0,35	6,61

7.3.7 Estudo de Linearidade dos compostos usando padrões internos

Dada a necessidade de utilizar padrões internos para a validação do método analítico, torna-se necessário estudar a linearidade da curva de calibração Y_A/Y_{PI} em função da concentração dos compostos de interesse.

O procedimento para determinar a linearidade é o mesmo que foi explicitado anteriormente, à exceção que as soluções padrão de calibração agora têm uma concentração constante dos padrões internos. Neste caso, representou-se graficamente 6 retas de calibração para cada composto de interesse e calculou-se um declive médio e uma ordenada de origem média. Calculou-se também o desvio padrão relativo (%RSD) do declive obtido. As retas, preparadas entre 30 de Junho de 2022 e 29 de Julho de 2022, foram obtidas com 6 a 8 pontos referentes às soluções padrão de calibração (figuras 7.39 a 7.45).

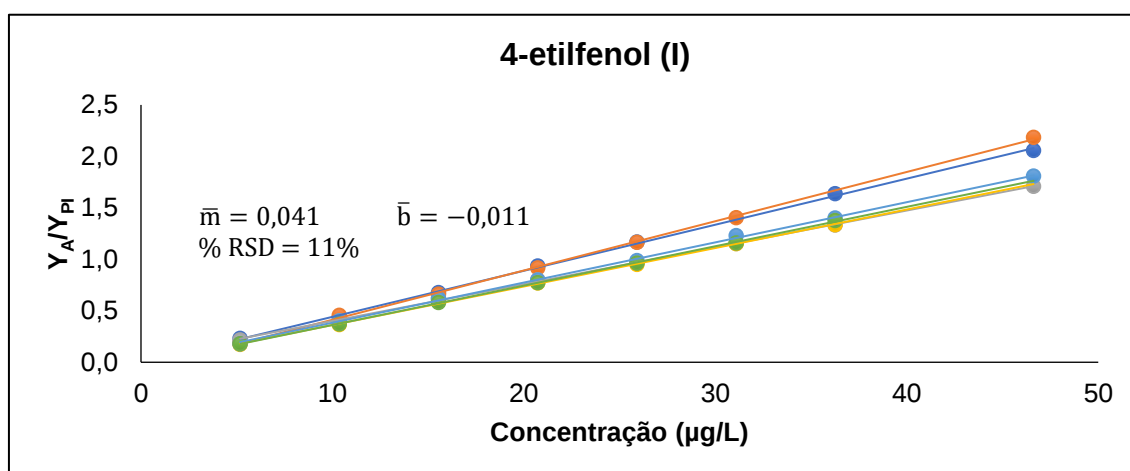


Figura 7.39- Representação gráfica da reta de calibração do 4-etilfenol com padrão interno (4-etilfenol- d_{10})

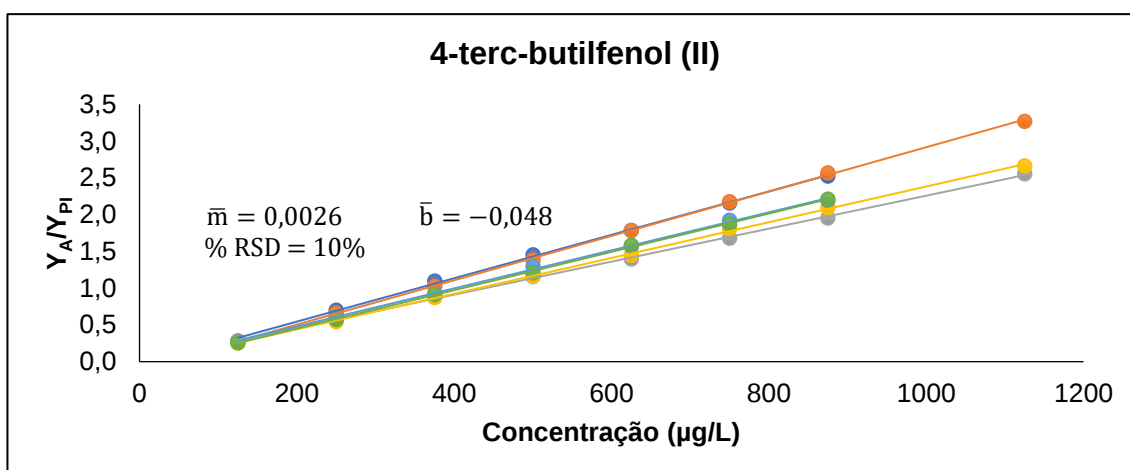


Figura 7.40- Representação gráfica da reta de calibração do 4-terc-butilfenol com padrão interno (4-terc-butil- d_9 -fenol-2,3,5,6- d_4)

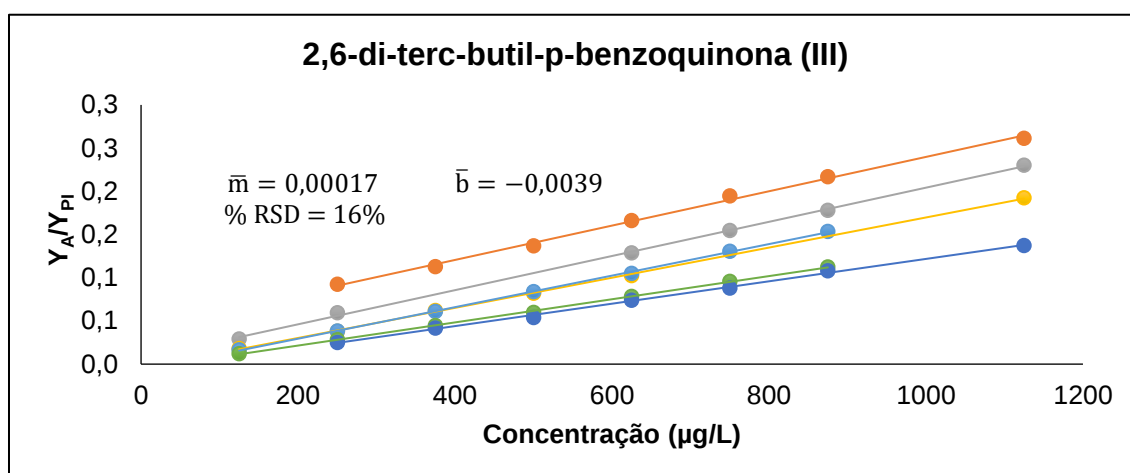


Figura 7.41- Representação gráfica da reta de calibração do 2,6-di-terc-butil-p-benzoquinona com padrão interno (4-terc-butil- d_9 -fenol-2,3,5,6- d_4)

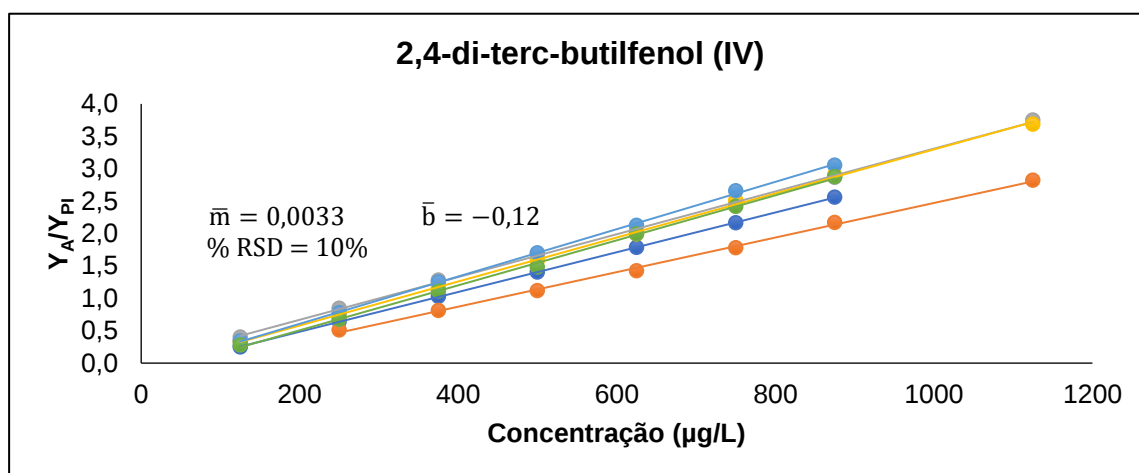


Figura 7.42- Representação gráfica da reta de calibração do 2,4-di-terc-butilfenol com padrão interno (4-terc-butil- d_9 -fenol-2,3,5,6- d_4)

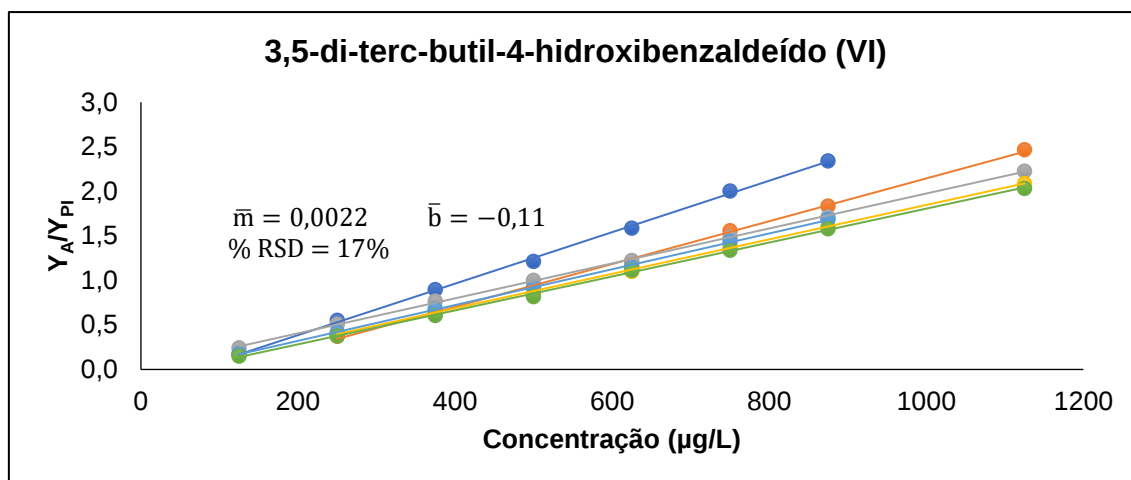


Figura 7.43- Representação gráfica da reta de calibração do 3,5-di-terc-butil-4-hidroxibenzaldeído com padrão interno (4-terc-butil- d_9 -fenol-2,3,5,6- d_4)

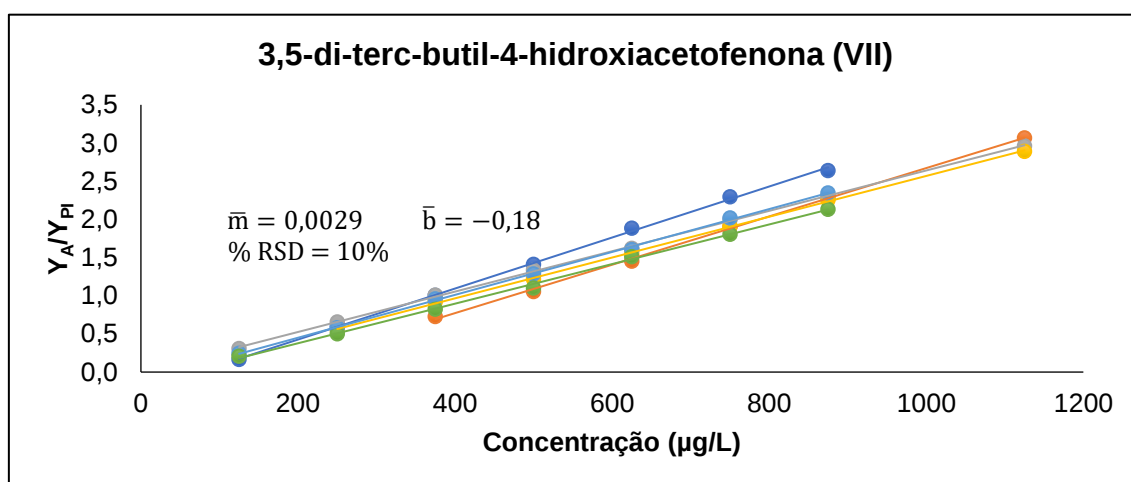


Figura 7.44- Representação gráfica da reta de calibração do 3,5-di-terc-butil-4-hidroxiacetofenona com padrão interno (4-terc-butil- d_9 -fenol-2,3,5,6- d_4)

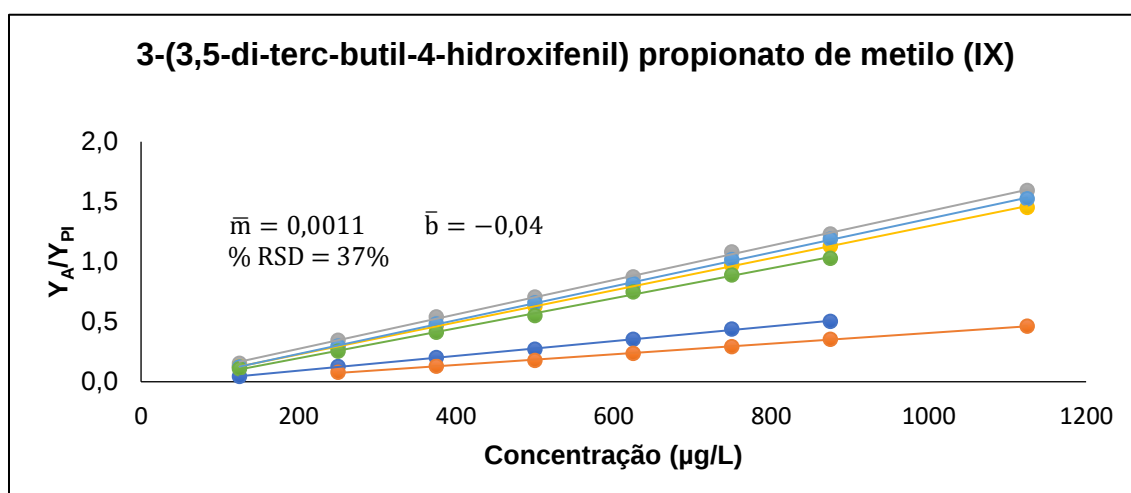


Figura 7.45- Representação gráfica da reta de calibração do 3-(3,5-di-terc-butil-4-hidroxifenil) propionato de metilo com padrão interno (4-terc-butil-d₉-fenol-2,3,5,6-d₄)

Todos os compostos demonstraram ter gamas de linearidade bem ajustadas, pelo método dos mínimos quadrados. O composto com um maior desvio padrão relativo em relação aos declives obtidos foi o composto IX, com um desvio de 37%. Já os compostos I, IV e VII apresentaram um RSD inferior a 12%.

Após a análise das várias retas de calibração para cada composto, foi escolhida uma para efetuar os estudos de linearidade. Considerou-se o melhor cenário possível, ou seja, escolheu-se a reta em que se obteve o menor limite de quantificação pelo cálculo do desvio padrão residual da reta de calibração.

Pelos resultados obtidos na tabela 7.14, observa-se que o coeficiente de correlação, R, foi superior a 0,995 e que o limite de quantificação foi inferior à menor concentração da gama de trabalho em estudo. Para além disso, os coeficientes de variação do método foram inferiores a 5%.

Tabela 7.14- Resumo dos resultados da aplicação do método dos mínimos quadrados para os compostos em estudo com padrão interno

Composto	Gama de linearidade (µg/L)	Coefficiente de correlação	Limite de Quantificação instrumental (µg/L)	Coefficiente de variação do método (%)
4-etilfenol (I)	5,2 - 46,6	0,9997	3,37	1,41
4-terc-butilfenol (II)	125-1125	0,9999	62,37	1,08
2,6-di-terc-butil-p-benzoquinona (III)	125-1125	0,9998	66,99	1,16
2,4-di-terc-butilfenol (IV)	125-1125	0,9997	81,68	1,41
3,5-di-terc-butil-4-hidroxibenzaldeído (VI)	125-1125	0,9998	74,72	1,29
3,5-di-terc-butil-4-hidroxiacetofenona (VII)	125-1125	0,9998	74,42	1,29
3-(3,5-di-terc-butil-4-hidroxifenil) propionato de metilo (IX)	125-1125	0,9999	61,69	1,07

A análise de resíduos demonstrou uma distribuição aleatória e o teste de Mandel determinou que a função de calibração linear está bem ajustada aos pontos experimentais (Anexo C e D), tal como se observa na tabela 7.15.

Tabela 7.15-Resumo dos resultados da aplicação do teste de Mandel para os compostos em estudo com padrão interno

Composto	Valor de Teste	Valor Crítico
4-etilfenol (I)	1,20	6,61
4-terc-butilfenol (II)	0,41	6,61
2,6-di-terc-butil-p-benzoquinona (III)	0,0027	6,61
2,4-di-terc-butilfenol (IV)	0,997	6,61
3,5-di-terc-butil-4-hidroxibenzaldeído (VI)	0,0081	6,61
3,5-di-terc-butil-4-hidroxiacetofenona (VII)	1,15	6,61
3-(3,5-di-terc-butil-4-hidroxifenil) propionato de metilo (IX)	0,94	6,61

O composto I, VI e VII podem ser quantificados pelo fator de resposta enquanto que os compostos II, III, IV e IX têm obrigatoriamente de ser quantificados pela reta de calibração, dado o não cumprimento dos testes de RIKILT e das áreas normalizadas (Anexo E e F). A decisão de aceitação destes testes é apresentada na tabela 7.16.

Tabela 7.16- Resumo dos resultados obtidos da aplicação do Teste de RIKILT e do Teste das áreas normalizadas para os compostos em estudo com padrão interno

Composto	Teste de RIKILT	Teste das áreas normalizadas
4-etilfenol (I)	☑	☑
4-terc-butilfenol (II)	☒	☒
2,6-di-terc-butil-p-benzoquinona (III)	☒	☒
2,4-di-terc-butilfenol (IV)	☒	☒
3,5-di-terc-butil-4-hidroxibenzaldeído (VI)	☑	☑
3,5-di-terc-butil-4-hidroxiacetofenona (VII)	☑	☑
3-(3,5-di-terc-butil-4-hidroxifenil) propionato de metilo (IX)	☒	☒

Finalmente, foi estudada a homogeneidade de variâncias (Anexo G) tendo em conta as gamas de trabalho aplicadas. Neste caso foram avaliadas duas populações normais independentes: o grupo dos padrões de menor concentração e o grupo dos padrões de maior concentração. Obtiveram-se diferenças consideráveis das variâncias destes dois grupos, dado que o valor de teste é superior ao valor da distribuição F de *Fisher* (tabela 7.17).

Tabela 7.17-Resumo dos resultados obtidos da aplicação do teste da homogeneidade de variâncias para os compostos em estudo

Composto	Valor de Teste	Valor Crítico F
4-etilfenol (I)	24,73	5,35
4-terc-butilfenol (II)	36,20	5,35
2,6-di-terc-butil-p-benzoquinona (III)	59,70	5,35
2,4-di-terc-butilfenol (IV)	33,99	5,35
3,5-di-terc-butil-4-hidroxibenzaldeído (VI)	78,55	5,35
3,5-di-terc-butil-4-hidroxiacetofenona (VII)	116,10	5,35
3-(3,5-di-terc-butil-4-hidroxifenil) propionato de metilo (IX)	45,87	5,35

O teste da homogeneidade de variâncias demonstra ser um teste redundante na avaliação da gama de trabalho em métodos cromatográficos, contrariando o estabelecido na norma ISO 8466-1. Este fator é provavelmente causado pelo facto destes métodos serem dinâmicos em termos da chegada dos analitos ao detetor, ao contrário de outros métodos analíticos, como a espectrometria de absorção molecular, em que as amostras a analisar se encontram estáticas.

7.3.8 Sensibilidade

A sensibilidade permite aferir a aptidão para diferenciar entre diferentes concentrações de um composto. Dada a utilização de retas de calibração, o declive da reta representa a sensibilidade que é constante ao longo da gama de trabalho. Na figura 7.46, encontram-se os valores da sensibilidade para cada um dos compostos de interesse, tendo em conta o declive médio das retas de calibração dos compostos com padrões internos.

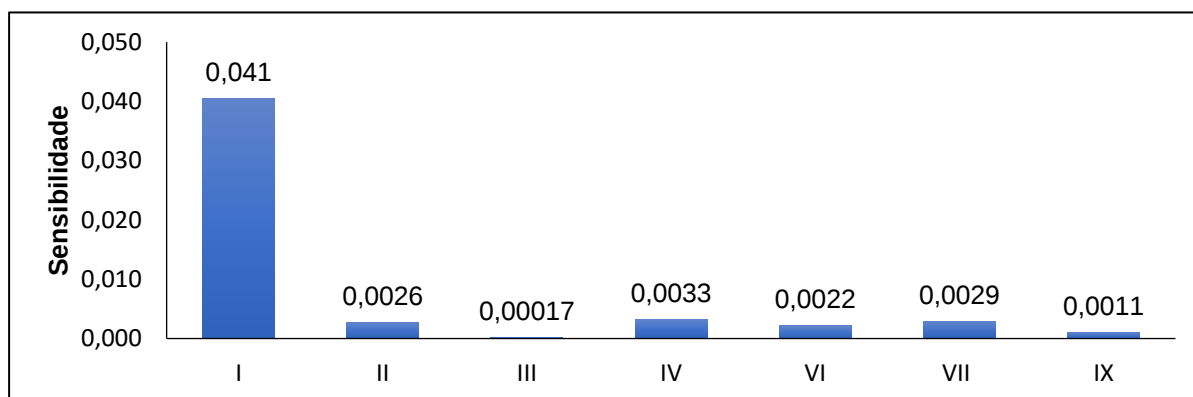


Figura 7.46-Representação gráfica da sensibilidade para cada composto em estudo

O composto I tem uma maior sensibilidade que os restantes. Significa que uma pequena variação da concentração deste composto se traduz numa grande alteração do sinal analítico, permitindo assim a distinção entre duas concentrações muito próximas. Já os restantes compostos têm uma sensibilidade mais de dez vezes inferior. Estes resultados são expectáveis, visto que, como a gama de trabalho do composto I é a mais baixa de todos os compostos, a saturação de sinal sentida não é tão grande, potenciando assim o aumento da sensibilidade.[123]

A sensibilidade do método poderia ser aumentada para os outros compostos caso se fizessem alterações na razão sinal-ruído ou na velocidade do scan. [97][124]

7.3.9 Limiares Analíticos instrumentais

Existem três abordagens distintas para o cálculo teórico dos limiares analíticos já descritas no capítulo 5.2.3.4.

A primeira consiste na preparação de dez soluções padrão de trabalho, em condições de repetibilidade, com a concentração mais baixa da gama de trabalho dos compostos e posterior análise por GC-MS. A segunda, consiste no cálculo dos limites através do desvio padrão residual da curva de calibração (tabela 7.18). Já a terceira abordagem consiste na determinação dos limites de deteção e quantificação

com recurso à razão sinal/ruído, S/N, para a concentração correspondente ao primeiro padrão da gama de trabalho (tabela 7.19).

O cálculo dos limiares analíticos para cada composto sem padrão interno é ainda descrito no Anexo H.

Tabela 7.18– Limiares analíticos obtidos para cada composto em estudo com padrão interno pela primeira e segunda abordagem

Composto com padrão interno	Limite de Detecção (µg/L)		Limite de Quantificação (µg/L)	
	Pela Repetibilidade	Pela Calibração	Pela Repetibilidade	Pela Calibração
4-etilfenol (I)	0,81	1,01	2,69	3,37
4-terc-butilfenol (II)	15,02	18,71	50,07	62,37
2,6-di-terc-butil-p-benzoquinona (III)	16,12	20,10	53,74	66,99
2,4-di-terc-butilfenol (IV)	13,39	24,50	44,62	81,68
3,5-di-terc-butil-4-hidroxibenzaldeído (VI)	13,58	22,42	45,28	74,72
3,5-di-terc-butil-4-hidroxiacetofenona (VII)	12,90	22,33	43,01	74,42
3-(3,5-di-terc-butil-4-hidroxifenil) propionato de metilo (IX)	13,77	18,51	45,89	61,69

Tabela 7.19- Limiares analíticos determinados para o padrão com concentração mais baixa da gama de trabalho pela razão sinal/ruído

Composto	S/N (médio)	RSD (%)	LOD (µg/L)	LOQ (µg/L)
4-etilfenol (I)	199,3	19,2	0,078	0,26
4-terc-butilfenol (II)	2798,6	22,0	0,13	0,45
2,6-di-terc-butil-p-benzoquinona (III)	416,6	47,6	0,90	3,00
2,4-di-terc-butilfenol (IV)	9924,4	12,8	0,038	0,13
3,5-di-terc-butil-4-hidroxibenzaldeído (VI)	8263,8	24,0	0,045	0,15
3,5-di-terc-butil-4-hidroxiacetofenona (VII)	10419,0	21,3	0,036	0,12
3-(3,5-di-terc-butil-4-hidroxifenil) propionato de metilo (IX)	3729,4	25,4	0,10	0,34

Os limites de quantificação obtidos são inferiores ao valor mais baixo da gama de trabalho, tal como requerido. Também se verifica que os limiares analíticos obtidos pelos ensaios de repetibilidade são inferiores aos limiares analíticos obtidos pela reta de calibração. Este resultado é expectável dado que, por norma, o desvio padrão correspondente às dez réplicas com a concentração mínima da gama de trabalho é inferior ao desvio padrão do método ($S_{\text{método}}$). Os limites analíticos determinados através das

razões S/N são muito mais baixos, porém é importante compreender que os resultados desta análise raramente expressam a realidade.

No Decreto-Lei n.º 83/2011, que estabelece princípios técnicos para a monitorização do estado da água, e no Decreto-Lei n.º 152/2017, que estabelece o regime da qualidade da água para consumo humano, é possível encontrar critérios de desempenho mínimos para os métodos analíticos. É referido, que o limite de quantificação tem de ser igual ou inferior a 30% do valor paramétrico.

É sabido que não há qualquer menção aos compostos de interesse, nos decretos-lei em causa. Portanto, neste caso, os valores de referência estipulados pelo grupo de trabalho *4MSI* são tomados como guia. No entanto, estes limites de referência são inferiores aos limites de quantificação instrumentais obtidos. Logo, é comprovada a necessidade de se usar uma técnica de preparação da amostra, para baixar o limite de quantificação do método de ensaio.

❖ Confirmação Limite de Quantificação

Depois de calculados os limites de quantificação teóricos, é necessário confirmar estes resultados em termos experimentais, em condições de repetibilidade. Posto isto, prepararam-se três soluções independentes com uma concentração aproximada ao limite de quantificação para cada composto de interesse. Neste caso, foi necessário observar os resultados obtidos para as diferentes retas de calibração com PI, de forma a selecionar qual o limite de quantificação experimental. Após análise por GC-MS, procedeu-se à quantificação das soluções e calculou-se o desvio padrão relativo e a média do erro relativo das soluções, tal como se pode ver pela tabela 7.20.

Tabela 7.20-Resumo dos resultados obtidos para a confirmação experimental do LOQ

Composto	LOQ teórico (µg/L) (pela reta de calibração)	Concentração média experimental (µg/L)	RSD (%)	Média do erro relativo (%)
4-etilfenol (I)	3,2	3,9	3,3	19,1
4-terc-butilfenol (II)	91,9	103,8	5,0	12,9
2,6-di-terc-butil-p-benzoquinona (III)	62,5	69,4	5,7	11,0
2,4-di-terc-butilfenol (IV)	105,9	118,5	1,2	11,9
3,5-di-terc-butil-4-hidroxibenzaldeído (VI)	105,9	131,3	0,4	24,0
3,5-di-terc-butil-4-hidroxiacetofenona (VII)	105,9	124,5	4,5	17,5
3-(3,5-di-terc-butil-4-hidroxifenil) propionato de metilo (IX)	120,2	136,9	3,5	13,9

Observa-se que a exatidão e a precisão em valor percentual registaram valores inferiores a 25%, confirmando-se experimentalmente o valor do limite de quantificação.

7.3.10 Precisão

Avaliou-se a precisão através de ensaios de repetibilidade e de precisão intermédia.

❖ Ensaios de Repetibilidade

Preparou-se, no mesmo dia, dez soluções padrão para três níveis de concentração diferentes: a concentração mais baixa, mais alta e a meio da gama de trabalho. Os padrões nos extremos da gama de trabalho são mais suscetíveis a sofrerem desvios e por isso serão atentamente estudados. Para avaliar este parâmetro calculou-se o desvio padrão relativo (%RSD), o desvio padrão de repetibilidade (S_r) e o limite de repetibilidade (r) separadamente para cada nível de concentração. Os resultados apresentam-se nas tabelas 7.21, 7.22 e 7.23.

O estudo da repetibilidade para os compostos sem padrão interno e para os padrões internos é também descrito no Anexo I.

Tabela 7.21-Resultados obtidos para a repetibilidade para a gama baixa dos compostos em estudo com padrão interno

Composto com padrão interno	Concentração gama baixa – P1 (µg/L)	RSD (%)	S_r	r
4-etilfenol (I)	5,18	4,4	0,3	0,8
4-terc-butilfenol (II)	125	3,4	5,3	14,8
2,6-di-terc-butil-p-benzoquinona (III)	125	3,6	5,7	15,9
2,4-di-terc-butilfenol (IV)	125	2,9	4,7	13,2
3,5-di-terc-butil-4-hidroxibenzaldeído (VI)	125	3,1	4,8	13,4
3,5-di-terc-butil-4-hidroxiacetofenona (VII)	125	2,7	4,5	12,7
3-(3,5-di-terc-butil-4-hidroxifenil) propionato de metilo (IX)	125	2,8	4,8	13,5

Tabela 7.22-Resultados obtidos para a repetibilidade para a gama média dos compostos em estudo com padrão interno

Composto com padrão interno	Concentração gama média - P5 (µg/L)	RSD (%)	S_r	r
4-etilfenol (I)	25,9	3,3	0,9	2,5
4-terc-butilfenol (II)	625	2,9	18,8	52,7
2,6-di-terc-butil-p-benzoquinona (III)	625	3,4	20,9	58,5
2,4-di-terc-butilfenol (IV)	625	3,0	19,5	54,6
3,5-di-terc-butil-4-hidroxibenzaldeído (VI)	625	2,6	16,9	47,2

3,5-di-terc-butil-4-hidroxiacetofenona (VII)	625	2,5	15,5	43,5
3-(3,5-di-terc-butil-4-hidroxifenil) propionato de metilo (IX)	625	2,5	16,1	45,0

Tabela 7.23-Resultados obtidos para a repetibilidade para a gama alta dos compostos em estudo com padrão interno

Composto com padrão interno	Concentração gama alta - P8 (µg/L)	RSD (%)	S _r	r
4-etilfenol (I)	46,62	2,3	1,1	3,1
4-terc-butilfenol (II)	1125	2,9	32,8	91,9
2,6-di-terc-butil-p-benzoquinona (III)	1125	7,2	81,4	227,8
2,4-di-terc-butilfenol (IV)	1125	3,3	37,4	104,7
3,5-di-terc-butil-4-hidroxibenzaldeído (VI)	1125	3,9	47,7	133,6
3,5-di-terc-butil-4-hidroxiacetofenona (VII)	1125	3,4	38,5	107,9
3-(3,5-di-terc-butil-4-hidroxifenil) propionato de metilo (IX)	1125	2,8	32,4	90,8

Os valores obtidos para o desvio padrão relativo foram favoráveis, situando-se entre 2% e 8%. O critério de aceitação deste parâmetro dita que o mesmo tem de ser igual ou inferior a 25%.

❖ Ensaio de Precisão Intermédia

A precisão intermédia também é utilizada para analisar a precisão do método. Esta tem em conta um maior número de efeitos na variabilidade dos resultados. Foram analisadas dez soluções padrão diferentes, em dias diferentes, para os mesmos três níveis de concentração. Para assegurar as condições de precisão intermédia, iniciou-se o estudo a 30 de Junho e terminou-se a 29 de Julho, dado que os ensaios não foram realizadas em dias seguidos. Os resultados apresentam-se nas tabelas 7.24, 7.25 e 7.26.

Tabela 7.24- Resultados obtidos para a precisão intermédia para a gama baixa dos compostos em estudo com padrão interno

Composto com padrão interno	Concentração gama baixa – P1 (µg/L)	RSD (%)	S _r	r
4-etilfenol (I)	5,18	6,4	0,3	0,9
4-terc-butilfenol (II)	125	5,7	7,2	20,2
2,6-di-terc-butil-p-benzoquinona (III)	125	5,3	7,1	19,9
2,4-di-terc-butilfenol (IV)	125	5,4	7,2	20,3
3,5-di-terc-butil-4-hidroxibenzaldeído (VI)	125	9,8	13,7	38,4

3,5-di-terc-butil-4-hidroxiacetofenona (VII)	125	7,5	9,9	27,8
3-(3,5-di-terc-butil-4-hidroxifenil) propionato de metilo (IX)	125	5,7	7,7	21,5

Tabela 7.25-Resultados obtidos para a precisão intermédia para a gama média dos compostos em estudo com padrão interno

Composto com padrão interno	Concentração gama média - P5 (µg/L)	RSD (%)	S _r	r
4-etilfenol (I)	25,9	1,3	0,4	1,0
4-terc-butilfenol (II)	625	1,6	10,7	29,9
2,6-di-terc-butil-p-benzoquinona (III)	625	1,2	7,9	22,1
2,4-di-terc-butilfenol (IV)	625	1,7	11,0	30,7
3,5-di-terc-butil-4-hidroxibenzaldeído (VI)	625	1,7	11,1	31,2
3,5-di-terc-butil-4-hidroxiacetofenona (VII)	625	1,6	10,8	30,3
3-(3,5-di-terc-butil-4-hidroxifenil) propionato de metilo (IX)	625	5,6	37,7	105,5

Tabela 7.26-Resultados obtidos para a precisão intermédia para a gama alta dos compostos em estudo com padrão interno

Composto com padrão interno	Concentração gama alta - P8 (µg/L)	RSD (%)	S _r	r
4-etilfenol (I)	46,62	1,5	0,7	2,1
4-terc-butilfenol (II)	1125	1,6	19,2	53,8
2,6-di-terc-butil-p-benzoquinona (III)	1125	1,0	11,9	33,4
2,4-di-terc-butilfenol (IV)	1125	1,5	17,2	48,0
3,5-di-terc-butil-4-hidroxibenzaldeído (VI)	1125	1,4	373,3	1045,2
3,5-di-terc-butil-4-hidroxiacetofenona (VII)	1125	1,1	371,7	1040,8
3-(3,5-di-terc-butil-4-hidroxifenil) propionato de metilo (IX)	1125	1,3	372,8	1043,9

O desvio padrão relativo obtido nos ensaios de precisão intermédia é superior ao obtido em ensaios de repetibilidade para a gama baixa de concentração. No entanto, para a gama média e para a gama alta o desvio padrão relativo obtido pela precisão intermédia foi um pouco mais baixo do que o valor obtido em ensaios de repetibilidade. Porém, como os valores obtidos são da mesma ordem de grandeza, conclui-se que a variável tempo não tem um grande impacto na análise dos padrões de calibração. Em suma, o critério de aceitação dos resultados é cumprido visto que o desvio padrão relativo para os sete compostos é inferior a 25%.

7.3.11 Ensaios de recuperação

Mais uma vez procederam-se aos ensaios de recuperação que asseguram a obtenção de uma medida da exatidão. Foram utilizadas as soluções de fortificação descritas no capítulo 6.5.5.

❖ Análise de brancos

Para cada sequência/dia de análise de ensaios de recuperação é também realizado um ensaio em branco com água ultrapura, ensaio este efetuado de igual modo aos ensaios de recuperação, sem fortificação dos compostos de interesse.

Todos os ensaios em branco efetuados revelaram a ausência ou a presença dos analitos de interesse em concentrações inferiores ao LOD do método para cada um dos compostos analisados.

❖ Análise de amostras

De igual modo, para cada dia de análise de ensaios de recuperação é efetuada a extração das amostras sob as quais são realizados os ensaios de recuperação, sem a fortificação dos compostos. Deste modo, é possível averiguar se os analitos em estudo estão previamente contidos na amostra ou não. Caso se verifique a sua presença, a sua concentração tem de ser subtraída à concentração obtida na amostra fortificada.

Todas as amostras analisadas revelaram a ausência ou a presença dos analitos de interesse em concentrações inferiores ao LOD do método para cada um dos compostos analisados. O critério utilizado para considerar a presença de um composto na amostra consistiu em verificar se o tempo de retenção é semelhante aos tempos de retenção dos compostos nas soluções padrão de calibração e ainda se a razão entre o ião de quantificação e os iões de qualificação é semelhante às razões dos iões obtidas nas soluções padrão de calibração.

❖ Determinação da percentagem de recuperação

Inicialmente, foram realizados alguns ensaios de recuperação para os compostos sem padrão interno em 12 amostras de água de consumo humano. Como critério de aceitação considerou-se que recuperações entre 70% e 120% podem ser aceites caso tenham um desvio padrão relativo (RSD%) inferior a 25%. No entanto pela figura 7.47, é possível constatar que as recuperações obtidas registaram valores acima do expectável para a maioria dos compostos em alguns dos ensaios, confirmando-se uma intensificação do sinal.

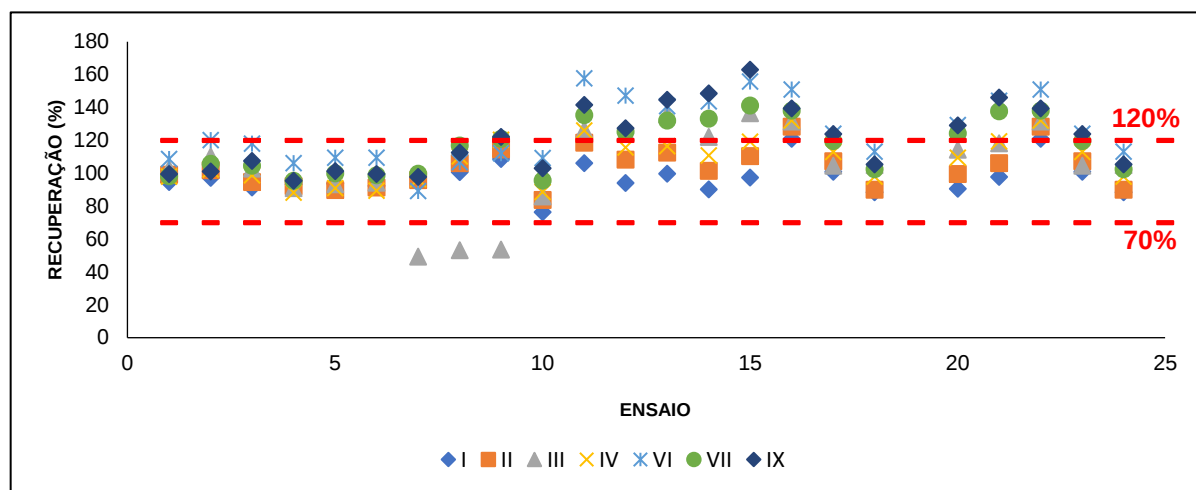


Figura 7.47-Recuperações obtidas através do método sem padrão interno para amostras de água de consumo humano

Tendo em conta os resultados do efeito de matriz do capítulo 7.3.3 e os resultados da figura 7.46, confirma-se novamente a necessidade de aplicar o método com padrão interno para o estudo dos ensaios de recuperação.

Para os estudos de avaliação das percentagens de recuperação dos compostos em estudo, utilizando o método de padrão interno, foram efetuados ensaios de recuperação em dois níveis de fortificação (tabela 7.27) e para as diversas matrizes estudadas: águas de consumo humano, águas superficiais e águas subterrâneas. As percentagens de recuperação foram calculadas de acordo com o que se encontra descrito no capítulo 5.3.1.3.

Tabela 7.27-Níveis de fortificação testados para cada composto no extrato das amostras

Composto com padrão interno	Nível de fortificação baixo (µg/L)	Nível de fortificação alto (µg/L)
4-etilfenol (I)	13,0	25,9
4-terc-butilfenol (II)	313	625
2,6-di-terc-butil-p-benzoquinona (III)	313	625
2,4-di-terc-butilfenol (IV)	313	625
3,5-di-terc-butil-4-hidroxibenzaldeído (VI)	313	625
3,5-di-terc-butil-4-hidroxiacetofenona (VII)	313	625
3-(3,5-di-terc-butil-4-hidroxifenil) propionato de metilo (IX)	313	625

No que respeita às amostras de água de consumo humano, observaram-se recuperações satisfatórias entre 77% e 97% (tabela 7.28). O desvio padrão relativo registou valores inferiores a 25%, sendo que o composto VI apresentou o maior desvio com 24%.

Tabela 7.28-Percentagens de recuperação obtidas em águas de consumo humano, com padrão interno

Composto com padrão interno	Nível de fortificação baixo (µg/L)			Nível de fortificação alto (µg/L)		
	Recuperação média (%)	RSD (%)	n	Recuperação média (%)	RSD (%)	n
4-etilfenol (I)	81,4	20,1	21	81,9	16,7	22
4-terc-butilfenol (II)	76,9	16,8	20	78,8	15,8	22
2,6-di-terc-butil-p-benzoquinona (III)	82,7	14,4	21	78,6	20,8	21
2,4-di-terc-butilfenol (IV)	78,7	19,4	22	80,9	17,0	21
3,5-di-terc-butil-4-hidroxibenzaldeído (VI)	84,1	23,7	20	88,5	17,7	20
3,5-di-terc-butil-4-hidroxiacetofenona (VII)	79,2	22,0	22	90,1	14,8	23
3-(3,5-di-terc-butil-4-hidroxifenil) propionato de metilo (IX)	81,4	21,4	21	97,1	15,7	20

Já as amostras de águas superficiais registaram recuperações entre 75% e 108% (tabela 7.29). Os desvios padrão relativos também são aceites pois foram obtidos valores entre 7% e 22%. Nas amostras de águas subterrâneas foram obtidas recuperações entre 72% e 110% (tabela 7.30) e os desvios padrão relativos demonstraram ser inferiores a 25%. Como a população das amostras em estudo é elevada e apresenta grande variabilidade, compreende-se que os valores dos desvios padrão relativos se possam situar perto do limite estabelecido (25%).

Tabela 7.29-Percentagens de recuperação obtidas em águas superficiais, com padrão interno

Composto com padrão interno	Nível de fortificação baixo (µg/L)			Nível de fortificação alto (µg/L)		
	Recuperação média (%)	RSD (%)	n	Recuperação média (%)	RSD (%)	n
4-etilfenol (I)	97,6	7,9	21	84,0	21,6	21
4-terc-butilfenol (II)	86,9	6,5	21	78,2	20,1	21
2,6-di-terc-butil-p-benzoquinona (III)	94,0	7,6	21	74,8	21,7	21
2,4-di-terc-butilfenol (IV)	88,7	11,9	20	80,6	18,8	20
3,5-di-terc-butil-4-hidroxibenzaldeído (VI)	108,0	11,2	21	101,1	19,4	21
3,5-di-terc-butil-4-hidroxiacetofenona (VII)	101,1	9,1	21	96,9	14,5	21
3-(3,5-di-terc-butil-4-hidroxifenil) propionato de metilo (IX)	104,1	11,1	21	106,3	11,6	21

Tabela 7.30-Percentagens de recuperação obtidas em águas subterrâneas, com padrão interno

Composto com padrão interno	Nível de fortificação baixo (µg/L)			Nível de fortificação alto (µg/L)		
	Recuperação média (%)	RSD (%)	n	Recuperação média (%)	RSD (%)	n
4-etilfenol (I)	76,5	24,3	20	107,6	12,7	21
4-terc-butilfenol (II)	72,0	24,0	20	100,3	13,9	21
2,6-di-terc-butil-p-benzoquinona (III)	77,6	24,1	21	100,3	21,7	20
2,4-di-terc-butilfenol (IV)	75,3	21,3	21	99,2	15,4	21
3,5-di-terc-butil-4-hidroxibenzaldeído (VI)	79,8	22,6	20	109,7	15,8	21
3,5-di-terc-butil-4-hidroxiacetofenona (VII)	79,8	21,0	20	101,6	16,5	21
3-(3,5-di-terc-butil-4-hidroxifenil) propionato de metilo (IX)	81,5	19,2	20	107,6	15,4	21

Por outro lado, não se observaram desvios significativos nos dois níveis de fortificação para os compostos em estudo. De igual modo, também não se observaram desvios significativos entre os diferentes tipos de matriz ensaiadas.

De modo a obter uma compreensão generalizada do valor da percentagem de recuperação para cada composto, foram compilados todos os resultados obtidos obtendo-se uma recuperação média global e o respetivo desvio padrão relativo (tabela 7.31). O composto II registou a recuperação mais baixa, com cerca de 82%, enquanto que o composto IX apresentou uma percentagem de recuperação de cerca de 96%, sendo a recuperação média global mais elevada.

Tabela 7.31- Percentagens de recuperação média global

Composto com padrão interno	Recuperação média global (%)	RSD (%)	n
4-etilfenol (I)	88,2	21,0	126
4-terc-butilfenol (II)	82,3	19,8	125
2,6-di-terc-butil-p-benzoquinona (III)	84,5	21,8	125
2,4-di-terc-butilfenol (IV)	83,8	19,7	125
3,5-di-terc-butil-4-hidroxibenzaldeído (VI)	95,5	21,8	122
3,5-di-terc-butil-4-hidroxiacetofenona (VII)	91,4	19,2	127
3-(3,5-di-terc-butil-4-hidroxifenil) propionato de metilo (IX)	96,5	19,3	123

7.3.1 Estabilidade da amostra

Foram efetuados estudos para avaliar a estabilidade da amostra desde a colheita até à sua preparação por extração líquido-líquido, de forma a não ocorrer perda dos compostos em análise.

Deste modo, preparou-se uma única amostra de água ultrapura num balão volumétrico de 2000 mL, fortificando-a a meio da gama de trabalho com as concentrações correspondentes dos compostos e dos padrões internos. Em dias não consecutivos, durante 12 dias, extraiu-se em duplicado a mesma amostra e procedeu-se a um ensaio de recuperação. A amostra fortificada ficou sempre guardada no frigorífico a 6 °C. Paralelamente, também foi preparado uma amostra de água ultrapura sem fortificação dos compostos, a qual funcionou como amostra para o ensaio em branco. Os resultados obtidos estão representados na figura 7.48.

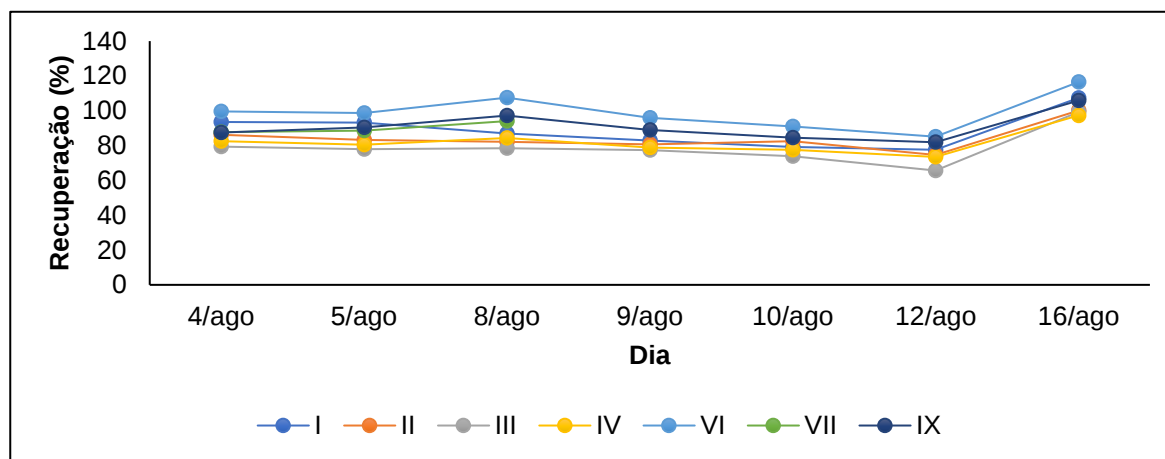


Figura 7.48-Recuperação média dos compostos em estudo em diferentes extratos da amostra analisadas ao longo do tempo

É possível observar que a extração da mesma amostra em diferentes dias, não teve um grande impacto na percentagem de recuperação obtida. No geral, as recuperações obtidas resultaram em valores semelhantes às recuperações médias globais dos ensaios de recuperação (tabela 7.32).

Tabela 7.32-Resumo dos resultados obtidos no estudo da estabilidade da amostra

Composto	Recuperação média (%)	RSD (%)
4-etilfenol (I)	88,7	10,8
4-terc-butilfenol (II)	84,2	8,6
2,6-di-terc-butil-p-benzoquinona (III)	78,8	11,9
2,4-di-terc-butilfenol (IV)	82,1	8,5
3,5-di-terc-butil-4-hidroxibenzaldeído (VI)	99,2	9,7
3,5-di-terc-butil-4-hidroxiacetofenona (VII)	88,3	8,9
3-(3,5-di-terc-butil-4-hidroxifenil) propionato de metilo (IX)	90,9	8,3

Ao calcular a recuperação média dos diferentes dias, é possível verificar que o coeficiente de variação associado é inferior a 12% para todos os compostos, sendo considerado aceitável. Posto isto, significa que a estabilidade da amostra é garantida, ao longo de 12 dias.

Comparando a amostra fortificada no dia 0 (4 de Agosto), simulando o dia de colheita da amostra, com a amostra fortificada extraída ao final de 12 dias (16 de Agosto), guardada no frigorífico durante esse período, é possível verificar que não ocorreram perdas significativas dos compostos em estudo.

Este ensaio indica também que após a colheita de uma amostra para a análise destes compostos, que a sua extração pode ser efetuada no prazo máximo de 12 dias.

7.3.1 Estabilidade do extrato

É importante compreender se o fator temporal tem algum impacto nos extratos depois destes serem preparados. Deste modo, prepararam-se na mesma altura 10 extratos de uma amostra para o mesmo nível de fortificação. Depois, foram guardados num congelador a -80 °C. Todas as semanas, analisou-se por GC-MS um destes extratos e registou-se a variação de sinal obtida.

Pela análise da figura 7.49, considera-se que a estabilidade do extrato é garantida visto que não ocorre nenhuma variação significativa da concentração dos extratos analisados, pelo menos durante 35 dias (5 semanas).

Analisando o extrato no dia 0, simulando o dia de preparação da amostra (LLE), com o extrato guardado no congelador a -80 °C durante 35 dias, é possível verificar que não ocorreram perdas significativas dos compostos em estudo.

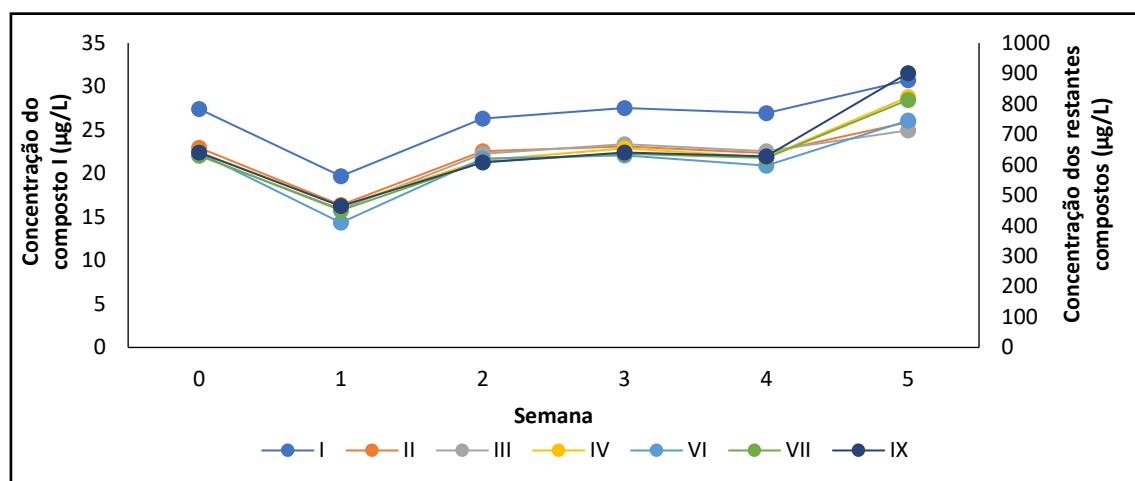


Figura 7.49-Concentração dos compostos em estudo em diferentes extratos analisados ao longo do tempo

Tabela 7.33-Resumo dos resultados obtidos no estudo da estabilidade do extrato

Composto	Concentração esperada (µg/L)	Concentração média estimada (µg/L)	RSD (%)
4-etilfenol (I)	25,9	26,4	12,6
4-terc-butilfenol (II)	625	635	12,9
2,6-di-terc-butil-p-benzoquinona (III)	625	624	13,0
2,4-di-terc-butilfenol (IV)	625	637	16,3
3,5-di-terc-butil-4-hidroxibenzaldeído (VI)	625	607	16,5
3,5-di-terc-butil-4-hidroxiacetofenona (VII)	625	627	16,8
3-(3,5-di-terc-butil-4-hidroxifenil) propionato de metilo (IX)	625	647	20,0

Este ensaio permite concluir que, mantendo os extratos armazenados num congelador a -80 °C, a sua análise cromatográfica pode ser efetuada até 5 semanas após o processo de preparação da amostra.

7.3.2 Limite de quantificação do método

O limite de quantificação do método é determinado tendo em conta o fator de concentração (FC=200) e a recuperação média global. É admitido ainda, um desvio de 25% face à recuperação média de modo a contabilizar possíveis afastamentos do valor obtido para a recuperação de determinado ensaio.

Na tabela 7.34, é possível verificar que os limites calculados são inferiores a 30% dos valores de referência estabelecidos no documento “4MSI Draft Common Approach on Organic Materials – Part C”. Assim, é garantido o cumprimento do critério do Decreto-Lei n.º 83/2011 e do Decreto-Lei n.º 152/2017.

Tabela 7.34- Limite de quantificação do método para os compostos com padrão interno

Composto	Limite de quantificação do método (µg/L)	Valor de referência (µg/L)	Critério de aceitação (30%) (µg/L)
4-etilfenol (I)	0,02	0,1	0,03
4-terc-butilfenol (II)	0,57	2,5	0,75
2,6-di-terc-butil-p-benzoquinona (III)	0,55	2,5	0,75
2,4-di-terc-butilfenol (IV)	0,56	250	75
3,5-di-terc-butil-4-hidroxibenzaldeído (VI)	0,49	2,5	0,75
3,5-di-terc-butil-4-hidroxiacetofenona (VII)	0,51	2,5	0,75
3-(3,5-di-terc-butil-4-hidroxifenil) propionato de metilo (IX)	0,49	50	15

7.3.3 Incertezas

No cálculo das incertezas foram consideradas duas metodologias: a metodologia *bottom-up* e *top-down*. Por sua vez, a metodologia *top-down* pode ser calculada com base no Guia Nordtest ou com base na norma ISO 11352.[125][126]

A primeira abordagem, na tabela 7.35, foca-se no cálculo da incerteza padrão associada à interpolação da reta (u_{inter}), a incerteza padrão associada à preparação das soluções padrão ($u_{padrão}$) e a incerteza padrão associada à precisão intermédia (u_{prec}). Para o cálculo da u_{inter} , utiliza-se como referência o padrão da gama de trabalho com a concentração mais baixa. Já a segunda metodologia, nas tabelas 7.36 e 7.37, abrange a incerteza associada à precisão (u_{prec}) e a incerteza associada à exatidão (u_{exat}).

É ainda aferida a incerteza combinada ($u_c(C)$) e a incerteza expandida ($U(C)$) para cada um destes métodos.

Tabela 7.35- Estimativa da incerteza expandida do método pela metodologia *bottom-up*

Composto	u_{inter} (%)	$u_{padrão}$ (%)	u_{prec} (%)	$u_c(C)$ (%)	$U(C)$ (%)
4-etilfenol (I)	8,2	2,5	2,1	8,8	17,6
4-terc-butilfenol (II)	9,3	3,0	1,9	9,9	19,8
2,6-di-terc-butil-p-benzoquinona (III)	6,1	2,2	1,8	6,7	13,5
2,4-di-terc-butilfenol (IV)	7,7	2,7	1,8	8,4	16,8
3,5-di-terc-butil-4-hidroxibenzaldeído (VI)	7,5	3,1	3,3	8,7	17,5
3,5-di-terc-butil-4-hidroxiacetofenona (VII)	7,5	3,2	2,5	8,5	17,0
3-(3,5-di-terc-butil-4-hidroxifenil) propionato de metilo (IX)	5,8	3,2	1,9	6,9	13,9

Tabela 7.36- Estimativa da incerteza expandida do método pela metodologia *top-down* pelo ISO 11352

Composto	u_{prec} (%)	u_{exat} (%)	$u_c(C)$ (%)	$U(C)$ (%)
4-etilfenol (I)	2,1	20,6	20,7	41,3
4-terc-butilfenol (II)	1,9	19,0	19,1	38,1
2,6-di-terc-butil-p-benzoquinona (III)	1,8	18,5	18,6	37,1
2,4-di-terc-butilfenol (IV)	1,8	18,9	19,0	38,0
3,5-di-terc-butil-4-hidroxibenzaldeído (VI)	3,3	23,9	24,1	48,2
3,5-di-terc-butil-4-hidroxiacetofenona (VII)	2,5	21,1	21,3	42,6
3-(3,5-di-terc-butil-4-hidroxifenil) propionato de metilo (IX)	1,9	21,0	21,1	42,1

Tabela 7.37- Estimativa da incerteza expandida do método pela metodologia *top-down* pelo Guia Nordtest

Composto	u_{prec} (%)	u_{exat} (%)	$u_c(C)$ (%)	$U(C)$ (%)
4-etilfenol (I)	2,1	3,5	4,1	8,2
4-terc-butilfenol (II)	1,9	3,8	4,2	8,5
2,6-di-terc-butil-p-benzoquinona (III)	1,8	3,1	3,6	7,1
2,4-di-terc-butilfenol (IV)	1,8	3,6	4,0	8,0
3,5-di-terc-butil-4-hidroxibenzaldeído (VI)	3,3	4,3	5,4	10,8
3,5-di-terc-butil-4-hidroxiacetofenona (VII)	2,5	4,1	4,8	9,6
3-(3,5-di-terc-butil-4-hidroxifenil) propionato de metilo (IX)	1,9	4,1	4,5	9,0

Sabe-se que na legislação atual não existe nenhum critério de desempenho mínimo referente à incerteza de medição para os compostos em estudo.

No Decreto-Lei N.º 83/2011 a incerteza de medição é limitada a um valor igual ou inferior a 50%. Ainda no Decreto-Lei N.º 152/2017, a incerteza de medição para alguns compostos orgânicos listados varia entre 30% e 50%. Já a Diretiva (UE) 2020/2184, que em janeiro de 2023 passará a Decreto-Lei, especifica algumas incertezas que podem ser tomadas como referência. É o caso dos pesticidas (30%), das substâncias perfluoralkiladas e polifluoralkiladas (50%) e dos hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (40%). Assim, considera-se uma incerteza máxima tolerável de 50%.

Observando as incertezas expandidas obtidas, confirma-se que estas cumprem com esta característica de desempenho mínimo da incerteza de medição, sendo inferiores a 50%.

A abordagem pela norma ISO 11352 registou a maior incerteza expandida entre 38% e 48%. Este resultado é explicado pelas elevadas diferenças relativas entre as concentrações observadas e a concentração de referência que corresponde ao valor médio dos resultados obtidos nos “n” ensaios de recuperação. Como foram considerados os três tipos de matriz para os cálculos, existe alguma variabilidade nos resultados que resulta num aumento da variável b' .

Finalmente, os resultados para a gama baixa e para a gama alta de concentrações do método global são expressos tendo em conta a incerteza expandida, que foi calculada pela abordagem *top down* (ISO 11352) e apresentados com um e dois algarismos significativos na tabela 7.38 e 7.39.

Tabela 7.38- Expressão de resultados da gama de trabalho usando 1 algarismo significativo na incerteza

Composto	Gama baixa ($\mu\text{g/L}$)	Gama alta ($\mu\text{g/L}$)
4-etilfenol (I)	$0,03 \pm 0,01$	$0,2 \pm 0,1$
4-terc-butilfenol (II)	$0,6 \pm 0,2$	6 ± 2
2,6-di-terc-butil-p-benzoquinona (III)	$0,6 \pm 0,2$	6 ± 2
2,4-di-terc-butilfenol (IV)	$0,6 \pm 0,2$	6 ± 2
3,5-di-terc-butil-4-hidroxibenzaldeído (VI)	$0,6 \pm 0,3$	6 ± 3
3,5-di-terc-butil-4-hidroxiacetofenona (VII)	$0,6 \pm 0,3$	6 ± 2
3-(3,5-di-terc-butil-4-hidroxifenil) propionato de metilo (IX)	$0,6 \pm 0,3$	6 ± 2

Tabela 7.39- Expressão de resultados da gama de trabalho usando 2 algarismos significativos na incerteza

Composto	Gama baixa ($\mu\text{g/L}$)	Gama alta ($\mu\text{g/L}$)
4-etilfenol (I)	$0,026 \pm 0,011$	$0,233 \pm 0,096$
4-terc-butilfenol (II)	$0,63 \pm 0,24$	$5,6 \pm 2,1$
2,6-di-terc-butil-p-benzoquinona (III)	$0,63 \pm 0,23$	$5,6 \pm 2,1$
2,4-di-terc-butilfenol (IV)	$0,63 \pm 0,24$	$5,6 \pm 2,1$
3,5-di-terc-butil-4-hidroxibenzaldeído (VI)	$0,63 \pm 0,30$	$5,6 \pm 2,7$
3,5-di-terc-butil-4-hidroxiacetofenona (VII)	$0,63 \pm 0,27$	$5,6 \pm 2,4$
3-(3,5-di-terc-butil-4-hidroxifenil) propionato de metilo (IX)	$0,63 \pm 0,26$	$5,6 \pm 2,4$

7.4 Ensaios de migração a materiais

Após a validação do método de ensaio procedeu-se a ensaios de migração de materiais orgânicos em contacto com água, de modo a avaliar a aplicabilidade do método de ensaio em situações reais. Para tal, foram seleccionados 8 materiais orgânicos diferentes usados em contacto com água do sistema de abastecimento, que foram submetidos a ensaios de migração de acordo com a norma EN 12873-1 e a EN 12873-2, método usado em rotina no laboratório de análises de água da EPAL. Os ensaios de migração foram efetuados com 2 tipos de água de migração: clorada (1mg/L de cloro) e não clorada.

Tendo em conta as dimensões dos materiais (capítulo 6.9.1) e o volume de água necessário para análise dos parâmetros químicos pretendidos, calculou-se a razão S/V para cada um dos materiais estudados, tal como se pode observar na tabela 7.40. Foram realizados 2 ensaios ao material B com diferentes razões S/V. As concentrações de cloro das águas cloradas utilizadas nos ensaios para cada material estão explicitadas no Anexo K.

Tabela 7.40-Parâmetros necessários à realização dos ensaios a materiais

Designação	Área superficial do material (dm ²)	N.º de provetes	N.º de tubos	Volume do ensaio (dm ³)	Razão S/V (dm ⁻¹)	FC (dia.dm ⁻¹)
A	1,32	2	-	0,2	6,6	10
B1	1,55	3	-	0,3	5,2	10
B2	1,55	3	-	0,15	10,3	10
C	1,10	2	-	0,2	5,5	1
D	1,49	3	-	0,2	7,4	10
E	4,21	2	-	0,8	5,3	0,01
F	5,5	-	1	0,6	9,9	10
G	5,0	-	8 (por imersão)	1,0	5,1	10
H	6,5	-	1	0,6	10,2	10

As águas de migração resultantes dos ensaios aos materiais foram analisadas por LLE-GC/MS de modo a pesquisar se ocorre a migração dos compostos em estudo. A confirmação da presença dos compostos numa água de migração foi feita pela análise do tempo de retenção e pela razão entre o sinal cromatográfico de cada ião de qualificação e do ião de quantificação, característica de cada composto.

Os resultados obtidos estão apresentados na tabela 7.41 e 7.42. Em paralelo, foram também realizados ensaios de migração apenas com água de ensaio (branco). Estes ensaios em branco não revelaram a presença de qualquer um dos compostos em estudo. A concentração estimada na torneira do consumidor (C_{tap}) foi calculada tendo em conta a taxa de migração referente ao 3.º ensaio de migração e o fator de conversão (Anexo K).

É possível confirmar a identificação e a quantificação dos compostos 2,6-di-terc-butil-p-benzoquinona (III), 2,4-di-terc-butilfenol (IV), 3,5-di-terc-butil-4-hidroxibenzaldeído (VII) e do 3-(3,5-di-terc-butil-4-hidroxifenil) propionato de metilo (IX) nos materiais analisados. No final da 3.ª migração, não foi detetada a presença dos compostos nas amostras dos diferentes materiais, com concentrações acima de 0,8 $\mu\text{g.L}^{-1}$ para o composto III; 0,6 $\mu\text{g.L}^{-1}$ para o composto IV; 0,2 $\mu\text{g.L}^{-1}$ para o composto VI e 0,3 $\mu\text{g.L}^{-1}$ para o composto IX.

Para o material B (poliamina epóxi) em que foram estudadas duas razões S/V diferentes, verificou-se que as taxas de migração para a 3.ª migração nestes dois ensaios distintos, para o composto 2,4-di-terc-butilfenol, não foram significativamente diferentes.

O composto 2,6-di-terc-butil-p-benzoquinona foi essencialmente detetado nos ensaios de migração de materiais à base de polietileno, tanto nos ensaios efetuados com água clorada como com água não clorada.

O composto 2,4-di-terc-butilfenol foi detetado nas águas de migração de diversos tipos de materiais orgânicos, essencialmente nos ensaios com água não clorada.

O composto 3-(3,5-di-terc-butil-4-hidroxifenil) propionato de metilo foi detetado em amostras de águas de migração resultantes dos ensaios exclusivamente com água não clorada em materiais de polietileno.

Contudo, pelos resultados obtidos, confirma-se que todos os materiais cumprem os requisitos necessários para estar em contacto com a água, visto que o C_{tap} dos compostos quantificados é inferior ao valor do MTC_{tap} usado como referência e indicado no documento “*4MSI Draft Common Approach on Organic Materials – Part C*”.

Tabela 7.41- Concentração dos compostos em estudo na amostra de migração com água clorada e não clorada parte 1/2

Composto	Material	Concentração na amostra (a_n^T)		
		Ensaio sem cloro / Ensaio com cloro		
		(µg/L)		
		1. ^a Migração	2. ^a Migração	3. ^a Migração
2,6-di-terc-butil-p-benzoquinona (III)	A	Amostra com cloro – 0,29		
	B1	Amostra com cloro – 0,41		
	C	Amostra sem cloro – 0,52	Amostra sem cloro – 0,36	Amostra sem cloro – 0,33
		Amostra com cloro – 0,70	Amostra com cloro – 0,63	Amostra com cloro – 0,72
	F	Amostra sem cloro – 0,55	Amostra sem cloro – 0,32	Amostra sem cloro – 0,29
		Amostra com cloro – 1,35	Amostra com cloro – 1,85	Amostra com cloro – 2,41
	H	Amostra sem cloro – 0,25	Amostra sem cloro – 0,52	Amostra sem cloro – 0,46
		Amostra com cloro – 0,42	Amostra com cloro – 1,29	Amostra com cloro – 1,29
2,4-di-terc-butilfenol (IV)	A	Amostra sem cloro – 0,35		
	B1	Amostra sem cloro – 1,33	Amostra sem cloro – 0,88	Amostra sem cloro – 0,88
		Amostra com cloro – 0,48		
	B2	Amostra sem cloro – 2,21	Amostra sem cloro – 1,23	Amostra sem cloro – 1,38
	C	Amostra sem cloro – 0,64	Amostra sem cloro – 0,51	Amostra sem cloro – 0,40
		Amostra com cloro – 1,09	Amostra com cloro – 0,52	Amostra com cloro – 0,33
	F	Amostra sem cloro – 0,66	Amostra sem cloro – 0,55	Amostra sem cloro – 0,42
	H	Amostra sem cloro – 0,45	Amostra sem cloro – 0,59	Amostra sem cloro – 0,65

Tabela 7.41 - Concentração dos compostos em estudo na amostra de migração com água clorada e não clorada parte 2/2

Composto	Material	Concentração na amostra (a_n^T)		
		Ensaio sem cloro / Ensaio com cloro		
		(µg/L)		
		1.ª Migração	2.ª Migração	3.ª Migração
3,5-di-terc-butil-4-hidroxibenzaldeído (VI)	E	Amostra sem cloro – 0,49	Amostra sem cloro – *	Amostra sem cloro –0,74
		Amostra com cloro – 0,38	Amostra com cloro – *	Amostra com cloro –0,73
	H			Amostra sem cloro –0,62
3-(3,5-di-terc-butil-4-hidroxifenil) propionato de metilo (IX)	F	Amostra sem cloro – 0,53	Amostra sem cloro – 0,57	Amostra sem cloro – 0,36
	H	Amostra sem cloro – 0,64	Amostra sem cloro – 0,72	Amostra sem cloro – 0,78

*Resultados não atingidos devido à quebra da ampola de agitação

Tabela 7.42- Taxa de migração e concentração estimada na torneira do consumidor dos compostos no ensaio sem cloro e no ensaio com cloro parte 1/2

Composto	Material	Taxa de migração ($\mu\text{g}.\text{dm}^{-2}.\text{d}^{-1}$)			C_{tap} ($\mu\text{g}.\text{L}^{-1}$)	MTC_{tap} ($\mu\text{g}.\text{L}^{-1}$)
		1.ª Migração	2.ª Migração	3.ª Migração		
2,6-di-terc-butil-p-benzoquinona (III)	A	Amostra com cloro – 0,014				
	B1	Amostra com cloro – 0,026				
	C	Amostra sem cloro – 0,032	Amostra sem cloro – 0,022	Amostra sem cloro – 0,020	0,020	2,5
		Amostra com cloro – 0,042	Amostra com cloro – 0,038	Amostra com cloro – 0,043	0,043	
	F	Amostra sem cloro – 0,019	Amostra sem cloro – 0,011	Amostra sem cloro – 0,010	0,10	
		Amostra com cloro – 0,047	Amostra com cloro – 0,064	Amostra com cloro – 0,084	0,84	
	H	Amostra sem cloro – 0,008	Amostra sem cloro – 0,017	Amostra sem cloro – 0,015	0,15	
		Amostra com cloro – 0,014	Amostra com cloro – 0,042	Amostra com cloro – 0,042	0,42	
2,4-di-terc-butilfenol (IV)	A	Amostra sem cloro – 0,018				
	B1	Amostra sem cloro – 0,085	Amostra sem cloro – 0,057	Amostra sem cloro – 0,056	0,56	250
		Amostra com cloro – 0,031				
	B2	Amostra sem cloro – 0,071	Amostra sem cloro – 0,040	Amostra sem cloro – 0,045	0,45	
	C	Amostra sem cloro – 0,039	Amostra sem cloro – 0,031	Amostra sem cloro – 0,025	0,025	
		Amostra com cloro – 0,066	Amostra com cloro – 0,032	Amostra com cloro – 0,020	0,020	
	F	Amostra sem cloro – 0,023	Amostra sem cloro – 0,019	Amostra sem cloro – 0,015	0,15	
	H	Amostra sem cloro – 0,015	Amostra sem cloro – 0,019	Amostra sem cloro – 0,021	0,21	

Tabela 7.42 - Taxa de migração e concentração estimada na torneira do consumidor dos compostos no ensaio sem cloro e no ensaio com cloro parte 2/2

Composto	Material	Taxa de migração ($\mu\text{g}.\text{dm}^{-2}.\text{d}^{-1}$)			C_{tap} ($\mu\text{g}.\text{L}^{-1}$)	MTC_{tap} ($\mu\text{g}.\text{L}^{-1}$)
		1. ^a Migração	2. ^a Migração	3. ^a Migração		
3,5-di-terc-butil-4-hidroxibenzaldeído (VI)	E	Amostra sem cloro – 0,031	Amostra sem cloro – *	Amostra sem cloro – 0,047	0,00047	2,5
		Amostra com cloro – 0,024	Amostra com cloro – *	Amostra com cloro – 0,046	0,00046	
	H			Amostra sem cloro – 0,020	0,20	
3-(3,5-di-terc-butil-4-hidroxifenil) propionato de metilo (IX)	F	Amostra sem cloro – 0,018	Amostra sem cloro – 0,020	Amostra sem cloro – 0,013	0,13	50
	H	Amostra sem cloro – 0,021	Amostra sem cloro – 0,023	Amostra sem cloro – 0,025	0,25	

*Resultados não atingidos devido à quebra da ampola de agitação

CONCLUSÃO

O objetivo deste trabalho consistiu na validação e implementação de um método de ensaio para a análise de produtos de degradação de agentes estabilizantes usados na composição de materiais em contacto com a água de consumo humano. O 4-etilfenol, o 4-terc-butilfenol, 2,6-di-terc-butil-p-benzoquinona, o 2,4-di-terc-butilfenol, o 2,6-di-terc-butil-4-vinilfenol, o 3,5-di-terc-butil-4-hidroxibenzaldeído, o 3,5-di-terc-butil-4-hidroxiacetofenona, o 7,9-di-terc-butil-1-oxaspiro(4,5)deca-6,9-dieno-2,8-diona, o 3-(3,5-di-terc-butil-4-hidroxifenil) propionato de metilo e o ácido 3-(3,5-di-terc-butil-4-hidroxifenil) propiónico foram alvo deste estudo.

A técnica analítica selecionada foi a Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrometria de Massas (GC/MS). As condições ideais para a identificação dos compostos em estudo foram obtidas pela análise por GC/MS em modo *Full Scan* de cada composto, de modo a identificar o íon de qualificação, os íões de quantificação, assim como os respetivos tempos de retenção, característicos de cada composto em estudo.

Conclui-se que a melhor técnica de preparação de amostra é a Extração Líquido-Líquido (LLE). Na metodologia por Extração em Fase Sólida (SPE) foram encontradas as seguintes limitações: efeitos de matriz entre 35% e 822%, dependendo do composto e contaminação do branco (sinal > LOD) devido à inadequabilidade do cartucho.

Posto isto, a análise em rotina destes compostos pode ser realizada conforme a metodologia LLE-GC/MS.

Para a técnica de preparação de amostra LLE, verificou-se que o efeito de matriz apresentou uma percentagem entre 19% e 64%, o que causava uma intensificação do sinal real levando à necessidade de implementar padrões internos, de modo a corrigir o efeito de matriz. Depois de averiguar quais os padrões internos com o sinal mais semelhante aos compostos em estudo, optou-se pelo 4-etilfenol-d₁₀ e pelo 4-terc-butil-d₉-fenol-2,3,5,6-d₄.

Os testes de linearidade realizados aos compostos em estudo com PI demonstraram que as retas de calibração apresentavam um bom ajuste linear para o conjunto de dados da calibração por aplicação do método dos mínimos quadrados. A gama de trabalho escolhida para o 4-etilfenol (I) encontra-se entre 5,2 e 46,6 µg/L e para os restantes compostos encontra-se entre 125 e 1125 µg/L. O coeficiente de correlação no grupo dos compostos em estudo foi superior a 0,9997 e o coeficiente de variação do método foi inferior a 1,41%. Todos os compostos em estudo cumpriram o teste de Mandel.

Mais ainda, os critérios de aceitação do Teste de RIKILT e do Teste das Áreas Normalizadas apenas foram cumpridos pelos compostos 4-etilfenol (I), 3,5-di-terc-butil-4-hidroxibenzaldeído (VI) e 3,5-di-terc-butil-4-hidroxiacetofenona (VII) o que significa que para os restantes produtos de degradação a quantificação não pode ser realizada pelo fator de resposta.

A homogeneidade de variâncias também não foi garantida, no entanto considerou-se suficiente os testes anteriores para assegurar a gama de linearidade dos analitos.

Os limites de deteção e quantificação instrumentais foram estimados através de ensaios de repetibilidade, pela reta de calibração e pela razão sinal ruído. Os limiares analíticos instrumentais conseguidos pela calibração são considerados como a melhor estimativa sendo que para o 4-etilfenol (I) o LOQ é de 3,37 µg/L e para os restantes compostos varia entre 62 µg/L e 82 µg/L.

Os estudos de precisão em condições de repetibilidade e de precisão intermédia apresentaram um desvio padrão relativo favorável entre 2% e 8% e entre 1% e 10%, respetivamente.

Os estudos de estabilidade do extrato ao longo do tempo demonstraram que este podia ser armazenado a uma temperatura de -80 °C durante pelo menos 5 semanas (%RSD<20%). Os estudos de estabilidade de uma amostra permitiram avaliar a sua estabilidade durante 12 dias até à preparação da amostra (%RSD<13%).

Os ensaios de recuperação foram realizados em três tipos diferentes de matrizes. A recuperação média global do método registou valores entre 82% (4-terc-butilfenol (II)) e 96% (3-(3,5-di-terc-butil-4-hidroxifenil) propionato de metilo (IX)) com desvios padrão relativos aceitáveis (%RSD<22%).

As incertezas expandidas associadas ao método de ensaio também foram estimadas. Pela metodologia “passo a passo” a incerteza expandida mais alta foi obtida para o 4-terc-butilfenol (20%) devido à elevada contribuição da incerteza padrão associada à interpolação da reta (9%). Pela norma ISO 11352, a incerteza expandida situou-se entre 38% e 48% graças ao elevado valor da componente da incerteza associada à exatidão. Já pelo guia Nordtest, a incerteza expandida registou os valores mais baixos entre 8% e 11%. Como se considerou o valor limite de 50%, que foi estabelecido pelo DL 152/2017 e pela Diretiva (UE) 2020/2184, pode-se concluir que os valores obtidos são aceitáveis.

Os ensaios de migração a diversos materiais permitiram a identificação e quantificação do 2,6-di-terc-butil-p-benzoquinona, 2,4-di-terc-butilfenol, 3,5-di-terc-butil-4-hidroxibenzaldeído e do 3-(3,5-di-terc-butil-4-hidroxifenil) propionato de metilo em diferentes materiais utilizados em tubagens e no sistema de armazenamento de água. Com base nos ensaios realizados, os materiais analisados cumpriram os critérios definidos no documento “*4MSI Draft Common Approach on Organic Materials – Part C*”, sendo que a concentração estimada na torneira do consumidor para os compostos encontrados foi inferior à concentração máxima tolerável.

Os principais resultados obtidos podem ser observados na tabela 8.1 e 8.2, para cada um dos compostos estudados.

Tabela 8.1- Resumo final dos estudos de linearidade instrumentais para os compostos em estudo com padrão interno

Composto	Gama de trabalho cromatográfica (µg/L)	Coefficiente de correlação	Limite de Detecção instrumental (µg/L)	Limite de Quantificação instrumental (µg/L)
4-etilfenol	5,2 - 46,6	0,9997	1,01	3,37
4-terc-butilfenol	125-1125	0,9999	18,71	62,37
2,6-di-terc-butil-p-benzoquinona	125-1125	0,9998	20,10	66,99
2,4-di-terc-butilfenol	125-1125	0,9997	24,50	81,68
3,5-di-terc-butil-4-hidroxibenzaldeído	125-1125	0,9998	22,42	74,72
3,5-di-terc-butil-4-hidroxiacetofenona	125-1125	0,9998	22,33	74,42
3-(3,5-di-terc-butil-4-hidroxifenil) propionato de metilo	125-1125	0,9999	18,51	61,69

Tabela 8.2-Resumo dos resultados obtidos do método de ensaio

Composto	Gama de trabalho global do método (µg/L)	Recuperação média global (%)	Limite de quantificação do método (µg/L)
4-etilfenol	0,029- 0,26	88	0,022
4-terc-butilfenol	0,76- 6,84	82	0,57
2,6-di-terc-butil-p-benzoquinona	0,74- 6,64	85	0,55
2,4-di-terc-butilfenol	0,75- 6,71	84	0,56
3,5-di-terc-butil-4-hidroxibenzaldeído	0,66 - 5,91	95	0,49
3,5-di-terc-butil-4-hidroxiacetofenona	0,68 - 6,15	91	0,51
3-(3,5-di-terc-butil-4-hidroxifenil) propionato de metilo	0,65- 5,84	96	0,49

Deste modo, foi possível cumprir os requisitos impostos ao desenvolvimento de um método analítico para o composto I, II, III, IV, VI, VII e IX. No entanto, o método não foi validado para todo o grupo inicial dos produtos de degradação em estudo.

❖ Perspetivas futuras

Como propostas de trabalho futuras, seria interessante tentar expandir as gamas de linearidade obtidas para os compostos II, III, IV e IX e tentar encontrar outras que cumprissem os testes de rikilt e das áreas normalizadas.

A validação dos compostos 7,9-di-terc-butil-1-oxaspiro (4,5) deca-6,9-dieno-2,8-diona (VIII) e do ácido 3-(3,5-di-terc-butil-4- hidroxifenil) propiónico (X) deverá ser alvo de um estudo futuro. Dada a interferência destes compostos com o 2,6-di-terc-butil-4-vinilfenol (V) e com o 3-(3,5-di-terc-butil-4-hidroxifenil) propionato de metilo (IX), não podem ser analisados na mesma sequência de trabalho.

Já para o 2,6-di-terc-butil-4-vinilfenol (V) foi impossível encontrar uma gama de trabalho que cumprisse os critérios associados ao valor limite do analito e sem existir contaminação do branco. Uma alternativa possível para a sua identificação seria utilizar o método desenvolvido por Armstrong et al. (2012) onde conseguiram identificar este composto empregando a Extração Sorptiva de Barra de Agitação acoplada a Cromatografia Gasosa com Espectrometria de Massa (SBSE-GC/MS). [127]

Como a técnica de preparação de amostra escolhida tem algumas desvantagens face à sua utilização poderá ponderar-se a sua substituição por uma técnica mais verde como o SPME por *headspace*. Esta técnica foi utilizada por Lützhøft et al., (2012) [20] que procedeu à identificação e quantificação dos compostos I, II, III, IV, VI, VII e IX.

Existem ainda outros produtos de degradação derivados de materiais plásticos que podem ser alvo de um estudo futuro: 2-tert-butilfenol, 2-tert-butil-4-metoxifenol, 2,6-di-tert-butil-4-metilfenol e n-pentilfenol.

Os agentes estabilizantes, que originam os produtos de degradação estudados, não puderam ser validados por cromatografia gasosa devido à elevada massa molecular que lhes é associada. Deste modo, no futuro deve ser implementado outro tipo de técnica como LC-MS ou HPLC.

Referências bibliográficas

- [1] "A Brief History of Water and Health from Ancient Civilizations to Modern Times," *Int. Water Assoc. Publ.*, [Online]. Disponível em: <https://www.iwapublishing.com/news/brief-history-water-and-health-ancient-civilizations-modern-times>.
- [2] "Water history for our times; IHP essays on water history; Vol.:2; 2011."
- [3] WHO, "Guidelines for drinking water quality, 2nd ed. Addendum to health criteria and other supporting information," *East. Mediterr. Reg. Off. Amman, Jordan*, vol. 2, pp. 132–388, 1996.
- [4] "DIRETIVA (UE) 2020/2184 DO PARLAMENTO EUROPEU E DO CONSELHO de 16 de dezembro de 2020 relativa à qualidade da água destinada ao consumo humano (reformulação)," *J. Of. da União Eur.*, no. L 435, pp. 1–62, 2020.
- [5] N. H. Omer, *Water Quality Parameters. In (Ed.), Water Quality - Science, Assessments and Policy*. IntechOpen, 2019.
- [6] "Importance of Water Quality and Testing," 2020. https://www.cdc.gov/healthywater/drinking/public/water_quality.html (acedido em Ago. 18, 2022).
- [7] "Water distribution system." https://www.wikiwand.com/en/Water_distribution_system (acedido em Jun. 19, 2022).
- [8] "Drinking Water Distribution Systems," *United States Environmental Protection Agency*, 2022. <https://www.epa.gov/dwsixyearreview/drinking-water-distribution-systems>.
- [9] S. Aaron, "Materials Used in Water Supply Pipes," *the Spruce*, 2022. <https://www.thespruce.com/types-of-pipe-used-for-water-2718736> (acedido em Jul. 19, 2022).
- [10] "How To Choose Water Tank, Steel Or Plastic?," *Turkney Project Solution*. <http://www.ansonindustry.com/choose-a-suitable-water-tank.html> (acedido em Jun. 19, 2022).
- [11] D. T. Roda, "Antioxidantes / Termoeestabilizantes," 2011. <http://www.ansonindustry.com/choose-a-suitable-water-tank.html>.
- [12] "Antioxidants to prevent Polymer Oxidation," *BASF*. <https://polymer-additives.specialchem.com/centers/antioxidants-to-prevent-polymer-oxidation> (acedido em Jun. 19, 2022).
- [13] D. Brocca, E. Arvin, and H. Mosbæk, "Identification of organic compounds migrating from polyethylene pipelines into drinking water," *Water Res.*, vol. 36, no. 15, pp. 3675–3680, 2002, doi: 10.1016/S0043-1354(02)00084-2.
- [14] R. Pitteloud and P. Dubs, "Antioxidants for Industrial Applications," vol. 9, no. 9, pp. 417–419, 1994.
- [15] "70331-94-1 | DTXSID1052450," *EPA - United States Environmental Protection Agency*. <https://comptox.epa.gov/dashboard/chemical/properties/DTXSID1052450> (acedido em Fev. 05, 2022).
- [16] "CAS DataBase List 1709-70-2," *Chemical Book*. https://www.chemicalbook.com/CASEN_1709-70-2.htm (acedido em Fev. 05, 2022).
- [17] "CAS DataBase List 2082-79-3," *Chemical Book*. https://www.chemicalbook.com/CASEN_2082-79-3.htm (acedido em Fev. 05, 2022).
- [18] M. Barcza, "Alquilação," *Escola de Engenharia de Lorena EEL-USP*. <https://sistemas.eel.usp.br/docentes/arquivos/1285870/63/Alquilacao.pdf> (acedido em Fev. 05, 2022).
- [19] "Alkylphenols," *Chemsec Sin List*. <https://sinlist.chemsec.org/chemical-groups/alkylphenols/> (acedido em Fev. 05, 2022).
- [20] H. C. H. Lützhøft *et al.*, "HS-SPME-GC-MS analysis of antioxidant degradation products migrating to drinking water from PE materials and PEX pipes," *Int. J. Environ. Anal. Chem.*, vol. 93, no. 6, pp. 593–612, 2013, doi: 10.1080/03067319.2012.727805.
- [21] 4MSI Common Approach, "Requirements and test methods for products made of Organic Materials in Contact with Drinking Water," no. February, pp. 1–28, 2019.
- [22] "4-terc-butylphenol," *ECHA - European Chemicals Agency*, 2022. <https://echa.europa.eu/pt/brief-profile/-/briefprofile/100.002.436> (acedido em Fev. 07, 2022).
- [23] "4-ethylphenol," *ECHA - European Chemicals Agency*, 2022. <https://echa.europa.eu/pt/brief-profile/-/briefprofile/100.004.181> (acedido em Fev. 07, 2022).

- [24] "2,6-di-terc-butyl-p-benzoquinone," *ECHA - European Chemicals Agency*, 2021. <https://echa.europa.eu/pt/substance-information/-/substanceinfo/100.010.861> (acedido em Fev. 07, 2022).
- [25] "2,4-di-terc-butylphenol," *ECHA - European Chemicals Agency*, 2022. <https://echa.europa.eu/pt/brief-profile/-/briefprofile/100.002.303> (acedido em Fev. 07, 2022).
- [26] "Methyl 3-(3,5-di-terc-butyl-4-hydroxyphenyl)propionate," *ECHA - European Chemicals Agency*, 2022. <https://echa.europa.eu/pt/brief-profile/-/briefprofile/100.026.351> (acedido em Fev. 07, 2022).
- [27] "3,5-Di-terc-butyl-4-hydroxybenzaldehyde," *Chemical Book*, 2022. https://www.chemicalbook.com/ChemicalProductProperty_EN_CB7282782.htm (acedido em Fev. 07, 2022).
- [28] "CAS DataBase List 14035-33-7," *Chemical Book*, 2017. https://www.chemicalbook.com/CASEN_14035-33-7.htm (acedido em Fev. 05, 2022).
- [29] "CAS DataBase List 82304-66-3," *Chemical Book*, 2017. https://www.chemicalbook.com/CASEN_82304-66-3.htm (acedido em Fev. 07, 2022).
- [30] "CAS DataBase List 20170-32-5," *Chemical Book*, 2017. https://www.chemicalbook.com/CASEN_20170-32-5.htm (acedido em Fev. 07, 2022).
- [31] "2,6-diterc-butyl-4-vinylphenol," *Chemical Book*, 2022. https://www.chemicalbook.com/ChemicalProductProperty_EN_CB83154043.htm (acedido em Fev. 07, 2022).
- [32] C. Kalweit, E. Stottmeister, and T. Rapp, "Contaminants migrating from crossed-linked polyethylene pipes and their effect on drinking water odour," *Water Res.*, vol. 161, pp. 341–353, 2019, doi: 10.1016/j.watres.2019.06.001.
- [33] B. R. Stern and G. Lagos, "Are there health risks from the migration of chemical substances from plastic pipes into drinking water? A review," *Hum. Ecol. Risk Assess.*, vol. 14, no. 4, pp. 753–779, 2008, doi: 10.1080/10807030802235219.
- [34] M. Connell *et al.*, "PEX and PP water pipes: Assimilable carbon, chemicals, and odors," *J. Am. Water Works Assoc.*, vol. 108, no. 4, pp. E192–E204, 2016, doi: 10.5942/jawwa.2016.108.0016.
- [35] D. Löschner, T. Rapp, F. U. Schlosser, R. Schuster, E. Stottmeister, and S. Zander, "Experience with the application of the draft European Standard prEN 15768 to the identification of leachable organic substances from materials in contact with drinking water by GC-MS," *Anal. Methods*, vol. 3, no. 11, pp. 2547–2556, 2011, doi: 10.1039/c1ay05471f.
- [36] C. Hametner, "Polypropylene pipes for drinking water supply," *J. Macromol. Sci. - Pure Appl. Chem.*, vol. 36 A, no. 11, pp. 1751–1758, 1999, doi: 10.1081/MA-100101625.
- [37] M. Bertoldo and F. Ciardelli, "Water extraction and degradation of a sterically hindered phenolic antioxidant in polypropylene films," *Polymer (Guildf.)*, vol. 45, no. 26, pp. 8751–8759, 2004, doi: 10.1016/j.polymer.2004.10.044.
- [38] M. Remberger, L. Kaj, A. Palm, J. Sternbeck, and E. K. E. Brorström-lundén, "Screening tertiary butylphenols, methylphenols, and long-chain alkylphenols in the Swedish environment," *IVL Rep.*, pp. 1–96, 2003, [Online]. Disponível em: <http://www.ivl.se/download/18.7df4c4e812d2da6a416800071799/B1594.pdf>.
- [39] A. Espert, L. A. De Las Heras, and S. Karlsson, "Emission of possible odorous low molecular weight compounds in recycled biofibre/polypropylene composites monitored by head-space SPME-GC-MS," *Polym. Degrad. Stab.*, vol. 90, no. 3, pp. 555–562, 2005, doi: 10.1016/j.polymdegradstab.2005.03.009.
- [40] R. Rodil, J. B. Quintana, G. Basaglia, M. C. Pietrogrande, and R. Cela, "Determination of synthetic phenolic antioxidants and their metabolites in water samples by downscaled solid-phase extraction, silylation and gas chromatography-mass spectrometry," *J. Chromatogr. A*, vol. 1217, no. 41, pp. 6428–6435, 2010, doi: 10.1016/j.chroma.2010.08.020.
- [41] E. Fries and W. Püttmann, "Analysis of the antioxidant butylated hydroxytoluene (BHT) in water by means of solid phase extraction combined with GC/MS," *Water Res.*, vol. 36, no. 9, pp. 2319–2327, 2002, doi: 10.1016/S0043-1354(01)00453-5.
- [42] F. Akoueson *et al.*, "Identification and quantification of plastic additives using Pyrolysis-GC / MS : a review To cite this version : HAL Id : anses-03137716," 2022.
- [43] I. Skjevrak, C. Brede, I. Steffensen, A. Mikalsen, P. Fjeldal, and H. Herikstad, "Non-targeted multi-component analytical surveillance of plastic food contact materials: Identification of substances not included in EU positive lists and their risk assessment," 2007, doi: 10.1080/02652030500090877.

- [44] “APROVAÇÃO EM PORTUGAL PARA OS PRODUTOS EM CONTACTO COM A ÁGUA DESTINADA AO CONSUMO HUMANO Nota Justificativa,” *Entidade Reguladora dos Serviços Águas e Resíduos*, pp. i–ii, 2015.
- [45] P. Europeu and P. Europeu, “DIRECTIVA 98/83/CE DO CONSELHO de,” *J. Of. das Comunidades Eur. Dir.*, no. L 330/32, 1998.
- [46] Assembleia da República, “Decreto-Lei n.º 152/2017,” *Diário da República*, 1ª série - N.º 235 - 7 dezembro 2017, pp. 6555–6576, 2017, [Online]. Disponível em: <https://dre.pt/dre/detalhe/decreto-lei/152-2017-114315242>.
- [47] “PUBLICADA NOVA DIRETIVA DA UNIÃO EUROPEIA, (UE) 2020/2184, RELATIVA À QUALIDADE DA ÁGUA DESTINADA AO CONSUMO HUMANO (REFORMULAÇÃO),” *Entidade Reguladora dos Serviços de Águas e Resíduos*, 2021. <https://dev.ersar.pt/pt/site-comunicacao/site-noticias/Paginas/publicada-nova-diretiva-UE-20202184.aspx> (acedido em Fev. 08, 2022).
- [48] “Approval and Harmonization – 4MS Initiative,” *Umwelt Bundesamt*, 2021. <https://dev.ersar.pt/pt/site-comunicacao/site-noticias/Paginas/publicada-nova-diretiva-UE-20202184.aspx>.
- [49] NSF International, “Drinking Water System Components - Health Effects. NSF/ANSI 61 - 2016,” *Am. Natl. Stand.*, pp. 1–65, 2016.
- [50] “Publicações,” *EPAL - Empresa Portuguesa das Águas Livres, S.A.*, 2022. <https://www.epal.pt/EPAL/menu/epal/publicações> (acedido em Jul. 09, 2022).
- [51] “SISTEMA DE ABASTECIMENTO/ SISTEMA DE PRODUÇÃO E TRANSPORTE/ INFRA-ESTRUTURAS,” *EPAL - Empresa Portuguesa das Águas Livres, S.A.*, 2022. <https://www.epal.pt/EPAL/menu/água/sistema-de-abastecimento/sistema-de-produção-e-transporte/infra-estruturas> (acedido em Jul. 09, 2022).
- [52] M. Rosa, “Da Companhia das Águas de Lisboa à EPAL,” *J. Águas Livres*, no. Edição especial N.º 8463/85, pp. 2–16, 2008, [Online]. Disponível em: https://repositorio.ul.pt/bitstream/10451/20817/1/ICS_RACarvalho_Abastecimento_Outreach.pdf.
- [53] “Folheto Controlo Qualidade da Água,” *EPAL - Empres. Port. das Águas Livres, S.A.*, no. 1.ª edição, 2018, [Online]. Disponível em: <https://www.epal.pt/EPAL/docs/default-source/agua/folheto-controlo-qualidade-da-água.pdf?sfvrsn=2>.
- [54] “Plano de Controlo da Qualidade da Água nos Sistemas de Abastecimento da EPAL e da AdVT,” *J. Águas Livres*, vol. 2/2022, no. N.º295, 2022.
- [55] N. J. K. Simpson, *SOLID-PHASE EXTRACTION - Principles Techniques and Applications*. Harbor City, California: Marcel Dekker Inc, 2000.
- [56] C. Poole, *Principles and Practice of Solid Phase Extraction*, vol. 2. Elsevier, 2002.
- [57] D. M. Diehl, “EXTRACTION | Sorptive Extraction Methods,” *Encycl. Sep. Sci.*, pp. 1–7, 2007, doi: 10.1016/b978-012226770-3/10678-8.
- [58] Thermo Scientific, “Removing Uncertainty by Applying Science to SPE,” *Polygen*, no. 1, pp. 1–144, 2011, [Online]. Disponível em: http://www.polygen.com.pl/imagesdb_spe---application-book-131002-0.pdf.
- [59] Thermo Scientific, “Solid Phase Extraction Guide - What is SPE?” <https://www.thermofisher.com/pt/en/home/industrial/chromatography/chromatography-sample-preparation/sample-preparation-consumables/solid-phase-extraction-consumables/spe-guide.html> (acedido em Jun. 17, 2022).
- [60] F. Novais and E. Poletti, “REVALIDAÇÃO DE MÉTODO DE DETECÇÃO DE DROGAS DE ABUSO EM FLUIDO ORAL ATRAVÉS DE CROMATOGRAFIA LÍQUIDA ACOPLADA À ESPECTROMETRIA DE MASSAS EM SÉRIE.”
- [61] A. Zwir-Ferenc and M. Biziuk, “Solid phase extraction technique - Trends, opportunities and applications,” *Polish J. Environ. Stud.*, vol. 15, no. 5, pp. 677–690, 2006.
- [62] D. W. W. Douglas E. Raynie, “Understanding and Improving Solid-Phase Extraction,” *LGC North Am.*, vol. 32, no. 2, 2014, Accessed: May 24, 2022. [Online]. Disponível em: <https://www.chromatographyonline.com/view/understanding-and-improving-solid-phase-extraction-1>.
- [63] M. da C. Castilho, F. Ramos, and M. I. N. Silveira, *Extracção em Fase Sólida (EFS):- Tipos de Enchimento*. Boletim da Sociedade Portuguesa de Química, 1995.
- [64] K. Bielicka-Daszkiwicz and A. Voelkel, “Theoretical and experimental methods of determination of the breakthrough volume of SPE sorbents,” *Talanta*, vol. 80, no. 2, pp. 614–621, 2009, doi:

- 10.1016/j.talanta.2009.07.037.
- [65] J. D. Thornton, "EXTRACTION, LIQUID-LIQUID," *Thermopedia*, 2011, doi: 10.1615/AtoZ.e.extraction_liquid-liquid.
- [66] J. D. Law and T. A. Todd, "Liquid-liquid extraction equipment," *Hydrometallurgy*, vol. 42, no. 3, p. 441, 1996, doi: 10.1016/0304-386x(95)00084-t.
- [67] F. F. Cantwell and M. Losier, "Liquid-liquid extraction," pp. 297–340, 2002.
- [68] A. Sandtorv, *How to be a Successful Organic Chemist*. LibreTexts, 2017.
- [69] C. Irina and A. Barbulescu, "Liquid-Liquid Extraction with and without a Chemical Reaction," *Mass Transf. Multiph. Syst. its Appl.*, no. June 2014, 2011, doi: 10.5772/15229.
- [70] P. Luis, *Membrane contactors*. Elsevier Inc., 2018.
- [71] W. Rahman, "Liquid-Liquid extraction Introduction," 2001. <https://old.amu.ac.in/emp/studym/100013304..pdf> (acedido em Abr. 22, 2022).
- [72] T. Rupasinghe, "Encyclopedia of Lipidomics," *Encycl. Lipidomics*, no. D, pp. 1–2, 2020, doi: 10.1007/978-94-007-7864-1.
- [73] D. Harvey, *DePauw University Analytical Chemistry 3.0*. LibreTexts, 2022.
- [74] L. S. Ettre, "The Centenary of 'Chromatography,'" *LCGC North Am.*, vol. 24, no. 7, pp. 680–692, 2006, [Online]. Disponível em: <https://www.chromatographyonline.com/view/centenary-chromatography>.
- [75] "Shimadzu's Fundamental Guide to Gas Chromatography- mass spectrometry (gc-ms)," *SpringerReference*, no. 1, 2020, doi: 10.1007/springerreference_30045.
- [76] "Gas Chromatography-Mass Spectrometry - A National Historic Chemical Landmark," *ACS Chemistry for Life*, 2022. <https://www.acs.org/content/acs/en/education/whatischemistry/landmarks/gas-chromatography-mass-spectrometry.html> (acedido em Maio 16, 2022).
- [77] R. A. Shellie, "Gas Chromatography," *Encycl. Forensic Sci. Second Ed.*, vol. 1, pp. 579–585, 2013, doi: 10.1016/B978-0-12-382165-2.00245-2.
- [78] D. J. Harvey, "Gas chromatography | Gas chromatography/mass spectrometry," *Encycl. Anal. Sci.*, pp. 169–179, 2019, doi: 10.1016/B978-0-12-409547-2.14103-4.
- [79] "What is Gas Chromatography?," *Shimadzu*. <https://www.ssi.shimadzu.com/service-support/faq/gas-chromatography/what-is-gas-chromatography/index.html> (acedido em Abr. 23, 2022).
- [80] "Basics & Fundamentals: Gas Chromatography," *Shimadzu*, p. 21, 2020.
- [81] GL sciences, "Sample Introduction in Capillary Gas Chromatography," 2016. <https://www.glsciences.eu/optic/gc-injections-manual.pdf> (acedido em Maio 02, 2022).
- [82] "Fundamentals of GC Columns," *Agilent Technologies*, 2022. <https://www.agilent.com/en/products/gas-chromatography/gccolumnsfundamentals> (acedido em Abr. 17, 2022).
- [83] M. M. Rahman, A. M. Abd El-Aty, J.-H. Choi, H.-C. Shin, S. C. Shin, and J.-H. Shim, "Basic Overview on Gas Chromatography Columns," *Anal. Sep. Sci.*, pp. 823–834, 2015, doi: 10.1002/9783527678129.assep024.
- [84] "Análise colunas GC," *Sungjin E&A*. <https://m.blog.naver.com/sj-lab/221799828553> (acedido em Jun. 07, 2022).
- [85] T. Taylor, "GC Temperature Programming—10 Things You Absolutely Need to Know," *LCGC North Am.*, vol. 33, no. 6, p. 438, 2015, [Online]. Disponível em: <https://www.chromatographyonline.com/view/gc-temperature-programming-10-things-you-absolutely-need-know>.
- [86] A. Braithwaite and F. J. Smith, "Gas Chromatography," *Chromatogr. Methods*, vol. 76, no. November, pp. 165–257, 2018, [Online]. Disponível em: http://link.springer.com/10.1007/978-94-011-0599-6_5.
- [87] R. P. Mazzarese, P. J. Zipfell, S. M. Bird, and M. W. Dong, "Chromatography Data Systems: Perspectives, Principles, and Trends," *LCGC North Am.*, vol. 37, no. 12, pp. 852–865, 2019.
- [88] H. M. McNair and J. M. Miller, *Basic Gas Chromatography - Techniques in Analytical Chemistry*. New York: Wiley-Interscience, 1998.
- [89] F. W. Willmott, *Modern Practice of Gas Chromatography*, vol. 29, no. 9. 1978.
- [90] A. Westman-Brinkmalm, J. Silberring, and G. Brinkmalm, "Separation Methods," *Mass Spectrom. Instrumentation, Interpret. Appl.*, pp. 105–115, 2008, doi: 10.1002/9780470395813.ch4.
- [91] D. A. Skoog, D. M. West, F. J. Holler, and S. R. Crouch, *Fundamentals of Analytical Chemistry*,

- 9th ed., vol. 7, no. 1. 2015.
- [92] R. Kaiser, *Theory of Gas Chromatography*, vol. 31, no. 11. Boston: Springer, 2013.
 - [93] G. E. Spangler, "Gas Chromatography: Theory and Thermodynamics, and Selectivity," *Anal. Sep. Sci.*, pp. 775–806, 2015, doi: 10.1002/9783527678129.assep022.
 - [94] K. L. Busch, "Mass spectrometry," *J. Chromatogr. A*, vol. 1040, no. 2, pp. 1–4, 2016.
 - [95] D. J. Harvey, "Mass Spectrometry - Ionization Methods Overview," *Encycl. Anal. Sci. Second Ed.*, pp. 350–359, 2004, doi: 10.1016/B0-12-369397-7/00348-4.
 - [96] S. S. Rubakhin and J. V. Sweedler, *Mass Spectrometry Imaging - Principles and Protocols*, vol. 656. 2010.
 - [97] P. B. Kyle, *Chapter 7 - Toxicology: GCMS*. Elsevier Inc., 2017.
 - [98] S. Medhe, "Mass Spectrometry: Detectors Review," [Http://www.Sciencepublishinggroup.Com](http://www.sciencepublishinggroup.com), vol. 3, no. 4, p. 51, 2018, doi: 10.11648/j.cbe.20180304.11.
 - [99] M. Kinter, "Mass spectrometry," *Anal. Chem.*, vol. 67, no. 12, pp. 493–497, 1995, doi: 10.1021/ac00108a034.
 - [100] T. H. Heim and A. M. Dietrich, "Sensory aspects and water quality impacts of chlorinated and chloraminated drinking water in contact with HDPE and cPVC pipe," *Water Res.*, vol. 41, no. 4, pp. 757–764, 2007, doi: 10.1016/j.watres.2006.11.028.
 - [101] EPAL - Empresa Portuguesa das Águas Livres S.A. Direção de Laboratórios, "Anexo Técnico de Acreditação L0242-1," *IPAC - Inst. Port. Acreditação*, pp. 2–5, 2013.
 - [102] EPAL - Empresa Portuguesa das Águas Livres S.A., "ME 50.16 Influência de Materiais não Metálicos e não Cimentícios na Água Destinada ao Consumo – Influência devido à Migração – Método de Ensaio para Materiais de Origem Fabril."
 - [103] "Guia Relacre 13 - Validação de Métodos Internos de Ensaio em Análise Química," *Assoc. Laboratórios Acreditados Port.*, 2000.
 - [104] EPAL - Empresa Portuguesa das Águas Livres S.A., "PT 29.04 Validação de Métodos de Ensaio Cromatográficos (GC, HPLC)," pp. 1–42.
 - [105] R. R. Freeman and D. Kukla, "The role of selectivity in gas chromatography," *J. Chromatogr. Sci.*, vol. 24, no. 9, pp. 392–395, 1986, doi: 10.1093/chromsci/24.9.392.
 - [106] B. Denoulet, "How to choose a stationary phase, optimize selectivity and get better resolution in chromatography." <https://www.barts-blog.net/how-to-choose-a-stationary-phase-optimize-selectivity-and-get-better-resolution-in-chromatography/> (acedido em Maio 24, 2022).
 - [107] D. Rood, "Gas chromatography problem solving and troubleshooting," *J. Chromatogr. Sci.*, vol. 42, no. 9, pp. 506–507, 2004, doi: 10.1093/chromsci/42.1.54.
 - [108] International organization for Standardization, "ISO 8466-1 Water Quality - Calibration and evaluation of analytical methods and estimation of performance characteristics," *Int. Organ. Stand.*, vol. 10406–1:20, pp. 3–6, 2019.
 - [109] International organization for Standardization, "ISO 8466-2:2001 Water quality — Calibration and evaluation of analytical methods and estimation of performance characteristics — Part 2: Calibration strategy for non-linear second-order calibration functions," vol. 2001, p. 12, 2001, [Online]. Disponível em: <https://www.iso.org/standard/34816.html>.
 - [110] "Guideline for the validation of analytical methods in chemistry," *Aust. Pestic. Vet. Med. Auth.*, no. October, 2004.
 - [111] *Guia Relacre 7*, no. Outubro. 1996.
 - [112] "How important is matrix effect in analyzing bioprocess samples?," *Batavia Biosciences*, 2022. <https://www.bataviabiosciences.com/matrix-effect/> (acedido em Jun. 09, 2022).
 - [113] W. Zhou, S. Yang, and P. G. Wang, "Matrix effects and application of matrix effect factor," *Bioanalysis*, vol. 9, no. 23, pp. 1839–1844, 2017, doi: 10.4155/bio-2017-0214.
 - [114] P. Panuwet *et al.*, "Biological Matrix Effects in Quantitative Tandem Mass Spectrometry-Based Analytical Methods: Advancing Biomonitoring," 2016. doi: 10.1080/10408347.2014.980775.Biological.
 - [115] R. Grant, "EVERYTHING YOU WANTED TO KNOW ABOUT INTERNAL STANDARDS, BUT WERE TO AFRAID TO ASK."
 - [116] European Commission, "Method Validation Procedures for Pesticide Residues Analysis in Food and Feed.," *Sante/11312/2021*, 2021, [Online]. Disponível em: https://www.eurl-pesticides.eu/userfiles/file/EurlALL/SANTE_11312_2021.pdf.
 - [117] International organization for Standardization, "ISO 11929-4 Determination of the characteristic limits (decision threshold, detection limit and limits of the coverage interval) for measurements of ionizing radiation — Fundamentals and application," vol. 2020, 2020.

- [118] Relacre, "Guia Relacre 31," 2006.
- [119] J. H. Buchmann and J. E. de S. Sarkis, "O conceito de incerteza aplicado aos processos de medição associados à preparação de uma solução de referência para calibração," *Quim. Nova*, vol. 25, no. 1, pp. 111–116, 2002, doi: 10.1590/s0100-40422002000100019.
- [120] M. A. Fahmey, M. A. Zayed, and Y. H. Keshk, "Comparative study on the fragmentation of some simple phenolic compounds using mass spectrometry and thermal analyses," *Thermochim. Acta*, vol. 366, no. 2, pp. 183–188, 2001, doi: 10.1016/S0040-6031(00)00724-3.
- [121] M. Tolinsk, *Typeset by Macmillan Publishing Solutions Printed and bound in United States of America*. 2009.
- [122] Q. Zheng, W. Fang, and J. Fan, "Determination of antioxidant irganox 1010 in polypropylene by infrared spectrometry," *IOP Conf. Ser. Earth Environ. Sci.*, vol. 514, no. 5, 2020, doi: 10.1088/1755-1315/514/5/052046.
- [123] "7 QUALITY OF ANALYTICAL PROCEDURES." <https://www.fao.org/3/W7295E/w7295e09.htm#7.5.3> sensitivity (acedido em Jun. 23, 2022).
- [124] S. Chandran and R. S. P. Singh, "Comparison of various international guidelines for analytical method validation," vol. 62, no. Green 1996, 2007, doi: 10.1691/ph.2007.1.5064.
- [125] B. Magnusson, M. Krysell, T. Näykki, and E. Sahlin, "Handbook for calculation of Measurement Uncertainty in Environmental Laboratories," no. January, 2012, [Online]. Disponível em: www.nordtest.info.
- [126] "ISO 11352 Water quality — Estimation of measurement uncertainty based on validation and quality control data Qualité," *Int. Organ. Stand.*, no. 1, 2012.
- [127] B. L. Armstrong, A. F. Senyurt, V. Narayan, X. Wang, L. Alquier, and G. Vas, "Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis Stir bar sorptive extraction combined with GC – MS / MS for determination of low level leachable components from implantable medical devices," *J. Pharm. Biomed. Anal.*, vol. 74, pp. 162–170, 2013, doi: 10.1016/j.jpba.2012.10.019.

ANEXOS

A. Propriedades Físico-químicas

Tabela A.1- Propriedades Físico-químicas dos produtos de degradação dos agentes estabilizantes [22–31]

Designação	N. ° CAS	Fórmula química	Massa molecular	Ponto de fusão a 101,3 kPa (°C)	Ponto de ebulição a 101,3 kPa (°C)	Solubilidade em água a 20 °C (mg/L)	Pressão de vapor a 20 °C (Pa)
I	123-07-9	C ₈ H ₁₀ O	122,16	45	215	740 (pH=4)	170
II	98-54-4	C ₁₀ H ₁₄ O	150,22	99,2	238	610 (pH=6 – 7)	-
III	719-22-2	C ₁₄ H ₂₀ O ₂	220,31	65 - 67	285 ± 15	-	0,055
IV	96-76-4	C ₁₄ H ₂₂ O	206,32	57	264	33 (pH=6 – 7)	< 100
V	19263-36-6	C ₁₆ H ₂₄ O	232,26	51	288 ± 9 (previsto)	-	-
VI	1620-98-0	C ₁₅ H ₂₂ O ₂	234,33	186-190	337 (previsto)	-	0 ± 79
VII	14035-33-7	C ₁₆ H ₂₄ O ₂	248,36	146,5	308	-	0 ± 93
VIII	82304-66-3	C ₁₇ H ₂₄ O ₃	276,37	139,5	426 ± 45 (previsto)	-	0 ± 133
IX	6386-38-5	C ₁₈ H ₂₈ O ₃	292,41	63 - 67	175	2,2 (pH= 6)	0,001
X	20170-32-5	C ₁₇ H ₂₆ O ₃	278,39	173	364 ± 37	-	0,0008

Tabela A.2- Propriedades Físico-químicas dos agentes estabilizantes [15–17]

Designação	N. ° CAS	Fórmula química	Massa molecular	Ponto de fusão a 101,3 kPa (°C)	Ponto de ebulição a 101,3 kPa (°C)	Solubilidade em água a 20 °C (µg/L)	Pressão de vapor a 20 °C (Pa)
<i>Ionox 330</i>	1709-70-2	C ₅₄ H ₇₈ O ₃	775,22	241 - 245	325	8,09 (pH=8)	0
<i>Irganox 1076</i>	2082-79-3	C ₃₅ H ₆₂ O ₃	530,86	50 - 55	323	2,85 (pH=6)	0 – 0,008
<i>Irganox 1010</i>	6683-19-8	C ₇₃ H ₁₀₈ O ₁₂	1 177,63	111 - 126	281	100	0,10
<i>Irgafos 168</i>	31570-04-4	C ₄₂ H ₆₃ O ₃ P	646,92	185	400	9	0
<i>Naugard XL-1</i>	70331-94-1	C ₄₀ H ₆₀ N ₂ O ₈	696,91	178	425	1,5 (pH =8)	0

B. Método dos Mínimos Quadrados

O método dos Mínimos Quadrados permite validar a linearidade da gama de concentrações, sendo que é caracterizado pela equação da reta da equação B.1.

$$y = mx + b \quad (\text{B.1})$$

Esta relação é composta por uma variável independente (x) e uma variável dependente (y) que servem como base para o cálculo dos coeficientes m e b .

y - Sinal instrumental

m - Declive da reta

x - Concentração dos padrões de calibração ($\mu\text{g/L}$)

b - Ordenada na origem

A fiabilidade de uma reta de calibração é avaliada através do coeficiente de correlação, R , ou pelo coeficiente de determinação, R^2 . Como tal, é uma medida de força da correlação entre os valores de y e x .

$$R = \frac{\sum_{i=1}^N [(x_i - \bar{x})(y_i - \bar{y})]}{\sqrt{\sum_{i=1}^N (x_i - \bar{x})^2 \sum_{i=1}^N (y_i - \bar{y})^2}} \quad (\text{B.2})$$

N – Número de padrões utilizados na reta de calibração

x_i – Concentração do padrão de calibração i

y_i – Sinal cromatográfico relativo a determinada concentração do padrão de calibração i

$\bar{x}$ – Média dos valores das concentrações das soluções padrão

$\bar{y}$ – Média dos valores do sinal cromatográfico

O intervalo de valores que o coeficiente R pode assumir é entre -1 e 1. A correlação pode ser positiva ($R = 1$) ou negativa ($R = -1$). Quando é positiva significa que para cada aumento positivo na variável x , há um aumento proporcional fixo positivo na variável y . Caso o coeficiente seja nulo não existe correlação entre as duas variáveis. Assume-se que o valor favorável à garantia da linearidade deve ser superior a 0,995. No entanto, o coeficiente de correção não é suficiente para a confirmação da linearidade da função de calibração, sendo necessária a aplicação de métodos estatísticos apropriados.

O declive da reta, m , como medida da sensibilidade do método analítico, é dado por:

$$m = \frac{\sum_{i=1}^N (x_i - \bar{x})(y_i - \bar{y})}{\sum_{i=1}^N (x_i - \bar{x})^2} \quad (\text{B.3})$$

Já a ordenada de origem é calculada pela equação B.4.

$$b = \bar{y} - m\bar{x} \quad (\text{B.4})$$

Estes coeficientes caracterizam a regressão linear, que é comparada com a dispersão dos valores do sinal instrumental em torno da reta de calibração. A precisão da calibração é descrita pelo desvio padrão residual ($S_{y/x}$):

$$S_{y/x} = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^N [y_i - (mx_i + b)]^2}{N-2}} \quad (\text{B.5})$$

Este desvio padrão relaciona-se diretamente com os desvios padrão do declive (S_m) e da ordenada na origem (S_b), pelas equações B.6 e B.7.

$$S_m = \frac{S_{y/x}}{\sqrt{\sum_{i=1}^N (x_i - \bar{x})^2}} \quad (\text{B.6})$$

$$S_b = S_{y/x} \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^N x_i^2}{N \times \sum_{i=1}^N (x_i - \bar{x})^2}} \quad (\text{B.7})$$

O cálculo dos limites de confiança tem em conta o cálculo destes desvios padrões:

$$b \pm t \times S_b \quad (\text{B.8})$$

$$m \pm t \times S_m \quad (\text{B.9})$$

t - Variável de t de *Student* para o nível de confiança esperado com $(N-2)$ graus de liberdade.

Após a obtenção destes 2 coeficientes, a concentração de uma amostra ($\hat{x}_i$) pode ser obtida por interpolação através da reta de calibração, como se pode observar pela equação B.10.

$$\hat{x}_i = \frac{y_i - b}{m} \quad (\text{B.10})$$

O desvio padrão do método, $S_{\text{método}}$, é definido como a razão entre o desvio padrão residual e a sensibilidade da calibração, ou seja, o declive da reta de calibração. Este descreve o desempenho do método e é válido dentro da gama de trabalho. O desvio padrão permite a comparação de métodos analíticos independentes.

$$S_{\text{método}} = \frac{S_{y/x}}{m} \quad (\text{B.11})$$

Finalmente o coeficiente de variação do método, CV_m , é a razão entre o desvio padrão do método e a média das concentrações dos padrões de calibração. Assume-se que o critério de aceitação do CV_m não deve ultrapassar os 5%.

$$CV_m = \frac{S_{\text{método}}}{\bar{x}} \times 100 \quad (\text{B.12})$$

C. Análise de Resíduos

Quando o declive e a ordenada na origem da reta de calibração são determinados, pode ser aplicada a análise de resíduos. Na realidade, estes coeficientes estabelecem um modelo matemático que raramente coincide com os valores experimentais observados. Estas diferenças entre os valores experimentais e os estimados tem o nome de resíduos. O método dos mínimos quadrados tem como objetivo minimizar a soma do quadrado dos resíduos, de maneira a otimizar a função linear.

Através da reta de calibração, calculam-se as áreas estimadas dos picos para cada concentração da amostra. De seguida calcula-se a razão entre a área do pico obtida experimentalmente e a área do pico estimada. Esta razão origina um desvio em percentagem que compara os valores experimentais de y e os valores previstos de y . Considera-se que este desvio deve ser igual ou inferior a 10% para garantir a linearidade na gama de trabalho.

Finalmente, a linearidade é avaliada pela elaboração de um gráfico que representa os desvios em função das respetivas concentrações dos padrões de calibração, de modo a detetar se há ou não correlação entre os resíduos, ou seja se eles são independentes ou não. Caso os pontos apresentem uma distribuição aleatória confirma-se a existência de linearidade.

❖ 4-etilfenol

Tabela C.1-Desvios relativamente à concentração-alvo para o 4-etilfenol sem padrão interno

Área Pico estimada	Área Experimental / Área Estimada	Concentração (µg/L)	Desvio (%)
351,29	0,95	5,18	-5,2
695,32	1,01	10,36	1,0
1039,34	1,02	15,54	2,3
1383,36	1,01	20,72	0,8
1727,38	1,00	25,90	-0,4
2071,41	0,99	31,08	-0,9
2415,43	1,00	36,26	-0,3
3103,47	1,00	46,62	0,3

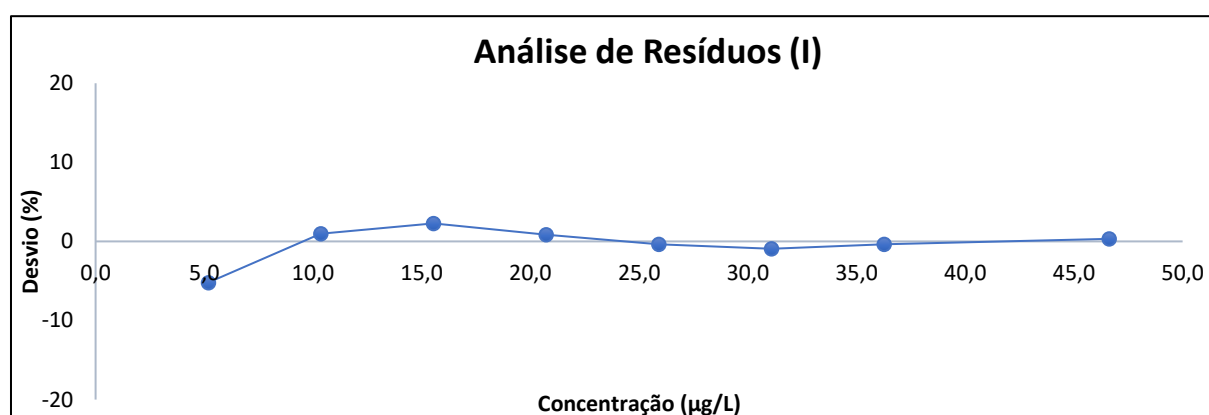


Figura C.1-Representação gráfica da concentração do 4-etilfenol sem padrão interno em função dos resíduos

Tabela C.2- Desvios relativamente à concentração-alvo para o 4-etilfenol com padrão interno

Área Pico estimada	Área Experimental / Área Estimada	Concentração (µg/L)	Desvio (%)
0,23	0,95	5,18	-5,2
0,41	0,98	10,36	-2,1
0,60	1,03	15,54	3,0
0,78	1,02	20,72	2,1
0,97	1,00	25,90	-0,3
1,15	1,00	31,08	-0,1
1,34	0,99	36,26	-0,6
1,71	1,00	46,62	-0,1

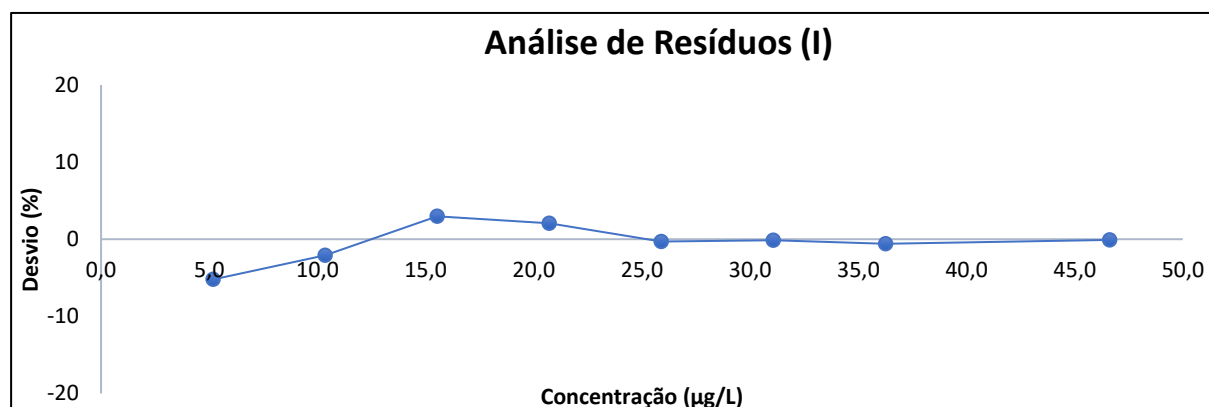


Figura C.2- Representação gráfica da concentração do 4-etilfenol com padrão interno em função dos resíduos

❖ **4-terc-butilfenol**

Tabela C.3- Desvios relativamente à concentração-alvo para o 4-terc-butilfenol sem padrão interno

Área Pico estimada	Área Experimental / Área Estimada	Concentração (µg/L)	Desvio (%)
5966,32	1,02	125	2,1
12774,50	0,99	250	-0,9
19582,68	1,00	375	0,2
26390,86	1,01	500	1,0
33199,04	0,99	625	-1,4
40007,21	1,00	750	-0,5
46815,39	1,01	875	0,7

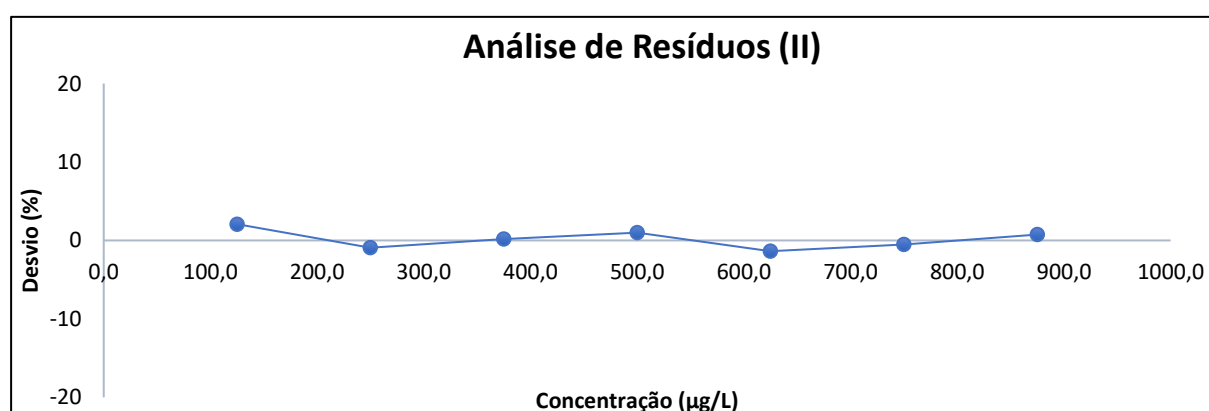
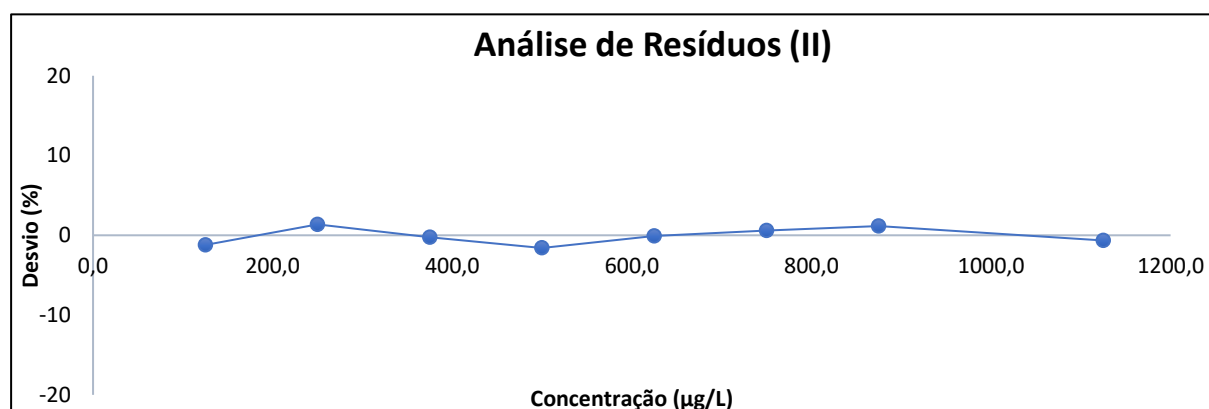


Figura C.3- Representação gráfica da concentração do 4-terc-butilfenol sem padrão interno em função dos resíduos

Tabela C.4- Desvios relativamente à concentração-alvo para o 4-terc-butilfenol com padrão interno

Área Pico estimada	Área Experimental / Área Estimada	Concentração (µg/L)	Desvio (%)
0,28	0,99	125	-1,2
0,65	1,01	250	1,4
1,03	1,00	375	-0,3
1,41	0,98	500	-1,6
1,79	1,00	625	-0,1
2,16	1,01	750	0,6
2,54	1,01	875	1,2
3,29	0,99	1125	-0,7

**Figura C.4-** Representação gráfica da concentração do 4-terc-butilfenol com padrão interno em função dos resíduos

❖ 2,6-di-terc-butil-p-benzoquinona

Tabela C.5- Desvios relativamente à concentração-alvo para o 2,6-di-terc-butil-p-benzoquinona sem padrão interno

Área Pico estimada	Área Experimental / Área Estimada	Concentração (µg/L)	Desvio (%)
749,75	1,07	125	7,4
1629,93	0,98	250	-1,7
2510,11	0,99	375	-1,1
3390,29	1,00	500	-0,1
4270,46	0,99	625	-0,7
5150,64	1,00	750	-0,3
6030,82	1,01	875	0,8

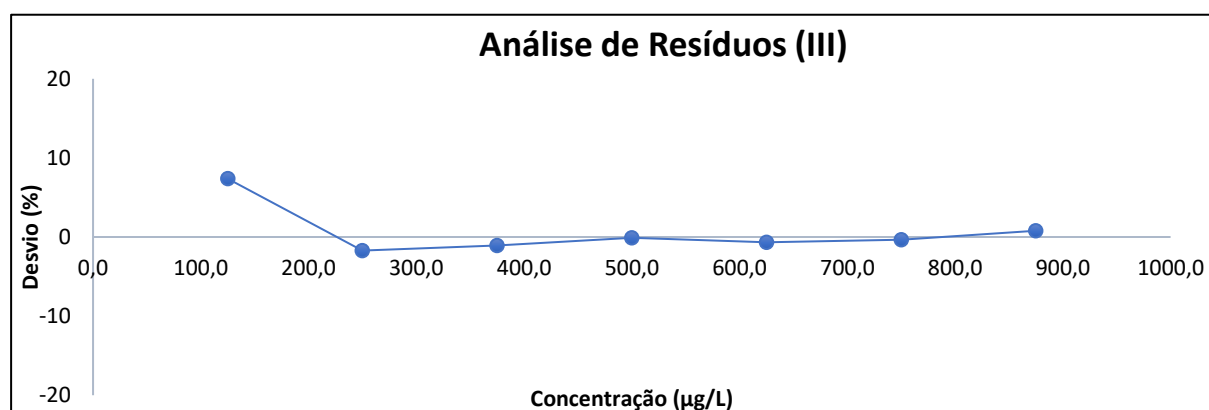


Figura C.5-Representação gráfica da concentração do 2,6-di-terc-butil-p-benzoquinona sem padrão interno em função dos resíduos

Tabela C.6-Desvios relativamente à concentração-alvo para o 2,6-di-terc-butil-p-benzoquinona com padrão interno

Área Pico estimada	Área Experimental / Área Estimada	Concentração (µg/L)	Desvio (%)
0,02	1,04	125	3,6
0,04	0,99	250	-0,6
0,06	0,99	375	-0,5
0,08	1,00	500	-0,3
0,11	0,98	625	-1,6
0,13	1,01	750	0,9
0,15	1,01	875	1,1
0,20	1,00	1125	-0,5

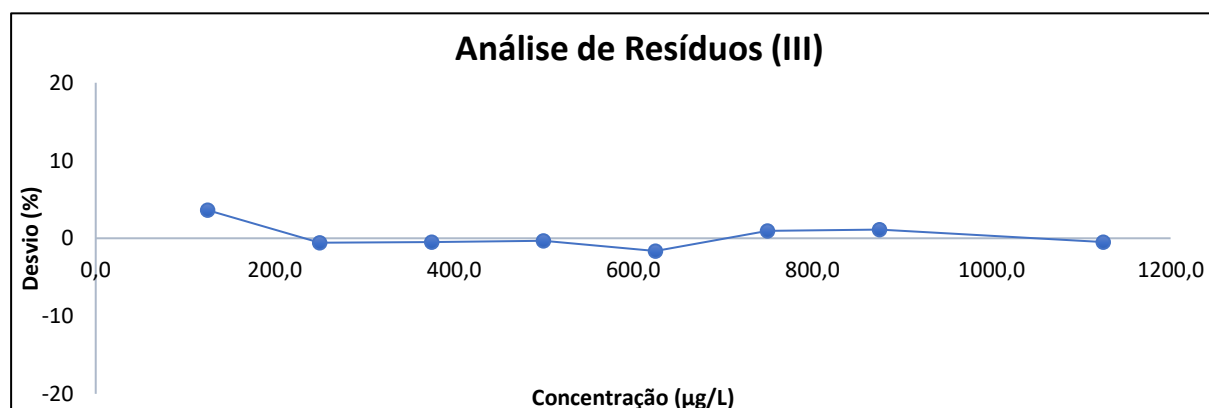


Figura C.6-Representação gráfica da concentração do 2,6-di-terc-butil-p-benzoquinona com padrão interno em função dos resíduos

❖ 2,4-di-terc-butilfenol

Tabela C.7- Desvios relativamente à concentração-alvo para o 2,4-di-terc-butilfenol sem padrão interno

Área Pico estimada	Área Experimental / Área Estimada	Concentração ($\mu\text{g/L}$)	Desvio (%)
4787,21	1,10	125	10,4
11193,71	0,98	250	-2,1
17600,21	0,99	375	-1,2
24006,71	0,99	500	-1,2
30413,21	0,99	625	-0,8
36819,71	1,01	750	1,0
43226,21	1,00	875	0,3

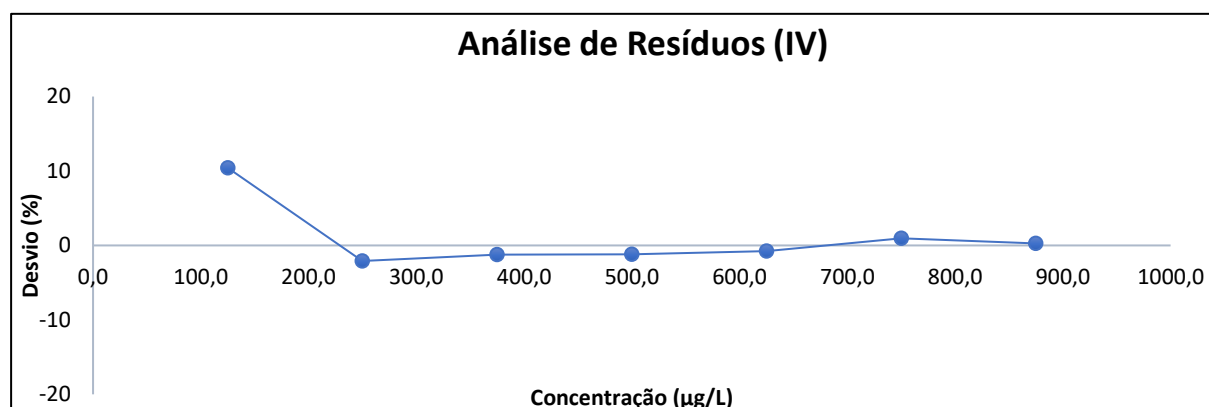


Figura C.7- Representação gráfica da concentração do 2,4-di-terc-butilfenol sem padrão interno em função dos resíduos

Tabela C.8- Desvios relativamente à concentração-alvo para o 2,4-di-terc-butilfenol com padrão interno

Área Pico estimada	Área Experimental / Área Estimada	Concentração ($\mu\text{g/L}$)	Desvio (%)
0,34	0,99	125	-0,8
0,79	0,98	250	-2,0
1,25	1,01	375	0,6
1,70	1,00	500	0,1
2,15	0,99	625	-1,2
2,60	1,02	750	2,3
3,05	1,00	875	0,1
3,96	0,99	1125	-0,7

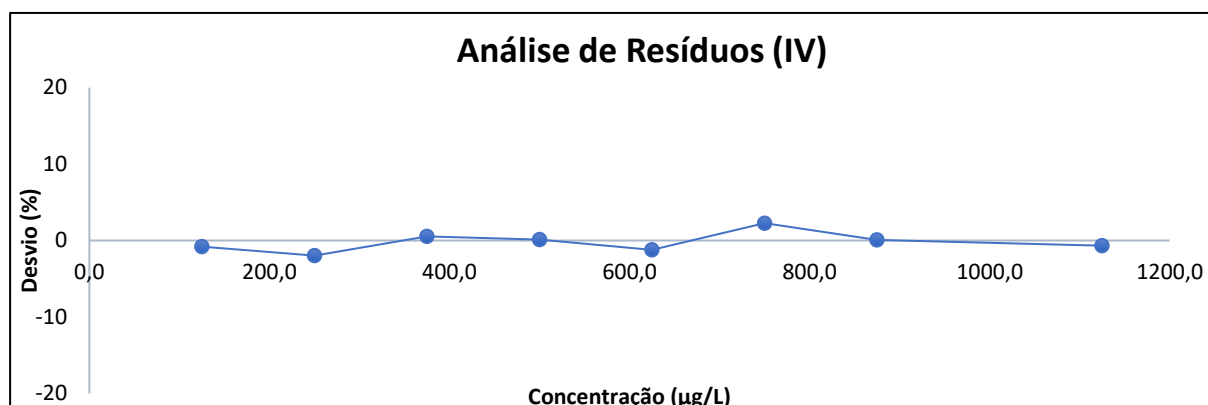


Figura C.8- Representação gráfica da concentração do 2,4-di-terc-butilfenol com padrão interno em função dos resíduos

❖ 3,5-di-terc-butil-4-hidroxibenzaldeído

Tabela C.9- Desvios relativamente à concentração-alvo para o 3,5-di-terc-butil-4-hidroxibenzaldeído sem padrão interno

Área Pico estimada	Área Experimental / Área Estimada	Concentração (µg/L)	Desvio (%)
2019,46	1,06	125	5,6
4428,93	1,02	250	2,1
6838,39	0,99	375	-1,4
9247,86	0,98	500	-1,9
11657,32	0,98	625	-1,8
14066,79	1,01	750	1,3
16476,25	1,01	875	0,6

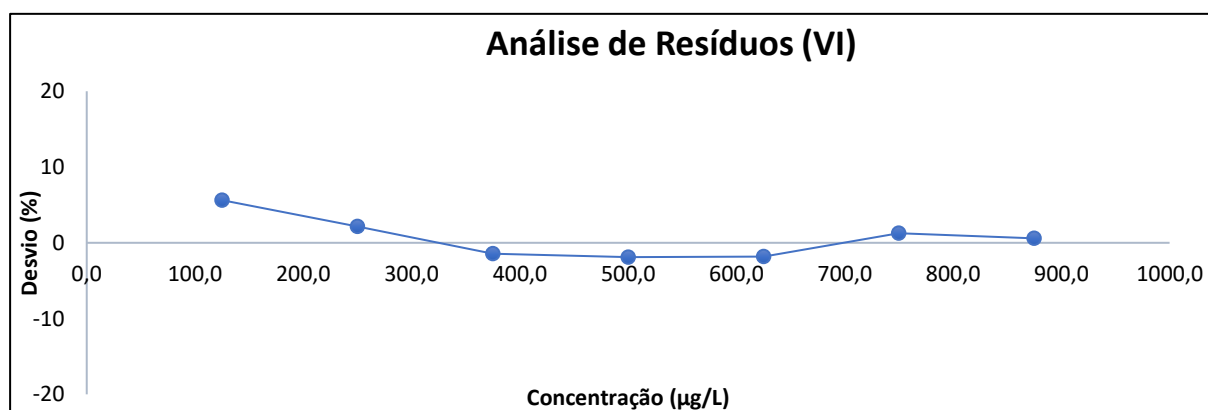
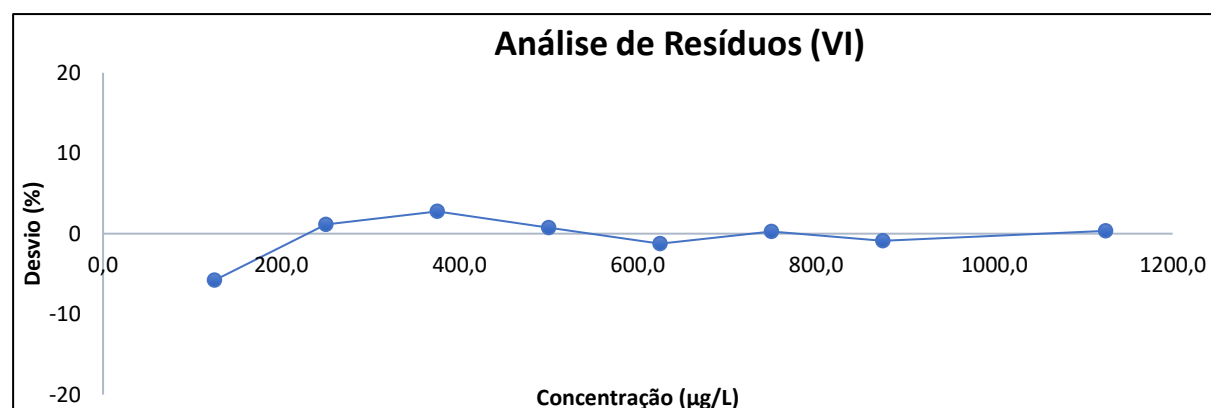


Figura C.9- Representação gráfica da concentração do 3,5-di-terc-butil-4-hidroxibenzaldeído sem padrão interno em função dos resíduos

Tabela C.10- Desvios relativamente à concentração-alvo para o 3,5-di-terc-butil-4-hidroxibenzaldeído com padrão interno

Área Pico estimada	Área Experimental / Área Estimada	Concentração (µg/L)	Desvio (%)
0,26	0,94	125	-5,8
0,50	1,01	250	1,1
0,75	1,03	375	2,8
0,99	1,01	500	0,7
1,24	0,99	625	-1,3
1,48	1,00	750	0,2
1,73	0,99	875	-0,9
2,22	1,00	1125	0,4

**Figura C.10-** Representação gráfica da concentração do 3,5-di-terc-butil-4-hidroxibenzaldeído com padrão interno em função dos resíduos❖ **3,5-di-terc-butil-4-hidroxiacetofenona****Tabela C.11-** Desvios relativamente à concentração-alvo para o 3,5-di-terc-butil-4-hidroxiacetofenona sem padrão interno

Área Pico estimada	Área Experimental / Área Estimada	Concentração (µg/L)	Desvio (%)
2161,18	1,05	125	4,5
5104,36	1,01	250	0,6
8047,54	0,99	375	-1,5
10990,71	0,98	500	-1,6
13933,89	1,01	625	0,6
16877,07	1,00	750	0,5
19820,25	1,00	875	0,0

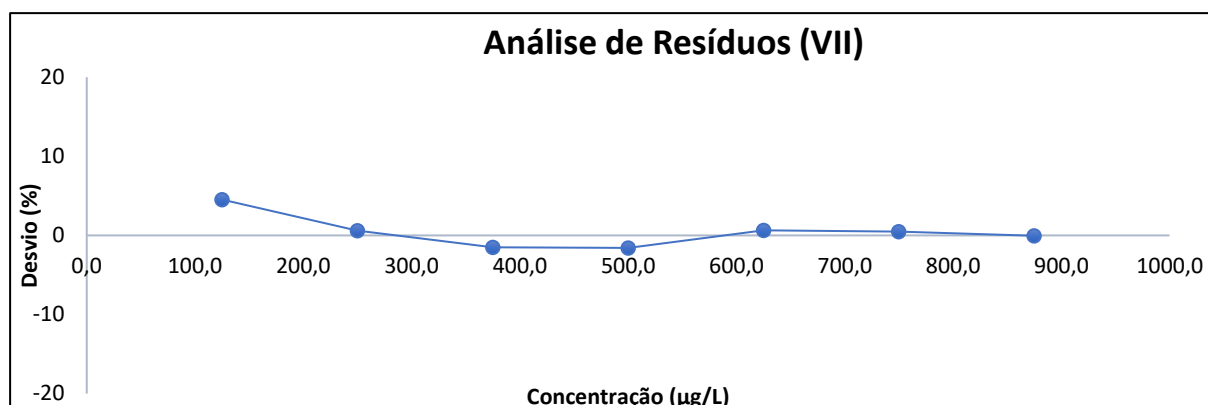


Figura C.11-Representação gráfica da concentração do 3,5-di-terc-butil-4-hidroxiacetofenona sem padrão interno em função dos resíduos

Tabela C.12-Desvios relativamente à concentração-alvo para o 3,5-di-terc-butil-4-hidroxiacetofenona com padrão interno

Área Pico estimada	Área Experimental / Área Estimada	Concentração (µg/L)	Desvio (%)
0,33	0,94	125	-6,1
0,66	1,00	250	0,1
0,99	1,02	375	1,9
1,32	1,01	500	1,4
1,65	0,98	625	-1,7
1,98	1,01	750	0,9
2,31	1,00	875	0,0
2,97	1,00	1125	-0,4

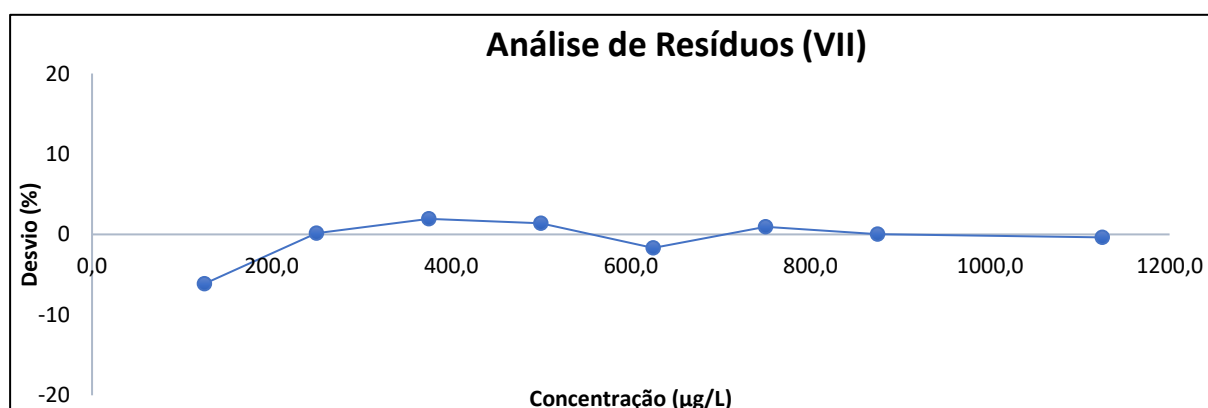
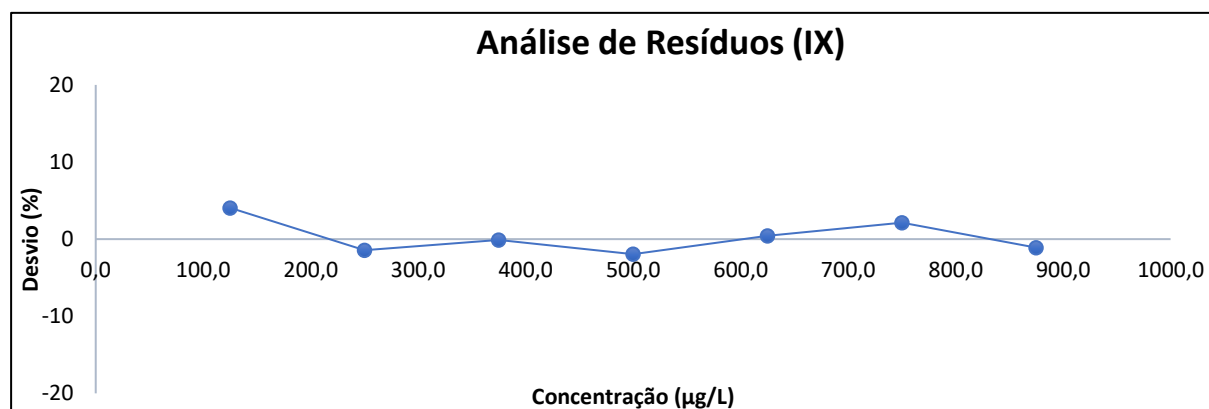


Figura C.12-Representação gráfica da concentração do 3,5-di-terc-butil-4-hidroxiacetofenona com padrão interno em função dos resíduos

❖ 3-(3,5-di-terc-butil-4-hidroxifenil) propionato de metilo

Tabela C.13- Desvios relativamente à concentração-alvo para o 3-(3,5-di-terc-butil-4-hidroxifenil) propionato de metilo sem padrão interno

Área Pico estimada	Área Experimental / Área Estimada	Concentração (µg/L)	Desvio (%)
878,36	1,04	125	4,1
1981,14	0,99	250	-1,4
3083,93	1,00	375	-0,1
4186,71	0,98	500	-2,0
5289,50	1,00	625	0,4
6392,29	1,02	750	2,1
7495,07	0,99	875	-1,1

**Figura C.13-** Representação gráfica da concentração do 3-(3,5-di-terc-butil-4-hidroxifenil) propionato de metilo sem padrão interno em função dos resíduos**Tabela C.14-** Desvios relativamente à concentração-alvo para o 3-(3,5-di-terc-butil-4-hidroxifenil) propionato de metilo com padrão interno

Área Pico estimada	Área Experimental / Área Estimada	Concentração (µg/L)	Desvio (%)
0,13	0,99	125	-1,1
0,30	0,98	250	-1,7
0,48	1,01	375	0,6
0,65	1,01	500	0,8
0,83	0,99	625	-1,4
1,01	1,01	750	1,2
1,18	1,01	875	0,6
1,53	0,99	1125	-0,6

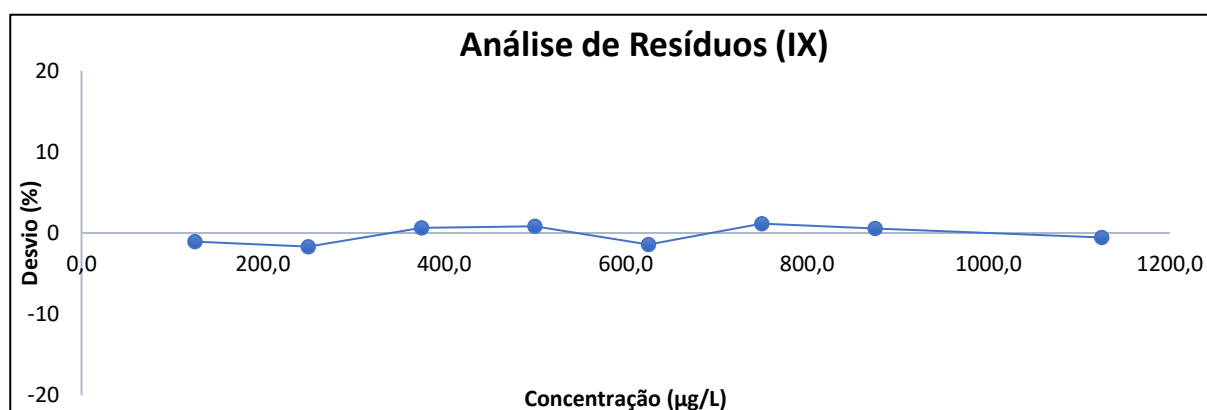


Figura C.14- Representação gráfica da concentração do 3-(3,5-di-terc-butil-4-hidroxifenil) propionato de metilo com padrão interno em função dos resíduos

❖ Padrões internos

Tabela C.15-Desvios relativamente à concentração-alvo para o composto 4-etilfenol-d₁₀

Área Pico estimada	Área Experimental / Área Estimada	Concentração (µg/L)	Desvio (%)
72,67	1,03	9,01	3,2
169,72	0,98	18,03	-2,2
266,78	1,00	27,04	0,5
363,83	0,99	36,05	-1,1
557,93	1,02	54,08	1,6
654,98	0,99	63,09	-0,6
849,09	1,00	81,12	-0,1

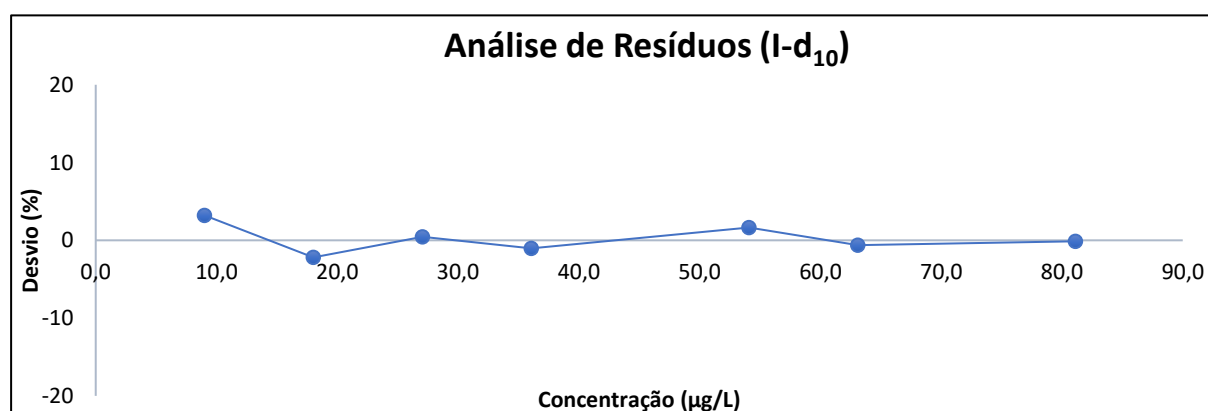
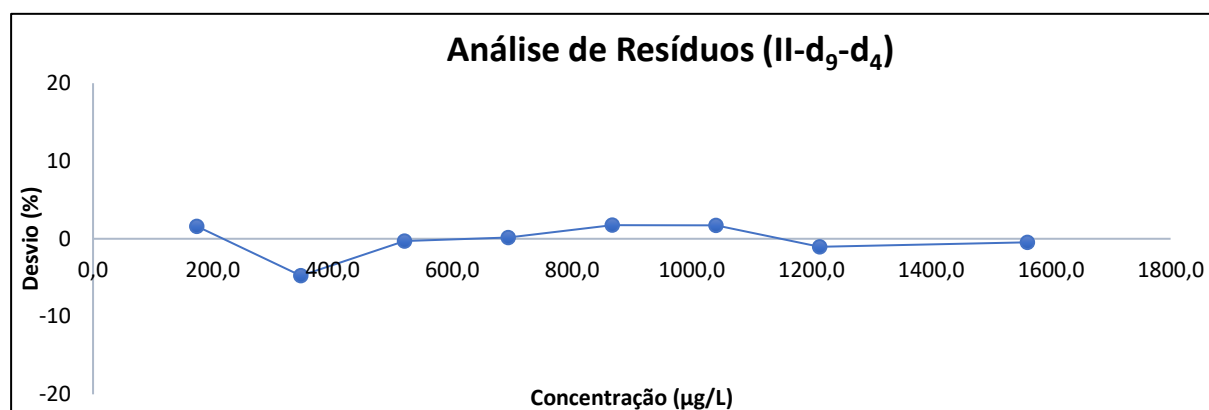


Figura C.15-Representação gráfica da concentração do 4-etilfenol-d₁₀ em função dos resíduos

Tabela C.16-Desvios relativamente à concentração-alvo para o composto 4-terc-butil-d₉-fenol-2,3,5,6-d₄

Área Pico estimada	Área Experimental / Área Estimada	Concentração (µg/L)	Desvio (%)
1513,03	1,02	173,45	1,6
3748,05	0,95	346,90	-4,8
5983,08	1,00	520,34	-0,3
8218,11	1,00	693,79	0,2
10453,14	1,02	867,24	1,7
12688,16	1,02	1040,69	1,7
14923,19	0,99	1214,14	-1,0
19393,25	1,00	1561,03	-0,5

**Figura C.16**-Representação gráfica da concentração do 4-terc-butil-d₉-fenol-2,3,5,6-d₄ em função dos resíduos

D. Teste de Mandel

Os dados de calibração obtidos são usados para calcular a função de calibração linear assim como a função de calibração não linear descritas nas normas ISO 8466-1 e ISO 8466-2, respectivamente. A partir dos respectivos desvios padrão residuais, $S_{y/x}$ e S_{y2} , calcula-se a diferença de variâncias (DS^2):

$$S_{y/x} = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^N (y_i - \bar{y}_i)^2}{N-2}} \quad (D.1)$$

$$S_{y2} = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^N (y_i - \bar{y}_{i2})^2}{N-3}} \quad (D.2)$$

$$DS^2 = (N-2) \times S_{y/x}^2 - (N-3) \times S_{y2}^2 \quad (D.3)$$

N – Número de padrões de calibração

y_i – Sinal obtido relativo a determinada concentração do padrão de calibração i

$\bar{y}_i$ – Sinal estimado pela função de calibração linear relativo a determinada concentração

$\bar{y}_{i2}$ – Sinal estimado pela função de calibração polinomial de 2º grau relativo a determinada concentração

De seguida calcula-se o valor teste (PG) e compara-se com a distribuição F de *Snedecor/Fisher*, tendo em contra os graus de liberdade, para um nível de significância de 95%.

$$PG = \frac{DS^2}{S_{y2}^2} \quad (D.4)$$

- $PG \leq F_{\text{crítico}}$ - A função de calibração linear é a que conduz a um melhor ajustamento dos dados.
- $PG > F_{\text{crítico}}$ - A função de calibração é não linear, devendo-se averiguar a hipótese de reduzir a gama de trabalho de forma a cumprir a primeira condição. Caso não se verifique essa possibilidade, opta-se pela função de calibração polinomial.

❖ 4-etilfenol

Tabela D.1-Áreas calculadas para os ajustes linear e polinomial para o 4-etilfenol sem padrão interno

Concentração (µg/L)	Área	Área Ajuste Linear	Área Ajuste Polinomial
5,18	333	351	351
10,36	702	695	695
15,54	1 063	1039	1039
20,72	1395	1383	1384
25,90	1721	1727	1728
31,08	2052	2071	2072
36,26	2407	2415	2415
46,62	3114	3103	3103

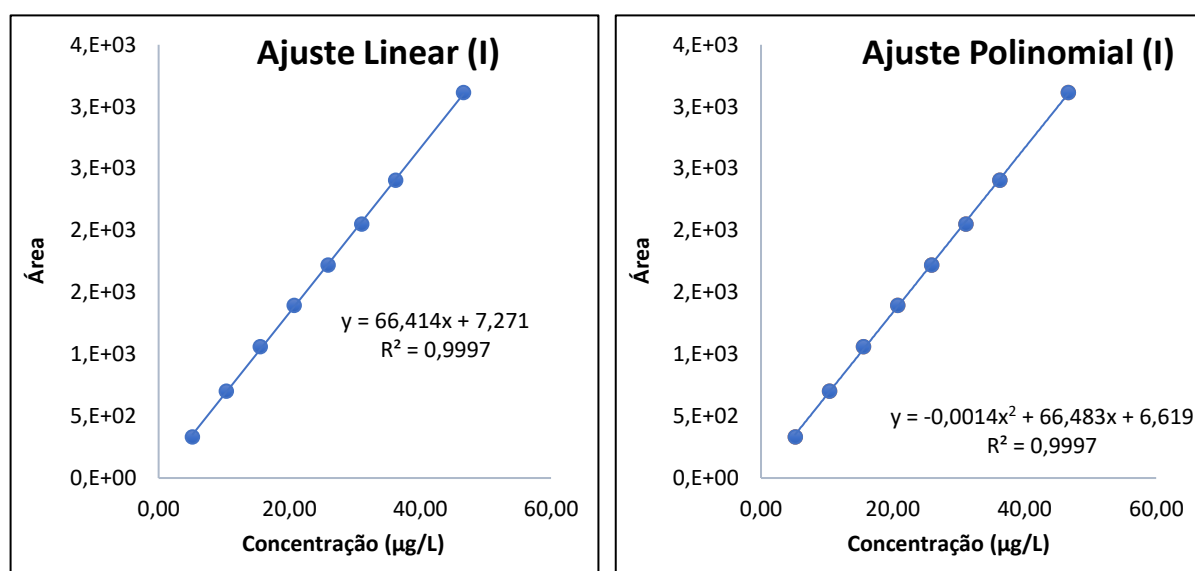


Figura D.1-Representação gráfica dos ajustes linear e polinomial para o 4-etilfenol sem padrão interno

Tabela D.2-Erros quadráticos obtidos para cada ajuste e respetivo desvio padrão residual para o 4-etilfenol sem padrão interno

Ajuste Linear		Ajuste Polinomial	
	$(y-y_i)^2$		$(y-y_i)^2$
	3,35E+02		3,23E+02
	4,47E+01		4,58E+01
	5,60E+02		5,56E+02
	1,35E+02		1,31E+02
	4,07E+01		4,34E+01
	3,77E+02		3,82E+02
	7,10E+01		7,13E+01
	1,11E+02		1,21E+02
Soma=	1,67E+03	Soma=	1,67E+03
N-2=	6	N-3=	5
S_{y/x}=	1,67E+01	S_{y/x(2º)}=	1,83E+01

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

$$DS^2 = 3,84E-01$$

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

$$VT = 0,001$$

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

Tabela D.3-Áreas calculadas para os ajustes linear e polinomial para o 4-etilfenol com padrão interno

Concentração (µg/L)	Área	Área Ajuste Linear	Área Ajuste Polinomial
5,18	0,22	0,23	0,22
10,36	0,41	0,41	0,41
15,54	0,62	0,60	0,60
20,72	0,80	0,78	0,79
25,90	0,97	0,97	0,97
31,08	1,15	1,15	1,16
36,26	1,33	1,34	1,34
46,62	1,71	1,71	1,70

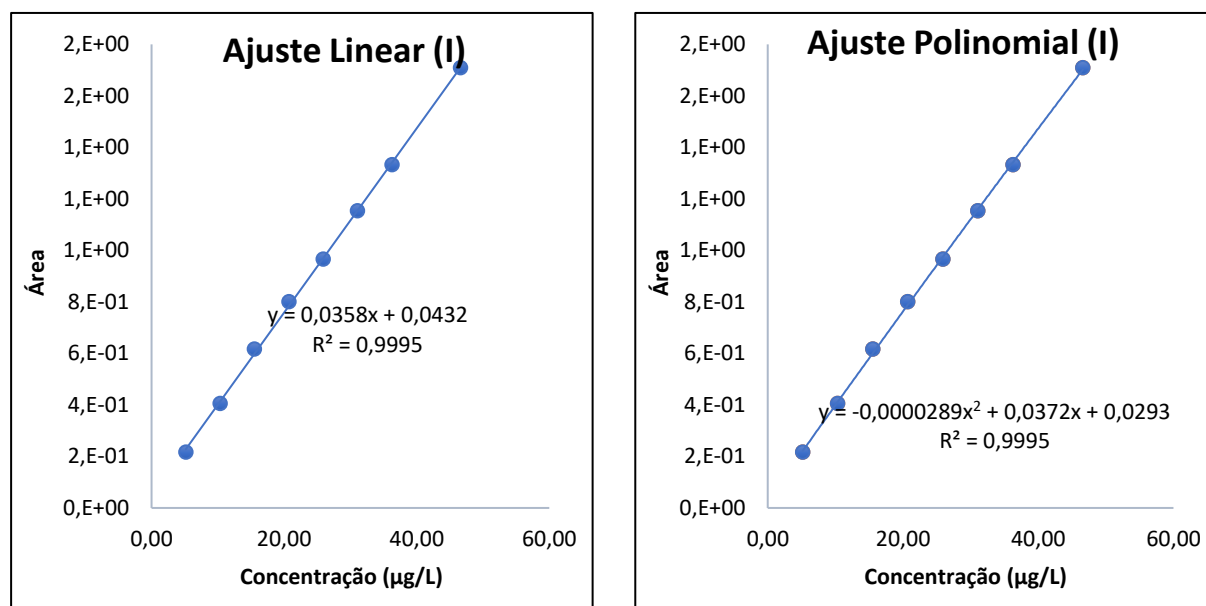


Figura D.2-Representação gráfica dos ajustes linear e polinomial para o 4-etilfenol com padrão interno

Tabela D.4-Erros quadráticos obtidos para cada ajuste e respetivo desvio padrão residual para o 4-etilfenol com padrão interno

Ajuste Linear		Ajuste Polinomial	
$(y-y_i)^2$		$(y-y_i)^2$	
	1,42E-04		2,19E-05
	7,51E-05		4,21E-05
	3,17E-04		2,71E-04
	2,64E-04		1,68E-04
	9,65E-06		4,65E-05
	1,98E-06		1,58E-05
	5,94E-05		5,76E-05
	1,57E-06		7,92E-05
Soma=	8,71E-04	Soma=	7,02E-04
N-2=	6	N-3=	5
S_{y/x}=	1,20E-02	S_{y/x(2ª)}=	1,18E-02

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

$$DS^2 = 1,69E-04$$

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

$$VT = 1,203$$

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

❖ 4-terc-butilfenol

Tabela D.5-Áreas calculadas para os ajustes linear e polinomial para o 4-terc-butilfenol sem padrão interno

Concentração (µg/L)	Área	Área Ajuste Linear	Área Ajuste Polinomial
125	6090	5966	6116
250	12657	12775	12774
375	19621	19583	19491
500	26658	26391	26268
625	32744	33199	33104
750	39808	40007	39999
875	47158	46815	46954

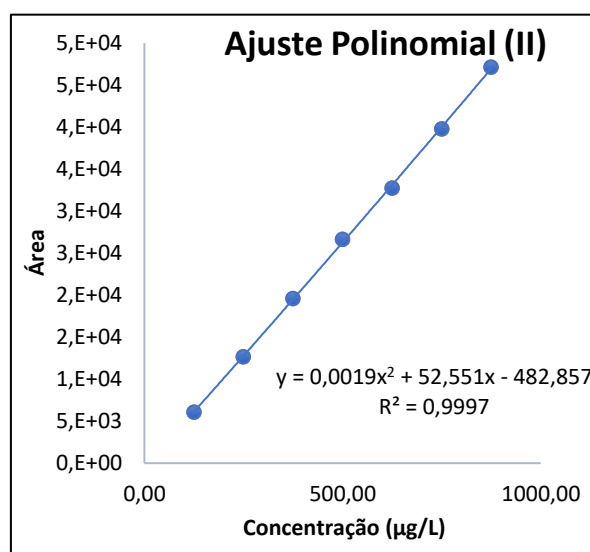
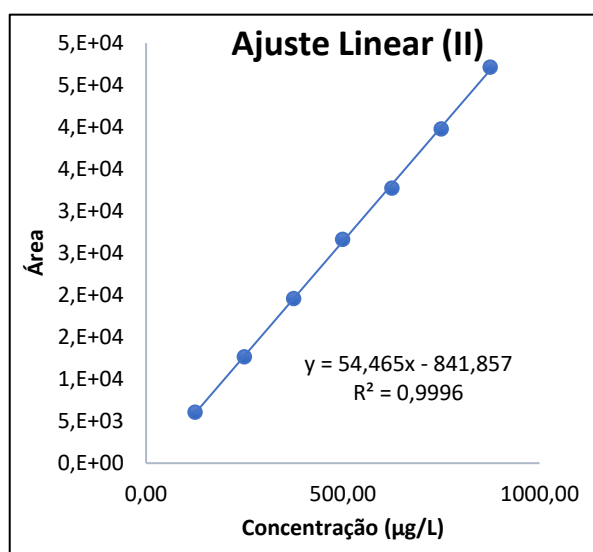


Figura D.3-Representação gráfica dos ajustes linear e polinomial para o 4-terc-butilfenol sem padrão interno

Tabela D.6- Erros quadráticos obtidos para cada ajuste e respetivo desvio padrão residual para o 4-terc-butilfenol sem padrão interno

Ajuste Linear		Ajuste Polinomial	
	$(y-y_i)^2$		$(y-y_i)^2$
	1,53E+04		6,59E+02
	1,38E+04		1,36E+04
	1,47E+03		1,69E+04
	7,14E+04		1,52E+05
	2,07E+05		1,29E+05
	3,97E+04		3,65E+04
	1,17E+05		4,17E+04
Soma=	4,66E+05	Soma=	3,91E+05
N-2=	5	N-3=	4
S_{y/x}=	3,05E+02	S_{y/x(2ª)}=	3,13E+02

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

$$DS^2 = 7,49E+04$$

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

$$VT = 0,766$$

$$F_{(1,5)95\%} = 7,71$$

Tabela D.7- Áreas calculadas para os ajustes linear e polinomial para o 4-terc-butilfenol com padrão interno

Concentração (µg/L)	Área	Área Ajuste Linear	Área Ajuste Polinomial
125	0,27	0,28	0,27
250	0,66	0,65	0,65
375	1,03	1,03	1,03
500	1,39	1,41	1,41
625	1,78	1,79	1,79
750	2,18	2,16	2,17
875	2,57	2,54	2,54
1125	3,27	3,29	3,29

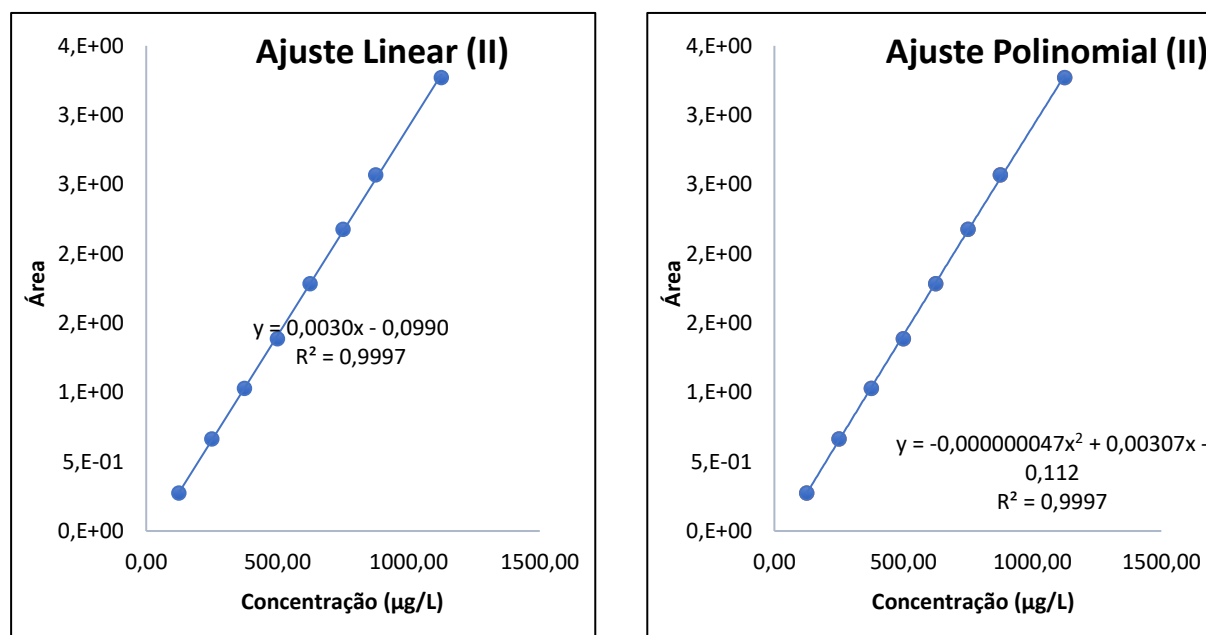


Figura D.4-Representação gráfica dos ajustes linear e polinomial para o 4-terc-butilfenol com padrão interno

Tabela D.8- Erros quadráticos obtidos para cada ajuste e respetivo desvio padrão residual para o 4-terc-butilfenol com padrão interno

Ajuste Linear		Ajuste Polinomial	
$(y-y_i)^2$		$(y-y_i)^2$	
	1,09E-05		1,12E-05
	7,99E-05		1,12E-04
	7,22E-06		2,15E-05
	5,02E-04		7,00E-04
	3,04E-06		4,13E-05
	1,77E-04		8,92E-05
	8,74E-04		7,85E-04
	4,69E-04		2,01E-04
Soma=	2,12E-03	Soma=	1,96E-03
N-2=	6	N-3=	5
S_{y/x}=	1,88E-02	S_{y/x(2°)}=	1,98E-02

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

$$DS^2 = 1,62E-04$$

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

$$VT = 0,413$$

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

❖ 2,6-di-terc-butil-p-benzoquinona

Tabela D.9–Áreas calculadas para os ajustes linear e polinomial para o 2,6-di-terc-butil-p-benzoquinona sem padrão interno

Concentração (µg/L)	Área	Área Ajuste Linear	Área Ajuste Polinomial
125	805	750	791
250	1602	1630	1628
375	2483	2510	2481
500	3387	3390	3349
625	4242	4270	4233
750	5134	5151	5133
875	6079	6031	6049

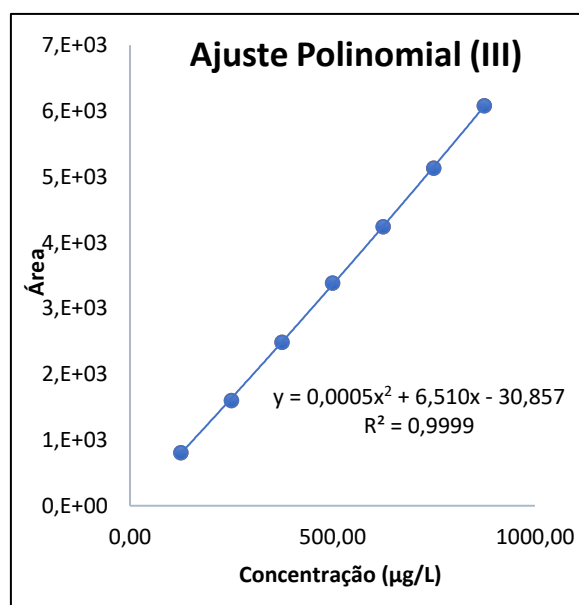
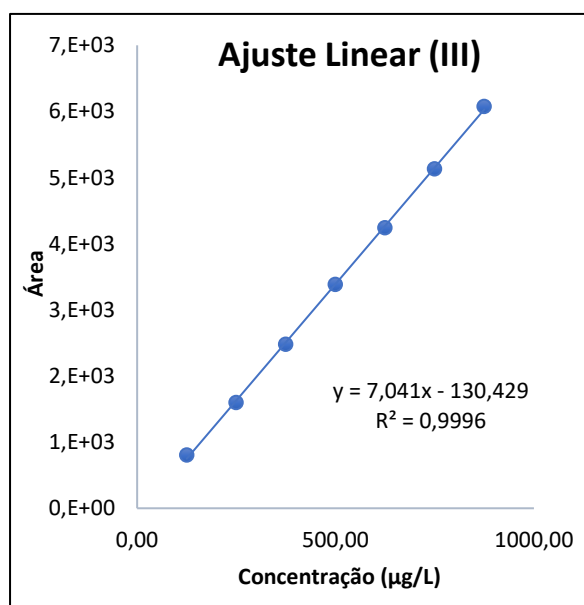


Figura D.5–Representação gráfica dos ajustes linear e polinomial para o 2,6-di-terc-butil-p-benzoquinona sem padrão interno

Tabela D.10-Erros quadráticos obtidos para cada ajuste e respetivo desvio padrão residual para o 2,6-di-terc-butil-p-benzoquinona sem padrão interno

Ajuste Linear		Ajuste Polinomial	
	$(y-y_i)^2$		$(y-y_i)^2$
	3,05E+03		2,03E+02
	7,80E+02		6,76E+02
	7,35E+02		4,60E+00
	1,08E+01		1,42E+03
	8,10E+02		7,30E+01
	2,77E+02		6,51E-01
	2,32E+03		9,27E+02
Soma=	7,99E+03	Soma=	3,30E+03
N-2=	5	N-3=	4
S_{y/x}=	4,00E+01	S_{y/x(2º)}=	2,87E+01

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

$$DS^2 = 4,68E+03$$

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

$$VT = 5,676$$

$$F_{(1,5)95\%} = 7,71$$

Tabela D.11-Áreas calculadas para os ajustes linear e polinomial para o 2,6-di-terc-butil-p-benzoquinona com padrão interno

Concentração (µg/L)	Área	Área Ajuste Linear	Área Ajuste Polinomial
125	0,017	0,016	0,016
250	0,039	0,039	0,039
375	0,061	0,061	0,061
500	0,084	0,084	0,084
625	0,10	0,11	0,11
750	0,13	0,13	0,13
875	0,15	0,15	0,15
1125	0,20	0,20	0,20

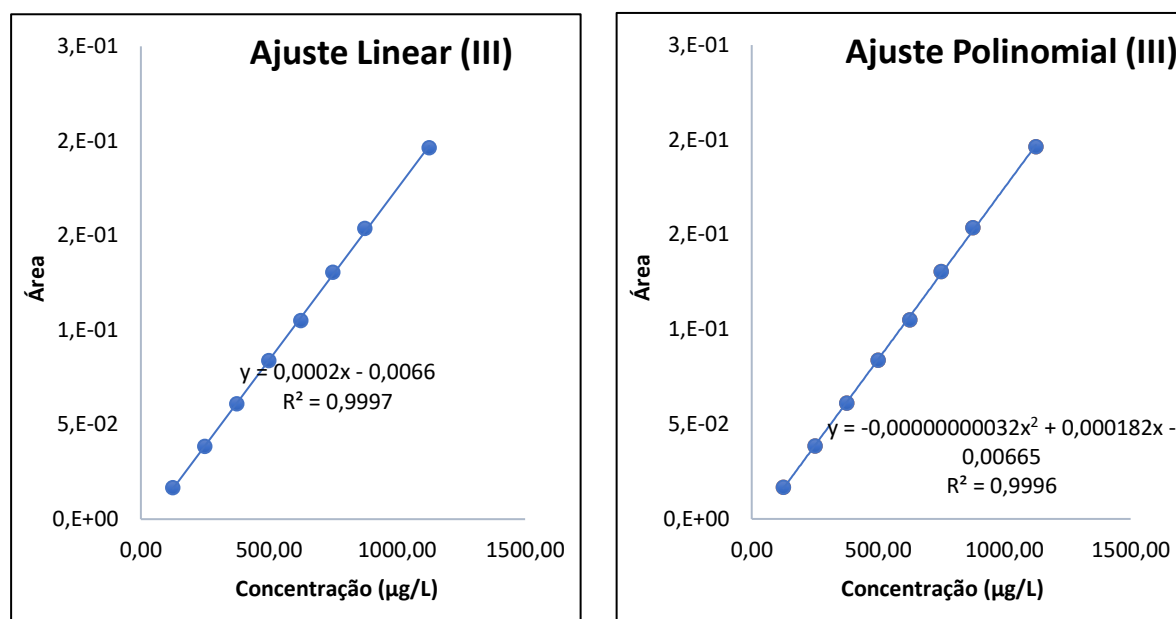


Figura D.6- Representação gráfica dos ajustes linear e polinomial para o 2,6-di-terc-butil-p-benzoquinona com padrão interno

Tabela D.12- Erros quadráticos obtidos para cada ajuste e respectivo desvio padrão residual para o 2,6-di-terc-butil-p-benzoquinona com padrão interno

	Ajuste Linear	Ajuste Polinomial
	$(y-y_i)^2$	$(y-y_i)^2$
	3,38E-07	3,89E-07
	5,02E-08	4,84E-08
	9,62E-08	1,11E-07
	6,48E-08	8,77E-08
	3,04E-06	3,22E-06
	1,48E-06	1,37E-06
	2,86E-06	2,74E-06
	9,11E-07	8,75E-07
Soma=	8,84E-06	8,83E-06
N-2=	6	5
S_{y/x}=	1,21E-03	1,33E-03

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

$$DS^2 = 4,72E-09$$

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

$$VT = 0,003$$

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

❖ 2,4-di-terc-butilfenol

Tabela D.13-Áreas calculadas para os ajustes linear e polinomial para o 2,4-di-terc-butilfenol sem padrão interno

Concentração (µg/L)	Área	Área Ajuste Linear	Área Ajuste Polinomial
125	5286	4787	5116
250	10960	11194	11193
375	17384	17600	17402
500	23722	24007	23742
625	30181	30413	30213
750	37179	36820	36816
875	43335	43226	43549

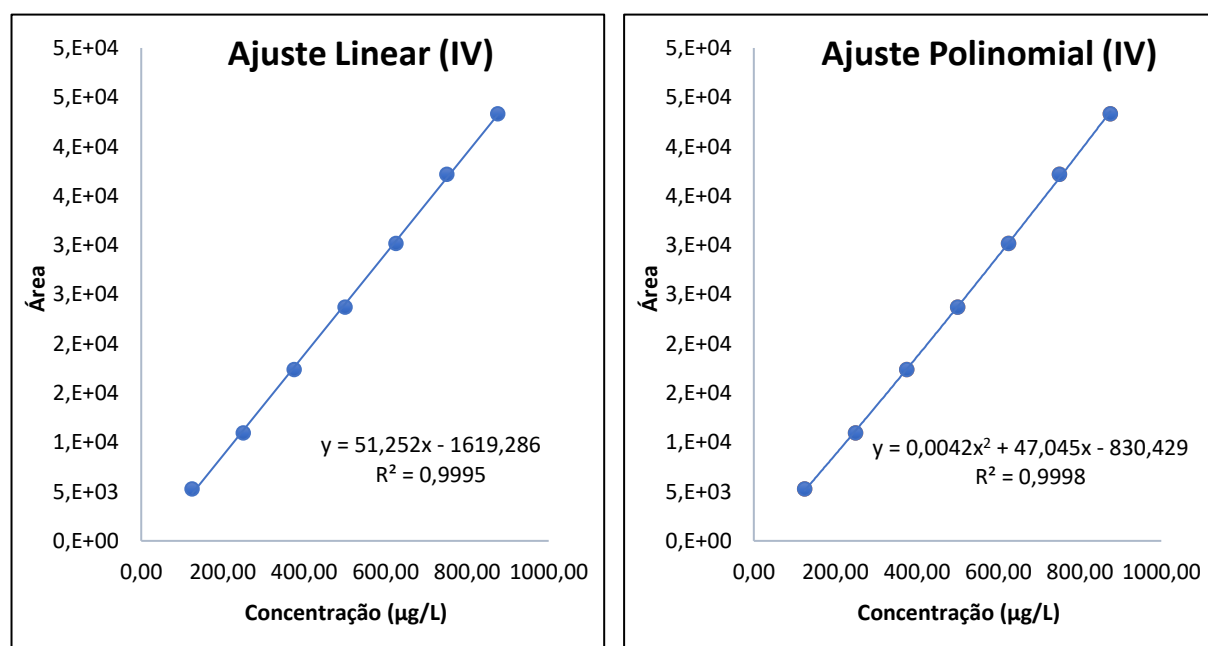


Figura D.7-Representação gráfica dos ajustes linear e polinomial para o 2,4-di-terc-butilfenol sem padrão interno

Tabela D.14-Erros quadráticos obtidos para cada ajuste e respetivo desvio padrão residual para o 2,4-di-terc-butilfenol sem padrão interno

Ajuste Linear		Ajuste Polinomial	
	$(y-y_i)^2$		$(y-y_i)^2$
	2,49E+05		2,90E+04
	5,46E+04		5,44E+04
	4,67E+04		3,24E+02
	8,11E+04		3,99E+02
	5,39E+04		1,04E+03
	1,29E+05		1,32E+05
	1,18E+04		4,60E+04
Soma=	6,26E+05	Soma=	2,63E+05
N-2=	5	N-3=	4
S_{y/x}=	3,54E+02	S_{y/x(2º)}=	2,56E+02

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

$$DS^2 = 3,63E+05$$

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

$$VT = 5,51764$$

$$F_{(1,5)95\%} = 7,71$$

Tabela D.15-Áreas calculadas para os ajustes linear e polinomial para o 2,4-di-terc-butilfenol com padrão interno

Concentração (µg/L)	Área	Área Ajuste Linear	Área Ajuste Polinomial
125	0,34	0,34	0,33
250	0,78	0,79	0,79
375	1,25	1,25	1,25
500	1,70	1,70	1,71
625	2,12	2,15	2,16
750	2,66	2,60	2,61
875	3,06	3,05	3,06
1125	3,93	3,96	3,94

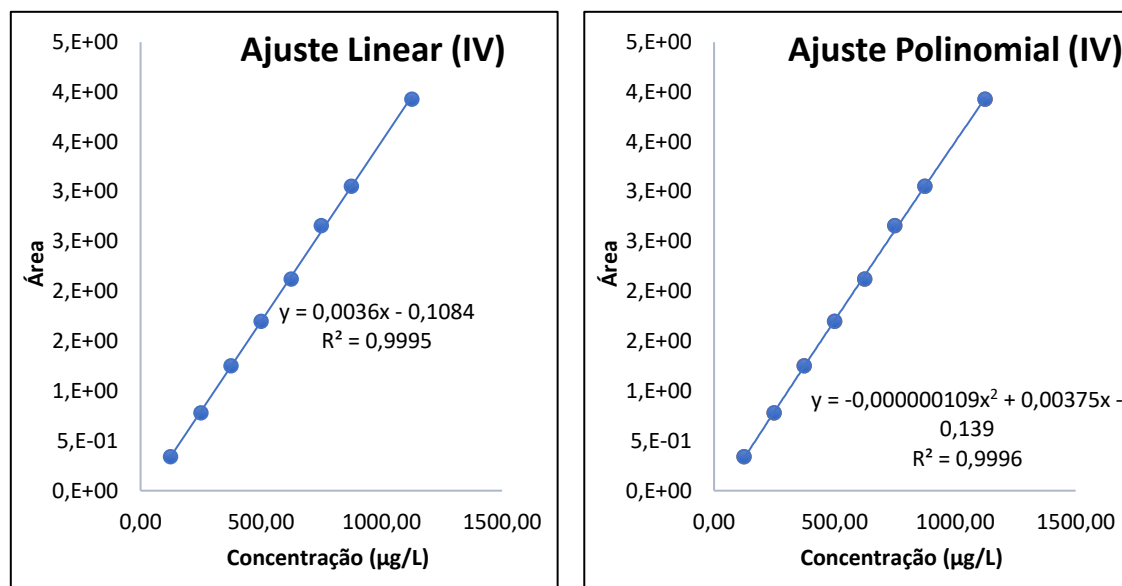


Figura D.8- Representação gráfica dos ajustes linear e polinomial para o 2,4-di-terc-butilfenol com padrão interno

Tabela D.16- Erros quadráticos obtidos para cada ajuste e respetivo desvio padrão residual para o 2,4-di-terc-butilfenol com padrão interno

Ajuste Linear		Ajuste Polinomial	
$(y-y_i)^2$		$(y-y_i)^2$	
	7,50E-06		1,63E-04
	2,46E-04		1,38E-04
	4,78E-05		7,12E-06
	5,69E-06		4,38E-05
	6,93E-04		1,35E-03
	3,50E-03		2,59E-03
	9,07E-06		2,97E-08
	7,15E-04		7,11E-05
Soma=	5,22E-03	Soma=	4,36E-03
N-2=	6	N-3=	5
S_{y/x}=	2,95E-02	S_{y/x(2ª)}=	2,95E-02

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

$$DS^2 = 8,68E-04$$

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

$$VT = 0,99670$$

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

❖ 3,5-di-ter-butil-4-hidroxibenzaldeído

Tabela D.17—Áreas calculadas para os ajustes linear e polinomial para o 3,5-di-ter-butil-4-hidroxibenzaldeído sem padrão interno

Concentração (µg/L)	Área	Área Ajuste Linear	Área Ajuste Polinomial
125	2133	2019	2178
250	4524	4429	4427
375	6741	6838	6738
500	9073	9248	9112
625	11447	11657	11549
750	14245	14067	14048
875	16572	16476	16609

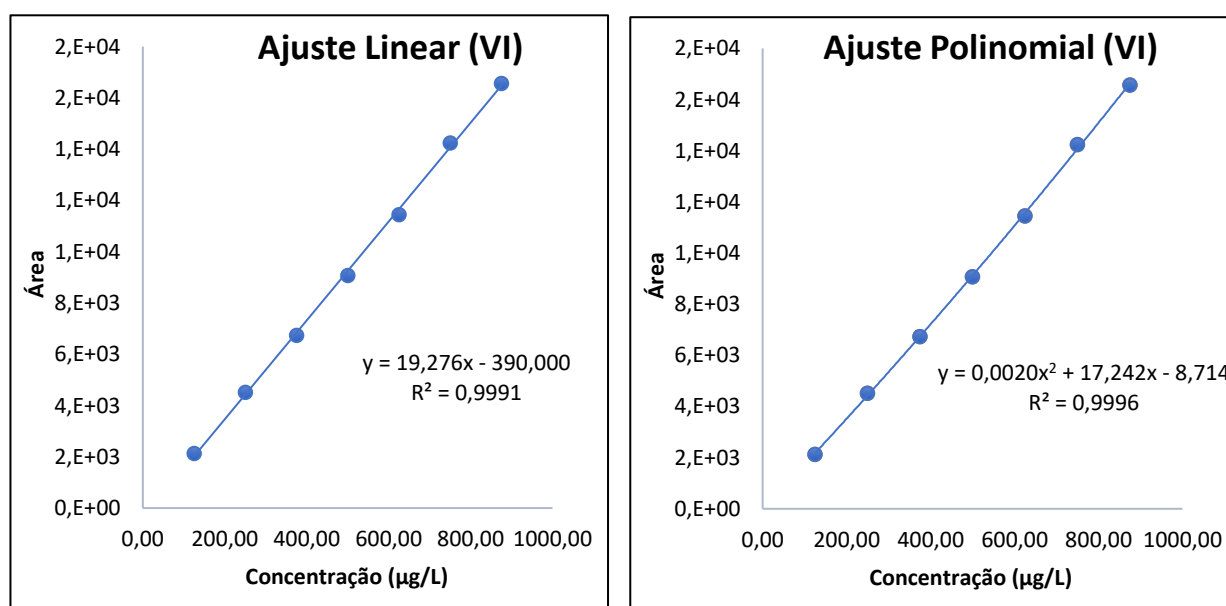


Figura D.9—Representação gráfica dos ajustes linear e polinomial para o 3,5-di-ter-butil-4-hidroxibenzaldeído sem padrão interno

Tabela D.18-Erros quadráticos obtidos para cada ajuste e respetivo desvio padrão residual para o 3,5-di-ter-butil-4-hidroxibenzaldeído sem padrão interno

Ajuste Linear		Ajuste Polinomial	
	$(y-y_i)^2$		$(y-y_i)^2$
	1,29E+04		2,01E+03
	9,04E+03		9,44E+03
	9,49E+03		6,97E+00
	3,06E+04		1,55E+03
	4,42E+04		1,04E+04
	3,18E+04		3,88E+04
	9,17E+03		1,40E+03
Soma=	1,47E+05	Soma=	6,36E+04
N-2=	5	N-3=	4
S_{y/x}=	1,72E+02	S_{y/x(2ª)}=	1,26E+02

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

$$DS^2 = 8,35E+04$$

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

$$VT = 5,250$$

$$F_{(1,5)95\%} = 7,71$$

Tabela D.19-Áreas calculadas para os ajustes linear e polinomial para o 3,5-di-ter-butil-4-hidroxibenzaldeído com padrão interno

Concentração (µg/L)	Área	Área Ajuste Linear	Área Ajuste Polinomial
125	0,24	0,26	0,26
250	0,51	0,50	0,50
375	0,77	0,75	0,75
500	1,00	0,99	0,99
625	1,22	1,24	1,24
750	1,49	1,48	1,49
875	1,71	1,73	1,73
1125	2,23	2,22	2,22

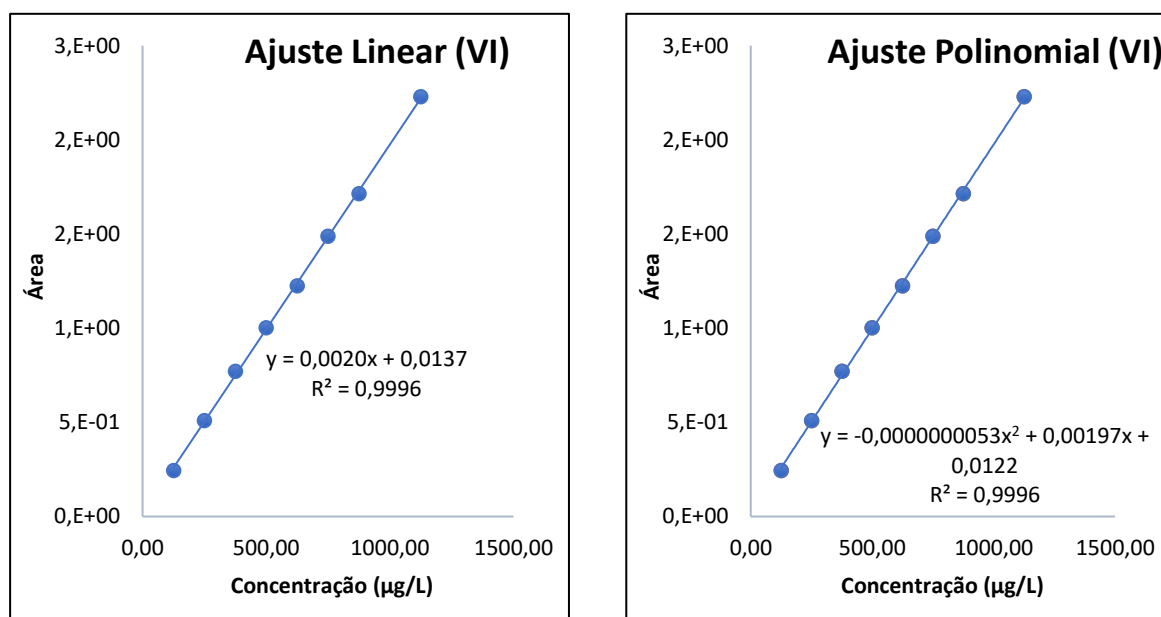


Figura D.10-Representação gráfica dos ajustes linear e polinomial para o 3,5-di-ter-butil-4-hidroxibenzaldeído com padrão interno

Tabela D.20-Erros quadráticos obtidos para cada ajuste e respetivo desvio padrão residual para o 3,5-di-ter-butil-4-hidroxibenzaldeído com padrão interno

Ajuste Linear		Ajuste Polinomial	
$(y-y_i)^2$		$(y-y_i)^2$	
	2,25E-04		2,03E-04
	3,32E-05		3,52E-05
	4,29E-04		4,20E-04
	5,39E-05		4,71E-05
	2,44E-04		2,62E-04
	1,37E-05		1,04E-05
	2,24E-04		2,31E-04
	6,52E-05		7,83E-05
Soma=	1,29E-03	Soma=	1,29E-03
N-2=	6	N-3=	5
S_{y/x}=	1,47E-02	S_{y/x(2°)}=	1,60E-02

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

$$DS^2 = 2,07E-06$$

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

$$VT = 0,008$$

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

❖ 3,5-di-ter-butil-4-hidroxiacetofenona

Tabela D.21-Áreas calculadas para os ajustes linear e polinomial para o 3,5-di-ter-butil-4-hidroxiacetofenona sem padrão interno

Concentração (µg/L)	Área	Área Ajuste Linear	Área Ajuste Polinomial
125	2259	2161	2237
250	5136	5104	5107
375	7927	8048	8009
500	10817	10991	10942
625	14022	13934	13906
750	16959	16877	16902
875	19815	19820	19928

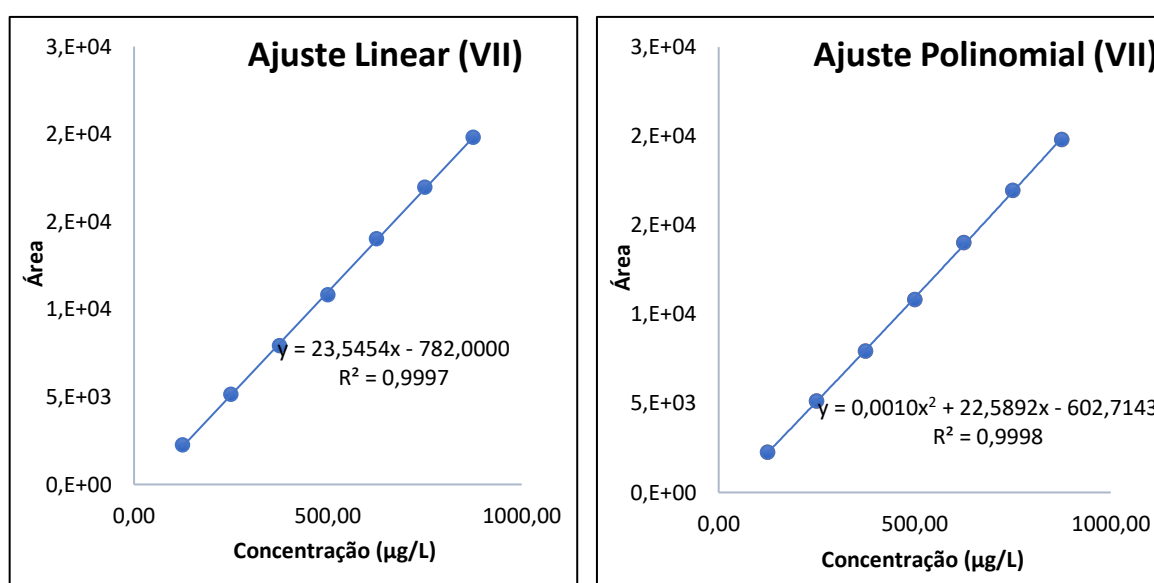


Figura D.11-Representação gráfica dos ajustes linear e polinomial para o 3,5-di-ter-butil-4-hidroxiacetofenona sem padrão interno

Tabela D.22-Erros quadráticos obtidos para cada ajuste e respetivo desvio padrão residual para o 3,5-di-ter-butil-4-hidroxiacetofenona sem padrão interno

Ajuste Linear		Ajuste Polinomial	
	$(y-y_i)^2$		$(y-y_i)^2$
	9,57E+03		5,04E+02
	1,00E+03		8,36E+02
	1,45E+04		6,70E+03
	3,02E+04		1,56E+04
	7,76E+03		1,34E+04
	6,71E+03		3,28E+03
	2,76E+01		1,29E+04
Soma=	6,98E+04	Soma=	5,32E+04
N-2=	5	N-3=	4
S_{y/x}=	1,18E+02	S_{y/x(2º)}=	1,15E+02

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

$$DS^2 = 1,66E+04$$

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

$$VT = 1,245$$

$$F_{(1,5)95\%} = 7,71$$

Tabela D.23-Áreas calculadas para os ajustes linear e polinomial para o 3,5-di-ter-butil-4-hidroxiacetofenona com padrão interno

Concentração (µg/L)	Área	Área Ajuste Linear	Área Ajuste Polinomial
125	0,31	0,33	0,32
250	0,66	0,66	0,65
375	1,01	0,99	0,99
500	1,34	1,32	1,32
625	1,62	1,65	1,66
750	2,00	1,98	1,99
875	2,31	2,31	2,31
1125	2,96	2,97	2,96

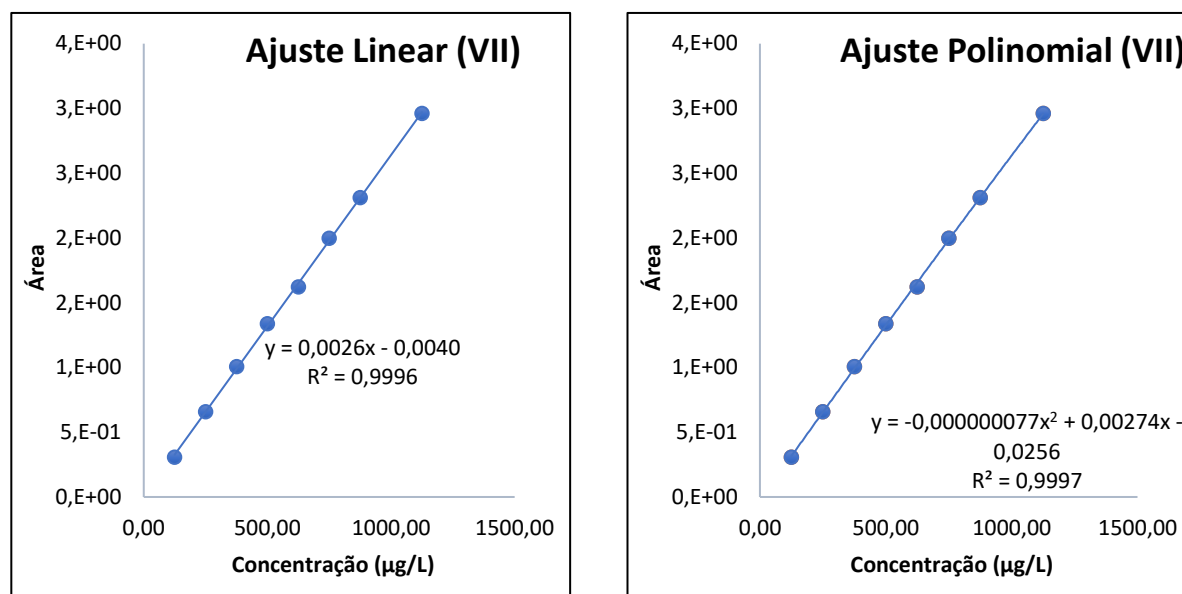


Figura D.12-Representação gráfica dos ajustes linear e polinomial para o 3,5-di-ter-butil-4-hidroxiacetofenona com padrão interno

Tabela D.24-Erros quadráticos obtidos para cada ajuste e respetivo desvio padrão residual para o 3,5-di-ter-butil-4-hidroxiacetofenona com padrão interno

Ajuste Linear		Ajuste Polinomial	
$(y-y_i)^2$		$(y-y_i)^2$	
	4,02E-04		8,42E-05
	7,96E-07		1,24E-05
	3,64E-04		2,53E-04
	3,40E-04		1,40E-04
	7,62E-04		1,24E-03
	3,45E-04		1,52E-04
	1,13E-06		1,95E-06
	1,08E-04		3,78E-06
Soma=	2,32E-03	Soma=	1,89E-03
N-2=	6	N-3=	5
S_{y/x}=	1,97E-02	S_{y/x(2ª)}=	1,94E-02

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

$$DS^2 = 4,35E-04$$

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

$$VT = 1,151$$

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

❖ 3-(3,5-di-terc-butil-4-hidroxifenil) propionato de metilo

Tabela D.25-Áreas calculadas para os ajustes linear e polinomial para o 3-(3,5-di-terc-butil-4-hidroxifenil) propionato de metilo sem padrão interno

Concentração (µg/L)	Área	Área Ajuste Linear	Área Ajuste Polinomial
125	914	878	880
250	1953	1981	1981
375	3081	3084	3083
500	4105	4187	4185
625	5313	5290	5288
750	6529	6392	6392
875	7412	7495	7497

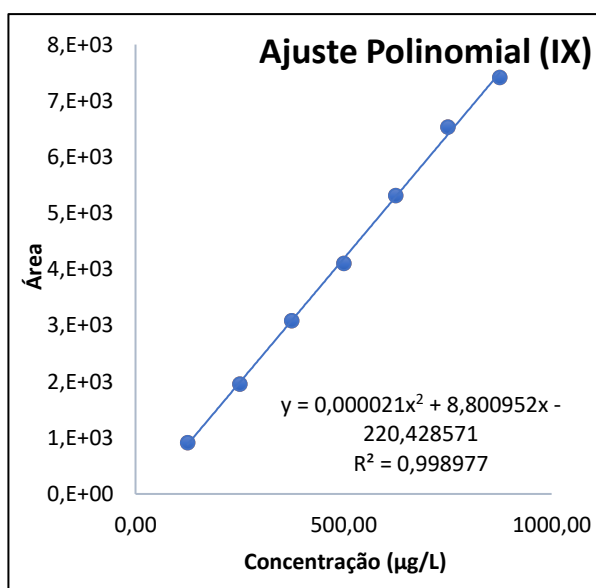
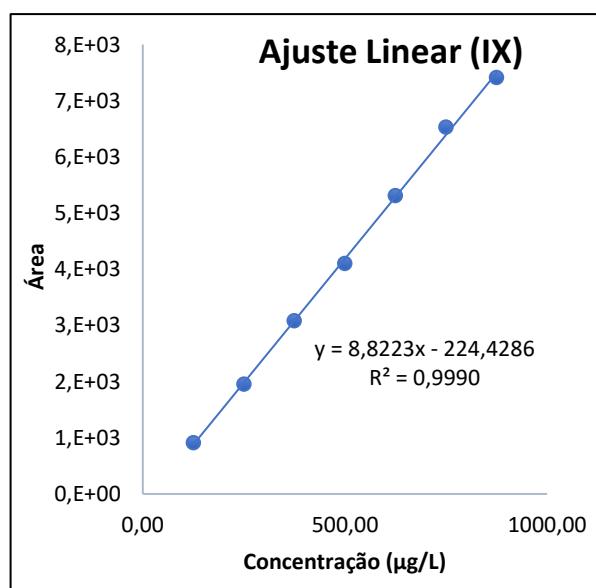


Figura D.13-Representação gráfica dos ajustes linear e polinomial para o 3-(3,5-di-terc-butil-4-hidroxifenil) propionato de metilo sem padrão interno

Tabela D.26-Erros quadráticos obtidos para cada ajuste e respectivo desvio padrão residual para o 3-(3,5-di-terc-butil-4-hidroxifenil) propionato de metilo sem padrão interno

Ajuste Linear		Ajuste Polinomial	
	$(y-y_i)^2$		$(y-y_i)^2$
	1,27E+03		1,15E+03
	7,92E+02		7,92E+02
	8,58E+00		3,61E+00
	6,68E+03		6,45E+03
	5,52E+02		6,05E+02
	1,87E+04		1,87E+04
	6,90E+03		7,14E+03
Soma=	3,49E+04	Soma=	3,49E+04
N-2=	5	N-3=	4
S_{y/x}=	8,35E+01	S_{y/x(2º)}=	9,34E+01

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

$$DS^2 = 9,25E+00$$

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

$$VT = 0,001$$

$$F_{(1,5)95\%} = 7,71$$

Tabela D.27-Áreas calculadas para os ajustes linear e polinomial para o 3-(3,5-di-terc-butil-4-hidroxifenil) propionato de metilo com padrão interno

Concentração (µg/L)	Área	Área Ajuste Linear	Área Ajuste Polinomial
125	0,12	0,13	0,12
250	0,30	0,30	0,30
375	0,48	0,48	0,48
500	0,66	0,65	0,66
625	0,82	0,83	0,83
750	1,02	1,01	1,01
875	1,19	1,18	1,18
1125	1,53	1,53	1,53

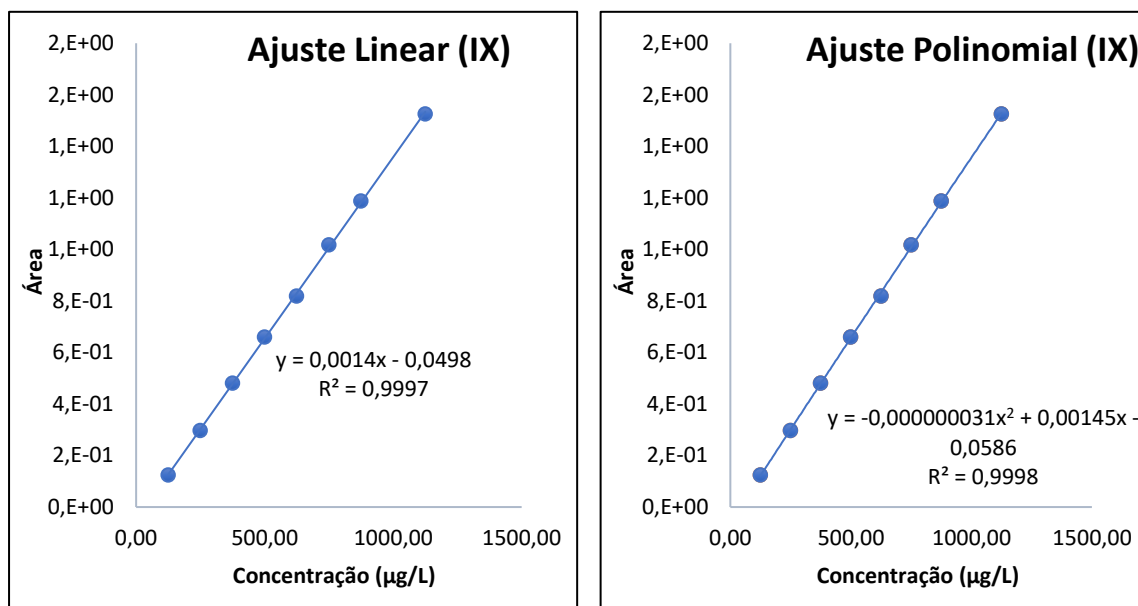


Figura D. 14-Representação gráfica dos ajustes linear e polinomial para o 3-(3,5-di-terc-butil-4-hidroxifenil) propionato de metilo com padrão interno

Tabela D.28-Erros quadráticos obtidos para cada ajuste e respetivo desvio padrão residual para o 3-(3,5-di-terc-butil-4-hidroxifenil) propionato de metilo com padrão interno

Ajuste Linear		Ajuste Polinomial	
$(y-y_i)^2$		$(y-y_i)^2$	
1,81E-06		9,56E-06	
2,57E-05		1,58E-05	
9,45E-06		3,17E-06	
2,83E-05		6,84E-06	
1,37E-04		2,21E-04	
1,35E-04		8,10E-05	
4,31E-05		2,95E-05	
7,17E-05		1,38E-05	
Soma=	4,52E-04	Soma=	3,80E-04
N-2=	6	N-3=	5
S_{y/x}=	8,68E-03	S_{y/x(2ª)}=	8,72E-03

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

$$DS^2 = 7,19E-05$$

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

$$VT = 0,944$$

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

❖ Padrões internos

Tabela D.29-Áreas calculadas para os ajustes linear e polinomial para 4-etilfenol-d₁₀

Concentração (µg/L)	Área	Área Ajuste Linear	Área Ajuste Polinomial
9,01	75	73	72
18,03	166	170	170
27,04	268	267	267
36,05	360	364	364
54,08	567	558	559
63,09	651	655	655
81,12	848	849	849

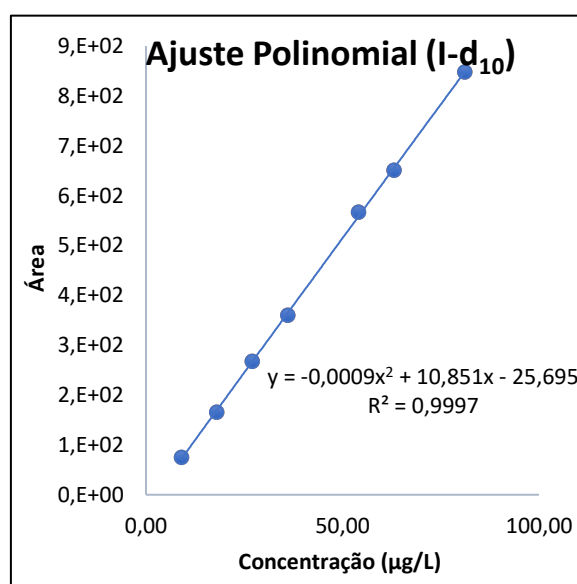
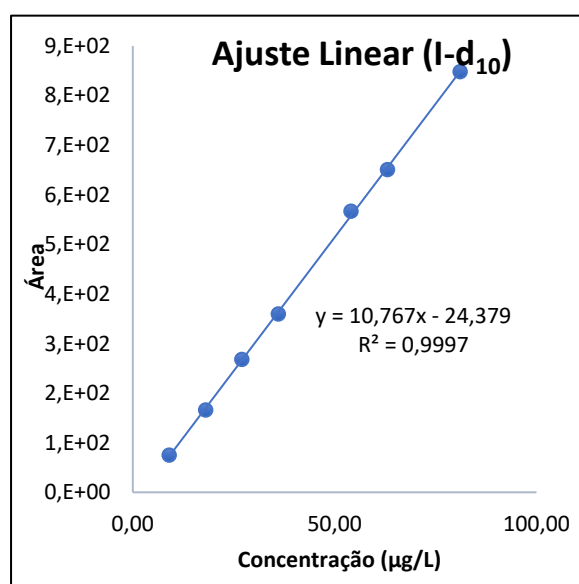
Figura D.15-Representação gráfica dos ajustes linear e polinomial para o 4-etilfenol-d₁₀

Tabela D.30-Erros quadráticos obtidos para cada ajuste e respetivo desvio padrão residual para o 4-etilfenol-d₁₀

Ajuste Linear		Ajuste Polinomial	
	$(y-y_i)^2$		$(y-y_i)^2$
	5,42E+00		8,77E+00
	1,39E+01		1,31E+01
	1,50E+00		8,70E-01
	1,47E+01		1,90E+01
	8,22E+01		7,20E+01
	1,59E+01		1,91E+01
	1,18E+00		4,13E-01
Soma=	1,35E+02	Soma=	1,33E+02
N-2=	5	N-3=	4
S_{y/x}=	5,19E+00	S_{y/x(2º)}=	5,77E+00

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

$$DS^2 = 1,38E+00$$

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

$$VT = 0,041$$

$$F_{(1,5)95\%} = 7,71$$

Tabela D.31-Áreas calculadas para os ajustes linear e polinomial para o 4-terc-butil-d₉-fenol-2,3,5,6-d₄

Concentração (µg/L)	Área	Área Ajuste Linear	Área Ajuste Polinomial
173,45	1537	1513	1420
346,90	3570	3748	3731
520,34	5966	5983	6024
693,79	8233	8218	8298
867,24	10636	10453	10555
1040,69	12908	12688	12794
1214,14	14769	14923	15014
1561,03	19301	19393	19402

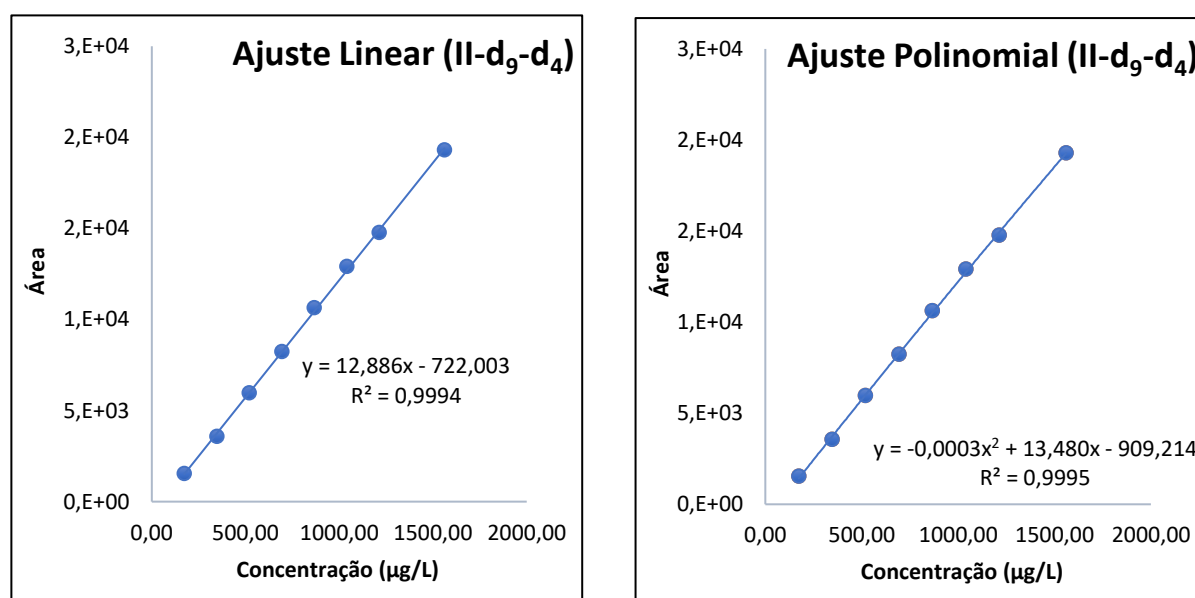
Figura D.16-Representação gráfica dos ajustes linear e polinomial para o 4-terc-butil-d₉-fenol-2,3,5,6-d₄

Tabela D.32-Erros quadráticos obtidos para cada ajuste e respetivo desvio padrão residual para o 4-terc-butil-d₉-fenol-2,3,5,6-d₄

Ajuste Linear		Ajuste Polinomial	
$(y-y_i)^2$		$(y-y_i)^2$	
5,75E+02		1,37E+04	
3,17E+04		2,58E+04	
2,92E+02		3,31E+03	
2,22E+02		4,27E+03	
3,34E+04		6,54E+03	
4,83E+04		1,30E+04	
2,38E+04		6,03E+04	
8,51E+03		1,01E+04	
Soma=	1,47E+05	Soma=	1,37E+05
N-2=	6	N-3=	5
S_{y/x}=	1,56E+02	S_{y/x(2º)}=	1,66E+02

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

$$DS^2 = 9,72E+03$$

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

$$VT = 0,35448$$

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

E. Teste de RIKILT

A análise da linearidade em cada ponto da reta de calibração é efetuada pelo teste de RIKILT. De modo, a avaliar o comportamento da reta de calibração é efetuado um gráfico de linearidade.

Para cada um dos pontos (y_i, x_i) é calculada a razão y_i/x_i que relaciona o sinal instrumental com a concentração. De seguida, calcula-se a média de todas as razões y_i/x_i , conferindo o valor de 100% a este valor médio. Finalmente, o valor percentual de cada valor y_i/x_i é calculado em função do valor médio, $\overline{y_i/x_i}$, pela equação E.1:

$$y_i/x_i (\%) = \frac{y_i/x_i}{\overline{y_i/x_i}} \times 100 \quad (\text{E.1})$$

O gráfico de linearidade relaciona o valor percentual da razão entre o sinal instrumental e o valor da concentração, $y_i/x_i (\%)$, em função da concentração respetiva. Idealmente esta razão deveria ser igual a 100% para ser obtida uma linearidade perfeita. No entanto, admite-se que os valores normalizados possam ter um desvio até 10%, o que significa que os valores devem estar compreendidos entre 90 e 100%. Caso seja obtido um ponto em que o valor percentual não cumpre este requisito, rejeita-se esse ponto, reduzindo-se a gama de trabalho e aplicando-se novamente o teste de RIKILT até que se cumpram os limites estabelecidos.

❖ 4-etilfenol

Tabela E.1-Cálculo das razões para o teste de RIKILT para o 4-etilfenol sem padrão interno

Concentração ($\mu\text{g/L}$) = x_i	Área = y_i	Razão y_i / x_i	% y_i / x_i
5,18	333	64,29	96
10,36	702	67,76	102
15,54	1 063	68,40	103
20,72	1395	67,33	101
25,90	1721	66,45	100
31,08	2052	66,02	99
36,26	2407	66,38	100
46,62	3114	66,80	100
Média		66,68	

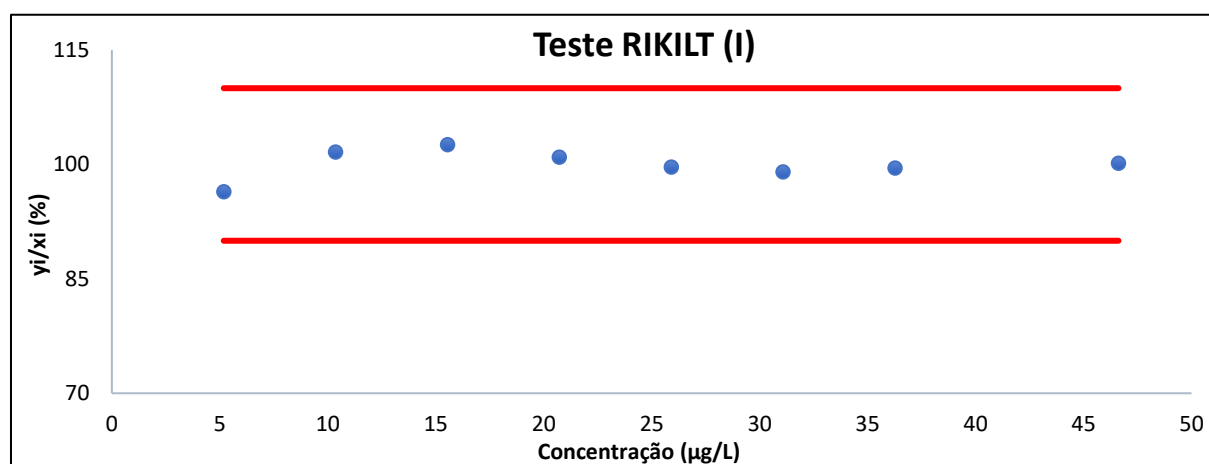


Figura E.1-Representação gráfica do teste de RIKILT para o 4-etilfenol sem padrão interno

Tabela E.2-Cálculo das razões para o teste de RIKILT para o 4-etilfenol com padrão interno

Concentração ($\mu\text{g/L}$) = x_i	Área relativa = y_i / y_{PI}	Razão $(y_i / y_{PI}) / x_i$	% $(y_i / y_{PI}) / x_i$
5,18	0,22	0,042	109
10,36	0,41	0,039	102
15,54	0,62	0,040	103
20,72	0,80	0,039	101
25,90	0,97	0,037	97
31,08	1,15	0,037	97
36,26	1,33	0,037	96
46,62	1,71	0,037	96
Média		0,038	

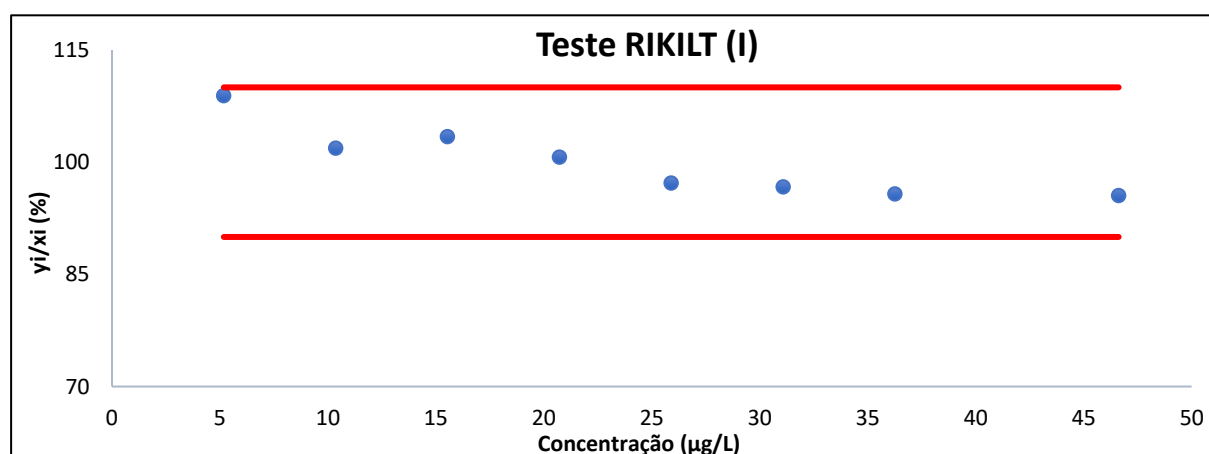


Figura E.2-Representação gráfica do teste de RIKILT para o 4-etilfenol com padrão interno

❖ 4-terc-butilfenol

Tabela E.3-Cálculo das razões para o teste de RIKILT para o 4-terc-butilfenol sem padrão interno

Concentração ($\mu\text{g/L}$) = x_i	Área = y_i	Razão y_i / x_i	% y_i / x_i
125	6090	48,72	94
250	12657	50,63	97
375	19621	52,32	101
500	26658	53,32	102
625	32744	52,39	101
750	39808	53,08	102
875	47158	53,89	104
Média		52,05	

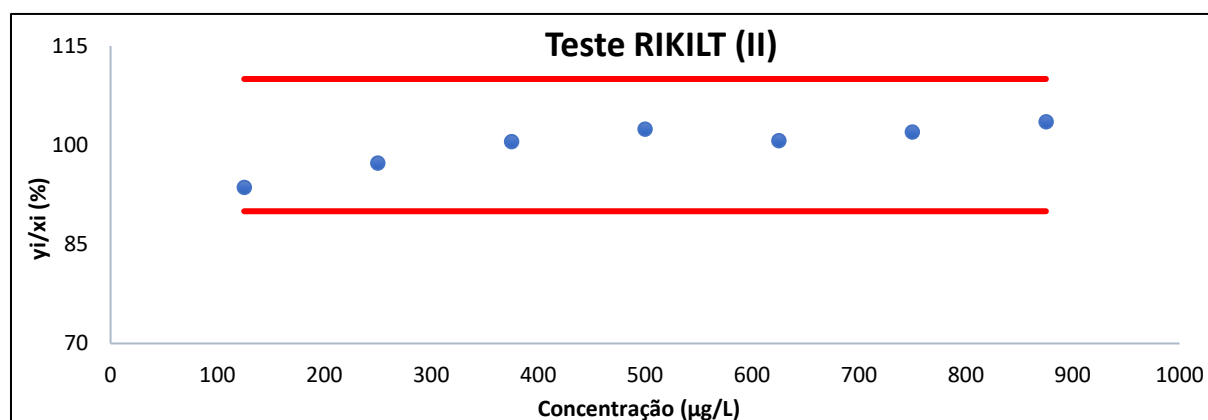


Figura E.3-Representação gráfica do teste de RIKILT para o 4-terc-butilfenol sem padrão interno

Tabela E.4-Cálculo das razões para o teste de RIKILT para o 4-terc-butilfenol com padrão interno

Concentração ($\mu\text{g/L}$) = x_i	Área relativa = y_i / y_{PI}	Razão $(y_i / y_{PI}) / x_i$	% $(y_i / y_{PI}) / x_i$
125	0,27	0,0022	80
250	0,66	0,0027	97
375	1,03	0,0027	100
500	1,39	0,0028	101
625	1,78	0,0029	104
750	2,18	0,0029	106
875	2,57	0,0029	107
1125	3,27	0,0029	106
Média		0,0027	

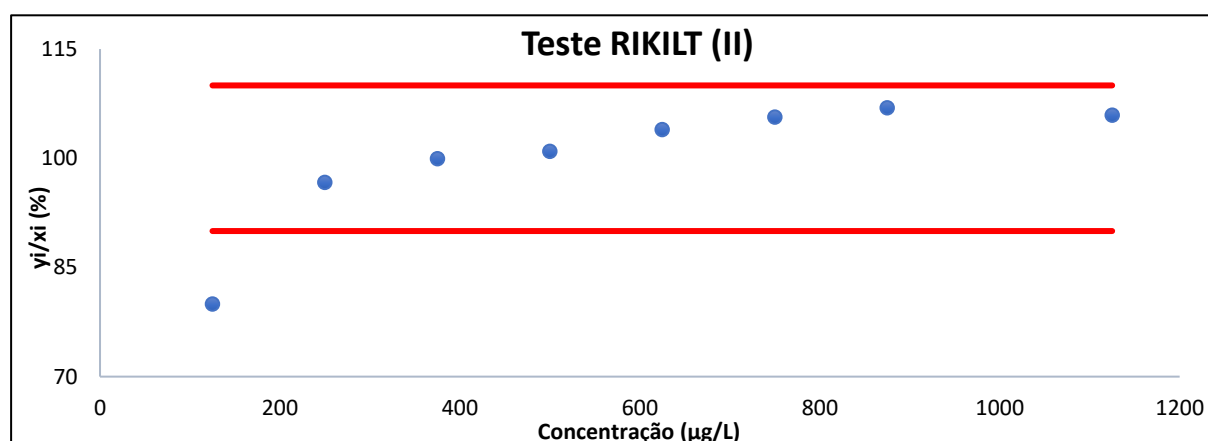


Figura E.4-Representação gráfica do teste de RIKILT para o 4-terc-butilfenol com padrão interno

❖ 2,6-di-terc-butil-p-benzoquinona

Tabela E.5-Cálculo das razões para o teste de RIKILT para o 2,6-di-terc-butil-p-benzoquinona sem padrão interno

Concentração ($\mu\text{g/L}$) = x_i	Área = y_i	Razão y_i / x_i	% y_i / x_i
125	805	6,44	96
250	1602	6,41	96
375	2483	6,62	99
500	3387	6,77	101
625	4242	6,79	101
750	5134	6,85	102
875	6079	6,95	104
Média		6,69	

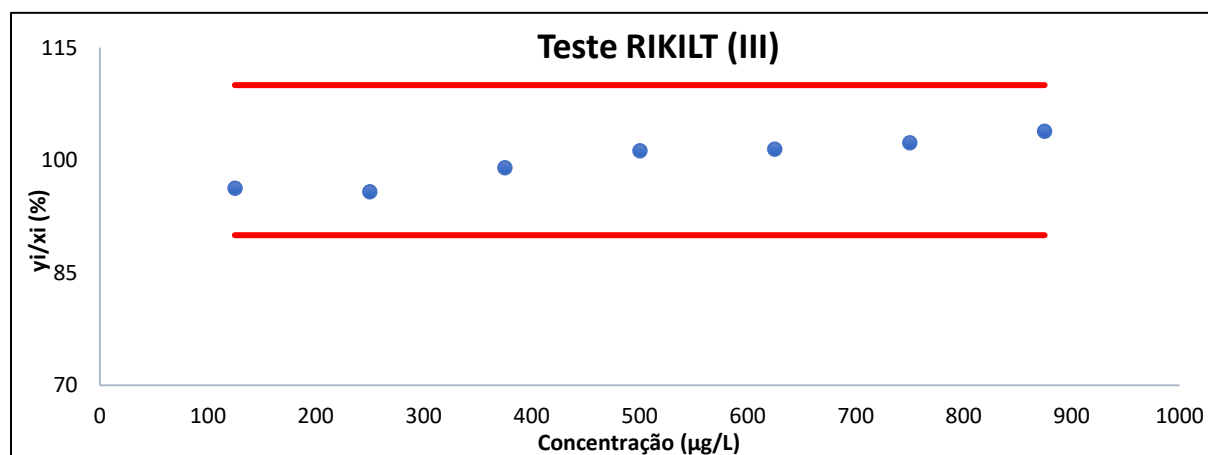
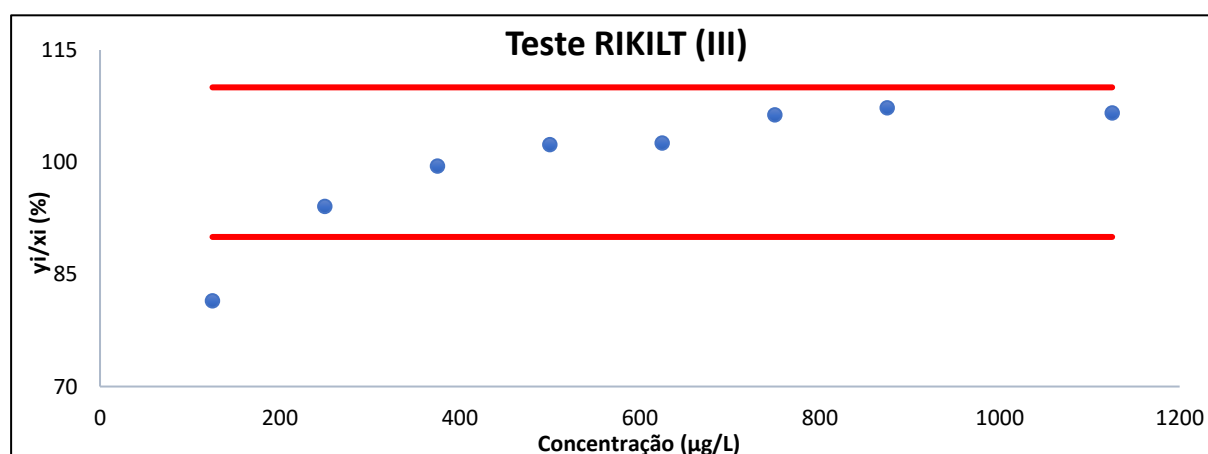


Figura E.5-Representação gráfica do teste de RIKILT para o 2,6-di-terc-butil-p-benzoquinona sem padrão interno

Tabela E.6—Cálculo das razões para o teste de RIKILT para o 2,6-di-terc-butil-p-benzoquinona com padrão interno

Concentração ($\mu\text{g/L}$) = x_i	Área relativa = y_i / y_{PI}	Razão $(y_i / y_{PI}) / x_i$	% $(y_i / y_{PI}) / x_i$
125	0,017	0,00013	81
250	0,039	0,00015	94
375	0,061	0,00016	99
500	0,084	0,00017	102
625	0,10	0,00017	103
750	0,13	0,00017	106
875	0,15	0,00018	107
1125	0,20	0,00017	107
Média		0,00016	

**Figura E.6**—Representação gráfica do teste de RIKILT para o 2,6-di-terc-butil-p-benzoquinona com padrão interno

❖ 2,4-di-terc-butilfenol

Tabela E.7-Cálculo das razões para o teste de RIKILT para o composto 2,4-di-terc-butilfenol sem padrão interno

Concentração ($\mu\text{g/L}$) = x_i	Área = y_i	Razão y_i / x_i	% y_i / x_i
125	5286	42,29	90
250	10960	43,84	94
375	17384	46,36	99
500	23722	47,44	101
625	30181	48,29	103
750	37179	49,57	106
875	43335	49,53	106
Média		46,76	

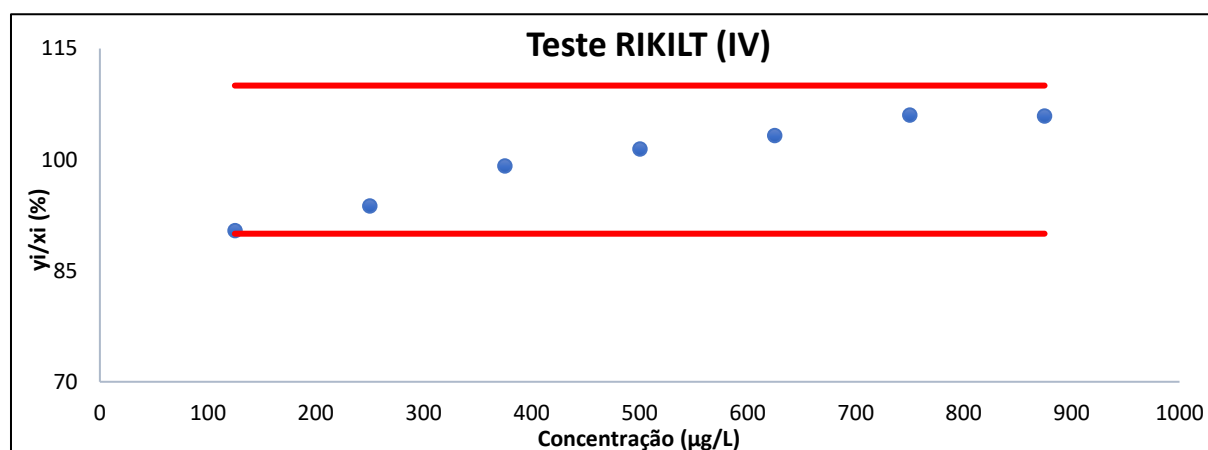
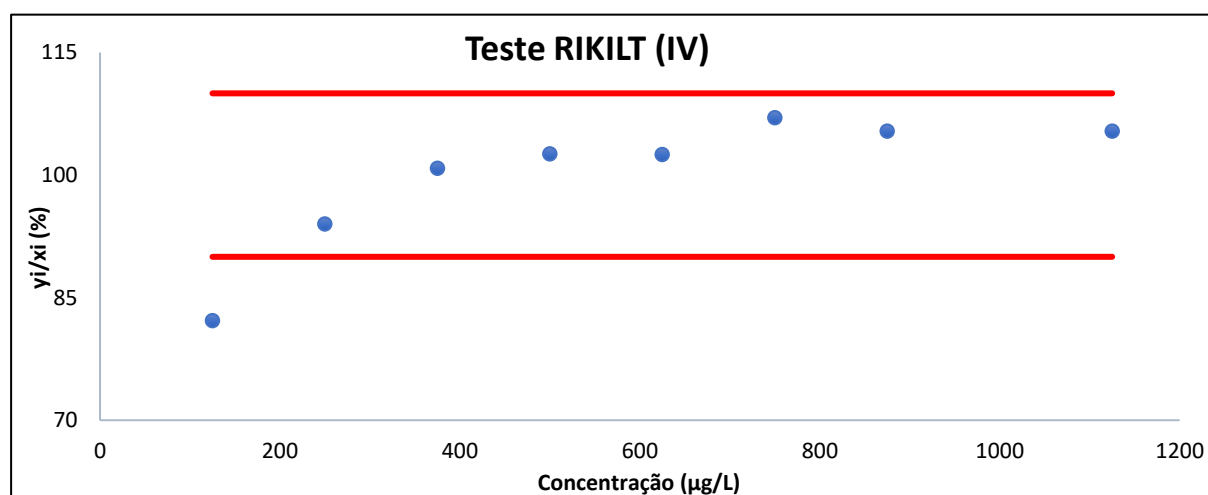


Figura E.7-Representação gráfica do teste de RIKILT para o 2,4-di-terc-butilfenol sem padrão interno

Tabela E.8-Cálculo das razões para o teste de RIKILT para o composto 2,4-di-terc-butilfenol com padrão interno

Concentração ($\mu\text{g/L}$) = x_i	Área relativa = y_i / y_{PI}	Razão $(y_i / y_{PI}) / x_i$	% $(y_i / y_{PI}) / x_i$
125	0,34	0,0027	82
250	0,78	0,0031	94
375	1,25	0,0033	101
500	1,70	0,0034	103
625	2,12	0,0034	103
750	2,66	0,0035	107
875	3,06	0,0035	105
1125	3,93	0,0035	105
Média		0,0033	

**Figura E.8**-Representação gráfica do teste de RIKILT para o 2,4-di-terc-butilfenol com padrão interno

❖ 3,5-di-terc-butil-4-hidroxibenzaldeído

Tabela E.9-Cálculo das razões para o teste de RIKILT para o 3,5-di-terc-butil-4-hidroxibenzaldeído sem padrão interno

Concentração ($\mu\text{g/L}$) = x_i	Área = y_i	Razão y_i / x_i	% y_i / x_i
125	2133	17,06	94
250	4524	18,10	99
375	6741	17,98	99
500	9073	18,15	100
625	11447	18,32	101
750	14245	18,99	104
875	16572	18,94	104
Média		18,22	

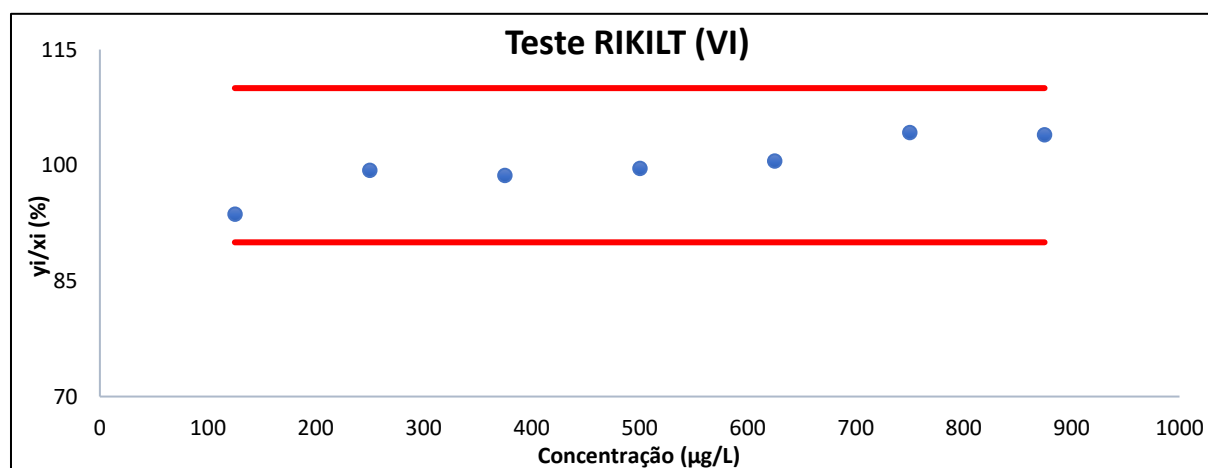
**Figura E.9**-Representação gráfica do teste de RIKILT para o 3,5-di-terc-butil-4-hidroxibenzaldeído sem padrão interno

Tabela E.10-Cálculo das razões para o teste de RIKILT para o 3,5-di-terc-butil-4-hidroxibenzaldeído com padrão interno

Concentração ($\mu\text{g/L}$) = x_i	Área relativa = y_i / y_{PI}	Razão (y_i / y_{PI}) / x_i	% (y_i / y_{PI}) / x_i
125	0,24	0,0020	98
250	0,51	0,0020	102
375	0,77	0,0021	103
500	1,00	0,0020	101
625	1,22	0,0020	98
750	1,49	0,0020	100
875	1,71	0,0020	98
1125	2,23	0,0020	99
Média		0,0020	

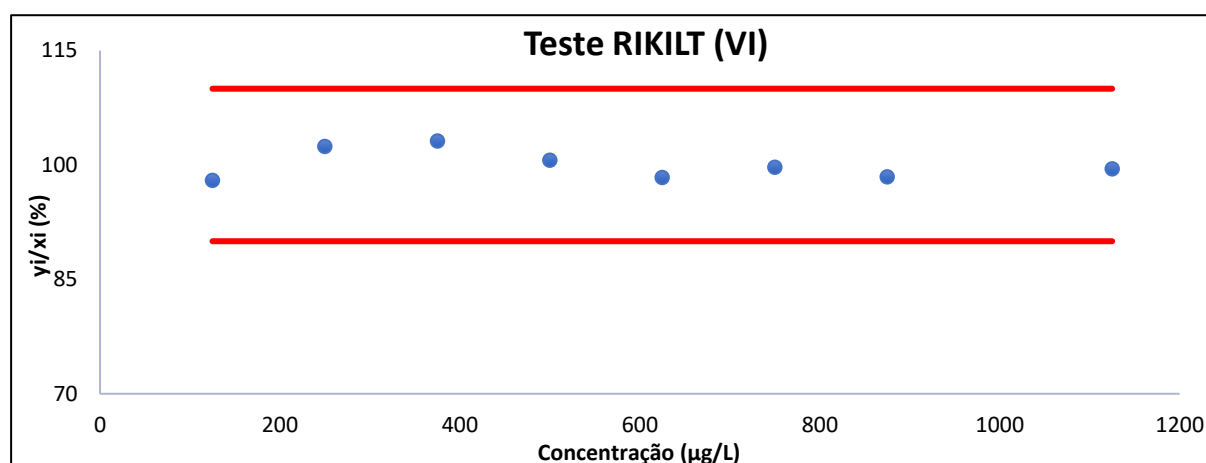


Figura E.10-Representação gráfica do teste de RIKILT para o 3,5-di-terc-butil-4-hidroxibenzaldeído com padrão interno

❖ 3,5-di-terc-butil-4-hidroxiacetofenona

Tabela E.11-Cálculo das razões para o teste de RIKILT para o 3,5-di-terc-butil-4-hidroxiacetofenona sem padrão interno

Concentração ($\mu\text{g/L}$) = x_i	Área = y_i	Razão y_i / x_i	% y_i / x_i
125	2259	18,07	85
250	5136	20,54	96
375	7927	21,14	99
500	10817	21,63	102
625	14022	22,44	105
750	16959	22,61	106
875	19815	22,65	106
Média		21,30	

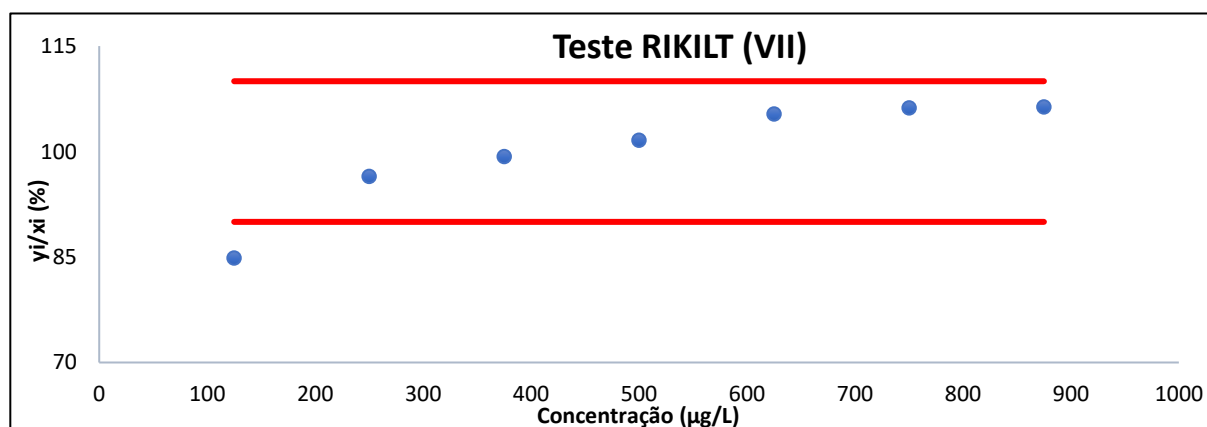


Figura E.11-Representação gráfica do teste de RIKILT para o 3,5-di-terc-butil-4-hidroxiacetofenona sem padrão interno

Tabela E.12-Cálculo das razões para o teste de RIKILT para o 3,5-di-terc-butil-4-hidroxiacetofenona com padrão interno

Concentração ($\mu\text{g/L}$) = x_i	Área relativa = y_i / y_{PI}	Razão (y_i / y_{PI}) / x_i	% (y_i / y_{PI}) / x_i
125	0,31	0,0025	94
250	0,66	0,0026	100
375	1,01	0,0027	102
500	1,34	0,0027	102
625	1,62	0,0026	99
750	2,00	0,0027	102
875	2,31	0,0026	101
1125	2,96	0,0026	100
Média		0,0026	

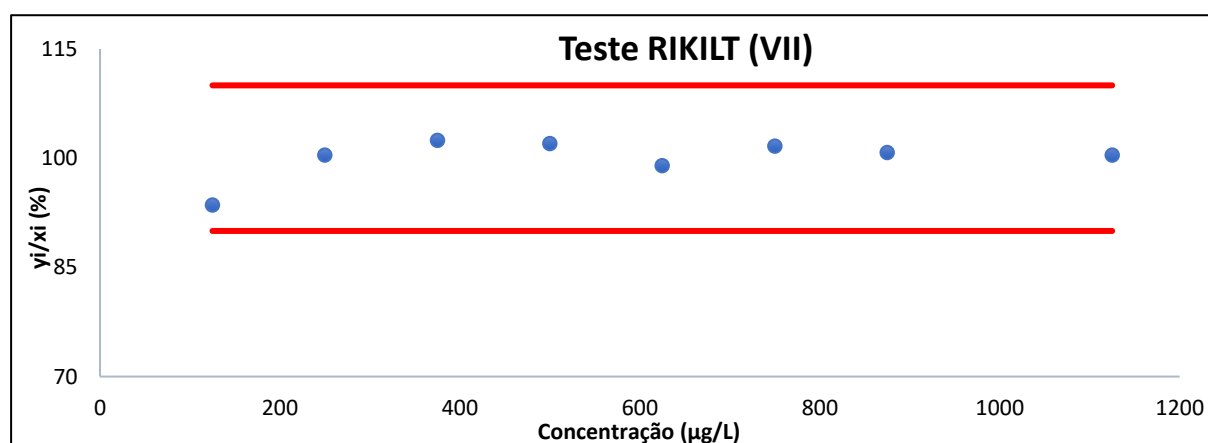


Figura E.12-Representação gráfica do teste de RIKILT para o 3,5-di-terc-butil-4-hidroxiacetofenona com padrão interno

❖ 3-(3,5-di-terc-butil-4-hidroxifenil) propionato de metilo

Tabela E.13—Cálculo das razões para o teste de RIKILT para o 3-(3,5-di-terc-butil-4-hidroxifenil) propionato de metilo sem padrão interno

Concentração ($\mu\text{g/L}$) = x_i	Área = y_i	Razão y_i / x_i	% y_i / x_i
125	914	7,31	89
250	1953	7,81	96
375	3081	8,22	100
500	4105	8,21	100
625	5313	8,50	104
750	6529	8,71	106
875	7412	8,47	104
Média		8,18	

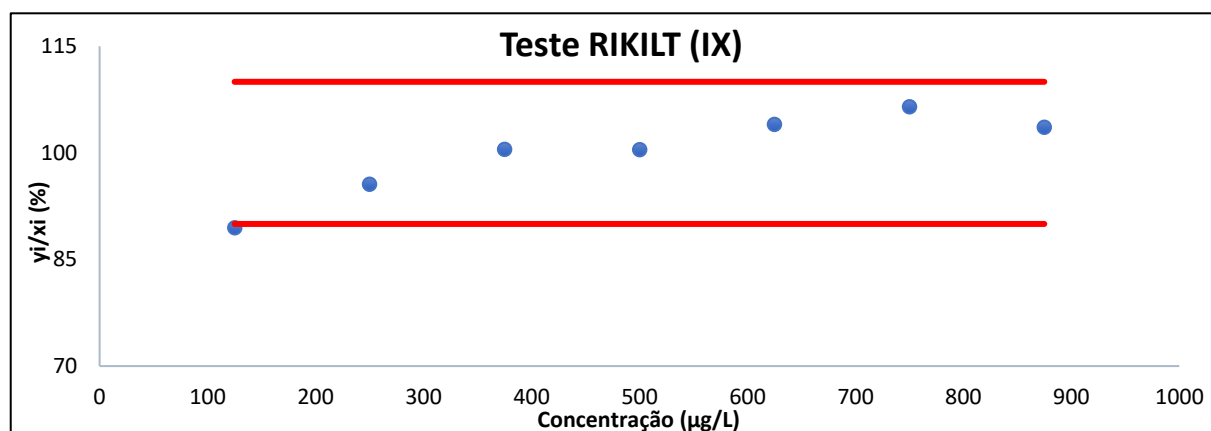
**Figura E.13**—Representação gráfica do teste de RIKILT para o 3-(3,5-di-terc-butil-4-hidroxifenil) propionato de metilo sem padrão interno

Tabela E.14-Cálculo das razões para o teste de RIKILT para o 3-(3,5-di-terc-butil-4-hidroxifenil) propionato de metilo com padrão interno

Concentração ($\mu\text{g/L}$) = x_i	Área relativa = y_i / y_{PI}	Razão (y_i / y_{PI}) / x_i	% (y_i / y_{PI}) / x_i
125	0,12	0,0010	79
250	0,30	0,0012	93
375	0,48	0,0013	101
500	0,66	0,0013	104
625	0,82	0,0013	103
750	1,02	0,0014	107
875	1,19	0,0014	107
1125	1,53	0,0014	107
Média		0,0013	

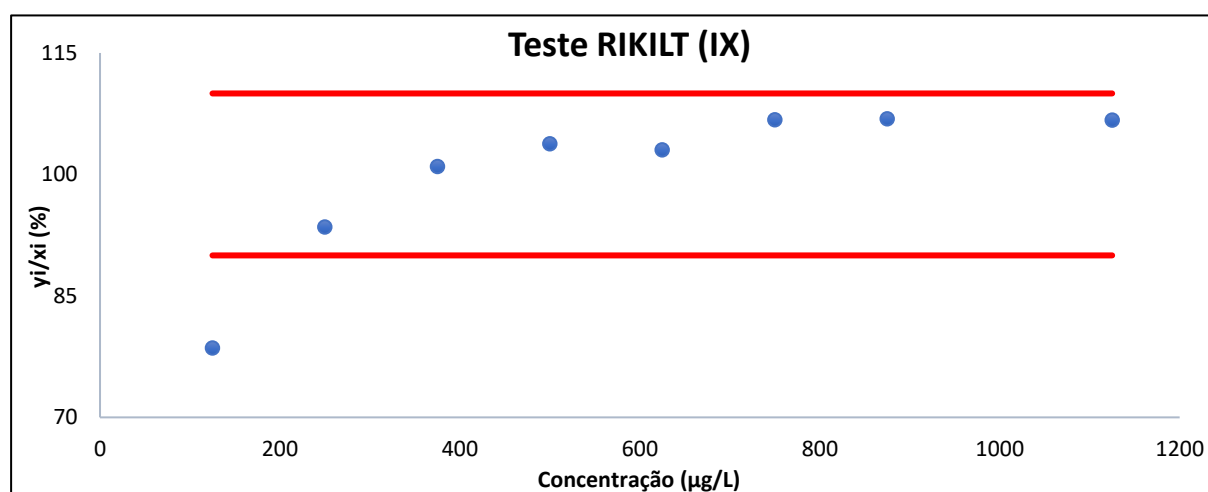


Figura E.14-Representação gráfica do teste de RIKILT para o 3-(3,5-di-terc-butil-4-hidroxifenil) propionato de metilo com padrão interno

F. Teste das Áreas Normalizadas

A avaliação da dispersão dos valores obtidos na calibração em relação aos valores ótimos, é feita através da análise das áreas normalizadas. A distribuição dos valores normalizados deve respeitar um intervalo previamente estabelecido.

Primeiramente, calculam-se as áreas estimadas dos picos cromatográficos correspondentes às concentrações da gama de trabalho, a partir da reta de calibração. De seguida, determina-se a razão entre o valor experimental do sinal cromatográfico e o valor estimado do sinal cromatográfico. A concentração que corresponde à razão mais perto de 1 é denominada C_{100} . Esta concentração corresponde ao ponto experimental com melhor correlação. Através da mesma, é possível proceder ao cálculo das áreas normalizadas:

$$\text{Área Normalizada} = \frac{\frac{A_i}{C_i} \times C_{100} \times 100}{A_{100}} \quad (\text{F.1})$$

A_i – Área do pico cromatográfico correspondente a determinada concentração

C_i – Concentração correspondente à área A_i

A_{100} – Área do pico cromatográfico correspondente ao ponto experimental com melhor correlação

C_{100} – Concentração correspondente ao ponto experimental com melhor correlação

Os valores calculados das áreas normalizadas devem estar compreendidos entre 85% e 115%. Caso este requisito não seja cumprido por algum valor normalizado, este deve ser excluído reduzindo-se a gama de trabalho e aplicando-se novamente este teste até os que os pontos possuam todos desvios inferiores a 15%. Os resultados podem ser observados graficamente onde os valores normalizados são apresentados em função da concentração do composto.

❖ 4-etilfenol

Tabela F.1- Cálculo dos valores normalizados para o 4-etilfenol sem padrão interno

Área Pico estimada	Área Experimental / Área estimada	Concentração (µg/L)	Valores normalizados
351,3	0,948	5,18	103,3
695,3	1,010	10,36	98,0
1039,3	1,023	15,54	97,0
1383,4	1,008	20,72	98,6
1727,4	0,996	25,90	99,9
2071,4	0,991	31,08	100,5
2415,4	0,997	36,26	100,0
3103,5	1,003	46,62	99,4

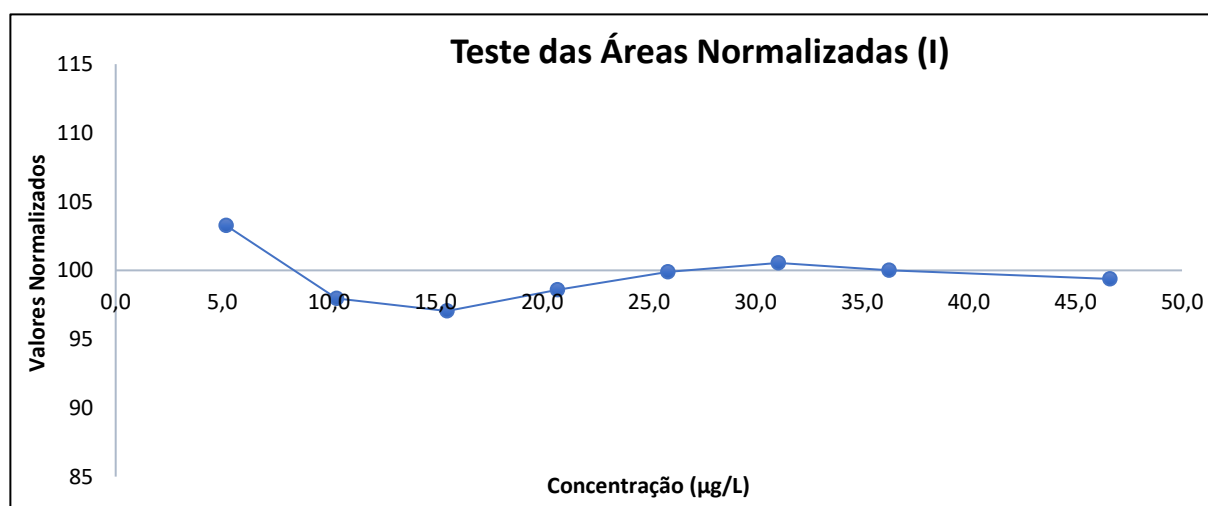


Figura F.1- Representação gráfica da concentração em função dos valores normalizados para o 4-etilfenol sem padrão interno

Tabela F.2-Cálculo dos valores normalizados para o 4-etilfenol com padrão interno

Área Pico estimada	Área Experimental / Área estimada	Concentração (µg/L)	Valores normalizados
0,23	0,948	5,18	88,8
0,41	0,979	10,36	94,9
0,60	1,030	15,54	93,5
0,78	1,021	20,72	96,1
0,97	0,997	25,90	99,5
1,15	0,999	31,08	100,0
1,34	0,994	36,26	101,0
1,71	0,999	46,62	101,2

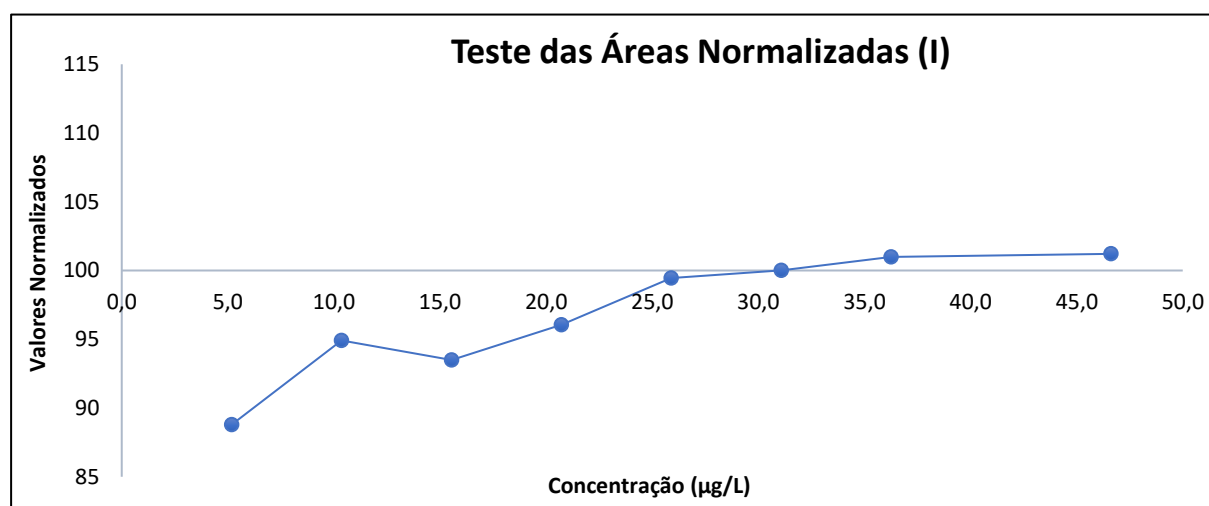


Figura F.2-Representação gráfica da concentração em função dos valores normalizados para o 4-etilfenol com padrão interno

❖ 4-terc-butilfenol

Tabela F.3-Cálculo dos valores normalizados para o 4-terc-butilfenol sem padrão interno

Área Pico estimada	Área Experimental / Área estimada	Concentração (µg/L)	Valores normalizados
5966,3	1,021	125	108,9
12774,5	0,991	250	104,8
19582,7	1,002	375	101,4
26390,9	1,010	500	99,6
33199,0	0,986	625	101,3
40007,2	0,995	750	100,0
46815,4	1,007	875	98,5

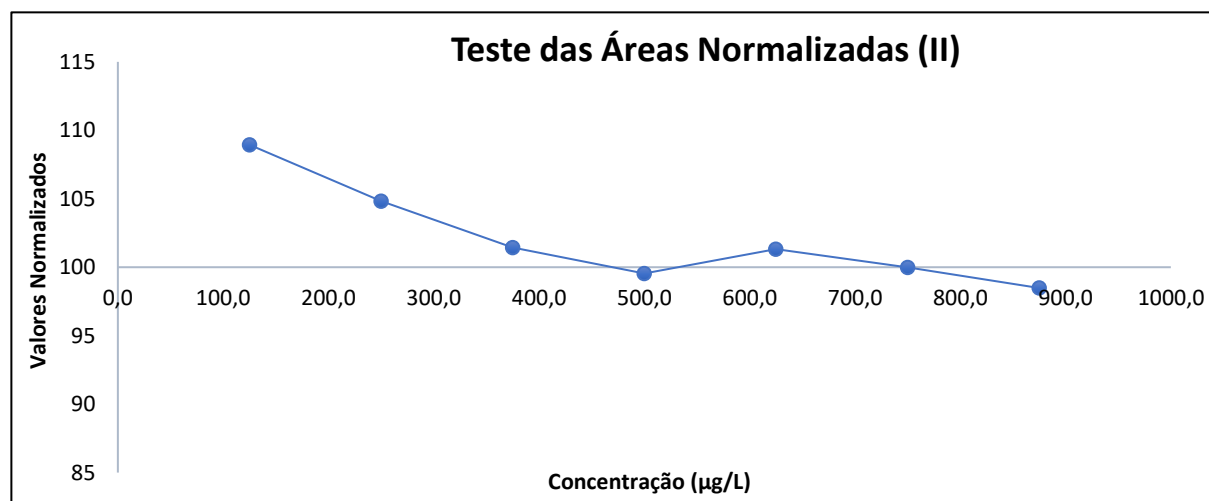


Figura F.3-Representação gráfica da concentração em função dos valores normalizados para o 4-terc-butilfenol sem padrão interno

Tabela F.4-Cálculo dos valores normalizados para o 4-terc-butilfenol com padrão interno

Área Pico estimada	Área Experimental / Área estimada	Concentração (µg/L)	Valores normalizados
0,28	0,988	125	124,9
0,65	1,014	250	103,4
1,03	0,997	375	100,0
1,41	0,984	500	99,0
1,79	0,999	625	96,1
2,16	1,006	750	94,6
2,54	1,012	875	93,5

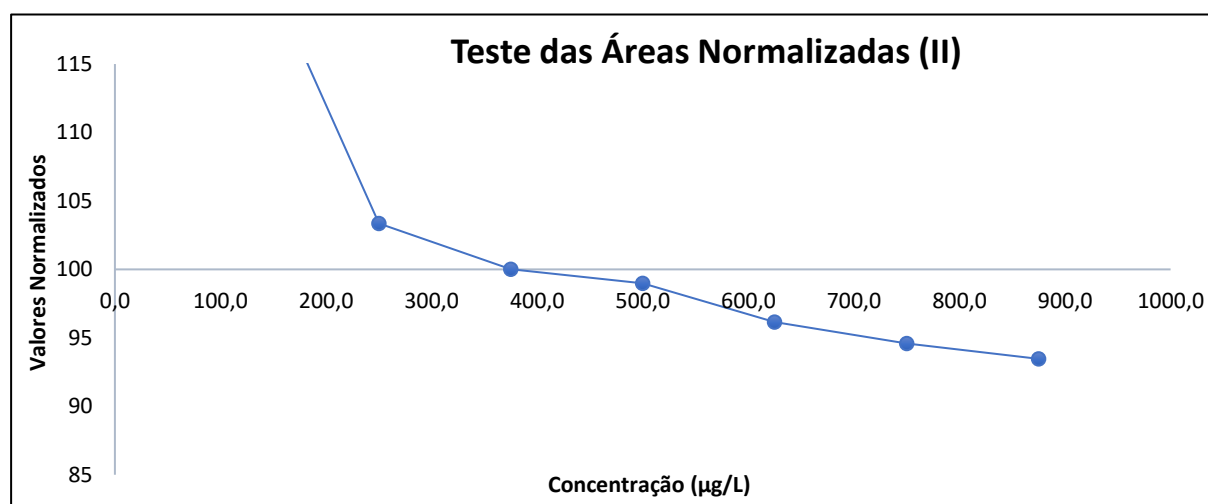


Figura F.4-Representação gráfica da concentração em função dos valores normalizados para o 4-terc-butilfenol com padrão interno

❖ 2,6-di-terc-butil-p-benzoquinona

Tabela F.5-Cálculo dos valores normalizados para o 2,6-di-terc-butil-p-benzoquinona sem padrão interno

Área Pico estimada	Área Experimental / Área estimada	Concentração (µg/L)	Valores normalizados
749,8	1,074	125	106,3
1629,9	0,983	250	106,8
2510,1	0,989	375	103,4
3390,3	0,999	500	101,1
4270,5	0,993	625	100,9
5150,6	0,997	750	100,0
6030,8	1,008	875	98,5

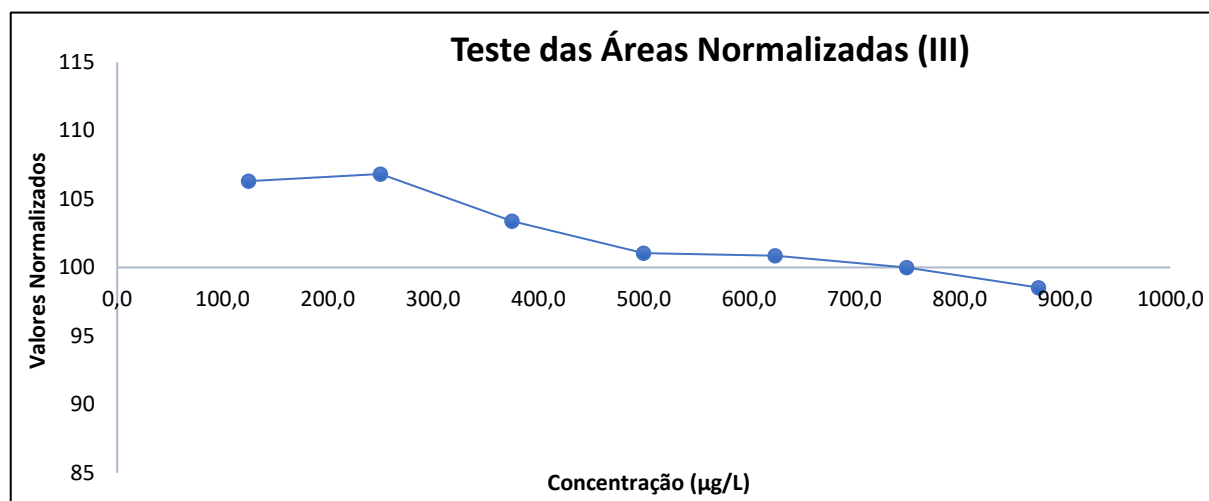


Figura F.5-Representação gráfica da concentração em função dos valores normalizados para o 2,6-di-terc-butil-p-benzoquinona sem padrão interno

Tabela F.6-Cálculo dos valores normalizados para o 2,6-di-terc-butil-p-benzoquinona com padrão interno

Área Pico estimada	Área Experimental / Área estimada	Concentração (µg/L)	Valores normalizados
0,02	1,036	125	125,6
0,04	0,994	250	108,8
0,06	0,995	375	102,9
0,08	0,997	500	100,0
0,11	0,984	625	99,8
0,13	1,009	750	96,3
0,15	1,011	875	95,4
0,20	0,995	1125	96,0

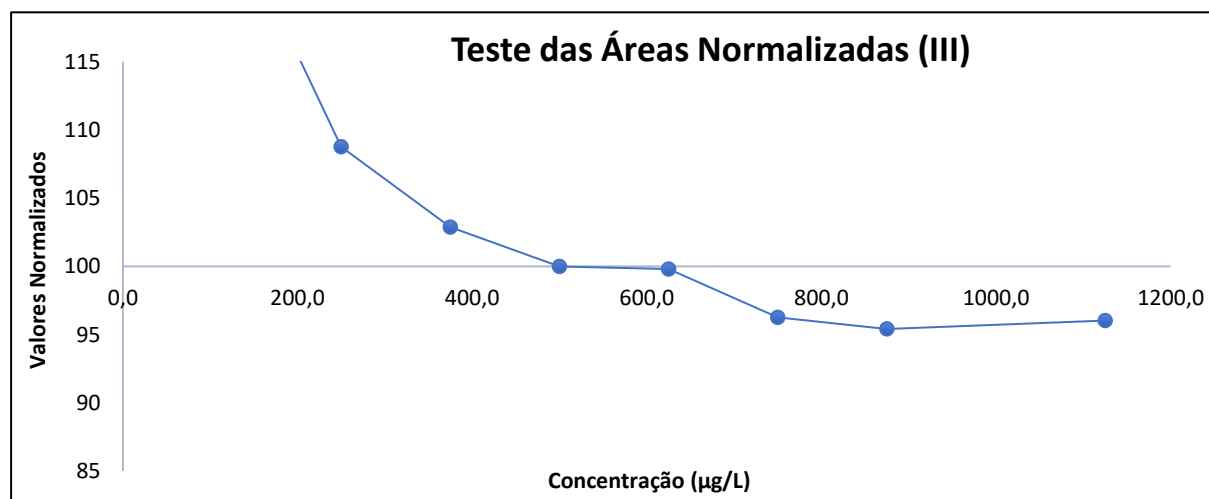


Figura F.6-Representação gráfica da concentração em função dos valores normalizados para o 2,6-di-terc-butil-p-benzoquinona com padrão interno

❖ 2,4-di-terc-butilfenol

Tabela F.7-Cálculo dos valores normalizados para o 2,4-di-terc-butilfenol sem padrão interno

Área Pico estimada	Área Experimental / Área estimada	Concentração (µg/L)	Valores normalizados
4787,2	1,104	125	117,1
11193,7	0,979	250	113,0
17600,2	0,988	375	106,8
24006,7	0,988	500	104,4
30413,2	0,992	625	102,6
36819,7	1,010	750	99,9
43226,2	1,003	875	100,0

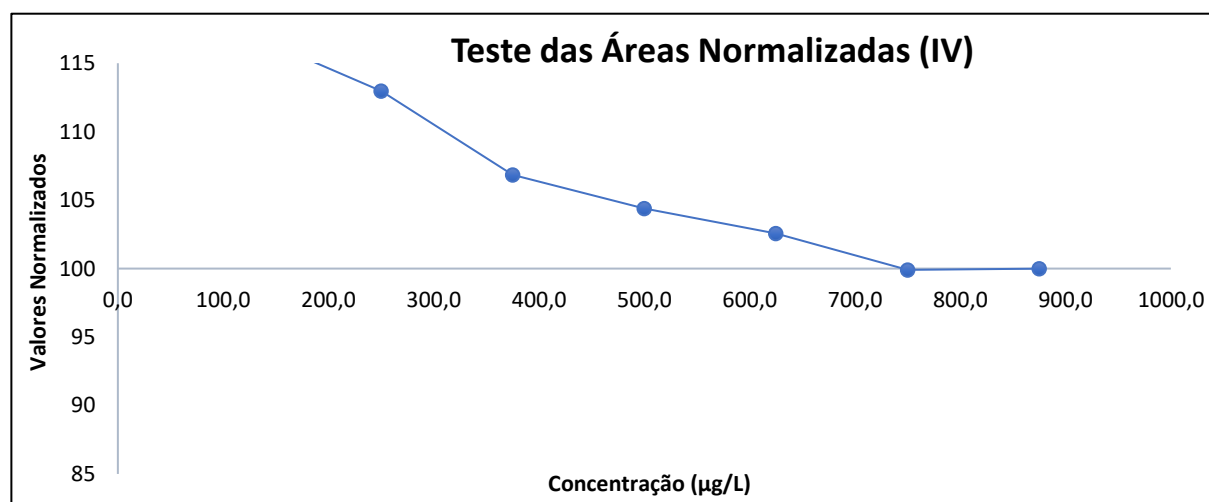


Figura F.7-Representação gráfica da concentração em função dos valores normalizados para o 2,4-di-terc-butilfenol sem padrão interno

Tabela F.8-Cálculo dos valores normalizados para o 2,4-di-terc-butilfenol com padrão interno

Área Pico estimada	Área Experimental / Área estimada	Concentração (µg/L)	Valores normalizados
0,34	0,992	125	128,2
0,79	0,980	250	112,1
1,25	1,006	375	104,5
1,70	1,001	500	102,7
2,15	0,988	625	102,8
2,60	1,023	750	98,5
3,05	1,001	875	100,0
3,96	0,993	1125	100,0

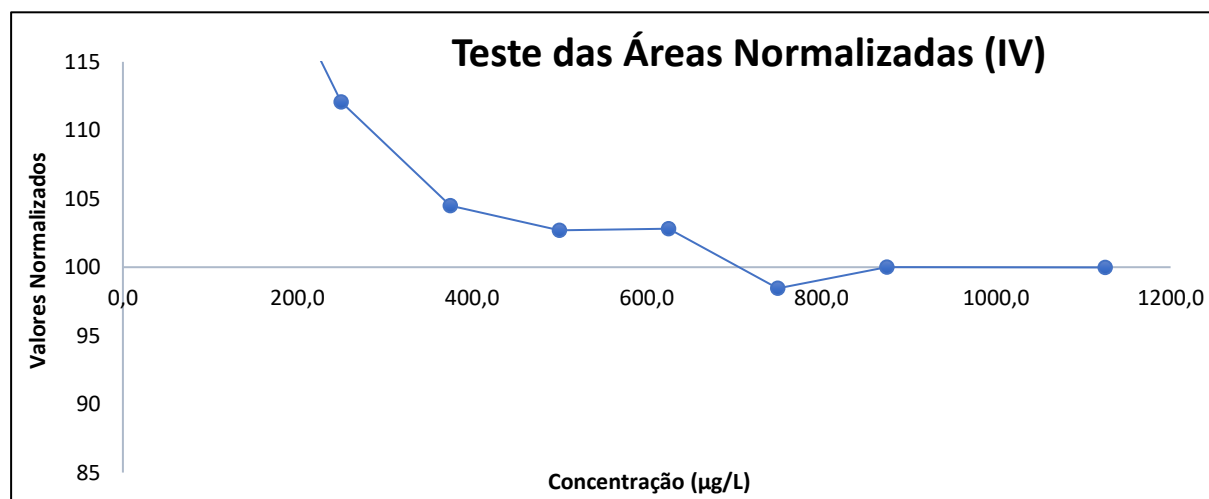


Figura F.8-Representação gráfica da concentração em função dos valores normalizados para o 2,4-di-terc-butilfenol com padrão interno

❖ 3,5-di-terc-butil-4-hidroxibenzaldeído

Tabela F.9—Cálculo dos valores normalizados para o 3,5-di-terc-butil-4-hidroxibenzaldeído sem padrão interno

Área Pico estimada	Área Experimental / Área estimada	Concentração (µg/L)	Valores normalizados
2019,5	1,056	125	111,0
4428,9	1,021	250	104,7
6838,4	0,986	375	105,4
9247,9	0,981	500	104,4
11657,3	0,982	625	103,4
14066,8	1,013	750	99,7
16476,3	1,006	875	100,0

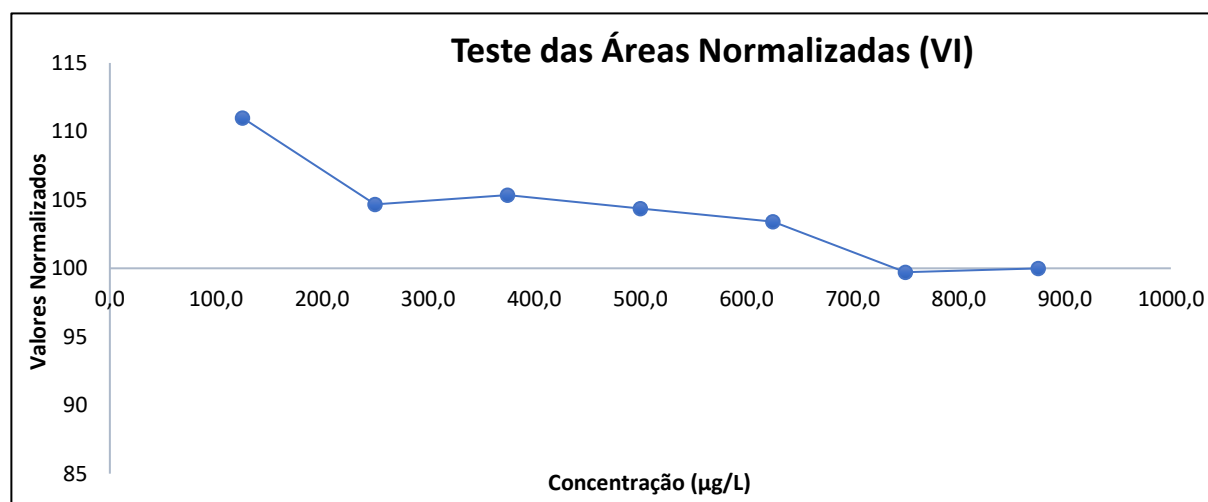
**Figura F.9**—Representação gráfica da concentração em função dos valores normalizados para o 3,5-di-terc-butil-4-hidroxibenzaldeído sem padrão interno

Tabela F.10-Cálculo dos valores normalizados para o 3,5-di-terc-butil-4-hidroxibenzaldeído com padrão interno

Área Pico estimada	Área Experimental / Área estimada	Concentração (µg/L)	Valores normalizados
0,26	0,942	125	101,7
0,50	1,011	250	97,3
0,75	1,028	375	96,7
0,99	1,007	500	99,1
1,24	0,987	625	101,3
1,48	1,002	750	100,0
1,73	0,991	875	101,3
2,22	1,004	1125	100,2

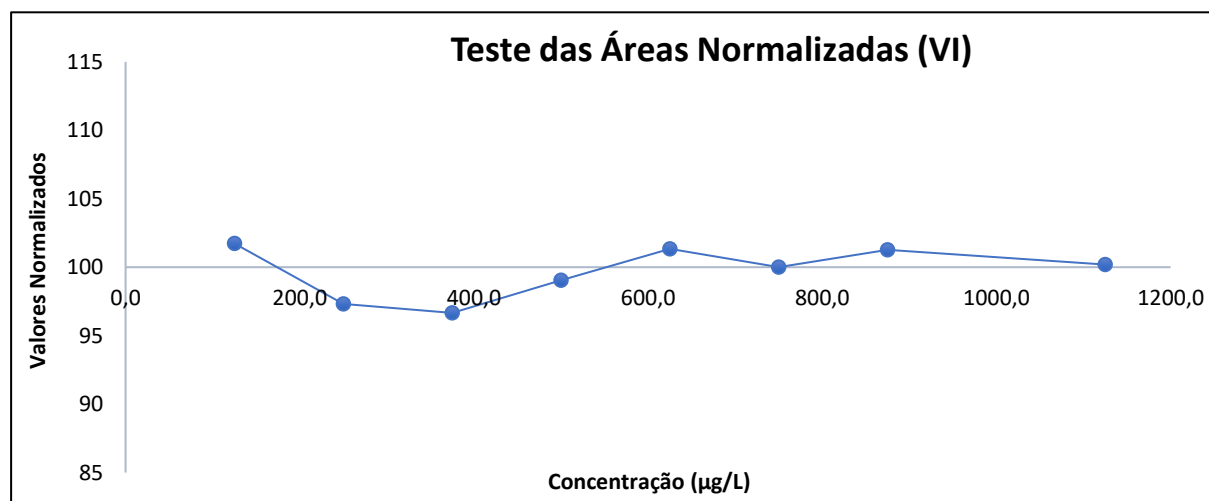


Figura F.10-Representação gráfica da concentração em função dos valores normalizados para o 3,5-di-terc-butil-4-hidroxibenzaldeído com padrão interno

❖ 3,5-di-terc-butil-4-hidroxiacetofenona

Tabela F.11-Cálculo dos valores normalizados para o 3,5-di-terc-butil-4-hidroxiacetofenona sem padrão interno

Área Pico estimada	Área Experimental / Área estimada	Concentração (µg/L)	Valores normalizados
2161,2	1,045	125	125,3
5104,4	1,006	250	110,2
8047,5	0,985	375	107,1
10990,7	0,984	500	104,7
13933,9	1,006	625	100,9
16877,1	1,005	750	100,1
19820,3	1,000	875	100,0

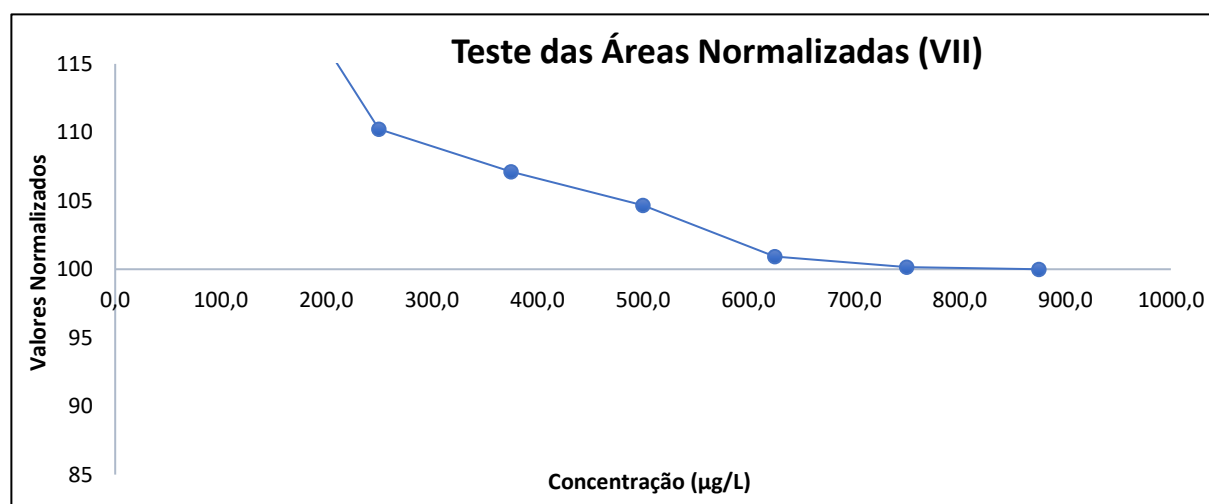


Figura F.11-Representação gráfica da concentração em função dos valores normalizados para o 3,5-di-terc-butil-4-hidroxiacetofenona sem padrão interno

Tabela F.12-Cálculo dos valores normalizados para o 3,5-di-terc-butil-4-hidroxiacetofenona com padrão interno

Área Pico estimada	Área Experimental / Área estimada	Concentração (µg/L)	Valores normalizados
0,33	0,939	125,00	107,7
0,66	1,001	250,00	100,3
0,99	1,019	375,00	98,4
1,32	1,014	500,00	98,8
1,65	0,983	625,00	101,8
1,98	1,009	750,00	99,1
2,31	1,000	875,00	100,0
2,97	0,996	1125,00	100,4

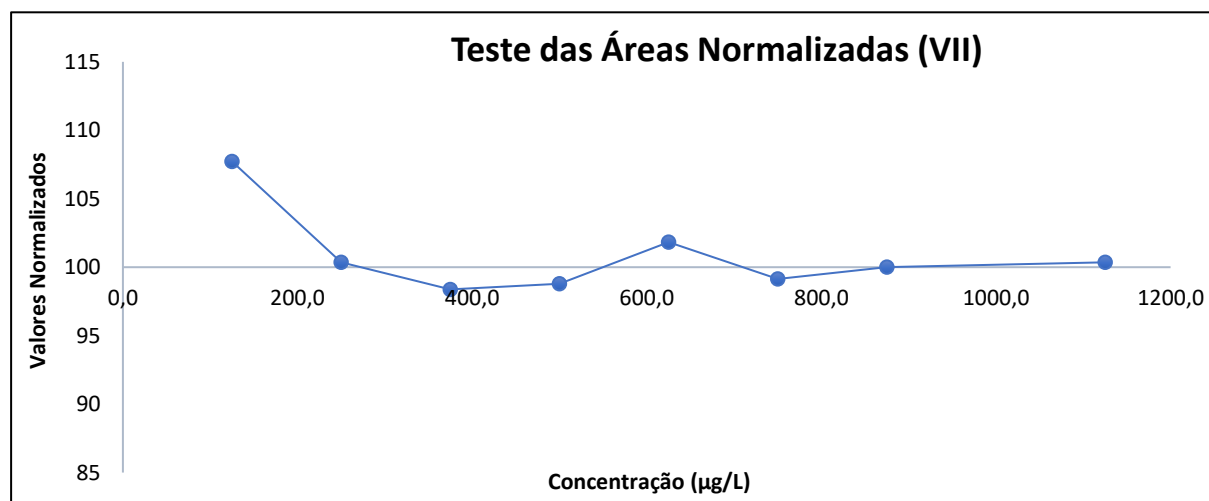


Figura F.12-Representação gráfica da concentração em função dos valores normalizados para o 3,5-di-terc-butil-4-hidroxiacetofenona com padrão interno

❖ 3-(3,5-di-terc-butil-4-hidroxifenil) propionato de metilo

Tabela F.13-Cálculo dos valores normalizados para o 3-(3,5-di-terc-butil-4-hidroxifenil) propionato de metilo sem padrão interno

Área Pico estimada	Área Experimental / Área estimada	Concentração (µg/L)	Valores normalizados
878,4	1,041	125	112,4
1981,1	0,986	250	105,2
3083,9	0,999	375	100,0
4186,7	0,980	500	100,1
5289,5	1,004	625	96,6
6392,3	1,021	750	94,4
7495,1	0,989	875	97,0

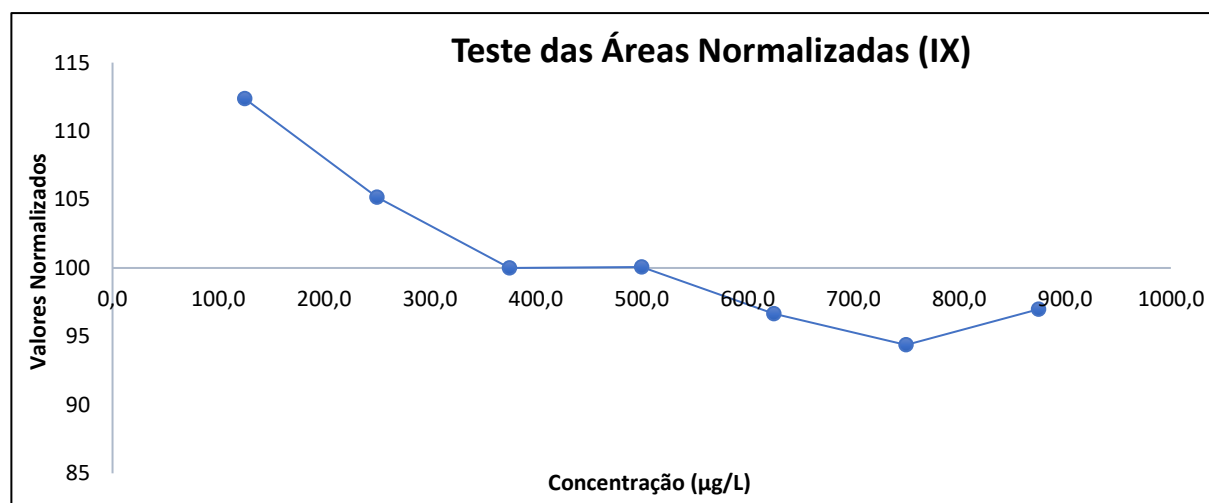
**Figura F.13**-Representação gráfica da concentração em função dos valores normalizados para o 3-(3,5-di-terc-butil-4-hidroxifenil) propionato de metilo sem padrão interno

Tabela F.14-Cálculo dos valores normalizados para o 3-(3,5-di-terc-butil-4-hidroxifenil) propionato de metilo com padrão interno

Área Pico estimada	Área Experimental / Área estimada	Concentração (µg/L)	Valores normalizados
0,13	0,989	125	128,5
0,30	0,983	250	108,0
0,48	1,006	375	100,0
0,65	1,008	500	97,3
0,83	0,986	625	98,0
1,01	1,012	750	94,6
1,18	1,006	875	94,5
1,53	0,994	1125	94,6

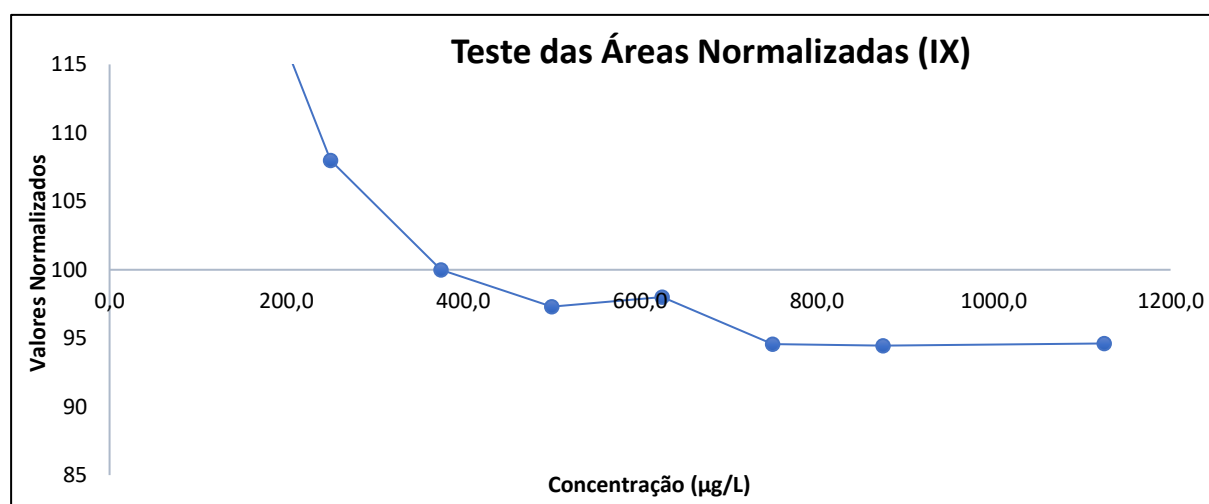


Figura F.14-Representação gráfica da concentração em função dos valores normalizados para o 3-(3,5-di-terc-butil-4-hidroxifenil) propionato de metilo com padrão interno

G. Teste de Homogeneidade de Variâncias

No caso da aplicação de uma reta de calibração, a gama de trabalho pode ser avaliada pelo teste de homogeneidade de variâncias, de acordo com a norma ISO 8466-1 para modelos lineares. A implementação deste teste envolve a análise de dez réplicas das soluções padrão à concentração mais baixa e mais alta da gama de trabalho. A variância dos resultados obtidos para cada solução padrão a um nível de concentração é calculada através da equação G.1.

$$S_i^2 = \frac{\sum_{j=1}^i (y_{ij} - \bar{y}_i)^2}{n_i - 1} \quad (G.1)$$

i- Número do padrão

j- Número de repetições realizadas para cada solução padrão

O cálculo do valor teste PG, pelas equações G.2 e G.3, permite verificar se existem diferenças substanciais entre as variâncias, nos limites da gama de trabalho.

$$PG = \frac{S_2^2}{S_1^2} \quad \text{se} \quad S_2^2 > S_1^2 \quad (G.2)$$

$$PG = \frac{S_1^2}{S_2^2} \quad \text{se} \quad S_1^2 > S_2^2 \quad (G.3)$$

O resultado obtido é comparado com o valor tabelado da distribuição F de *Snedecor / Fisher*, para n-1 graus de liberdade e para um nível de confiança de 99%.

Se $PG \leq F_{crítico}$ significa que a diferença de variâncias não é significativa o que se traduz numa gama de trabalho bem ajustada. Se $PG \geq F_{crítico}$ significa que a diferença de variâncias é significativa.

❖ 4-etilfenol

Tabela G.1-Áreas obtidas nas duas gamas de concentração para o 4-etilfenol sem padrão interno

Concentração inferior: 5,2 µg/L

Área
242
268
292
262
302
283
282
298
295
280

N-1 =	9
Média=	280,4
Desvio padrão=	18,6
RSD (%)=	6,62
Variância=	3,4E+02

Concentração superior: 46,7 µg/L

Área
3090
3217
3237
3422
3373
3326
3324
3276
3323
3312

N-1 =	9
Média=	3290,0
Desvio padrão=	92,3
RSD (%)=	2,81
Variância=	8,5E+03

F_{99%} = 5,35

PG = 24,73

❖ 4-terc-butilfenol

Tabela G.2-Áreas obtidas nas duas gamas de concentração para o 4-terc-butilfenol sem padrão interno

Concentração inferior: 125 µg/L

Área
4524
5186
5389
4935
5471
5303
5161
5268
5533
5372

N-1 =	9
Média=	5214,2
Desvio padrão=	296,6
RSD (%)=	5,69
Variância=	8,8E+04

Concentração superior: 1125 µg/L

Área
63281
66493
66899
69315
67743
68824
69505
67680
68043
67308

N-1 =	9
Média=	67509,1
Desvio padrão=	1784,6
RSD (%)=	2,64
Variância=	3,2E+06

F_{99%} = 5,35

PG = 36,20

❖ 2,6-di-terc-butil-p-benzoquinona

Tabela G.3-Áreas obtidas nas duas gamas de concentração para o 2,6-di-terc-butil-p-benzoquinona sem padrão interno

Concentração inferior: 125 µg/L

Área
517
604
636
553
633
625
611
612
644
625

Concentração superior: 1125 µg/L

Área
8689
8903
9080
9540
9153
9475
9654
8862
9196
9189

N-1 =	9
Média=	606,0
Desvio padrão=	40,3
RSD (%)=	6,64
Variância=	1,6E+03

N-1 =	9
Média=	9174,1
Desvio padrão=	311,1
RSD (%)=	3,39
Variância=	9,7E+04

F_{99%} = 5,35

PG = 59,70

❖ 2,4-di-terc-butilfenol

Tabela G.4-Áreas obtidas nas duas gamas de concentração para o 2,4-di-terc-butilfenol sem padrão interno

Concentração inferior: 125 µg/L

Área
3618
4181
4317
3988
4446
4549
4348
4409
4573
4681

Concentração superior: 1125 µg/L

Área
58603
61710
61378
64677
62250
63274
64076
59735
62211
61903

N-1 =	9
Média=	4311,0
Desvio padrão=	315,0
RSD (%)=	7,31
Variância=	9,9E+04

N-1 =	9
Média=	61981,7
Desvio padrão=	1836,5
RSD (%)=	2,96
Variância=	3,4E+06

F_{99%} = 5,35

PG = 33,99

❖ 3,5-di-terc-butil-4-hidroxibenzaldeído

Tabela G.5- Áreas obtidas nas duas gamas de concentração para o 3,5-di-terc-butil-4-hidroxibenzaldeído sem padrão interno

Concentração inferior: 125 µg/L

Área
1324
1559
1466
1436
1588
1616
1552
1558
1614
1639

Concentração superior: 1125 µg/L

Área
23455
24585
24900
26312
25227
25679
25632
23739
25196
24903

N-1 =	9
Média=	1535,2
Desvio padrão=	98,3
RSD (%)=	6,40
Variância=	9,7E+03

N-1 =	9
Média=	24962,8
Desvio padrão=	870,9
RSD (%)=	3,49
Variância=	7,6E+05

F_{99%} = 5,35

PG = 78,55

❖ 3,5-di-terc-butil-4-hidroxiacetofenona

Tabela G.6-Áreas obtidas nas duas gamas de concentração para o 3,5-di-terc-butil-4-hidroxiacetofenona sem padrão interno

Concentração inferior: 125 µg/L

Área
1497
1769
1671
1636
1826
1843
1782
1733
1831
1825

N-1 =	9
Média=	1741,3
Desvio padrão=	110,9
RSD (%)=	6,37
Variância=	1,2E+04

Concentração superior: 1125 µg/L

Área
31015
32227
32585
34802
33540
33636
33938
31133
32864
32873

N-1 =	9
Média=	32861,3
Desvio padrão=	1195,4
RSD (%)=	3,64
Variância=	1,4E+06

F_{99%} = 5,35

PG = 78,55

❖ 3-(3,5-di-terc-butil-4-hidroxifenil) propionato de metilo

Tabela G.7-Áreas obtidas nas duas gamas de concentração para o 3-(3,5-di-terc-butil-4-hidroxifenil) propionato de metilo sem padrão interno

Concentração inferior: 125 µg/L

Área
542
667
609
588
660
708
672
633
695
693

Concentração superior: 1125 µg/L

Área
9960
10150
10349
10935
10878
10671
10683
9906
10449
10329

N-1 =	9
Média=	646,70
Desvio padrão=	53,21
RSD (%)=	8,23
Variância=	2,8E+03

N-1 =	9
Média=	10431,0
Desvio padrão=	360,4
RSD (%)=	3,45
Variância=	1,3E+05

F_{99%} = 5,35

PG = 45,87

H. Limiares Analíticos (LOQ e LOD)

A determinação dos limiares analíticos foi providenciada pelos cálculos descritos no capítulo 5.2.3.4. A 1.^a metodologia depende do método dos mínimos quadrados, calculando-se os limites pelo desvio padrão residual das retas de calibração apresentadas no capítulo 7.3.1 e 7.3.7.

Tabela H.1-Limiares analíticos calculados pela reta de calibração dos compostos sem e com padrão interno

Composto	Limite de Detecção (µg/L)		Limite de Quantificação (µg/L)	
	Sem padrão interno	Com padrão interno	Sem padrão interno	Com padrão interno
4-etilfenol	0,75	1,01	2,51	3,37
4-terc-butilfenol	16,82	18,71	56,06	62,37
2,6-di-terc-butil-p-benzoquinona	17,03	20,10	56,76	66,99
2,4-di-terc-butilfenol	20,71	24,50	69,04	81,68
3,5-di-terc-butil-4-hidroxibenzaldeído	26,70	22,42	89,00	74,72
3,5-di-terc-butil-4-hidroxiacetofenona	15,05	22,33	50,17	74,42
3-(3,5-di-terc-butil-4-hidroxifenil) propionato de metilo	28,41	18,51	94,69	61,69

Na 2.^a metodologia, os limites analíticos dos compostos com padrão interno são calculados com base nos resultados obtidos nos ensaios de precisão em condições de repetibilidade ao nível de concentração mais baixo da gama de trabalho. Injetam-se dez vezes esta solução padrão e calcula-se o desvio padrão de forma a estimar o limite de detecção e o limite de quantificação. Na 3.^a metodologia os limiares analíticos são estimados pela razão sinal ruído do pico cromatográfico. De seguida apresentam-se os resultados destas metodologias para cada um dos compostos.

❖ 4-etilfenol

Tabela H.2-Áreas e concentrações estimadas para o padrão de menor concentração do 4-etilfenol sem padrão interno

Área (Y _A)	Concentração estimada (µg/L)
14 316	7,33
13 188	6,88
13 911	7,17
13 018	6,81
13 954	7,18
12 722	6,70
13 380	6,96
11 691	6,29
13 559	7,03
12 822	6,74
Média das concentrações (µg/L) =	6,91
Desvio padrão (µg/L) =	0,28
RSD (%) =	4,11
LOD (µg/L) =	0,85
LOQ (µg/L) =	2,84

Tabela H.3-Áreas e concentrações estimadas para o padrão de menor concentração do 4-etilfenol com padrão interno

Área relativa (Y_A/Y_{PI})	Concentração estimada ($\mu\text{g/L}$)
0,27	6,60
0,23	5,77
0,25	6,15
0,23	5,85
0,25	6,30
0,24	5,92
0,25	6,17
0,23	5,69
0,26	6,33
0,25	6,14
Média das concentrações ($\mu\text{g/L}$) =	6,09
Desvio padrão ($\mu\text{g/L}$) =	0,27
RSD (%) =	4,41
LOD ($\mu\text{g/L}$) =	0,81
LOQ ($\mu\text{g/L}$) =	2,69

Tabela H.4-Limiares analíticos calculados pela razão sinal ruído para o 4-etilfenol

S/N	
	168,7
	217,8
	246,6
	139,3
	199,3
	148,3
	208,7
	208,7
	256
Média =	199,3
Desvio padrão =	38,2
RSD (%) =	19,2
LOD (µg/L) =	0,078
LOQ (µg/L) =	0,26

❖ 4-terc-butilfenol

Tabela H.5-Áreas e concentrações estimadas para o padrão de menor concentração do 4-terc-butilfenol sem padrão interno

Área (Y _A)	Concentração estimada (µg/L)
392 516	172,99
369 656	166,29
388 220	171,73
367 363	165,62
386 070	171,10
359 066	163,19
372 761	167,20
352 803	161,36
381 704	169,82
356 662	162,49
Média das concentrações (µg/L) =	167,18
Desvio padrão (µg/L) =	3,90
RSD (%) =	2,33
LOD (µg/L) =	11,69
LOQ (µg/L) =	38,95

Tabela H.6-Áreas e concentrações estimadas para o padrão de menor concentração do 4-terc-butilfenol com padrão interno

Área relativa (Y_A/Y_{PI})	Concentração estimada ($\mu\text{g/L}$)
0,38	155,69
0,33	137,91
0,36	146,74
0,33	138,54
0,36	147,13
0,34	142,57
0,35	145,92
0,35	144,57
0,37	150,69
0,35	145,72
Média das concentrações ($\mu\text{g/L}$) =	145,55
Desvio padrão ($\mu\text{g/L}$) =	5,01
RSD (%) =	3,44
LOD ($\mu\text{g/L}$) =	15,02
LOQ ($\mu\text{g/L}$) =	50,07

Tabela H.7-Limiares analíticos calculados pela razão sinal ruído para o 4-terc-butilfenol

S/N	
	2861,4
	2537,7
	2407,2
	2165,2
	2108,9
	2344,5
	3539,8
	3944,0
	3278,9
Média =	2798,6
Desvio padrão =	614,7
RSD (%) =	22,0
LOD (µg/L) =	0,13
LOQ (µg/L) =	0,45

❖ 2,6-di-terc-butil-p-benzoquinona

Tabela H.8-Áreas e concentrações estimadas para o padrão de menor concentração do 2,6-di-terc-butil-p-benzoquinona sem padrão interno

Área (Y _A)	Concentração estimada (µg/L)
17 829	172,24
16 105	162,21
16 876	166,69
15 671	159,68
16 440	164,15
15 467	158,49
16 011	161,66
15 227	157,10
15 808	160,48
15 937	161,23
Média das concentrações (µg/L) =	162,39
Desvio padrão (µg/L) =	4,18
RSD (%) =	2,57
LOD (µg/L) =	12,54
LOQ (µg/L) =	41,79

Tabela H.9-Áreas e concentrações estimadas para o padrão de menor concentração do 2,6-di-terc-butil-p-benzoquinona com padrão interno

Área relativa (Y_A/Y_{PI})	Concentração estimada ($\mu\text{g/L}$)
0,017	163,33
0,014	144,06
0,015	151,19
0,014	142,69
0,015	149,52
0,015	146,88
0,015	149,36
0,015	148,71
0,015	149,71
0,016	153,04
Média das concentrações ($\mu\text{g/L}$) =	149,85
Desvio padrão ($\mu\text{g/L}$) =	5,37
RSD (%) =	3,59
LOD ($\mu\text{g/L}$) =	16,12
LOQ ($\mu\text{g/L}$) =	53,74

Tabela H.10-Limiares analíticos calculados pela razão sinal ruído para o 2,6-di-terc-butil-p-benzoquinona

	S/N
	634,8
	368,2
	866,6
	468,1
	269,3
	301,2
	244,1
	356,7
	240,5
Média =	416,6
Desvio padrão =	198,5
RSD (%) =	47,6
LOD ($\mu\text{g/L}$) =	0,90
LOQ ($\mu\text{g/L}$) =	3,00

❖ 2,4-di-terc-butilfenol

Tabela H.11-Áreas e concentrações estimadas para o padrão de menor concentração do 2,4-di-terc-butilfenol sem padrão interno

Área (Y _A)	Concentração estimada (µg/L)
447 162	176,41
417 384	169,54
435 119	173,63
410 135	167,87
427 438	171,86
400 339	165,61
411 166	168,11
389 684	163,15
417 676	169,61
393 494	164,03
Média das concentrações (µg/L) =	168,98
Desvio padrão (µg/L) =	3,97
RSD (%) =	2,35
LOD (µg/L) =	11,91
LOQ (µg/L) =	39,70

Tabela H.12-Áreas e concentrações estimadas para o padrão de menor concentração do 2,4-di-terc-butilfenol com padrão interno

Área relativa (Y_A/Y_{PI})	Concentração estimada ($\mu\text{g/L}$)
0,44	167,52
0,37	151,35
0,40	158,16
0,37	150,84
0,40	157,28
0,38	154,12
0,39	155,90
0,39	154,90
0,40	159,08
0,39	155,75
Média das concentrações ($\mu\text{g/L}$) =	156,49
Desvio padrão ($\mu\text{g/L}$) =	4,46
RSD (%) =	2,85
LOD ($\mu\text{g/L}$) =	13,39
LOQ ($\mu\text{g/L}$) =	44,62

Tabela H.13-Limiares analíticos calculados pela razão sinal ruído para o 2,4-di-terc-butilfenol

S/N	
	8 763,6
	11 942,0
	10 798,0
	10 249,7
	9 743,4
	10 135,3
	10 700,3
	9 802,9
	7 184,8
Média =	9924,4
Desvio padrão =	1268,7
RSD (%) =	12,8
LOD (µg/L) =	0,038
LOQ (µg/L) =	0,13

❖ 3,5-di-terc-butil-4-hidroxibenzaldeído

Tabela H.14-Áreas e concentrações estimadas para o padrão de menor concentração do 3,5-di-terc-butil-4-hidroxibenzaldeído sem padrão interno

Área (Y _A)	Concentração estimada (µg/L)
237 974	188,13
223 244	182,64
233 914	186,62
222 482	182,36
229 950	185,14
211 436	178,24
214 821	179,50
199 285	173,71
222 912	182,52
210 143	177,76
Média das concentrações (µg/L) =	181,66
Desvio padrão (µg/L) =	4,19
RSD (%) =	2,31
LOD (µg/L) =	12,56
LOQ (µg/L) =	41,88

Tabela H.15-Áreas e concentrações estimadas para o padrão de menor concentração do 3,5-di-terc-butil-4-hidroxibenzaldeído com padrão interno

Área relativa (Y_A/Y_{PI})	Concentração estimada ($\mu\text{g/L}$)
0,23	154,75
0,20	139,63
0,21	146,71
0,20	140,41
0,21	145,93
0,20	141,16
0,20	141,85
0,20	138,98
0,21	146,90
0,21	143,75
Média das concentrações ($\mu\text{g/L}$) =	144,01
Desvio padrão ($\mu\text{g/L}$) =	4,53
RSD (%) =	3,14
LOD ($\mu\text{g/L}$) =	13,58
LOQ ($\mu\text{g/L}$) =	45,28

Tabela H.16-Limiares analíticos calculados pela razão sinal ruído para o 3,5-di-terc-butil-4-hidroxibenzaldeído

	S/N
	6 919,1
	7 052,8
	10 141,6
	9 377,3
	5 062,9
	9 078,2
	6 610,5
	8 160,8
	11 970,7
Média =	8263,8
Desvio padrão =	1984,2
RSD (%) =	24,0
LOD ($\mu\text{g/L}$) =	0,045
LOQ ($\mu\text{g/L}$) =	0,15

❖ 3,5-di-terc-butil-4-hidroxiacetofenona

Tabela H.17-Áreas e concentrações estimadas para o padrão de menor concentração do 3,5-di-terc-butil-4-hidroxiacetofenona sem padrão interno

Área (Y _A)	Concentração estimada (µg/L)
310 099	184,13
288 406	177,95
301 839	181,78
287 844	177,79
298 953	180,95
273 714	173,76
278 589	175,15
257 740	169,20
292 367	179,07
270 966	172,97
Média das concentrações (µg/L) =	177,27
Desvio padrão (µg/L) =	4,30
RSD (%) =	2,43
LOD (µg/L) =	12,91
LOQ (µg/L) =	43,05

Tabela H.18-Áreas e concentrações estimadas para o padrão de menor concentração do 3,5-di-terc-butil-4-hidroxiacetofenona com padrão interno

Área relativa (Y_A/Y_{PI})	Concentração estimada ($\mu\text{g/L}$)
0,30	171,02
0,26	156,73
0,28	162,95
0,26	157,55
0,28	162,89
0,26	158,26
0,26	159,03
0,26	156,24
0,28	164,53
0,27	160,24
Média das concentrações ($\mu\text{g/L}$) =	160,94
Desvio padrão ($\mu\text{g/L}$) =	4,30
RSD (%) =	2,67
LOD ($\mu\text{g/L}$) =	12,90
LOQ ($\mu\text{g/L}$) =	43,01

Tabela H.19-Limiares analíticos calculados pela razão sinal ruído para o 3,5-di-terc-butil-4-hidroxiacetofenona

	S/N
	10 735,1
	7 913,1
	11 039,7
	12 037,1
	11 544,3
	9 335,9
	8 888,6
	7 311,5
	14 965,6
Média =	10419,0
Desvio padrão =	2223,4
RSD (%) =	21,3
LOD ($\mu\text{g/L}$) =	0,036
LOQ ($\mu\text{g/L}$) =	0,12

❖ 3-(3,5-di-terc-butil-4-hidroxifenil) propionato de metilo

Tabela H.20-Áreas e concentrações estimadas para o padrão de menor concentração do 3-(3,5-di-terc-butil-4-hidroxifenil) propionato de metilo sem padrão interno

Área (Y _A)	Concentração estimada (µg/L)
151 486	186,84
141 421	180,79
147 900	184,68
142 095	181,19
146 913	184,09
135 424	177,19
133 876	176,26
123 736	170,16
142 663	181,54
132 421	175,38
Média das concentrações (µg/L) =	179,81
Desvio padrão (µg/L) =	4,79
RSD (%) =	2,66
LOD (µg/L) =	14,37
LOQ (µg/L) =	47,90

Tabela H.21-Áreas e concentrações estimadas para o padrão de menor concentração do 3-(3,5-di-terc-butil-4-hidroxifenil) propionato de metilo com padrão interno

Área relativa (Y_A/Y_{PI})	Concentração estimada ($\mu\text{g/L}$)
0,15	173,51
0,13	159,06
0,14	165,43
0,13	160,46
0,14	165,63
0,13	161,40
0,13	159,73
0,12	156,82
0,14	166,70
0,13	162,41
Média das concentrações ($\mu\text{g/L}$) =	163,12
Desvio padrão ($\mu\text{g/L}$) =	4,59
RSD (%) =	2,81%
LOD ($\mu\text{g/L}$) =	13,77
LOQ ($\mu\text{g/L}$) =	45,89

Tabela H.22-Limiares analíticos calculados pela razão sinal ruído para o 3-(3,5-di-terc-butil-4-hidroxifenil) propionato de metilo

	S/N
	3 804,1
	4 031,7
	2 401,8
	3 218,0
	4 331,1
	5 286,3
	3 197,1
	4 844,8
	2 449,3
Média =	3729,4
Desvio padrão =	947,1
RSD (%) =	25,4
LOD ($\mu\text{g/L}$) =	0,10
LOQ ($\mu\text{g/L}$) =	0,34

I. Precisão

Para além dos ensaios de precisão em condições de repetibilidade efetuados para os compostos em estudo na presença do padrão interno, indicados no capítulo 7.3.10, procedeu-se também ao estudo da repetibilidade dos compostos sem padrão interno para os 3 níveis de concentração da gama de trabalho.

Tabela I.1-Ensaio de repetibilidade para a gama baixa dos compostos em estudo sem padrão interno

Composto sem padrão interno	Concentração gama baixa – P1 (µg/L)	RSD (%)	S _r	r
4-etilfenol	5,18	4,1	0,3	0,8
4-terc-butilfenol	125	2,3	4,1	11,5
2,6-di-terc-butil-p-benzoquinona	125	2,6	4,4	12,3
2,4-di-terc-butilfenol	125	2,3	4,2	11,7
3,5-di-terc-butil-4-hidroxibenzaldeído	125	2,3	4,4	12,4
3,5-di-terc-butil-4-hidroxiacetofenona	125	2,4	4,5	12,7
3-(3,5-di-terc-butil-4-hidroxifenil) propionato de metilo	125	2,7	5,1	14,1

Tabela I.2-Ensaio de repetibilidade para a gama média dos compostos em estudo sem padrão interno

Composto sem padrão interno	Concentração gama média – P5 (µg/L)	RSD (%)	S _r	r
4-etilfenol	25,9	3,0	0,9	2,4
4-terc-butilfenol	625	2,6	18,1	50,7
2,6-di-terc-butil-p-benzoquinona	625	4,4	29,1	81,4
2,4-di-terc-butilfenol	625	3,2	22,1	61,8
3,5-di-terc-butil-4-hidroxibenzaldeído	625	2,8	19,3	54,1
3,5-di-terc-butil-4-hidroxiacetofenona	625	2,5	17,0	47,5
3-(3,5-di-terc-butil-4-hidroxifenil) propionato de metilo	625	2,7	18,3	51,3

Tabela I.3-Ensaio de repetibilidade para a gama alta dos compostos em estudo sem padrão interno

Composto sem padrão interno	Concentração gama alta – P8 (µg/L)	RSD (%)	S _r	r
4-etilfenol	46,62	10,4	5,5	15,4
4-terc-butilfenol	1125	10,6	138,5	387,7
2,6-di-terc-butil-p-benzoquinona	1125	11,3	152,4	426,8
2,4-di-terc-butilfenol	1125	10,6	144,7	405,0
3,5-di-terc-butil-4-hidroxibenzaldeído	1125	10,7	145,2	406,5
3,5-di-terc-butil-4-hidroxiacetofenona	1125	10,3	137,3	384,6
3-(3,5-di-terc-butil-4-hidroxifenil) propionato de metilo	1125	11,1	152,4	426,8

O estudo da precisão em condições de repetibilidade dos padrões internos também foi avaliada à concentração utilizada nas soluções padrão.

Tabela I.4-Ensaio de repetibilidade dos padrões internos

	4-etilfenol-d ₁₀ (C=36,05 µg/L)	4-tercbutil-d ₉ -fenol- 2,3,5,6-d ₄ (C=693,79 µg/L)
	Área	Área
	62 983	1 110 590
	73 193	1 296 202
	77 561	1 361 234
	76 326	1 358 322
	82 103	1 476 663
	81 561	1 458 865
	81 853	1 454 374
	82 224	1 474 169
	83 420	1 497 074
	82 564	1 491 728
Média =	78 379	1 397 922
Desvio padrão =	6 022	115 484
RSD (%) =	7,68	8,26

J. Validação do Método em SPE

Inicialmente, implementou-se a técnica de preparação da amostra em SPE sendo que a gama de trabalho escolhida seria aproximadamente entre os 5 e os 50 ppb. Como tal, os ensaios necessários para o processo de validação do método de análise foram aplicados. De seguida apresentam-se os principais resultados:

❖ Testes de Linearidade

Tabela J.1-Resumo dos resultados obtidos da aplicação do método dos mínimos quadrados para a gama de trabalho entre 5-50 µg/L

Composto	Gama de linearidade (µg/L)	Coefficiente de correlação	Limite de Quantificação (µg/L)	Limite de Detecção (µg/L)
4-etilfenol	5,2-46,6	0,9998	3,29	0,99
4-terc-butilfenol	5,3-47,3	0,9998	3,62	1,09
2,6-di-terc-butil-p-benzoquinona	5,2-47,2	0,9998	3,49	1,05
2,4-di-terc-butilfenol	5,4-48,3	0,9996	4,49	1,35
2,6-di-terc-butil-4-vinilfenol	5,3-47,4	0,9999	2,50	0,75
3,5-di-terc-butil-4-hidroxibenzaldeído	5,0-44,9	0,9999	2,35	0,70
3,5-di-terc-butil-4-hidroxiacetofenona	5,2-46,8	0,9999	2,22	0,67
3-(3,5-di-terc-butil-4-hidroxifenil) propionato de metilo	5,4-48,6	0,9998	3,46	1,04

Tabela J.2-Resumo dos resultados obtidos da aplicação dos testes de linearidade para a gama de trabalho entre 5-50 µg/L

Composto	Análise dos resíduos	Teste de Mandel	Teste de RIKILT	Teste das áreas normalizadas	Homogeneidade de variâncias
4-etilfenol	☑	☑	☑	☑	☒
4-terc-butilfenol	☑	☑	☑	☑	☒
2,6-di-terc-butil-p-benzoquinona	☑	☑	☑	☑	☒
2,4-di-terc-butilfenol	☑	☑	☑	☑	☒
2,6-di-terc-butil-4-vinilfenol	☑	☑	☑	☑	☒
3,5-di-terc-butil-4-hidroxibenzaldeído	☑	☑	☑	☑	☒
3,5-di-terc-butil-4-hidroxiacetofenona	☑	☑	☑	☑	☒

3-(3,5-di-terc-butil-4-hidroxifenil) propionato de metilo	☒	☒	☒	☒	☒
--	-------------------------------------	-------------------------------------	-------------------------------------	-------------------------------------	-------------------------------------

❖ Limiares analíticos

Tabela J.3- Limites de detecção e quantificação obtidos para cada composto para a gama de trabalho entre 5-50 µg/L

Composto	Limite de Detecção (µg/L)		Limite de Quantificação (µg/L)	
	Pela Repetibilidade	Pela Calibração	Pela Repetibilidade	Pela Calibração
4-etilfenol	0,32	0,99	1,08	3,29
4-terc-butilfenol	0,44	1,09	1,47	3,62
2,6-di-terc-butil-p-benzoquinona	0,51	1,05	1,71	3,49
2,4-di-terc-butilfenol	0,88	1,35	2,93	4,49
2,6-di-terc-butil-4-vinilfenol	1,34	0,75	4,48	2,50
3,5-di-terc-butil-4-hidroxibenzaldeído	0,55	0,70	1,84	2,35
3,5-di-terc-butil-4-hidroxiacetofenona	0,43	0,67	1,43	2,22
3-(3,5-di-terc-butil-4-hidroxifenil) propionato de metilo	0,49	1,04	1,64	3,46

Tabela J.4- Resumo dos resultados obtidos para a confirmação experimental do LOQ para a gama de trabalho entre 5-50 µg/L

Composto	LOQ teórico (µg/L) (pela reta de calibração)	Concentração média experimental (µg/L)	RSD (%)	Média do erro relativo (%)
4-etilfenol	3,4	3,1	1,9	7,7
4-terc-butilfenol	3,4	3,4	0,8	0,7
2,6-di-terc-butil-p-benzoquinona	3,4	3,8	2,9	12,2
2,4-di-terc-butilfenol	4,6	4,3	1,1	5,8
2,6-di-terc-butil-4-vinilfenol	2,6	2,6	5,2	4,5
3,5-di-terc-butil-4-hidroxibenzaldeído	2,5	2,9	4,4	16,9
3,5-di-terc-butil-4-hidroxiacetofenona	2,6	3,2	4,0	22,0
3-(3,5-di-terc-butil-4-hidroxifenil) propionato de metilo	3,5	3,7	2,2	4,5

❖ Repetibilidade

Tabela J.5- Resultados obtidos nos estudos de precisão em condições de repetibilidade para a gama baixa entre 5-50 µg/L

Composto	Concentração gama baixa – P1 (µg/L)	RSD (%)	S _r	r
4-etilfenol	5,2	2,4	0,1	0,3
4-terc-butilfenol	5,3	2,1	0,2	0,4
2,6-di-terc-butil-p-benzoquinona	5,2	5,3	0,2	0,5
2,4-di-terc-butilfenol	5,4	5,2	0,3	0,9
2,6-di-terc-butil-4-vinilfenol	5,3	4,9	0,5	1,3
3,5-di-terc-butil-4-hidroxibenzaldeído	5,0	3,9	0,2	0,5
3,5-di-terc-butil-4-hidroxiacetofenona	5,2	3,9	0,2	0,4
3-(3,5-di-terc-butil-4-hidroxifenil) propionato de metilo	5,4	3,3	0,2	0,5

Tabela J.6- Resultados obtidos nos estudos de precisão em condições de repetibilidade para a gama média entre 5-50 µg/L

Composto	Concentração gama média – P5 (µg/L)	RSD (%)	S _r	r
4-etilfenol	26,0	4,4	0,8	2,1
4-terc-butilfenol	26,3	4,0	1,1	3,1
2,6-di-terc-butil-p-benzoquinona	26,2	7,1	1,2	3,4
2,4-di-terc-butilfenol	26,8	4,1	0,7	1,9
2,6-di-terc-butil-4-vinilfenol	26,3	3,4	0,9	2,5
3,5-di-terc-butil-4-hidroxibenzaldeído	24,9	3,2	0,5	1,5
3,5-di-terc-butil-4-hidroxiacetofenona	26,0	2,8	0,4	1,1
3-(3,5-di-terc-butil-4-hidroxifenil) propionato de metilo	27,0	3,9	0,7	1,8

Tabela J.7- Resultados obtidos nos estudos de precisão em condições de repetibilidade para a gama alta entre 5-50 µg/L

Composto	Concentração gama alta – P8 (µg/L)	RSD (%)	S_r	r
4-etilfenol	46,7	1,4	0,6	1,7
4-terc-butilfenol	47,3	1,3	0,9	2,6
2,6-di-terc-butil-p-benzoquinona	47,2	2,1	0,8	2,3
2,4-di-terc-butilfenol	48,3	1,8	0,8	2,3
2,6-di-terc-butil-4-vinilfenol	47,4	1,5	1,2	3,3
3,5-di-terc-butil-4-hidroxibenzaldeído	44,9	1,6	0,7	2,0
3,5-di-terc-butil-4-hidroxiacetofenona	46,8	1,8	0,7	2,0
3-(3,5-di-terc-butil-4-hidroxifenil) propionato de metilo	48,6	1,6	16,6	46,5

K. Ensaio de Migração a Materiais

Tabela K.1-Concentração de cloro nas águas cloradas utilizadas nos ensaios a materiais

Material	Concentração cloro (µg/L)			
	Pré-tratamento	1.º Ensaio de migração	2.º Ensaio de migração	3.º Ensaio de migração
A, B	1,08	1,12	1,24	1,07
C, F, G	1,02	0,99	0,87	1,22
D, E, H	0,90	1,12	1,14	1,21

Os fatores de conversão são utilizados de forma a tornar o resultado do ensaio de migração numa concentração representativa da situação real. Dependendo do tipo de produto utilizado, são aplicados diferentes fatores de concentração, tais como os explicitados na tabela K.2.

Tabela K.2-Fatores de conversão aplicados nos diferentes grupos de produtos

Grupo de produtos	FC (dia.dm⁻¹)
Tubos e revestimentos internos:	
ID < 80 mm (redes prediais, edifícios)	20
80 mm ≤ ID < 300 mm (rede distribuição)	10
ID ≥ 300 mm (rede adutora)	5
Acessórios:	
ID < 80 mm (redes prediais, edifícios)	4
80 mm ≤ ID < 300 mm (rede distribuição)	2
ID ≥ 300 mm (rede adutora)	1
Componentes de acessórios:	
ID < 80 mm (redes prediais, edifícios)	0,4
80 mm ≤ ID < 300 mm (rede distribuição)	0,1
ID ≥ 300 mm (rede adutora)	0,1
Sistema de armazenagem (reservatórios):	
Em redes prediais e edifícios	4
Nos sistemas de abastecimento de água	1
Produtos de reparação para sistemas de armazenagem:	
Em redes prediais e edifícios:	
❖ Produtos que cobrem a superfície total ou uma parte substancial desta (ex.º: revestimentos)	4
❖ Produtos que cobrem menos de 1 % da superfície total	0,04
Nos sistemas de abastecimento de água:	
❖ Produtos que cobrem a superfície total ou uma parte substancial desta (ex.º: revestimentos)	1
❖ Produtos que cobrem menos de 1 % da superfície total	0,01



2022

INÊS DE OLIVEIRA

IMPLEMENTAÇÃO E VALIDAÇÃO DE UM MÉTODO DE ENSAIO PARA ANÁLISE DE PRODUTOS DE
DEGRADAÇÃO DE AGENTES ESTABILIZANTES DE MATERIAIS USADOS EM CONTACTO COM
ÁGUA DE CONSUMO HUMANO