



INSTITUTO SUPERIOR DE ENGENHARIA DE LISBOA

Área Departamental de Engenharia Química

Monitorização de compostos orgânicos em matrizes ambientais

CÁTIA VANESSA GOMES LUCAS

(Licenciada em Engenharia Química e Biológica – Ramo Ambiente)

Trabalho Final de Mestrado – Estágio para obtenção do
Grau de Mestre em Engenharia da Qualidade e Ambiente

Orientadores:

Doutora Maria Teresa Loureiro dos Santos (ADEQ/ISEL)

Doutor Pedro Manuel da Fonseca Antunes (APA, I.P.)

Júri:

Presidente: Doutor João Miguel Alves da Silva

Vogais: Doutor Teodoro José Pereira Trindade

Doutor Pedro Manuel da Fonseca Antunes

Dezembro 2018



INSTITUTO SUPERIOR DE ENGENHARIA DE LISBOA

Área Departamental de Engenharia Química

Monitorização de compostos orgânicos em matrizes ambientais

CÁTIA VANESSA GOMES LUCAS

(Licenciada em Engenharia Química e Biológica – Ramo Ambiente)

Trabalho Final de Mestrado – estágio para obtenção do
Grau de Mestre em Engenharia da Qualidade e Ambiente

Orientadores:

Doutora Maria Teresa Loureiro dos Santos (ADEQ/ISEL)

Doutor Pedro Manuel da Fonseca Antunes (APA, I.P.)

Júri:

Presidente: Doutor João Miguel Alves da Silva

Vogais: Doutor Teodoro José Pereira Trindade

Doutor Pedro Manuel da Fonseca Antunes

Dezembro 2018

Agradecimentos

Gostaria de agradecer, em primeiro lugar, à Agência Portuguesa do Ambiente, I.P., em especial à Doutora Vanda Reis, diretora do Laboratório de Referência do Ambiente, por me ter proporcionado todas as condições necessárias à realização deste trabalho final de mestrado.

Ao Doutor Pedro Antunes, orientador, por toda a dedicação, orientação durante todas as etapas deste trabalho, transmissão de conhecimentos, paciência e conselhos que, certamente, usarei na minha vida futura.

À Doutora Maria Teresa Santos, orientadora, pelos conhecimentos transmitidos e orientação durante o trabalho.

À Paula Ramalho, por toda a amizade, confiança, calma, conselhos e conhecimentos transmitidos durante o tempo de estágio.

À Liliana e à Verónica, por terem tornado esta experiência mais divertida, além da amizade que fomos construindo ao longo do tempo.

A todos os elementos que constituem não só o Laboratório de Referência do Ambiente, mas também a APA, I.P. em geral, pela simpatia e disponibilidade demonstradas durante o tempo de estágio.

Aos meus amigos, por todo o apoio, incentivo e amizade durante esta difícil temporada.

À minha família por todo o amor, paciência, motivação e apoio incondicional, não só nesta fase, mas em todas as etapas da minha vida.

Resumo

A agricultura tem sido uma das atividades humanas com maior impacto sobre os diversos compartimentos ambientais, sobretudo devido ao uso intensivo de produtos agroquímicos, onde se enquadram os pesticidas.

Acresce, que a poluição ambiental das águas superficiais, que resulta da disseminação dos pesticidas, é cada vez mais um problema ambiental relevante, uma vez que constitui uma ameaça não só aos organismos vivos, como também representa um risco significativo para a saúde humana.

Alguns pesticidas foram classificados como substâncias prioritárias e/ou perigosas, pelo Decreto-Lei n.º 218/2015, de 7 de outubro, como por exemplo a quinoxifena e o dicofol. Assim, tornou-se necessário o desenvolvimento e validação de métodos de monitorização para os referidos compostos.

Após o estudo de alguns parâmetros de validação, ficou evidenciado que as metodologias mais adequadas para a determinação dos referidos pesticidas, correspondem à agregação de técnicas, tais como, a extração líquido-líquido com a cromatografia gasosa com detetor de captura de eletrões (LLE-GC/ECD) e a extração em fase sólida com a cromatografia líquida acoplada a um espetrómetro de massa (SPE-LC-MS).

Ainda assim, das duas metodologias desenvolvidas, verificou-se que a que faz uso da preparação de amostra por extração em fase sólida (SPE-LC-MS), aparenta ser a mais adequada para determinar em conjunto os analitos quinoxifena e dicofol. Esta metodologia possui diversas vantagens, uma vez que requer menor consumo de tempo, é uma técnica ambientalmente mais sustentável e permite extrair em simultâneo um maior número de amostras.

Palavras-chave: pesticidas, dicofol, quinoxifena, cromatografia líquida, espectrometria de massa

Abstract

Agriculture has been one of the human applications with the greatest impact on environmental ecosystems, due to the use of agrochemicals, as pesticides.

In addition, environmental pollution of surface waters resulting from the spread of pesticides is increasingly a relevant environmental problem, as it poses a threat not only to living organisms but also poses a significant risk to human health.

Some pesticides were classified as priority, dangerous, or both, like quinoxifena and dicofol. Thus, development and validation of monitoring methods for these two compounds has become necessary.

After the study of some validation parameters of each methodology, it was evidenced that the most appropriate methodologies are the Liquid-liquid Extraction with Gas Chromatography-Electron Capture Detector (LLE-GC/ECD) and the Solid Phase Extraction with Liquid Chromatography-Mass Spectrometer (SPE-LC-MS).

However, from the two methodologies developed, it was verified that the SPE-LC-MS methodology seems to be the most adequate for the environmental determination of the two analytes, namely due to the less time consuming, to be an environmentally more sustainable technique and, at the same time, a greater number of extracted samples.

Keywords: pesticides, dicofol, quinoxifen, liquid chromatography, mass spectrometry

Lista de Símbolos e Abreviaturas

APA	Agência Portuguesa do Ambiente
APCI	<i>Atmospheric Pressure Chemical Ionization</i> (Ionização Química à Pressão Atmosférica)
ARH	Administração Regional Hidrográfica
CV	Coeficiente de Variação
ECD	<i>Electron Capture Detector</i> (Detetor de Captura de Eletrões)
ESI	<i>Electrospray Ionization</i> (Ionização por <i>Electrospray</i>)
GC	<i>Gas Chromatography</i> (Cromatografia Gasosa)
GC-ECD	<i>Gas Chromatography – Electron Capture Detector</i> (Cromatografia Gasosa – Detetor de Captura de Eletrões)
GC-MS	<i>Gas Chromatography – Mass Spectrometry</i> (Cromatografia Gasosa – Espectrometria de Massa)
H ₂	Hidrogénio molecular
HCl	Ácido Clorídrico
He	Hélio
LC	<i>Liquid Chromatography</i> (Cromatografia Líquida)
LC-MS	<i>Liquid Chromatography – Mass Spectrometry</i> (Cromatografia Líquida – Espectrometria de Massa)
LD	Limite de Detecção
LLE	<i>Liquid-liquid Extraction</i> (Extração líquido-líquido)
LQ	Limite de Quantificação
MeOH	Metanol
MRC	Material de Referência Certificado
MS	<i>Mass Spectrometry</i> (Espectrometria de massa)

N ₂	Azoto molecular
NaOH	Hidróxido de Sódio
Ni	Níquel
NQA	Norma de Qualidade Ambiental
PTB	Persistência, Toxicidade e Bioacumulação
RSD	<i>Relative Standard Deviation</i> (Desvio Padrão Relativo)
S/N	<i>Signal to Noise</i> (Sinal/ruído)
SIM	<i>Single Ion Monitoring</i> (Monitorização de ião selecionado)
SPE	<i>Solid Phase Extration</i> (Extração em Fase Sólida)
TFM	Trabalho Final de Mestrado

Índice

Resumo	iii
Abstract	iv
Lista de Símbolos e Abreviaturas	v
1. Introdução	1
1.1 Enquadramento do tema	1
1.2 Objetivo e metodologia.....	1
1.3 Agência Portuguesa do Ambiente, I.P.....	2
1.4 Estrutura do trabalho.....	4
2. Substâncias perigosas prioritárias – pesticidas	7
3. Metodologia analítica	11
3.1 Métodos de preparação de amostras	11
3.1.1 Extração líquido-líquido.....	11
3.1.2 Extração em fase sólida	12
3.2 Métodos de análise cromatográfica	13
3.2.1 Detetor de captura de eletrões	14
3.2.2 Detetor de espectrometria de massa	17
3.2.2.1 Espectrometria de massa acoplada à cromatografia líquida	19
3.3 Validação de métodos experimentais	20
3.3.1 Seletividade.....	21
3.3.2 Gama de trabalho, linearidade e sensibilidade	21
3.3.3 Limiares analíticos.....	22
3.3.4 Precisão	23
3.3.5 Exatidão	24
3.3.6 Incerteza	24
4. Parte Experimental	27
4.1. Material	27
4.2. Equipamento	27
4.3. Reagentes e padrões	28
4.4. Descrição de procedimentos analíticos	29
4.4.1. Preparação das soluções padrão	29
4.4.2. Preparação de amostras	30
4.4.2.1. Extração líquido-líquido.....	30
4.4.2.2. Extração em fase sólida	34
4.4.3. Análise cromatográfica.....	36
5. Apresentação e Discussão de Resultados	41
5.1 Considerações gerais	41

5.2 A razão sinal/ruído	41
5.3 Gama de trabalho, linearidade e sensibilidade	45
5.4 Limiares analíticos	48
5.5 Precisão	50
5.6 Exatidão	51
5.6.1 Extração líquido-líquido.....	51
5.6.1.1 Efeito do solvente.....	51
5.6.1.2 Efeito do número de extrações.....	53
5.6.1.3 Efeito do pH da amostra.....	54
5.6.2 Extração em fase sólida.....	56
5.6.2.1 Efeito do tipo de enchimento do cartucho.....	56
5.6.2.2 Efeito do volume de solvente de eluição.....	58
5.6.2.3 Efeito do pH da amostra.....	59
5.7 Incerteza	61
6. Conclusões	64
7. Perspetivas Futuras	68
Referências Bibliográficas	69
Anexos	72
Anexo I – Protocolo de estágio entre as instituições ISEL e APA	73
Anexo II – Póster apresentado no Fórum de Engenharia Química e Biológica de 2018	76
Anexo III – Lista de material utilizado	77

Índice de Figuras

Figura 1. Estrutura molecular da quinoxifena.....	8
Figura 2. Estrutura molecular do dicofol.....	9
Figura 3. Esquema típico das etapas da extração em fase sólida.....	12
Figura 4. Esquema de funcionamento de um cromatógrafo gasoso.....	13
Figura 5. Esquema de funcionamento de um ECD.....	15
Figura 6. Exemplo de um cromatograma com a identificação dos picos cromatográficos.....	16
Figura 7. Cromatógrafo gasoso com detetor de captura de elétrons (Agilent, 6890A series).....	16
Figura 8. Esquema representativo de funcionamento de um detetor de MS ...	17
Figura 9. Espectro de massa da quinoxifena, obtido por GC-MS.....	18
Figura 10. Cromatógrafo gasoso acoplado a espectrómetro de massa (Perkin Elmer, Clarus 500).....	19
Figura 11. Cromatógrafo líquido acoplado a espectrómetro de massa (Agilent, 1100 series).....	20
Figura 12. Esquema da preparação de soluções.....	29
Figura 13. Esquema do procedimento de análise através da técnica de extração líquido-líquido.....	31
Figura 14. Fitas indicadoras de pH.....	32
Figura 15. Ampolas de decantação.....	32
Figura 16. Ampolas de decantação num agitador mecânico.....	33
Figura 17. Evaporador rotativo (Bibby).....	33
Figura 18. Sistema de concentração em corrente de azoto.....	34
Figura 19. Esquematização da metodologia efetuada através da técnica de extração em fase sólida.....	35
Figura 20. Sistema automático de extração de amostras em fase sólida (ThermoScientific AutoTrace 280 – Dionex).....	36
Figura 21. Cromatogramas obtidos em modo varrimento total ($m/z = 50-400$) por LC-MS, com fonte de ionização ESI: a) quinoxifena e b) dicofol.....	42
Figura 22. Cromatogramas obtidos em modo varrimento total ($m/z = 50-400$) por LC-MS, com fonte de ionização APCI: a) quinoxifena e b) dicofol.....	43
Figura 23. Curvas de calibração obtidas no sistema LC-MS para cada analito	46
Figura 24. Curvas de calibração obtidas no sistema GC-MS para cada analito	47
Figura 25. Curvas de calibração obtidas no sistema GC/ECD para cada analito	47
Figura 26. Separação de fases em cada extração, com cada solvente.....	52
Figura 27. Percentagem de recuperação de cada analito, por solvente.....	53

Figura 28. Percentagens de recuperação obtidas para cada analito, em cada extração	54
Figura 29. Influência do pH na recuperação: A – quinoxifena e B - dicofol.....	55
Figura 30. Resultados de recuperação para a quinoxifena e o dicofol por SPE, com diferentes tipos de cartuchos	57
Figura 31. Efeito do volume de metanol utilizado na eluição dos analitos, com cartuchos OASIS HLB	59
Figura 32. Efeito do pH da amostra na recuperação dos analitos, utilizando cartuchos OASIS HLB	60

Índice de Tabelas

Tabela 1. Valores regulatórios para cada analito, segundo o Anexo II do Decreto-Lei n.º 218/2015	9
Tabela 2. Concentrações dos padrões de quinoxifena e dicofol preparados...	29
Tabela 3. Propriedades dos solventes utilizados	30
Tabela 4. Rampa de temperatura do forno do GC-ECD	37
Tabela 5. Rampa de temperaturas do forno do GC-MS.....	38
Tabela 6. Condições utilizadas no espectrómetro de massa do GC-MS em modo SIM.....	38
Tabela 7. Condições utilizadas no espectrómetro de massa do LC-MS	39
Tabela 8. Resumo da percepção da intensidade do sinal de cada sistema para cada composto.....	44
Tabela 9. Valores da razão sinal/ruído para a quinoxifena (50 µg/L) e o dicofol (1,5 mg/L), obtidos com os diversos sistemas de análise.....	44
Tabela 10. Gama de trabalho e linearidade obtidas para cada composto, consoante o sistema cromatográfico considerado	46
Tabela 11. Valor de sensibilidade associada a cada equipamento.....	48
Tabela 12. Limiares analíticos teóricos obtidos para os dois analitos, consoante o sistema de análise considerado.....	49
Tabela 13. Coeficientes de variação da quinoxifena e do dicofol, ao longo da gama de trabalho, nos sistemas LC-MS e GC/ECD	50
Tabela 14. Componentes de incertezas associadas à quinoxifena (a pH = 7), para as duas metodologias estudadas	61
Tabela 15. Componentes de incerteza associadas ao dicofol (a pH = 7), para as duas metodologias testadas.....	62
Tabela 16. Incerteza expandida de cada metodologia, associada a cada composto	62

1. Introdução

1.1 Enquadramento do tema

A exploração agrícola tem sido uma das atividades humanas com maior impacto sobre a biodiversidade, constituindo uma enorme ameaça à conservação dos solos e das massas de água superficiais, devido ao uso de produtos agroquímicos onde se enquadram os pesticidas ^[1,2].

De acordo com o Decreto-Lei n.º 218/2015, de 7 de outubro, a poluição das águas superficiais com produtos agroquímicos pode causar “toxicidade aguda e crónica nos organismos aquáticos, acumulação no ecossistema e perda de habitats e de biodiversidade, para além de constituir uma ameaça para a saúde humana” ^[3].

Assim, foram estabelecidas normas de qualidade ambiental (NQA), definidas no âmbito da política da água, cujo objetivo consiste em controlar a presença destas substâncias no ambiente, e conseqüentemente, proteger a saúde humana. As NQA estabelecem os valores máximos de concentração possíveis de certos compostos nos diferentes compartimentos ambientais (água, solos ou biota), por forma, a garantir um certo grau de segurança na normal utilização destes recursos ^[3].

O Decreto-Lei n.º 218/2015, de 7 de outubro, ^[3] define as NQA para algumas substâncias, classificando-as também como prioritárias e/ou perigosas, estabelecendo assim como objetivo final, a redução ou eliminação da sua presença no ambiente. Duas dessas substâncias, classificadas como perigosas prioritárias são a quinoxifena e o dicofol, pesticidas de classes e modos de ação distintos.

1.2 Objetivo e metodologia

Este trabalho final de mestrado (TFM) teve como objetivo o desenvolvimento e a validação de metodologias de análise de modo a quantificar compostos orgânicos, nomeadamente a quinoxifena e o dicofol, em matrizes aquosas. Os

referidos pesticidas fazem parte da lista de substâncias prioritárias no domínio da política da água, sendo extremamente pertinente a sua quantificação em matrizes aquosas, nomeadamente em águas superficiais e subterrâneas.

Para o desenvolvimento das metodologias de análise foram realizados e validados vários ensaios de recuperação com recurso a técnicas preparativas de amostra, e posteriormente, analisados os extratos através de técnicas cromatográficas distintas. Assim, estudaram-se os efeitos de cada parâmetro, de modo a fomentar a taxa de recuperação dos analitos das amostras aquosas.

O TFM tipo estágio foi realizado entre fevereiro e julho do corrente ano, no Laboratório de Referência do Ambiente (LRA) da Agência Portuguesa do Ambiente, I.P. (APA, I.P.) ao abrigo do protocolo de estágio estabelecido entre a APA e o ISEL, presente no Anexo I. Em concreto, a parte laboratorial foi executada no setor de Química Orgânica.

1.3 Local de estágio - Agência Portuguesa do Ambiente, I.P.

A APA é o principal regulador em matéria de ambiente em Portugal, tendo como competências a monitorização, planeamento e avaliação, licenciamento e fiscalização e emprega cerca de 700 pessoas ^[4].

Desde 2012 que é o resultado da fusão de nove organismos, entre os quais estão cinco administrações regionais hidrográficas (ARH), nomeadamente:

- ARH do Norte;
- ARH do Centro;
- ARH do Tejo e Oeste;
- ARH do Alentejo;
- ARH do Algarve.

Esta instituição tem como missão “propor, desenvolver e acompanhar a gestão integrada e participada das políticas de ambiente e de desenvolvimento sustentável, ...” e visiona “contribuir para o desenvolvimento sustentável de

Portugal, assente em elevados padrões de proteção e valorização dos sistemas ambientais e de abordagens integradas das políticas públicas.” [4].

Como já foi referido, a APA representa a autoridade máxima do ambiente em Portugal tendo-lhe sido atribuídas, entre outras, algumas funções, tais como:

- “Propor, desenvolver e acompanhar a execução das políticas de ambiente, ...”;
- “Exercer as funções de Autoridade Nacional da Água, ...”;
- “Exercer as funções de Autoridade Nacional de Resíduos, ...”;
- “Exercer as funções de Autoridade Nacional para a Prevenção e Controlo Integrados da Poluição, ...”;
- “Exercer as funções de autoridade competente para o regime de responsabilidade ambiental”;
- “Elaborar estudos e análises prospetivas e de cenarização, modelos e instrumentos de simulação, ...”;
- “Assegurar a gestão da rede de laboratórios do ambiente e colaborar na acreditação de outros laboratórios e de novas técnicas analíticas” [4].

Da constituição da APA é parte integrante o Laboratório de Referência do Ambiente, situado em Lisboa, que é composto por 5 sectores, nomeadamente:

- Metais;
- Química Geral;
- Biologia/Microbiologia;
- Qualidade do Ar;
- Química Orgânica.

Este laboratório está acreditado pela norma NP EN ISO/IEC 17025 para diferentes metodologias abrangendo diferentes matrizes (p.e.: águas, lamas,

sedimentos e solos), sendo sujeito a duas auditorias anuais para verificação da conformidade dos ensaios. A principal matriz de ensaios, com cerca de 80 % do total de amostras, é água [4].

No setor de Química Orgânica, onde foi realizada a parte prática deste trabalho, a sua atividade abrange atualmente cerca de 300 substâncias individuais para verificação das normas de qualidade ambientais NQA segundo do Decreto-Lei n.º 218/2015.

1.4 Estrutura do trabalho

Este TFM está dividido em sete capítulos, os quais são descritos a seguir, para além de três anexos finais.

O Capítulo 1 refere-se ao enquadramento do tema, aos objetivos e estrutura do trabalho realizado.

O Capítulo 2 refere-se às substâncias perigosas e prioritárias, classificação dos analitos.

O Capítulo 3 refere-se à metodologia analítica do trabalho, subdividindo-se em três subcapítulos, referentes aos métodos de preparação de amostras, métodos de análise cromatográfica e à validação dos métodos experimentais.

O Capítulo 4 refere-se à parte experimental, o qual está dividido em quatro subcapítulos, onde se apresentam os materiais utilizados, os reagentes e os padrões, bem como os equipamentos e uma descrição detalhada do procedimento analítico utilizado.

No Capítulo 5 apresentam-se os resultados obtidos durante o decorrer do trabalho, assim como uma breve discussão dos mesmos. Este capítulo está dividido em seis subcapítulos, referindo os vários parâmetros para a validação dos métodos.

Nos Capítulos 6 e 7 são apresentadas as conclusões e as perspetivas futuras do presente trabalho, respetivamente.

Este trabalho deu origem a uma comunicação em painel, apresentada no Fórum de Engenharia Química e Biológica 2018, decorrido nos dias 8, 9 e 10 de maio de 2018, no ISEL (Anexo II).

2. Substâncias perigosas prioritárias – pesticidas

O Decreto-Lei n.º 218/2015, de 7 de outubro, estabelece a lista de substâncias a monitorizar nas massas de água superficiais (interiores - rios, lagos e massas de água fortemente modificados – e outras águas superficiais – de transição, costeiras e territoriais), assim como a respetiva NQA para cada substância, expressas em concentração máxima admissível e valor médio anual ^[3].

As substâncias enumeradas no Anexo I, do referido Decreto-Lei, classificam-se em substâncias prioritárias e perigosas prioritárias. As substâncias prioritárias são definidas na alínea I, no artigo 3º do Decreto-Lei n.º 218/2015, como “as substâncias que representam risco significativo para o ambiente aquático ou por seu intermédio...” e as substâncias perigosas são selecionadas tendo por base algumas propriedades, tais como, a sua persistência, toxicidade e bioacumulação (critério PTB) ^[3,5].

Assim, as substâncias classificadas como perigosas prioritárias definem-se como “as substâncias identificadas como apresentando um risco acrescido em relação às substâncias prioritárias, sendo a sua seleção feita com base em normativo próprio relativo a substâncias perigosas ou nos acordos internacionais relevantes” ^[5].

De entre as substâncias listadas no Anexo I do referido Decreto-Lei estão os dois pesticidas estudados neste trabalho, a quinoxifena e o dicofol. Estes pesticidas estão classificados como substâncias perigosas prioritárias, tornando, portanto, imprescindível a sua monitorização ^[3].

A quinoxifena, como é comumente conhecida, é um pesticida da classe dos fungicidas, com a fórmula molecular $C_{15}H_8Cl_2FNO$ e nome IUPAC 5,7-Dicloro-4-(4-fluorfenoxi)quinolina. Este é um pesticida de uso, essencialmente preventivo, no tratamento ao oídio da videira. A quinoxifena apresenta toxicidade elevada para organismos aquáticos, como os peixes, organismos invertebrados e algas, não sendo considerado tóxico em espécies terrestres. Nos humanos, pode causar reações alérgicas quando entra em contacto com a pele ^[6 9]. Esta substância é bastante solúvel em solventes orgânicos como o diclorometano ou

o acetato de etilo, sendo, portanto, pouco solúvel em água ^[9]. Devido à sua elevada agregação com as partículas do solo e à fraca solubilidade em água, permanece mais facilmente na camada superior do solo, possibilitando a sua absorção pela raiz das plantas ^[8]. A quinoxifena tem massa molar 308,133 g/mol ^[9] e ponto de ebulição a 423 °C ^[10]. A sua densidade é de 1,56 e a solubilidade em água corresponde a de 0,047 g/L (20 °C). Os principais iões obtidos por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa (GC-MS) correspondem a 237, 272 e 307 m/z. Na Figura 1 representa-se a estrutura da molécula quinoxifena ^[9].

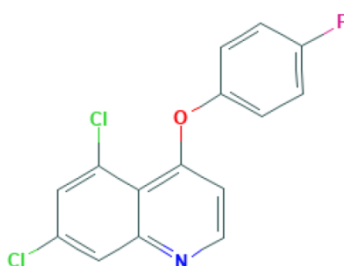


Figura 1. Estrutura molecular da quinoxifena ^[9]

O outro pesticida referido, o dicofol, pertence à classe dos acaricidas que são utilizados, por exemplo, na cultura do algodão ^[11]. As suas propriedades apresentam elevada toxicidade para os organismos aquáticos e para os seres humanos, quer seja através de contacto com a pele ou olhos, ou pela sua ingestão. Outro efeito relevante, consiste em provocar danos em órgãos, se a exposição ao produto for prolongada. A sua solubilidade é mais elevada em solventes orgânicos como a acetona ou o acetato de etilo, sendo praticamente insolúvel em água ^[12]. Assim, a poluição da água com este composto advém da acumulação de produto no solo ou da aplicação inapropriada do produto, isto é, a sua aplicação em excesso ^[13].

O dicofol, também conhecido como “*Keltane*”, tem uma estrutura semelhante ao DDT, considerando-se um seu metabolito ^[14]. Este composto tem nome IUPAC 2,2,2-Tricloro-1,1-bis(4-clorofenil)etanol e a sua fórmula molecular é C₁₄H₉Cl₅O. A sua massa molar é 370,475 g/mol, possui uma densidade de 1,13 e temperatura de ebulição é 225 °C. Relativamente à solubilidade em água (25 °C), corresponde a 0,8 mg/L, sendo, portanto, inferior à da quinoxifena. Os

principais iões obtidos por GC-MS correspondem a 139, 251 e 253 m/z. A estrutura da molécula do dicofol apresenta-se na Figura 2 ^[12].

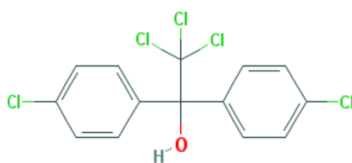


Figura 2. Estrutura molecular do dicofol (adaptada de ^[12])

Os valores de NQA estabelecidos na legislação nacional para estas substâncias são apresentados na Tabela 1.

Tabela 1. Valores regulatórios para cada analito, segundo o Anexo II do Decreto-Lei n.º 218/2015 ^[3]

Composto	Média Anual (µg/L)		Concentração Máxima Admissível (µg/L)	
	Águas superficiais interiores	Outras águas superficiais	Águas superficiais interiores	Outras águas superficiais
Quinoxifena	0,15	0,015	2,7	0,54
Dicofol	$1,3 \times 10^{-3}$	$3,2 \times 10^{-5}$	n.a.	n.a.

n.a não aplicável.

Assim, tendo como referência o menor valor regulatório, verifica-se que para a quinoxifena este corresponde a 0,015 µg/L (15 ng/L) e para o dicofol a 0,000032 µg/L (0,032 ng/L).

3. Metodologia analítica

3.1 Métodos de preparação de amostras

Um método de preparação de amostras consiste numa sequência de passos requeridos para transformar a amostra em algo apropriado para análise. A preparação de amostra pode incluir a sua diluição, a extração de analito de uma matriz complexa, a concentração de um analito para um nível a que este possa ser quantificado, a conversão química de um analito numa outra forma detetável e a remoção ou disfarce de espécies interferentes ^[15].

Neste trabalho, a preparação de amostra teve como objetivo a extração do analito a partir de uma matriz complexa. Para isso, as técnicas extrativas estudadas foram a extração líquido-líquido e a extração em fase sólida.

3.1.1 Extração líquido-líquido

De um modo geral, a extração líquido-líquido (LLE) é uma operação de separação, cujo objetivo consiste em extrair os analitos presentes numa amostra, através do contacto entre esta e um solvente imiscível, no qual o analito deve ser solúvel e não se decompõe.

Tipicamente, este tipo de extração é executado entre uma fase aquosa (designada por amostra) e uma fase orgânica (constituída por um solvente, imiscível com a água). Os solventes vulgarmente utilizados como fase orgânica são, por exemplo, o éter dietílico, o *isooctano* ou o hexano, (menos densos que a água) ou clorofórmio, diclorometano ou tetraclorometano (mais densos que a água) ^[15].

As vantagens desta técnica são, essencialmente, a fácil remoção de sais inorgânicos, o tempo de desenvolvimento do método curto e os baixos custos em termos de equipamento. Todavia, existem também algumas desvantagens, uma vez, que tem um custo mais intensivo do ponto de vista de trabalho laboratorial, exige um maior consumo de solventes orgânicos e é difícil de automatizar ^[16].

3.1.2 Extração em fase sólida

A extração em fase sólida (SPE) difere do tipo anterior, pois em vez de ser promovida a transferência do analito de uma fase líquida para outra, o analito fica retido numa fase sólida, a qual é constituída por um enchimento selecionado de acordo com o tipo de analito que se pretende extrair. Neste método é usado um pequeno volume de fase estacionária cromatográfica, de modo a isolar os analitos presentes na fase líquida (vulgarmente designada por amostra), removendo assim a maior parte da matriz aquosa e simplificando em muito a subsequente etapa de análise. Na Figura 3 representam-se as etapas de uma típica SPE.

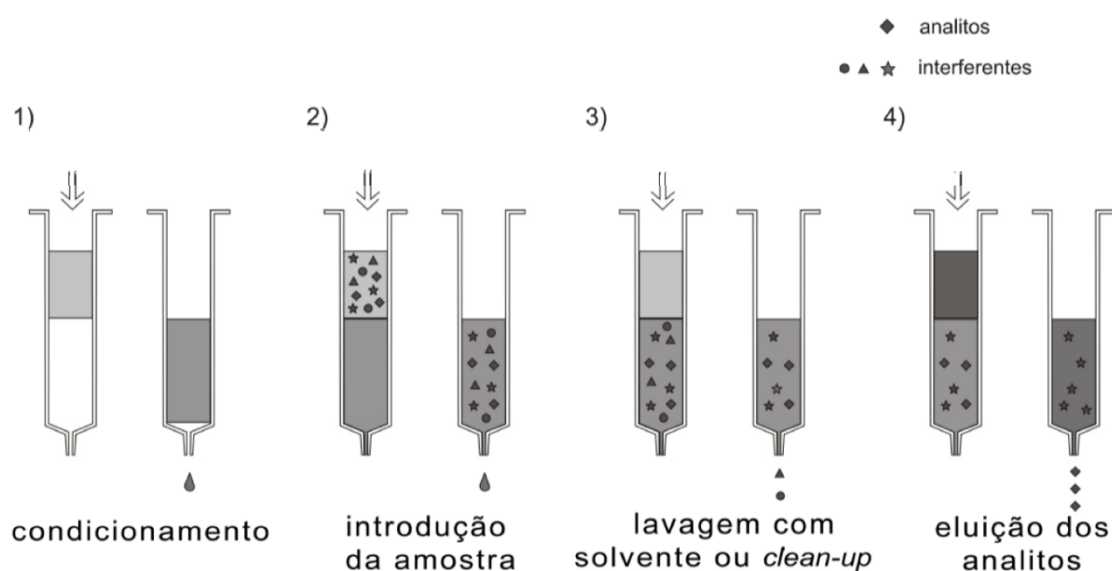


Figura 3. Esquema típico das etapas da extração em fase sólida [17]

Numa SPE, usualmente a primeira fase corresponde ao condicionamento ou ativação do adsorvente do cartucho, com um solvente adequado. De seguida, a passagem da amostra pelo enchimento do cartucho permite a retenção dos analitos, e por vezes também de alguns interferentes. A terceira etapa, designada por lavagem, tem como objetivo principal retirar os interferentes eventualmente também extraídos. Por fim, a quarta e última etapa representa a eluição do analitos [17].

Comparativamente com a LLE, a técnica de SPE é muito mais seletiva, para além de ser eficaz mesmo em matrizes variáveis e complexas. Tal como no caso

anterior, possibilita também um efeito de concentração, mas em maior grau, permitindo obter elevadas recuperações dos analitos e com elevada reprodutibilidade. No entanto, a SPE tem maiores custos associados (designadamente em termos de equipamentos e consumíveis), sendo ainda uma técnica bem mais complexa que a anterior [16].

3.2 Métodos de análise cromatográfica

A cromatografia é um processo de separação em que uma das fases é mantida fixa (designada por fase estacionária), enquanto outra fase se movimenta através desta (denominada por fase móvel), possibilitando assim a separação dos componentes de uma mistura.

A cromatografia é dividida em diversas categorias baseadas no mecanismo de interação entre o soluto e a fase estacionária ou no estado físico da fase móvel. Relativamente aos tipos de interação fase móvel-fase estacionária, podemos falar de cromatografia de adsorção, de partição, de troca iónica, por exclusão molecular e por afinidade. Quanto ao estado físico da fase móvel, esta pode estar no estado líquido ou gasoso, designando-se assim, por cromatografia líquida (LC) ou gasosa (GC), respetivamente [15].

O esquema de funcionamento de um cromatógrafo gasoso é apresentado na Figura 4, o qual é usualmente constituído por injetor, coluna e detetor.

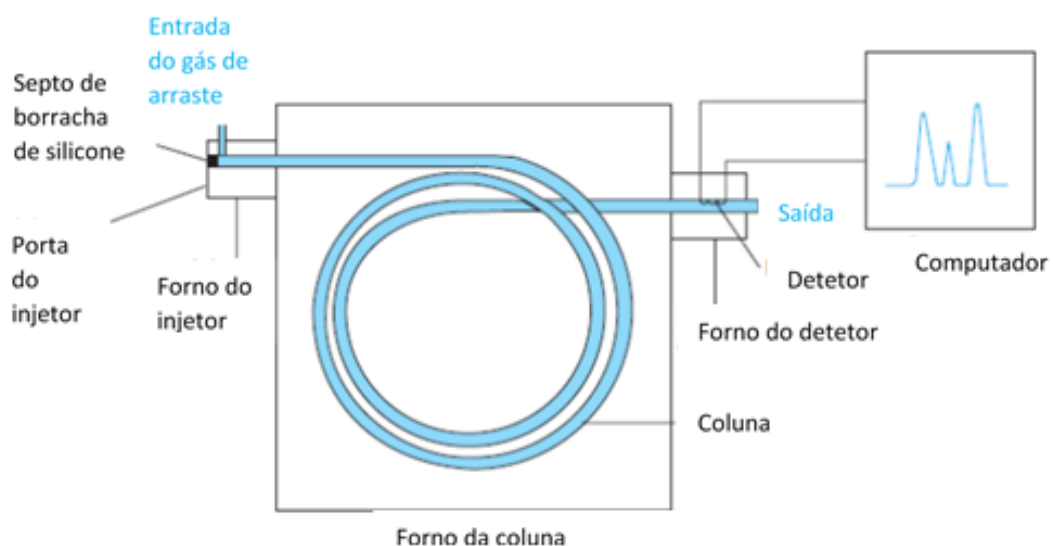


Figura 4. Esquema de funcionamento de um cromatógrafo gasoso

Uma amostra líquida volátil (ou sob a forma de gás) é injetada através de um septo num orifício aquecido (injetor), onde é rapidamente vaporizada. Este vapor atravessa a coluna de separação cromatográfica e é levado ao detetor, cuja resposta é enviada para um sistema de aquisição de dados, como por exemplo um computador. À coluna, que pode ser do tipo capilar ou de enchimento, é imposto um aquecimento no forno, que quando faseado é denominado por rampa de aquecimento. Assim a coluna é mantida a determinada temperatura de modo a fornecer pressão de vapor suficiente para os analitos serem eluídos num tempo razoável, enquanto que o detetor é mantido a uma temperatura superior à da coluna para garantir que não ocorre condensação dos analitos ^[15].

A escolha do detetor deve ter em conta três características fundamentais, nomeadamente, ter sensibilidade a baixas concentrações de analito, dar resposta linear para diferentes analitos e conservar a resposta simétrica e bem definida para os compostos de interesse. Entre os vários tipos de detetores existentes, este trabalho é focado em apenas dois, nomeadamente, no detetor de captura de eletrões (ECD) e no de espectrometria de massa (MS) ^[15].

3.2.1 Detetor de captura de eletrões

O ECD é particularmente sensível a moléculas com elevada afinidade eletrónica nomeadamente as que contenham halogéneos, carbonilos conjugados, nitrilos, grupos nitro e organometálicos. Por estas características e pelo facto de responder a compostos com facilidade em formar aniões, o ECD é relativamente insensível a hidrocarbonetos, álcoois e cetonas ^[15]. Na Figura 5 representa-se o esquema de funcionamento característico de um ECD.

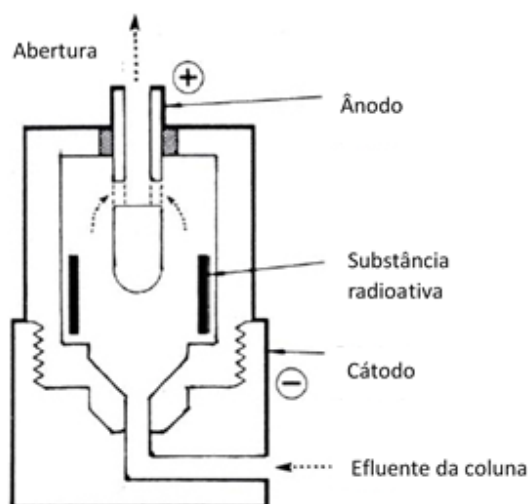


Figura 5. Esquema de funcionamento de um ECD [18]

Tipicamente o ECD está associado à cromatografia gasosa, na qual, o gás de arraste (que pode ser constituído, por H₂, He ou N₂) tem como função arrastar a amostra pela coluna. Quando a fase móvel em forma de gás entra no detetor, esta é ionizada por ação de elétrons com elevada energia emitidos por uma fonte de iões radioativos (por exemplo, ⁶³Ni). A fonte radioativa gera um fluxo de elétrons que produzem uma corrente elétrica estável e sempre que é eluído um componente que captura alguns dos elétrons, o valor dessa corrente é alterado, o que é registado como um pico cromatográfico. Este tipo de detetor é extremamente sensível para compostos com elevada afinidade eletrónica, sendo possível efetuar quantificações com limites comparáveis ou inferiores aos obtidos com a monitorização de ião selecionado por espectrometria de massa [15].

A identificação de um pico é conseguida através da comparação do seu tempo de retenção (correspondente ao tempo compreendido entre o momento de injeção da mistura na coluna à chegada do analito ao detetor) com o de um padrão da presumível substância. A análise quantitativa é baseada na área ou altura de um pico cromatográfico [15]. Na maioria dos equipamentos, a intensidade do pico é transmitida para o computador que possui um programa de aquisição de dados, como por exemplo o *software GC OpenLab* (Agilent) [19], utilizado neste trabalho. No programa é necessário desenhar linhas de base abaixo dos picos de modo a decidir sobre os limites da medição, tal como representado na Figura 6.

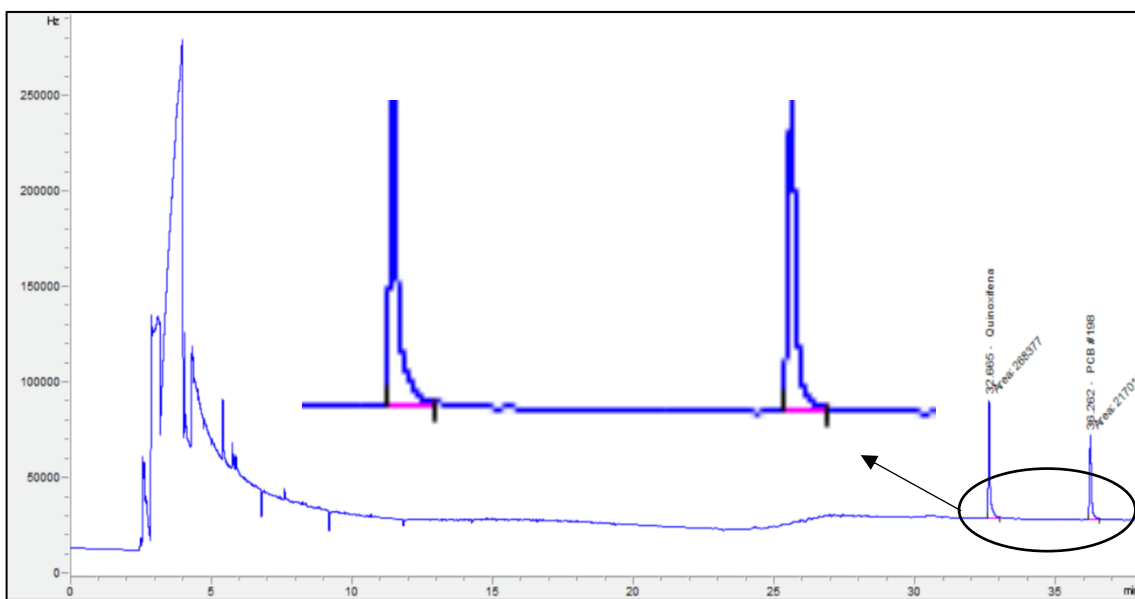


Figura 6. Exemplo de um cromatograma com a identificação dos picos cromatográficos

Na gama de concentração cuja resposta é linear, a área ou altura de um pico é proporcional à concentração do analito [15].

O cromatógrafo gasoso com detetor de captura de elétrons (GC/ECD) utilizado neste trabalho é o representado na Figura 7.

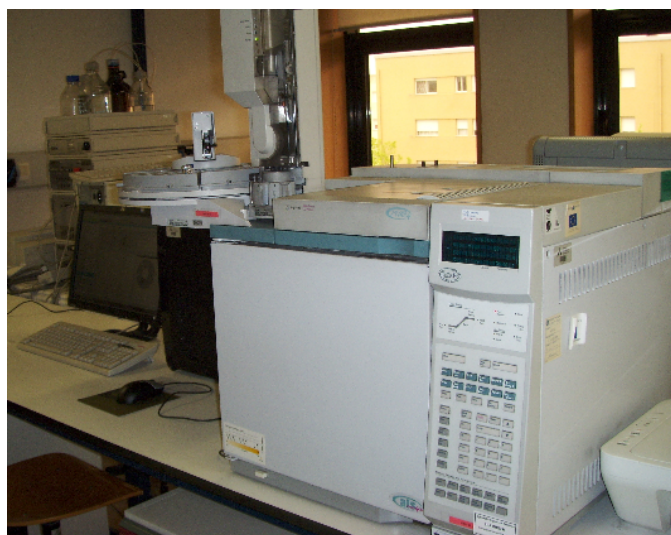


Figura 7. Cromatógrafo gasoso com detetor de captura de elétrons (Agilent, 6890A series)

3.2.2 Detetor de espectrometria de massa

Um espectrómetro de massa é um detetor sensível que fornece informações quantitativas e qualitativas. A sua seletividade facilita os critérios de preparação de amostra ou a separação cromatográfica completa dos componentes de uma mistura. O funcionamento de um espectrómetro de massa é representado na Figura 8.

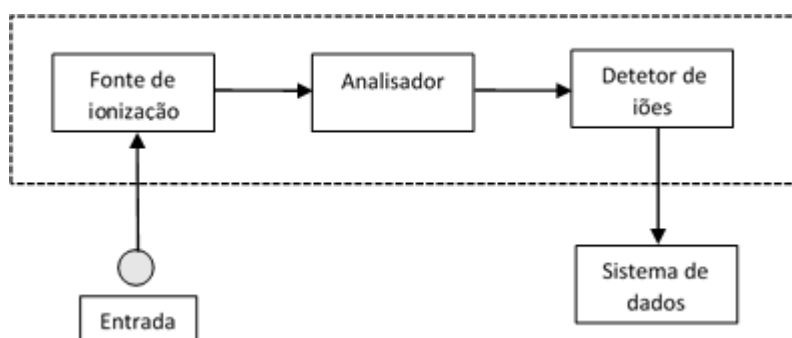


Figura 8. Esquema representativo de funcionamento de um detetor de MS [20]

Na fonte de ionização, as moléculas da fase móvel em forma de gás são convertidas em espécies carregadas. De seguida, os iões passam para o analisador no qual são separados de acordo com a sua razão massa/carga. Posteriormente, os iões alcançam o detetor, produzindo um sinal elétrico que é registado e representado na forma de gráfico pelo sistema de aquisição de dados [20,21].

Um detetor de espectrometria de massa, quando funciona em modo de ião selecionado, permite quantificar um componente a partir de um cromatograma complexo, formado por compostos fracamente separados. O modo de ião selecionado (SIM) reduz o limite de deteção, comparado com o modo de varrimento total (*Full Scan*), uma vez que no primeiro caso, durante o mesmo intervalo de tempo, o espectrómetro analisa apenas os iões selecionados [15].

A espectrometria de massa requer vácuo elevado de modo a prevenir colisões moleculares durante a separação dos iões. Todavia, o processo cromatográfico requer uma pressão elevada. O problema em juntar um sistema cromatográfico e um espectrómetro de massa está na remoção do excesso de vapor produzido aquando da vaporização do eluato à entrada do espectrómetro de massa. No entanto, a cromatografia gasosa evoluiu de forma a empregar colunas capilares

estreitas, de modo a que, assim, o eluato não sobrecarregue o sistema de vácuo do espectrómetro de massa [15,20].

Para a identificação de um composto, dois picos específicos e intensos do seu espectro de massa são selecionados. O íon quantitativo é usado para a quantificação (corresponde, usualmente, ao mais intenso do espectro) e o íon de confirmação é usado para identificação ou confirmação da identidade do composto (se possível este deverá corresponder ao valor da respetiva massa molecular) [15]. Na Figura 9 apresenta-se um espectro de massa obtido para a quinoxifena, a título de exemplo.

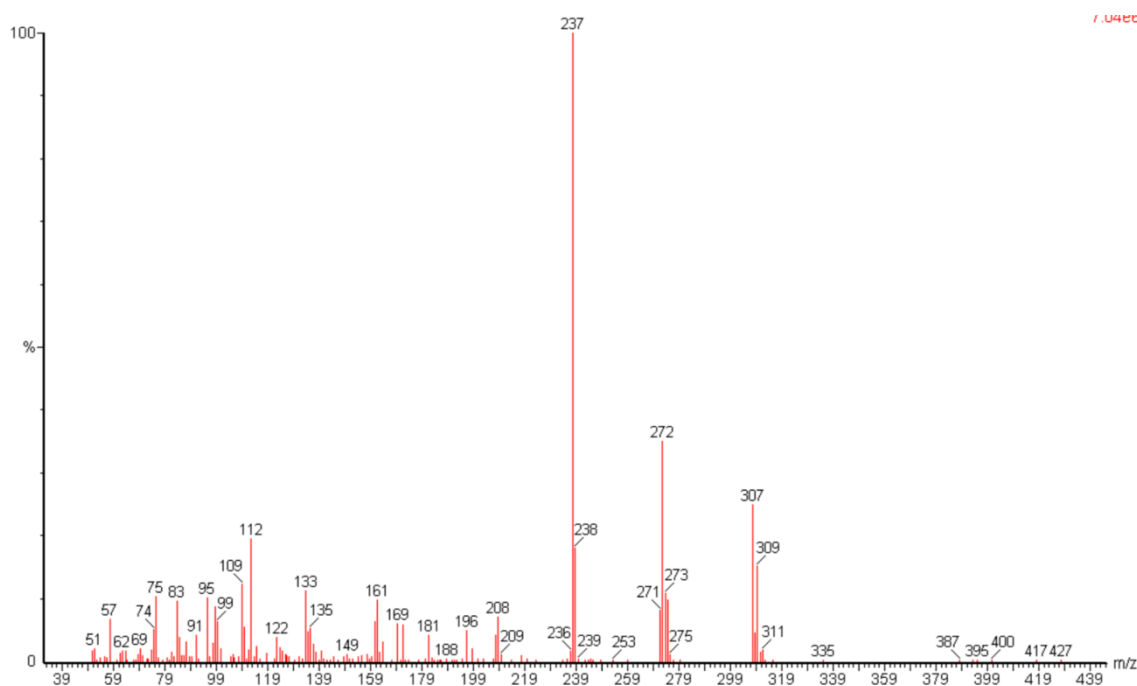


Figura 9. Espectro de massa da quinoxifena, obtido por GC-MS

No caso apresentado na Figura 9, o íon quantitativo corresponde ao pico a 237 m/z e o íon de confirmação de identidade é o 307 m/z, o qual correspondente à massa molecular da quinoxifena.

Na Figura 10 apresenta-se o cromatógrafo gasoso com espectrometria de massa (GC-MS), utilizado durante este trabalho.

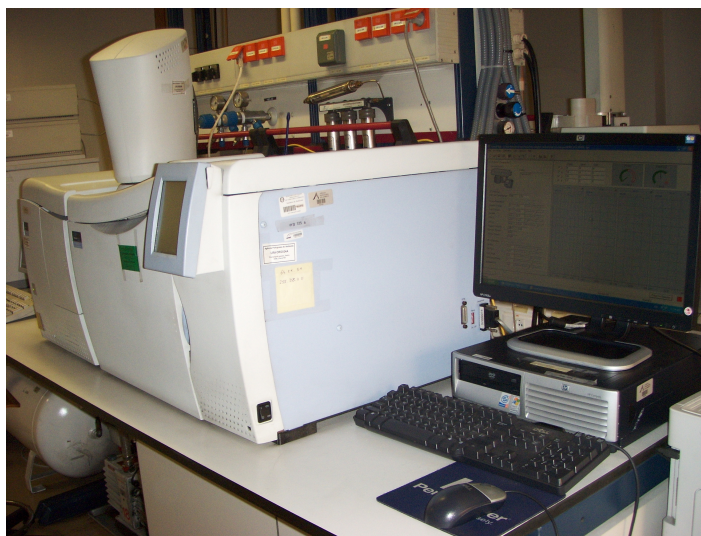


Figura 10. Cromatógrafo gasoso acoplado a espectrómetro de massa (Perkin Elmer, Clarus 500)

3.2.2.1 Espectrometria de massa acoplada à cromatografia líquida

A técnica de cromatografia líquida acoplada a um espectrómetro de massa (LC-MS), permite a separação e a identificação de espécies presentes numa amostra à medida que eluem da coluna cromatográfica, tal como no sistema anterior. No entanto, no acoplamento destas duas técnicas, apesar da elevada sensibilidade que é conseguida, existe também uma desvantagem ^[20]. A desvantagem advém do facto da cromatografia líquida criar um grande volume de eluato (constituído por soluto e solvente), que quando entra no espectrómetro de massa, gera um elevado volume de gás (cerca de 10 a 1000 vezes mais que o volume do gás de arraste produzido na cromatografia gasosa). Desta forma, para não se sobrecarregar o sistema de vácuo do espectrómetro de massa, tal quantidade de gás deve ser removida previamente à separação dos iões na fonte do espectrómetro. Os modos de ionização eletrónica que permitem lidar com este efeito, e que são igualmente mais usuais aquando o acoplamento entre a espectrometria de massa e a cromatografia líquida, correspondem à ionização por *electrospray* (ESI) e à ionização química à pressão atmosférica (APCI) ^[15,20].

A combinação entre a cromatografia líquida e a espectrometria de massa oferece elevada seletividade, uma vez que picos fracamente separados podem ser isolados, selecionando-se um ou mais valores de massa distintos correspondentes ao composto de interesse ^[20].

O equipamento LC-MS utilizado neste trabalho está representado na Figura 11.



Figura 11. Cromatógrafo líquido acoplado a espectrômetro de massa (Agilent, 1100 series)

3.3 Validação de métodos experimentais

Todos os métodos utilizados em laboratório precisam ser validados, com o objetivo de confirmar que os métodos se adequam ao uso. Assim, são objeto de validação os seguintes casos:

- Métodos não normalizados;
- Métodos criados pelo laboratório;
- Métodos normalizados usados fora do campo para o qual foram desenvolvidos;
- Ampliações e modificações dos métodos normalizados.

O processo de validação de um método deve estar descrito num procedimento e os estudos para determinar os parâmetros de desempenho devem ser realizados em equipamentos e instrumentos dentro das especificações (funcionando corretamente, adequadamente calibrados e validados). Do mesmo modo, o operador que realiza os estudos deve ser competente na área de estudo e precisa ter conhecimento suficiente sobre o trabalho, sendo portanto, capaz de tomar as decisões apropriadas durante a realização do estudo [22].

Para a validação de métodos experimentais, deve-se ter em conta os seguintes parâmetros ^[23]:

- Seletividade;
- Gama de trabalho, Linearidade e Sensibilidade;
- Limites analíticos;
- Precisão;
- Exatidão;
- Incerteza.

3.3.1 Seletividade

A matriz de uma amostra pode conter espécies químicas que interfiram no desempenho de uma medição, interferentes estes que podem aumentar ou reduzir o sinal do método ^[22].

Um método diz-se seletivo quando produz respostas a vários analitos, mas distingue a resposta de um analito relativamente à de outros ^[23].

Uma forma de determinar a seletividade de um método instrumental consiste na determinação da razão sinal/ruído, que compara o nível do sinal obtido para o analito com o ruído de fundo gerado pelo equipamento ^[24]. Este rácio é calculado a partir dum cromatograma, com base na altura do pico do analito (sinal) dividido pela linha de base do cromatograma do respetivo branco (ruído).

3.3.2 Gama de trabalho, linearidade e sensibilidade

Em qualquer método quantitativo existe uma gama de concentrações de analito para a qual o método pode ser aplicado. Assim, é prioritária a escolha de uma gama de trabalho que cubra o intervalo de concentrações em que o método irá ser aplicado.

Ao limite inferior da gama de concentrações deve corresponder o limite de quantificação, enquanto que o limite superior dependerá da resposta do

equipamento ao analito. Idealmente, a gama de trabalho deve ser do tipo linear, na qual a resposta do sinal tem uma relação proporcional com a concentração do analito. Neste âmbito, e para o caso de uma resposta linear entre o sinal e a concentração de analito, tem-se a expressão 1.

$$y = mx + b \quad (1)$$

Em que:

y representa a resposta (altura ou área do pico, neste caso);

x representa a concentração de analito em cada padrão;

b representa a ordenada na origem;

m representa o declive da reta (vulgarmente designada por sensibilidade do método).

Verifica-se, pois, que, a sensibilidade do método é mais elevada, quanto maior a variação da resposta à menor variação de concentração [22].

3.3.3 Limiares analíticos

De um modo geral, limiares analíticos são os limites do método perante a presença de um analito e são definidos como limite de deteção (LD) e limite de quantificação (LQ), respetivamente.

O LD define-se como “a menor quantidade ou concentração de um analito na amostra de teste que pode ser distinguida de forma confiável de zero ou em branco” [23], sendo calculado pela expressão 2.

$$LD = 3s_0 + x_{BI} \quad (2)$$

Em que:

s_0 representa o desvio padrão dos resultados obtidos para as medições de x_{BI} ;

x_{BI} representa a média aritmética do teor medido de uma série de brancos ou padrões vestígio ($n \geq 10$).

Se aos resultados for subtraído o resultado do branco, este último termo é ignorado. O termo s_0 tem como base 10 medições independentes da

concentração de analito presente num padrão e o fator de 3 corresponde ao nível de confiança de 99 % [25].

O LQ é definido como a menor concentração de analito que o método consegue quantificar, sendo determinado pela expressão 3.

$$LQ = 10s_0 + x_{BI} \quad (3)$$

Experimentalmente, pode utilizar-se o padrão de calibração de menor concentração da gama de trabalho, para este limiar analítico [22].

3.3.4 Precisão

A precisão de um método define-se como o grau de concordância entre os valores medidos obtidos repetidamente e segundo as mesmas condições [26,27]. Este aspeto pode ser determinado sob três formas, nomeadamente:

- Repetibilidade;
- Precisão intermédia;
- Reprodutibilidade.

Neste trabalho, apenas irá ser considerada a determinação da precisão por meio da repetibilidade, cujas condições experimentais, durante todo o processo, foram equivalentes, tais como o operador, instrumento de medição, condições, etc.

A precisão é expressa pelo Coeficiente de Variação (CV), também conhecido como desvio padrão relativo (RSD). Esta medida é expressa em percentagem, sendo determinada pela expressão 4.

$$CV (\%) = \frac{s_0}{CMD} \times 100 \quad (4)$$

Em que:

CMD representa a concentração média determinada [22].

3.3.5 Exatidão

A exatidão é definida como o “grau de concordância entre um valor medido e um valor verdadeiro duma mensuranda” [26] e pode ser determinada a partir de três formas distintas, tais como:

- A participação em exercícios de ensaios interlaboratoriais;
- Utilização de Materiais de Referência Certificados (MRC);
- Execução de ensaios de recuperação com amostras fortificadas [27].

Pela impossibilidade da participação em ensaios interlaboratoriais e a utilização de MRC, iremos focar-nos apenas na determinação da exatidão do método a partir de ensaios de recuperação com amostras fortificadas, isto é, adicionar uma concentração de analito conhecida a uma toma de água ultrapura e verificar qual a recuperação obtida após a execução de cada metodologia analítica.

Assim, a percentagem de recuperação é calculada utilizando a expressão 5.

$$\text{Recuperação (\%)} = \left(\frac{C_1 - C_2}{C_3} \right) \times 100 \quad (5)$$

Em que:

C_1 representa a concentração do analito na amostra fortificada;

C_2 representa a concentração do analito na amostra não fortificada;

C_3 representa a concentração do analito adicionada à amostra fortificada [20].

3.3.6 Incerteza

A incerteza do método define-se como um parâmetro não negativo que determina a dispersão dos valores atribuídos a uma medida, com base nas informações usadas [25]. Este parâmetro é calculado a partir da combinação das componentes de incerteza principais de um método.

A expressão 6 é utilizada para a determinação da incerteza combinada.

$$\mu_{\text{comb}} = \sqrt{\sum_{i=1}^n (\mu_i)^2} \quad (6)$$

Em que:

u_i representa individualmente as componentes de incerteza;

n representa o número de componentes de incerteza.

A incerteza expandida (U) é calculada a partir da incerteza combinada, multiplicando-a por um fator de confiança estatística apropriado (usualmente utiliza-se o valor de 2) [26].

4. Parte Experimental

4.1. Material

A lista de material utilizado durante a execução da parte experimental deste trabalho, está apresentada no Anexo III.

4.2. Equipamento

Nesta secção, apresentam-se os equipamentos utilizados durante o trabalho experimental.

- Balança (Mettler Toledo ABS4, com resolução de 0,1 mg);
- Dispensador de solventes orgânicos (Brand);
- Agitador mecânico (Gerhardt, Laboshake);
- Sistema automático de extração de amostras (ThermoScientific, AutoTrace 280 – Dionex);
- Evaporador rotativo Büchi (R-200), com unidade de vácuo (V-513) e banho termostatizado (B-490);
- Evaporador rotativo (Bibby, RE 100), com unidade de vácuo (Büchi, V-700), controlador de vácuo (Büchi, V-850) e banho termostatizado (Bibby, RE 100B);
- Cromatógrafo líquido com detetor de espectrometria de massa (Agilent LC/MS, 1100 series);

Software – LC/MSD ChemStation, versão Rev. A.10.02 [1757];

Coluna de separação cromatográfica Agilent PAH Eclipse, com 5 µm de poro, 4,6 mm de diâmetro e 250 mm de comprimento;

- Cromatógrafo gasoso com detetor de espectrometria de massa (Perkin Elmer, Clarus 500);

Software – TurboMass versão 5.4.2.31617;

Coluna de separação cromatográfica com baixo derrame Agilent Technologies (VF-5ms) com 0,25 µm de espessura de filme, 0,25 mm de diâmetro interno e 30 m de comprimento;

- Cromatógrafo gasoso equipado com detetor de captura de elétrons (Agilent, 6890A series);

Software – GC Open Lab versão Rev. C.01.05 [35];

Coluna de separação cromatográfica, Varian (CPSIL 19CB), com 0,25 µm de espessura de filme, 0,25 mm de diâmetro interno e 60 m de comprimento.

4.3. Reagentes e padrões

Apresentam-se, em primeiro lugar, os reagentes utilizados, e posteriormente, os padrões necessários para realizar a parte experimental deste trabalho de estágio.

Reagentes:

- Diclorometano (Honeywell, CH₂Cl₂, CAS n.º 75-09-2, Pureza: ≥ 99,9 %);
- Acetato de Etilo (VWR International, C₄H₈O₂, CAS n.º 141-78-6 Pureza: ≥ 99,5 %);
- Metanol (J. T. Baker, CH₃OH, CAS n.º 67-56-1, Pureza: HPLC Gradient Grade);
- *Isooctano* (2,2,4-Trimetilpentano – SupraSolv, Merck, C₈H₁₈, CAS n.º 540-84-1 Pureza: ≥ 99,8 %);

Padrões:

Padrão certificado PCB IUPAC 198 (Dr. Ehrenstorfer, Pureza: 99,1 %);

Padrão certificado quinoxifena (Dr. Ehrenstorfer, Pureza: 98,0 %);

Padrão certificado dicofol (Dr. Ehrenstorfer, Pureza: 99,0 %).

4.4. Descrição de procedimentos analíticos

4.4.1. Preparação das soluções padrão

A partir de padrões certificados prepararam-se duas soluções mãe em metanol, respetivamente uma com quinoxifena e outra com dicofol. Por diluição destas, foi preparada uma solução intermédia, e posteriormente através de novas diluições, foram preparadas as soluções padrão de trabalho, de acordo com o esquema apresentado na Figura 12.

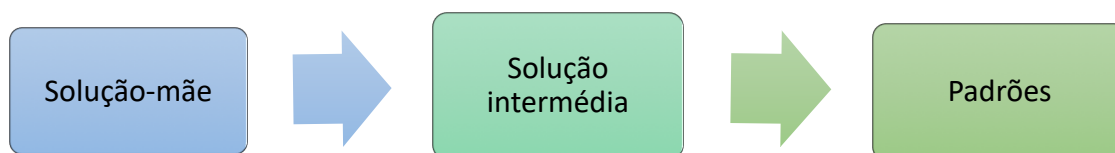


Figura 12. Esquema da preparação de soluções

Na Tabela 2 apresentam-se os teores dos analitos nas referidas soluções padrão de P1 a P7.

Tabela 2. Concentrações dos padrões de quinoxifena e dicofol preparados

Composto	Sol. Mãe (g/L)	Sol. Intermédia (mg/L)	Soluções padrão de trabalho (µg/L)						
			P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7
Quinoxifena	0,45	4,5	10	50	100	300	750	1501	1999
Dicofol	0,96		10	50	100	300	750	1501	1999

Embora, no início da parte experimental tenham sido preparados padrões contendo cada um dos analitos individualmente, após a otimização dos métodos de análise, os padrões foram novamente preparados, mas agora contendo os dois analitos em conjunto. Salienta-se ainda que a solução intermédia e os padrões de trabalho foram também preparados em dois solventes diferentes, nomeadamente em metanol e acetato de etilo, uma vez que o uso de um

solvente inadequado influencia o resultado obtido pelo equipamento, pois pode interferir com o funcionamento normal da coluna de separação.

4.4.2. Preparação de amostras

Foram selecionadas duas técnicas de preparação de amostra distintas, designadamente a extração líquido-líquido e a extração em fase sólida.

Para a extração líquido-líquido, escolheram-se três solventes (diclorometano, acetato de etilo e o *isooctano*, tendo em particular consideração as suas propriedades, algumas das quais se apresentam na Tabela 3. Por outro lado, teve-se também em atenção, o objetivo principal que se pretendia alcançar neste trabalho, ou seja, uma eficaz recuperação dos analitos.

Tabela 3. Propriedades dos solventes utilizados

Propriedades	Diclorometano	Acetato de etilo	<i>Isooctano</i>
Solubilidade em água a 20 °C (g/L) [28]	20	77	$1,4 \times 10^{-3}$
Ponto ebulição (°C) [29-31]	40	77	99
Ponto fusão (°C) [29-31]	-97	-84	-107
Densidade (a 20 °C) [29-31]	1,3	0,9	0,7
Pressão de vapor (kPa) [29-31]	47,4	10	5,1
Estrutura [29-31]			
Permitividade [32]	8,93 (298 K)	5,99 (298 K)	1,94 (298 K)

4.4.2.1. Extração líquido-líquido

Na Figura 13, apresenta-se um esquema representativo da metodologia empregue neste trabalho, para a técnica de extração líquido-líquido dos analitos.

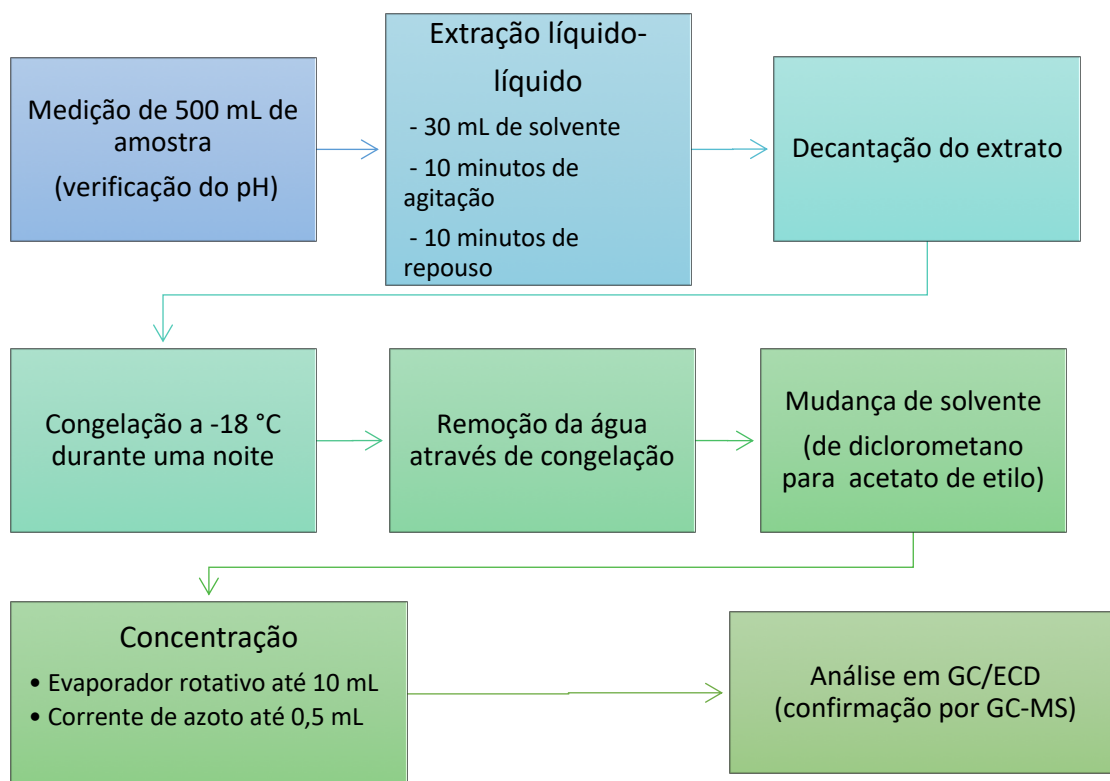


Figura 13. Esquema do procedimento de análise através da técnica de extração líquido-líquido

Tal como se pode verificar pela análise da Figura 13, o processo inicia-se com a medição de uma toma de 500 mL de amostra de água ultrapura, e de seguida é fortificada com uma determinada quantidade de solução padrão do analito que se pretende extrair. Posteriormente, verifica-se com fita indicadora semelhante à apresentada na Figura 14, se o pH se encontra nos valores pretendidos (durante este trabalho foram utilizados dois níveis de pH, respetivamente, com valores de 2 ou 7). Sempre que foi necessário proceder ao ajuste do pH das amostras, recorreu-se a duas soluções; uma primeira de carácter ácido constituída por ácido clorídrico (HCl)(com concentração de 1M) e uma segunda de natureza alcalina constituída por hidróxido de sódio (NaOH) (com concentração 1M).



Figura 14. Fitas indicadoras de pH

Após esta etapa inicial, a amostra é colocada numa ampola de decantação, à qual se adiciona um volume de 30 mL de solvente orgânico, tal como demonstrado na Figura 15. Segue-se o processo de extração líquido-líquido, através de agitação mecânica, durante 10 minutos e a 200 rpm (Figura 16). Após este período, deixa-se a mistura repousar durante outros 10 minutos, por forma, a facilitar a separação das fases. Decanta-se a fase orgânica para um frasco de recolha e realizam-se mais duas extrações sucessivas com novas tomas de solvente fresco (utilizando condições idênticas às da primeira extração). Juntam-se as três fases orgânicas num frasco e coloca-se o mesmo num congelador (à temperatura $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$) durante uma noite.



Figura 15. Ampolas de decantação

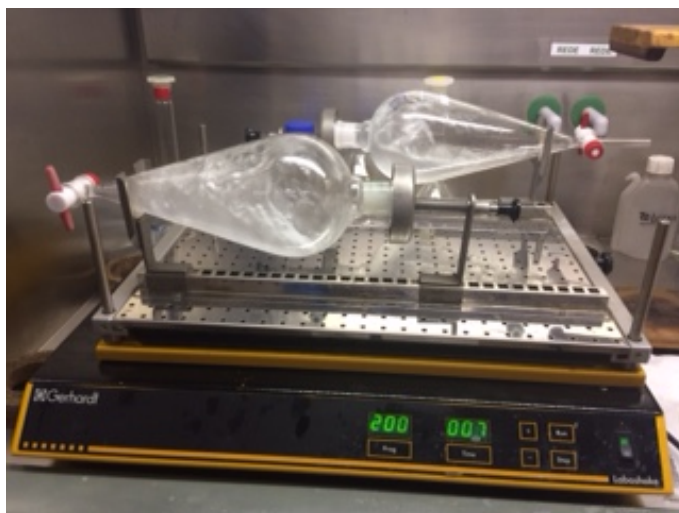


Figura 16. Ampolas de decantação num agitador mecânico

Passado o período de tempo correspondente a uma noite, retira-se a amostra do congelador, e sem deixar descongelar a água, transfere-se a fase orgânica para um balão de fundo plano, por forma, a remover eventuais vestígios aquosos ainda presentes no extrato. Segue-se a operação unitária de redução do volume do extrato, a qual consiste em concentrá-lo num evaporador rotativo (Figura 17), até que o mesmo perfaça aproximadamente 10 mL.



Figura 17. Evaporador rotativo (Bibby)

Nesta fase, realça-se que, consoante o solvente utilizado durante a etapa de extração, a análise dos compostos através de GC/ECD torna imperativo mudar o solvente quando o extrato é constituído por diclorometano.

Após a anterior redução de volume, o extrato é transferido para um tubo de ensaio graduado, e prossegue-se a sua concentração, até que o seu volume corresponda a 0,5 mL, tal como ilustrado na Figura 18. Deste modo, todo o procedimento utilizado promove uma concentração de 1:1000 para os compostos testados, ou seja, dos 500 mL de amostra iniciais, os analitos passaram a estar contidos num volume de 0,5 mL.



Figura 18. Sistema de concentração em corrente de azoto

Numa última fase, os 0,5 mL de extrato são analisados por cromatografia gasosa (GC/ECD ou GC-MS, consoante o caso).

4.4.2.2. *Extração em fase sólida*

A outra metodologia de preparação de amostra utilizada no âmbito deste trabalho, foi a extração em fase sólida. Um esquema ilustrativo da mesma metodologia é apresentado na Figura 19.

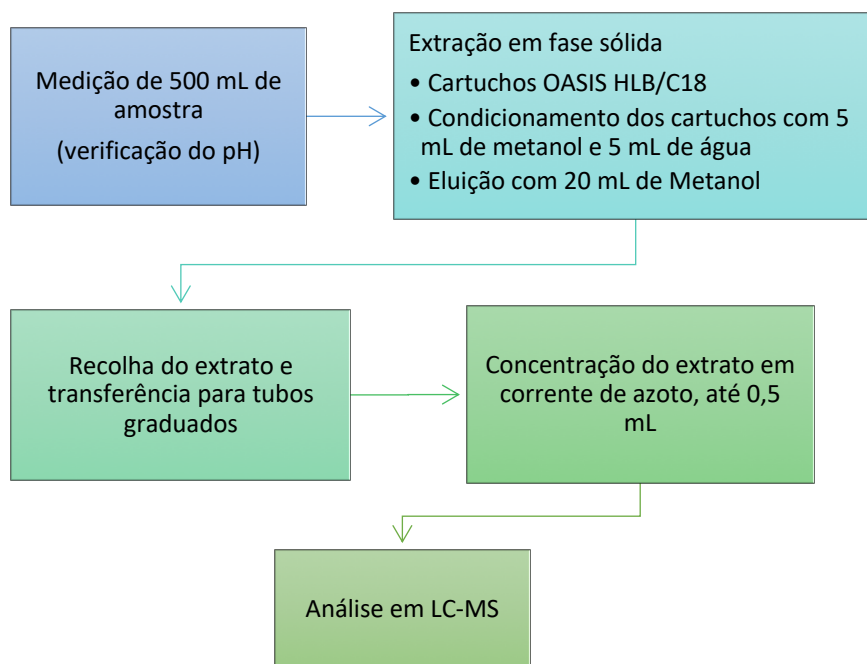


Figura 19. Esquemática da metodologia efetuada através da técnica de extração em fase sólida

A análise da Figura 19, permite constatar que o procedimento é novamente iniciado com a medição de uma toma de 500 mL de amostra, sendo o pH da mesma acertado aos valores de 2 ou 7, consoante as condições de extração testadas.

Após esta fase inicial, a amostra é colocada no sistema automático de extração em fase sólida (Figura 20), sendo submetida ao processo extrativo. Foram escolhidos dois tipos diferentes de cartuchos de extração:

- Cartucho OASIS HLB;
- Cartucho C18.

Estes cartuchos diferem sobretudo no tipo de adsorvente, sendo o primeiro constituído por um polímero do tipo polidivinilbenzeno, enquanto que o segundo é constituído por octadecil. Deste modo, fica claro que as suas características de adsorção são diferentes, uma vez que a sua polaridade é também significativamente distinta.

Previamente à passagem da amostra, ambos os cartuchos foram condicionados com 5 mL de metanol e 5 mL de água, sendo que a eluição dos analitos foi

efetuada com diferentes volumes de metanol ou diclorometano (10, 20 e 30 mL). Os extratos obtidos foram recolhidos em recipientes adequados, transferidos para tubos de ensaio graduados, e concentrados sob corrente de azoto, até ao volume final de 0,5 mL. Posteriormente, os extratos foram analisados por LC-MS.



Figura 20. Sistema automático de extração de amostras em fase sólida (ThermoScientific AutoTrace 280 – Dionex)

4.4.3. Análise cromatográfica

Para a identificação e quantificação dos analitos, foram testados três sistemas cromatográficos diferentes:

- Cromatógrafo gasoso com deteção por captura de eletrões (GC/ECD);
- Cromatógrafo gasoso com deteção por espectrometria de massa (GC-MS);
- Cromatógrafo líquido com deteção por espectrometria de massa (LC-MS).

Estes três sistemas possibilitam diferentes abordagens para os analitos, sendo que permitem variar condições relevantes, cujo o impacto pode ser significativo na análise dos compostos.

Relativamente à análise por GC/ECD, foi utilizado o sistema apresentado na Figura 7.

Neste equipamento de cromatografia, estava instalada uma coluna cromatográfica Varian (CPSIL 19CB), com 0,25 µm de espessura de filme, 0,25 mm de diâmetro interno e 60 m comprimento.

Foi utilizado um volume de injeção de amostra de 1 µL e a rampa de temperaturas utilizada correspondeu à que consta na Tabela 4.

Tabela 4. Rampa de temperatura do forno do GC-ECD

Tempo (min)	Taxa (°C/min)	Temperatura (°C)
0,0	-	90
1,0	20	90
7,0		215
13	3	215
30		270
32	-	270

O tempo de duração da corrida foi de 32 minutos, sendo que, foram avaliados dois tipos de calibração, nomeadamente a calibração pelo método de padrão externo e interno (neste último caso, foi usado o PCB IUPAC 198 como padrão interno).

Relativamente ao sistema do GC-MS, utilizou-se o equipamento apresentado na Figura 10, equipado com uma coluna de separação da marca Agilent Technologies (VF-5ms), com 0,25 µm de espessura de filme, 0,25 mm de diâmetro interno e 30 m comprimento.

Foi utilizado um volume de injeção de amostra de 1,5 µL, sendo que na Tabela 5, apresenta-se a rampa de temperatura do forno que foi usada durante a análise.

Tabela 5. Rampa de temperaturas do forno do GC-MS

Tempo (min)	Taxa (°C/min)	Temperatura (°C)
0,0	-	60
1,0	10	60
15		200
24	20	200
27		280
38	-	280

A análise no cromatógrafo GC-MS foi efetuada por dois modos diferentes:

- Modo de varrimento total (*Full Scan*);
- Modo de ião selecionado (SIM).

O primeiro modo serviu essencialmente para determinar os iões mais intensos dos analitos, enquanto que após esta seleção, os mesmos foram analisados recorrendo ao modo SIM. As condições do espectrómetro de massa foram as apresentadas na Tabela 6.

Tabela 6. Condições utilizadas no espectrómetro de massa do GC-MS em modo SIM

Parâmetro	Quinoxifena	Dicofol
Tipo de ionização	Ionização eletrónica com modo positivo (EI ⁺ ; 70 eV)	
Temperatura da interface	250 °C	
Temperatura da fonte	180 °C	
Iões monitorizados (m/z)	237; 272; 307	139; 251; 253
SCAN (m/z)	50 - 400	

Nota: os valores representados a negrito são referentes aos iões de quantificação

O terceiro sistema de análise referido neste trabalho foi o LC-MS, sendo o mesmo apresentado na Figura 11.

Para este equipamento, a coluna de separação cromatográfica utilizada foi uma Agilent PAH Eclipse, com 5 µm de poro, 4,6 mm diâmetro interno e 250 mm de comprimento.

Foi utilizado um volume de injeção de amostra de 50 µL e a temperatura do forno foi mantida constante, à temperatura de 30 °C, durante toda a análise. A fase móvel foi constituída unicamente por metanol e o fluxo foi de 0,5 mL/min.

Relativamente ao espectrómetro de massa, foram testados os seguintes tipos de fonte de ionização:

- Ionização por *Electrospray* (ESI – modos positivo e negativo);
- Ionização química à pressão atmosférica (APCI – modos positivo e negativo).

Tal como no caso da cromatografia gasosa, os compostos foram analisados através de varrimento total (para aferir os iões mais intensos), e posteriormente, analisados em modo SIM.

As condições utilizadas no espectrómetro de massa foram as apresentadas na Tabela 7.

Tabela 7. Condições utilizadas no espectrómetro de massa do LC-MS

Parâmetro	Quinoxifena	Dicofol
Tipo de ionização	APCI ⁺ (4000 V)	
Temperatura do gás	350 °C	
Temperatura vaporização	375 °C	
Fluxo do gás nebulizador	4 L/min (azoto)	
Iões monitorizados (m/z)	308 ; 310	251 ; 253
SCAN (m/z)	50 - 400	

Nota: os valores representados a negrito são referentes aos iões de quantificação

5. Apresentação e Discussão de Resultados

5.1 Considerações gerais

As metodologias utilizadas neste trabalho, como qualquer outro método de laboratório, necessitaram de validação, de modo a tornar os resultados obtidos credíveis e adequados ao uso na monitorização ambiental. Assim, foi necessário avaliar e estudar diversos aspetos fundamentais, tais como os apresentados de seguida:

- Razão sinal/ruído;
- Linearidade;
- Gama de trabalho;
- Sensibilidade;
- Limiares analíticos;
- Precisão;
- Exatidão;
- Incerteza.

O estudo destes parâmetros possibilita a escolha das melhores condições de análise para os compostos em escrutínio, permitindo também dessa forma, inferir sobre a metodologia mais adequada.

5.2 A razão sinal/ruído

Este parâmetro pode considerar-se como o primordial para definir uma boa escolha do sistema instrumental de análise que se mais adeque aos objetivos que pretendemos alcançar. No âmbito deste trabalho foram selecionados três sistemas cromatográficos distintos, designadamente:

- Cromatógrafo gasoso com detetor de captura de eletrões (GC/ECD);

- Cromatógrafo gasoso com detetor de espectrometria de massa (GC-MS);
- Cromatógrafo líquido com detetor de espectrometria de massa (LC-MS).

Para avaliar a razão sinal/ruído dos dois compostos nos referidos sistemas, iniciou-se o estudo através da análise individual dos mesmos em cada equipamento. Deste modo, recorreu-se a uma solução-mãe em metanol contendo cada analito, e procedeu-se à sua análise, nos três sistemas cromatográficos mencionados. Esta etapa foi particularmente crucial para o sistema LC-MS, pois existem quatro possibilidades de análise distintas, nomeadamente ionização por APCI e ESI (em modo positivo e negativo). Assim, foi possível definir, qual das fontes e dos modos, produziu um sinal mais intenso para os iões correspondentes a cada composto.

Nas Figuras 21 e 22 apresentam-se exemplos de cromatogramas obtidos com as fontes de ionização ESI e APCI para a quinoxifena e o dicofol (em modo positivo e negativo, respetivamente).

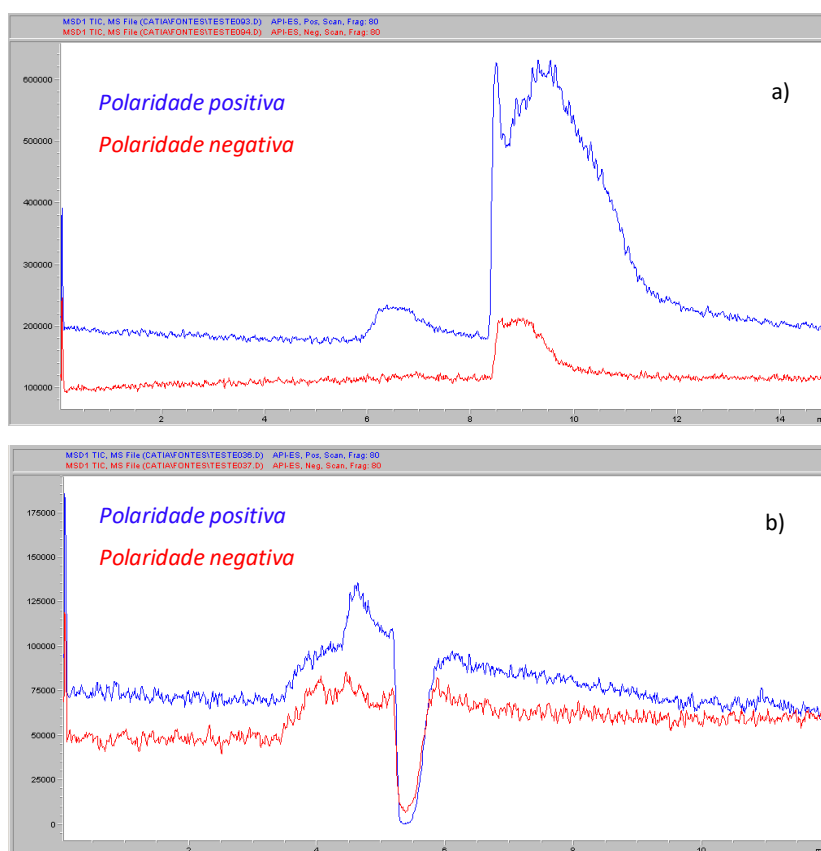


Figura 21. Cromatogramas obtidos em modo varrimento total ($m/z = 50-400$) por LC-MS, com fonte de ionização ESI: a) quinoxifena e b) dicofol

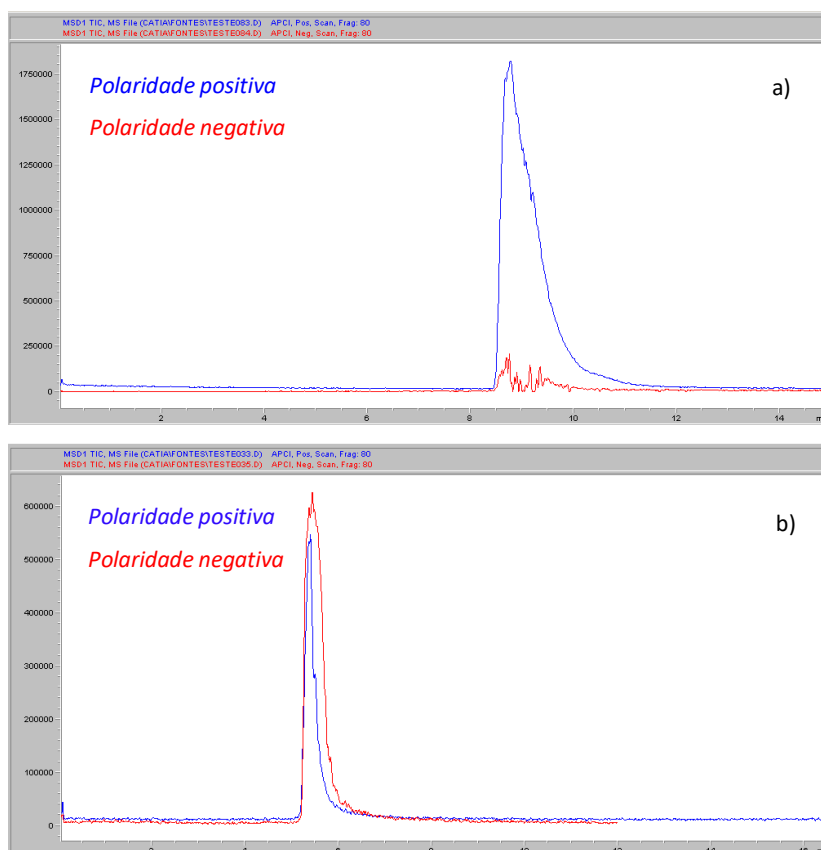


Figura 22. Cromatogramas obtidos em modo varrimento total ($m/z = 50-400$) por LC-MS, com fonte de ionização APCI: a) quinoxifena e b) dicofol

Analisando a Figura 21, verifica-se que para a fonte de ionização ESI não são produzidos bons resultados, significando isto que, no cromatograma, não é possível destacar o sinal emitido na presença do analito, em relação à linha de base, para o composto dicofol, quer usando o modo positivo quer o modo negativo. Todavia, verifica-se também, que esta fonte consegue obter apreciáveis resultados para a quinoxifena, sendo estes significativamente melhores quando se opera em modo positivo.

Por outro lado, constata-se que a ionização APCI (Figura 22), exceptuando a quinoxifena com o modo negativo, obtém picos significativamente intensos para ambos os compostos.

Com base nos resultados anteriores pode afirmar-se que a escolha mais favorável para a análise dos dois compostos corresponde à ionização por APCI em modo positivo (Tabela 8).

Tabela 8. Resumo da percepção da intensidade do sinal de cada sistema para cada composto

Analito	Fonte			
	APCI		ESI	
	Modo positivo	Modo negativo	Modo positivo	Modo negativo
Quinoxifena	+++	+	++	+
Dicofol	+++	+++	Sem intensidade de sinal	

Nota: + pouca intensidade de sinal; ++ alguma intensidade de sinal; +++ elevada intensidade de sinal

As análises com as soluções-mãe permitiram ainda definir quais os iões mais intensos para cada um dos compostos, pois foram efetuadas em modo de varrimento total (*Full scan*). Esta seleção é importante, pois para se alcançarem os níveis de quantificação impostos pelas normas regulatórias (ppb e ppt), torna-se necessário operar o espectrómetro em modo de ião selecionado (SIM). Assim, os iões selecionados para cada um dos compostos já foram apresentados anteriormente, encontram-se descritos na Tabela 7.

Para a avaliação da razão sinal/ruído de cada composto em cada um dos sistemas analíticos mencionados, foram utilizados padrões com baixo teor de cada analito, fazendo o quociente entre as alturas máximas obtidas para o sinal de analito (que corresponde ao sinal) e a linha de base respetiva (que corresponde ao ruído). Assim, foram preparados dois padrões, um com concentração de 50 µg/L em quinoxifena e outro com concentração de 1,5 mg/L em dicofol, e posteriormente, estas soluções foram analisadas.

Os resultados obtidos para a razão sinal/ruído apresentam-se na Tabela 9.

Tabela 9. Valores da razão sinal/ruído para a quinoxifena (50 µg/L) e o dicofol (1,5 mg/L), obtidos com os diversos sistemas de análise

Analito	GC/ECD	GC-MS	LC-MS			
			APCI ⁺	APCI ⁻	ESI ⁺	ESI ⁻
Quinoxifena	4,1	32	61	1,8	75	n.d.
Dicofol	1,1	3,5	2,8	n.d.	n.d.	n.d.

Nota: n.d. – valores não detetados

A Tabela 9 mostra que o sistema com o qual se obtém melhor razão sinal/ruído corresponde ao LC-MS. Consta-se pois, que para a quinoxifena em modo positivo APCI ou ESI obtém-se um $s/n = 61$ e 75 , respetivamente, enquanto que para o dicofol em APCI modo positivo o valor corresponde a $s/n = 2,8$ (resultado bastante próximo do obtido com GC-MS, cujo o valor é de $s/n = 3,5$). É ainda possível corroborar os resultados obtidos anteriormente e com as soluções-mãe para o sistema LC-MS, pois verifica-se que o maior valor de sinal/ruído obtém-se, igualmente, quando se opera com ionização APCI em modo positivo.

Com base no estudo efetuado parece sobressair que o sistema mais adequado para quantificar níveis vestigiais dos dois compostos corresponde ao LC-MS, operando com uma fonte de ionização APCI e em modo positivo.

5.3 Gama de trabalho, linearidade e sensibilidade

Para cada composto, a gama de trabalho escolhida teve em conta os valores legislados, em termos de NQA, segundo o Decreto-Lei n.º 218/2015, de 7 de outubro.

Analisando os valores de NQA descritos no referido diploma, pode verificar-se que as concentrações de quinoxifena e dicofol, situam-se na ordem dos ng/L, cujos os valores mais baixos correspondem a 15 e $0,032$ ng/L, respetivamente.

Para alcançar estes teores de analito nas matrizes aquosas, é necessário concentrar as amostras num fator de $1:1000$, e conseqüentemente, torna-se possível a sua quantificação na ordem dos ng/L. Todavia, importa salientar que o valor mínimo de NQA referido no Decreto-Lei para o dicofol é extremamente baixo, o que impõe elevada pressão sobre as técnicas preparativas, bem como os métodos instrumentais necessários para o alcançar.

Na Tabela 10 apresenta-se a gama de trabalho definida para cada analito e as respetivas curvas de calibração linearmente ajustadas, atendendo às condições de cada sistema de análise.

Tabela 10. Gama de trabalho e linearidade obtidas para cada composto, consoante o sistema cromatográfico considerado

Sistema cromatográfico	Analito	Gama de trabalho (ng/L)	Curva de calibração	R ²
GC-MS	Quinoxifena	50-1999	$y = 9,5092 x - 1596,7$	0,9902
	Dicofol	50-1501	$y = 0,0819 x + 47,481$	0,9901
LC-MS	Quinoxifena	10-1999	$y = 8708,5 x - 36851$	0,9979
	Dicofol	100-1999	$y = 18,004 x - 175,88$	0,9981
GC/ECD	Quinoxifena	50-1999	$y = 1285,8 x - 110258$	0,9886
	Dicofol	50-1501	$y = 347,42 x + 2569,6$	0,9992

A Tabela 10 mostra que para os dois compostos, a gama de trabalho não é idêntica uma vez que a sensibilidade do sistema LC-MS para a quinoxifena é superior à do dicofol. Estes resultados são apresentados e discutidos mais adiante, logo após a representação gráfica das curvas de calibração.

Nas Figuras 23 a 25, apresentam-se graficamente as curvas de calibração para cada composto, que correspondem às que estão discriminadas na Tabela 10.

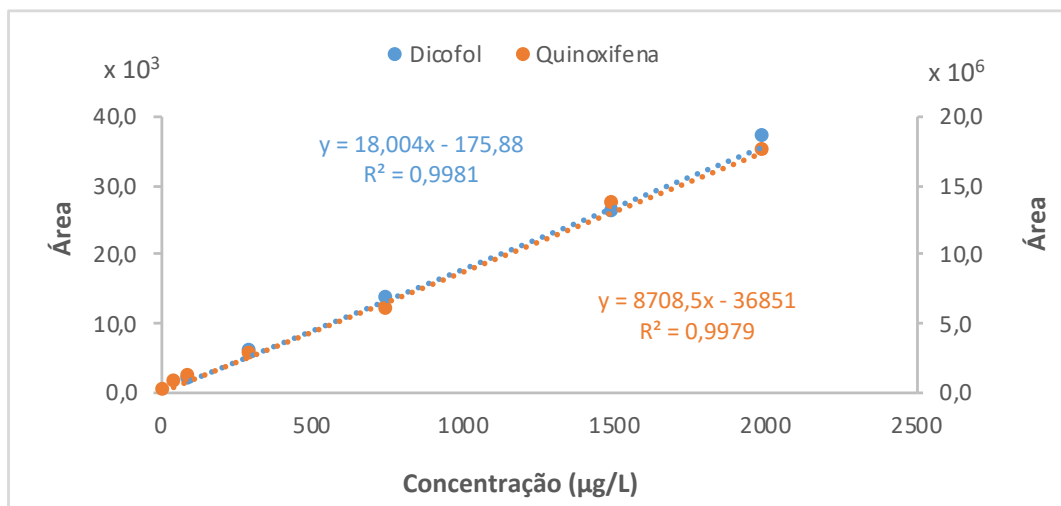


Figura 23. Curvas de calibração obtidas no sistema LC-MS para cada analito

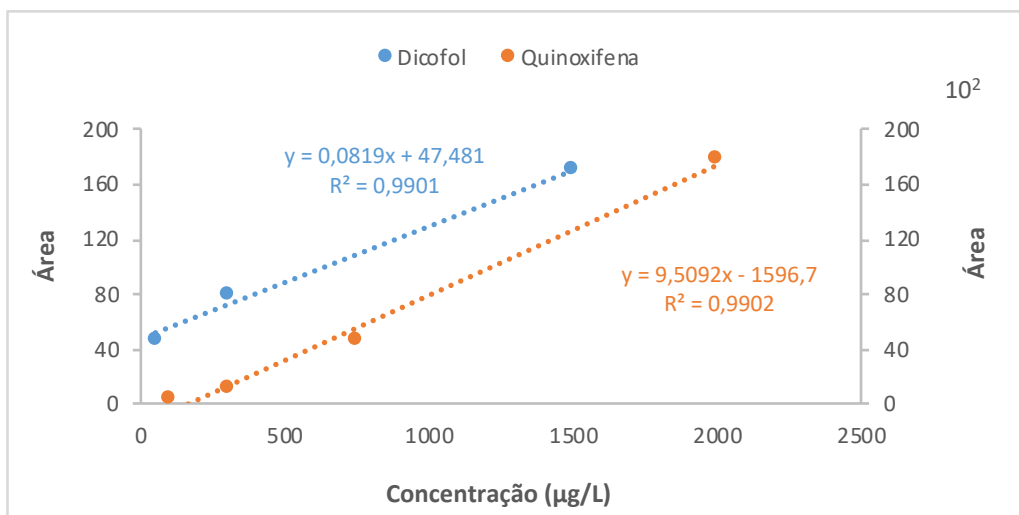


Figura 24. Curvas de calibração obtidas no sistema GC-MS para cada analito

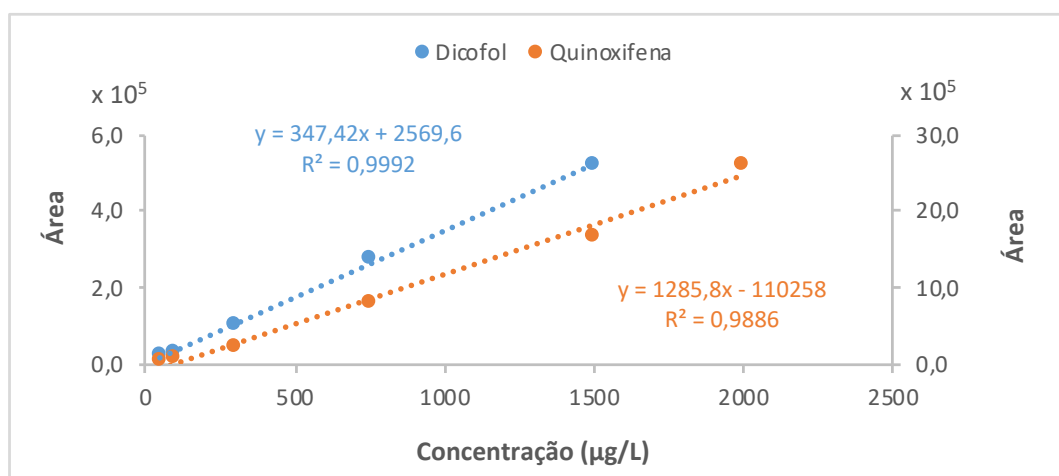


Figura 25. Curvas de calibração obtidas no sistema GC/ECD para cada analito

Analisando as Figuras 23 a 25, constata-se um bom ajuste linear, verificando-se um fator de correlação superior a 0,99 para todas as curvas de calibração, que cobrem a gama de trabalho anteriormente referida, sugerindo uma boa correlação entre os dados (concentração vs área).

Os declives das curvas de calibração linearmente ajustadas correspondem à sensibilidade do método instrumental, tal como já foi referido no Capítulo 3. De qualquer forma, esclarece-se que a sensibilidade não é mais que o quociente entre a variação da resposta (área ou altura dos picos) e a variação da concentração de analito. Assim, na Tabela 11, apresentam-se os valores de

sensibilidade correspondentes à quinoxifena e ao dicofol, em conformidade com os três sistemas cromatográficos testados.

Tabela 11. Valor de sensibilidade associada a cada equipamento

Analito	GC/ECD (Hz.s/μgL^{-1})	GC-MS (Counts.s/μgL^{-1})	LC-MS (Counts.s/(μgL^{-1}))
Quinoxifena	1286	10	8708
Dicofol	347	0,08	18

Os resultados da Tabela 11 mostram, que o sistema mais sensível é o LC-MS (sensibilidade de 8708 e 18, para a quinoxifena e o dicofol, respetivamente). Contudo, é também visível que o sistema GC/ECD produz igualmente bons resultados em termos de sensibilidade para ambos os compostos, sendo que para o dicofol até supera o sistema LC-MS. Deste modo, nas secções seguintes, serão apenas comparados estes dois sistemas (LC-MS e GC/ECD), dado que foram os que obtiveram melhor desempenho no parâmetro sensibilidade, resguardando-se o sistema de GC-MS apenas para confirmação da identidade dos analitos nos resultados obtidos por GC/ECD.

5.4 Limiares analíticos

Os limiares analíticos representam os valores para os quais é possível distinguir o sinal do analito do sinal do branco com um determinado nível de confiança estatístico e a concentração mínima para a qual é possível quantificar o teor de analito com um nível aceitável de precisão e exatidão.

Neste sentido, para os sistemas instrumentais que não produzem resposta na ausência de analito, torna-se necessário para a obtenção do LD e do LQ, o uso de um padrão com um teor de analito bastante reduzido, mas que ainda assim provoque uma resposta no detetor (menor adição de concentração aceitável de analito). A análise de réplicas nestas condições (um mínimo de 10 independentes), quando multiplicada por um fator de confiança estatística (vulgarmente, 95 % ou mais), permite determinar o valor de LD (fator de 3) e o de LQ (fator de 10). Para uma melhor clarificação deste assunto pode ser

consultada a secção 3 do Capítulo 3, correspondente à validação de métodos analíticos.

Na Tabela 12 são apresentados os valores teóricos correspondentes aos limiares analíticos de cada composto, obtidos para cada método cromatográfico.

Tabela 12. Limiares analíticos teóricos obtidos para os dois analitos, consoante o sistema de análise considerado

Sistema de análise	Quinoxifena		Dicofol	
	LD (ng/L)	LQ (ng/L)	LD (ng/L)	LQ (ng/L)
GC/ECD	3	9	9	29
LC-MS	2	7	25	83

Após a obtenção dos valores teóricos dos limiares, os mesmos devem ser verificados experimentalmente através da análise de uma solução com um teor de analito semelhante aos resultados apresentados na Tabela 12. Todavia, foi selecionado como o limite de quantificação de cada um dos métodos desenvolvidos o valor correspondente ao primeiro padrão da gama de trabalho. Assim, para a quinoxifena o LQ corresponde a 10 e 50 ng/L, para os sistemas LC-MS e GC/ECD, respetivamente, enquanto que para o dicofol, o LQ corresponde a 100 e 50 ng/L para os sistemas LC-MS e GC/ECD, respetivamente.

Os resultados mostram que os limiares analíticos da quinoxifena quando se utiliza o sistema LC-MS cumprem a NQA estipulada no Decreto-Lei n.º 218/2015, de 7 de outubro (valor mínimo de 15 ng/L). No que respeita ao dicofol, verifica-se uma situação diferente, pois os limiares obtidos por qualquer dos sistemas superam as normas de qualidade ambiental definidas no referido diploma (valor mínimo de 0,032 ng/L). Tal facto que já tinha sido sugerido anteriormente quando se alertou para a dificuldade em alcançar teores de concentração dessa magnitude. Todavia, é possível quantificar o dicofol em valores da ordem de grandeza dos ng/L com dois sistemas diferentes.

5.5 Precisão

Este parâmetro é muito importante pois permite avaliar a dispersão dos valores instrumentais obtidos dentro do intervalo da gama de trabalho. Uma maneira eficaz de o fazer, corresponde à determinação do desvio-padrão associado aos diferentes níveis de concentração, (utilizando réplicas, um mínimo de 5 independentes). Posteriormente, calcula-se o respetivo desvio-padrão relativo associado a cada um dos níveis de concentração utilizados (vulgarmente denominado por CV – Coeficiente de Variação). Na Tabela 13 estão discriminados os resultados obtidos para a precisão instrumental ao longo do intervalo da gama de trabalho.

Tabela 13. Coeficientes de variação da quinoxifena e do dicofol, ao longo da gama de trabalho, nos sistemas LC-MS e GC/ECD

Concentração (ng/L)	% CV			
	Quinoxifena		Dicofol	
	LC-MS	GC/ECD	LC-MS	GC/ECD
10	3	-	-	-
50	2	4	-	4
100	1	3	8	3
300	1	3	7	2
750	1	2	3	5
1501	1	1	3	5
1999	2	3	4	-

Os dados da Tabela 13 mostram coeficientes de variação baixos, inferiores a 10 %, para a totalidade dos casos. Estes dados evidenciam variabilidades experimentais baixas e concordantes com metodologias de análise finas e rigorosas.

5.6 Exatidão

A exatidão corresponde ao grau de concordância entre um valor medido e o valor tido como verdadeiro. Existem diversas formas de avaliar este parâmetro, no entanto os mais recomendáveis implicam o recurso a:

- Participação em exercícios de comparação interlaboratorial;
- Ensaio com materiais de referência certificados (MRC);
- Ensaio de recuperação com amostras fortificadas.

Em virtude de não ter sido possível obter exercícios interlaboratoriais e MRC para os compostos testados no âmbito deste trabalho, optou-se pelo uso do último meio referido para o estudo da exatidão.

5.6.1 Extração líquido-líquido

Para a validação da exatidão recorrendo a esta técnica extrativa foram estudados individualmente três aspetos importantes, que condicionam ou podem condicionar o desempenho do método, nomeadamente:

- Efeito do tipo de solvente;
- Efeito do número de extrações necessárias;
- Efeito pH da amostra.

5.6.1.1 *Efeito do solvente*

A influência do solvente utilizado na recuperação dos analitos, é um aspeto crucial para a obtenção de boas taxas de recuperação, dado que diferentes solventes possuem diferentes propriedades, e estas podem fomentar ou reduzir as recuperações dos analitos. Tal como já se referiu no Capítulo 4, foram testados três solventes, sendo esta escolha baseada nas propriedades dos solventes e dos analitos sob estudo. Para o efeito, optou-se por um solvente pouco polar, outro medianamente polar e um último também com moderada polaridade, mas de natureza química semelhante aos analitos (isto é, com átomos de cloro na sua constituição).

Os solventes testados foram:

- *Isooctano*;
- Acetato de etilo;
- Diclorometano.

Relativamente ao acetato de etilo, verificou-se que os ensaios efetuados com este solvente não permitiram separar a fase orgânica da fase aquosa. Este facto deve-se sobretudo à elevada solubilidade do acetato de etilo em água (77 g/L o que corresponde a cerca de 43 mL de acetato de etilo por cada 500 mL de água) [27]. Tendo sido utilizados 30 mL de acetato de etilo em cada extração, os cálculos e a Figura 26 mostram, que não foi possível decantar este volume de solvente da toma de 500 mL de água utilizada.

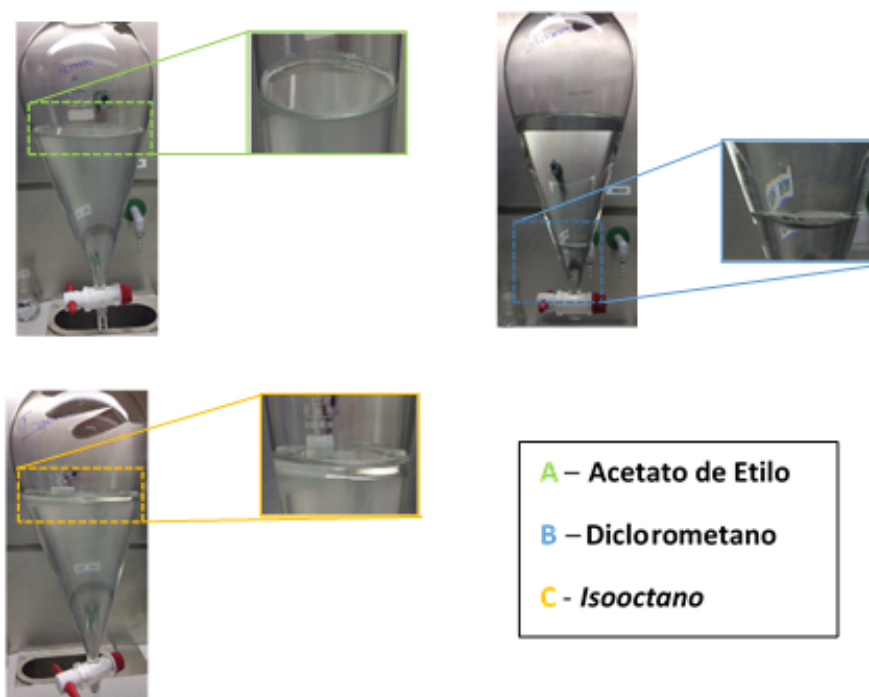


Figura 26. Separação de fases em cada extração, com cada solvente

Por este motivo este solvente foi excluído, uma vez que não permitia avaliar a recuperação dos analitos nos ensaios efetuados.

Relativamente aos restantes solventes, as recuperações obtidas utilizando três extrações sucessivas e uma amostra aquosa fortificada, apresentam-se na Figura 27. As condições dos referidos ensaios foram as seguintes: 3 extrações

sucessivas, cada uma com 30 mL de solvente, 10 minutos de extração, 10 minutos de repouso e usando 200 rpm no agitador mecânico; estes ensaios foram ainda realizados em duplicado (com variabilidade abaixo dos 5 % entre duplicados) e a pH neutro.

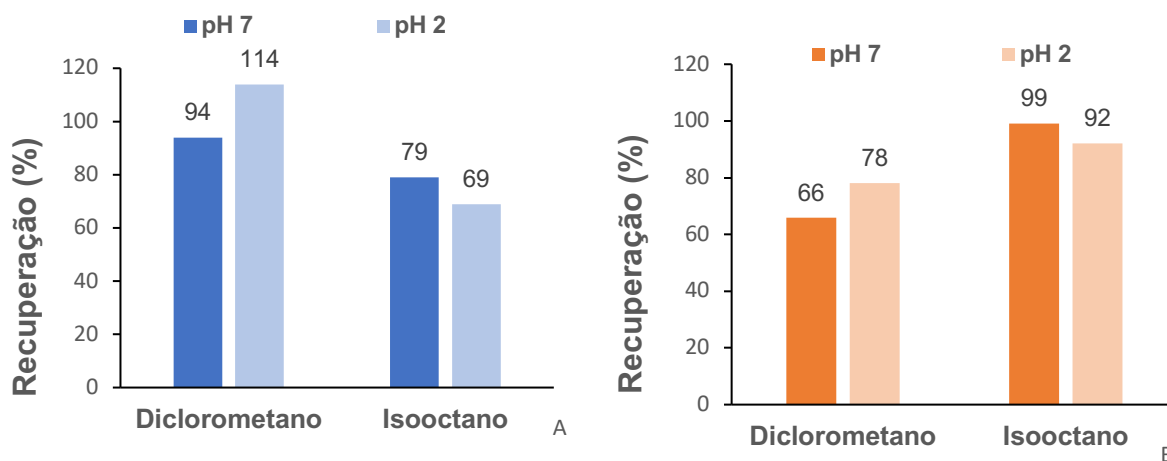


Figura 27. Percentagem de recuperação de cada analito, por solvente

A Figura 27 mostra que se obtém uma maior percentagem de recuperação para a quinoxifena quando se utiliza o diclorometano como solvente extrativo. No caso do dicofol, o solvente com que se obtém melhores resultados de recuperação é o *isooctano*. Verifica-se também, que nas condições anteriores, os dois solventes obtêm sempre recuperações de analito superiores a 60 % e inferiores a 100 %.

5.6.1.2 Efeito do número de extrações

A influência do número de extrações sucessivas é um aspeto importante, na medida em que pode ser suficiente apenas uma extração para obter boas recuperações de analito, ou podem ser precisas mais para alcançar os mesmos resultados. Na Figura 28 apresentam-se as recuperações de analito obtidas para ambos os solventes, em duplicado (com diferenças entre duplicados de 1 a 5 %) e a pH neutro, consoante o número de extrações utilizadas. As condições para a realização destes ensaios foram: extrações sucessivas cada uma com 30 mL de solvente, 10 minutos de extração, 10 minutos de repouso e usando 200 rpm no agitador mecânico.

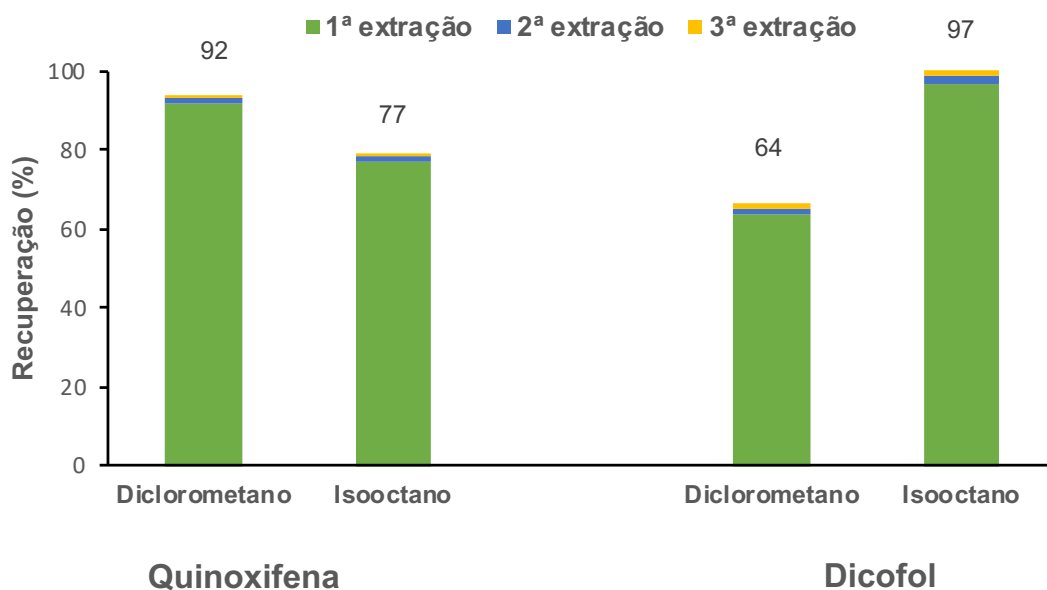


Figura 28. Percentagens de recuperação obtidas para cada analito, em cada extração

A Figura 28 permite constatar que ambos os solventes recuperam a quase totalidade dos analitos na primeira extração, sendo que os valores obtidos para as restantes extrações foram inferiores ao limite de quantificação do método. Deste modo, e por forma a garantir a recuperação total dos analitos das amostras, considera-se que o número adequado de extrações consiste em duas sucessivas e nas condições mencionadas na apresentação da Figura 28.

5.6.1.3 Efeito do pH da amostra

Outro parâmetro importante em qualquer técnica extrativa que utilize amostras aquosas é o seu pH. Este parâmetro pode tornar-se fundamental, uma vez que o pH é influenciado pela concentração de iões hidrónio em solução, o que por seu turno condiciona a quantidade de espécies carregadas existentes. Acresce, que o número de espécies carregadas influencia a força iónica da amostra, fator que pode ter preponderância na eficácia da extração. Por estes motivos, tornou-se importante avaliar a influência do parâmetro pH nas recuperações de analito, tendo sido escolhidos dois níveis distintos para o fazer, o valor de pH igual a 2 e 7.

A Figura 29 contém os resultados das recuperações de analito, efetuadas com os dois solventes, e utilizando amostras fortificadas com pH de valor 2 e 7. As

condições de realização destes ensaios, em duplicado (com variabilidades entre os 3 e os 5%), foram as seguintes: 2 extrações sucessivas cada uma com 30 mL de solvente, 10 minutos de extração, 10 minutos de repouso e usando 200 rpm no agitador mecânico.

Figura 29. Influência do pH na recuperação: A – quinoxifena e B - dicofol

Analisando a Figura 29, pode observar-se que, para o analito quinoxifena, a sua recuperação melhora acidificando a amostra e quando o solvente utilizado é o diclorometano. Por outro lado, quando o solvente é o *isooctano*, a recuperação é sensivelmente menor para valores de pH ácido, relativamente à amostra neutra.

No que respeita ao dicofol, a sua recuperação é visivelmente mais elevada quando se utiliza como solvente o *isooctano*, acidificando ou não a amostra. No entanto, para pH neutro e para este mesmo solvente, verifica-se que a recuperação deste analito é ligeiramente superior, quando comparada com a recuperação obtida com pH ácido. Relativamente ao diclorometano, a situação é inversa, pois verifica-se que as melhores recuperações dos analitos ocorrem quando a amostra está acidificada.

Sistematizando então a informação referente à técnica de extração líquido-líquido, verifica-se que o método mais adequado para extrair os dois analitos em conjunto, consiste na utilização do solvente *isooctano*, com duas extrações sucessivas e com a amostra a pH neutro. Ainda assim, salienta-se que em termos práticos, o uso do diclorometano simplifica a parte experimental na etapa de decantação da fase orgânica, dado que este solvente, sendo mais denso que a água (1,3 g/mL), permite separar mais facilmente as duas fases (Figura 26). Todavia, e considerando a análise por GC/ECD, o uso do diclorometano requer um passo adicional antes da análise do extrato neste sistema cromatográfico (mudança de solvente). Ou seja, esta operação é necessária pois o detetor de captura de eletrões responde aos compostos com elevada afinidade eletrónica (nomeadamente, os compostos halogenados) e o diclorometano é um solvente

que cumpre estas especificações, pelo que tem de ser removido previamente à análise cromatográfica.

5.6.2 Extração em fase sólida

A outra técnica extrativa utilizada para validar o parâmetro exatidão foi a extração em fase sólida. Para tal, foram estudados individualmente três aspetos relevantes, de modo a determinar a influência de cada um deles nas recuperações dos analitos. Os três fatores estudados foram os seguintes:

- Efeito do tipo de enchimento do cartucho;
- Efeito do volume de solvente de eluição;
- Efeito do pH da amostra.

5.6.2.1 *Efeito do tipo de enchimento do cartucho*

O enchimento (ou adsorvente) dos cartuchos utilizados nas extrações do tipo SPE constitui um fator condicionante na recuperação dos analitos, uma vez, que o princípio básico desta técnica se relaciona com a afinidade existente entre o analito e o enchimento. Assim, durante a etapa de extração da amostra fomenta-se o contacto entre o analito e o enchimento, permitindo que estes interajam e se agreguem (isto é, que o analito fique retido no enchimento do cartucho), conseguindo-se assim durante a eluição recuperar o analito presente na amostra inicial. Esta operação, para além de permitir extrair o analito da amostra, permite também separar o mesmo de interferentes, que porventura possam condicionar etapas posteriores da análise. Assim, com base nestes critérios foram testados dois tipos de cartuchos diferentes, designadamente:

- Cartucho C18, cujo enchimento é constituído por octadecil;
- Cartucho OASIS HLB, cujo enchimento é constituído por um polímero do tipo polidivinilbenzeno;

Estes dois tipos de enchimento diferem sobretudo na sua constituição, e consequentemente, na sua polaridade. O primeiro, por ser pouco polar, tem maior afinidade com compostos de natureza apolar, sendo por isso apropriado

para utilização em separações do tipo fase reversa. Por outro lado, o segundo tipo de adsorvente, ultrapassa algumas das limitações do de C18, permitindo, portanto, extrair compostos com natureza polar e apolar, dado o seu enchimento consistir num polímero com propriedades mistas (hidrofílicas e lipofílicas).

Os resultados obtidos para a extração da quinoxifena e do dicofol por SPE, utilizando os dois tipos de enchimento mencionados, são apresentados na Figura 30. Os ensaios de extração foram realizados em duplicado (com variabilidade máxima de 5 %), a pH neutro, à temperatura ambiente e os cartuchos sujeitos a um condicionamento (com 5 mL de metanol seguidos de 5 mL de água), sendo a eluição efetuada com 20 mL de metanol.

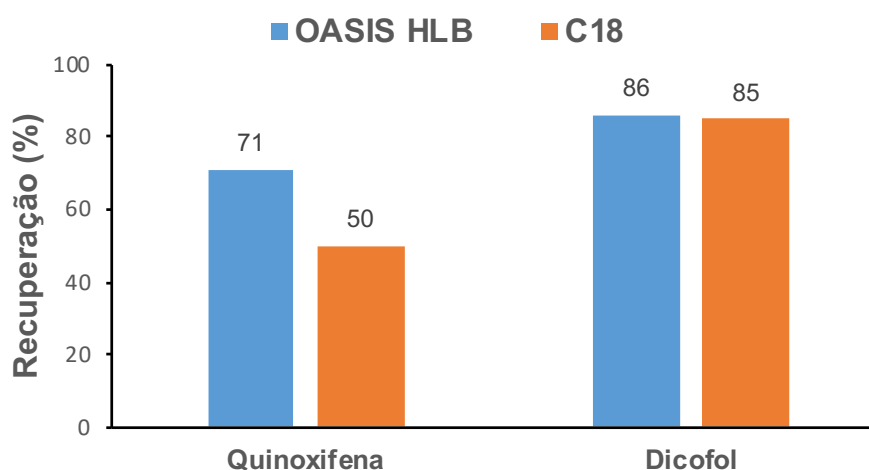


Figura 30. Resultados de recuperação para a quinoxifena e o dicofol por SPE, com diferentes tipos de cartuchos

Analisando a Figura 30 pode verificar-se que o cartucho que permite maior recuperação dos analitos é o OASIS HLB. No caso da quinoxifena, a recuperação obtida utilizando este tipo de cartucho é acentuadamente maior do que a obtida quando se utiliza o de C18 (71 e 50 %, respetivamente). Já relativamente ao dicofol, as recuperações obtidas com ambos os cartuchos, são sensivelmente idênticas (86 e 85 %, respetivamente). Constata-se ainda, que os dois tipos de enchimento extraem melhor o dicofol do que a quinoxifena, dado que para o primeiro composto as recuperações obtidas são relativamente superiores.

Resumindo, a melhor escolha para a extração conjunta dos dois compostos deve recair no uso dos cartuchos que asseguram uma maior recuperação dos dois analitos, isto é, o do tipo OASIS HLB.

5.6.2.2 Efeito do volume de solvente de eluição

O volume de solvente de eluição numa extração do tipo SPE influencia a recuperação dos analitos, uma vez que, os analitos podem ficar moderada ou intensamente retidos no adsorvente, dependendo da força de interação entre ambos. Acresce, que a solubilidade dos analitos no solvente de eluição, pode também condicionar o volume de solvente necessário para os eluir na totalidade. Assim, numa primeira aproximação, foi avaliada bibliograficamente a solubilidade da quinoxifena e do dicofol em solventes vulgarmente utilizados no laboratório. Com base nesses dados, optou-se pela escolha do metanol como solvente adequado para eluir ambos os compostos (solubilidade em metanol: quinoxifena, 21,5 g/L e dicofol, 36 g/L).

Para avaliar o volume de solvente de eluição mais apropriado para a extração por SPE, testaram-se três volumes distintos de metanol: 10, 20 e 30 mL, cujos resultados obtidos apresentam-se na Figura 31. Os ensaios de extração foram realizados em duplicado (com variação de 1 %), à temperatura ambiente, a pH neutro e os cartuchos foram sujeitos a um condicionamento (com 5 mL de metanol seguidos de 5 mL de água), sendo a eluição efetuada com diferentes volumes de metanol.

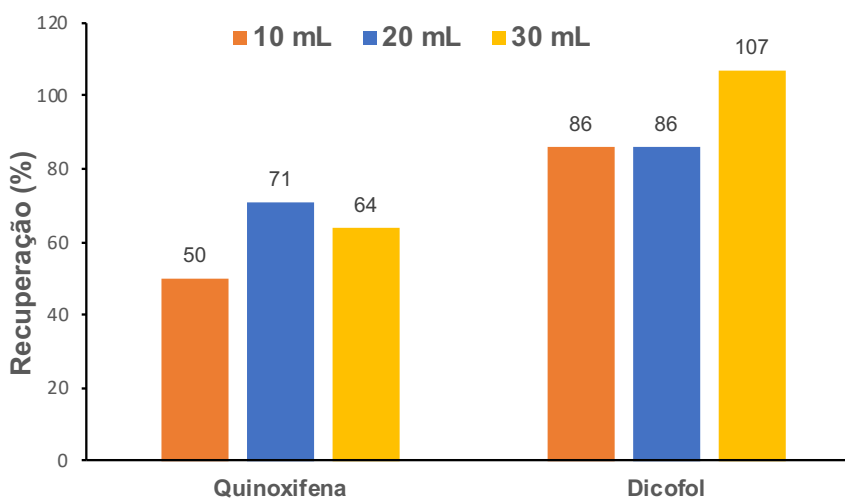


Figura 31. Efeito do volume de metanol utilizado na eluição dos analitos, com cartuchos OASIS HLB

A Figura 31 mostra, que para o analito quinoxifena, obtém-se uma maior recuperação quando se utiliza um volume de eluição de 20 mL de metanol, transparecendo também que não existe vantagem em utilizar mais uma toma de 10 mL de solvente para eluir este composto. Relativamente ao dicofol, a recuperação mantém-se semelhante usando 10 ou 20 mL de eluição, mas aumenta sensivelmente quando o volume de eluição corresponde a 30 mL. Face ao descrito, o volume de solvente mais adequado corresponde a 20 mL, dado que este volume permite obter boas recuperações para ambos os analitos (superiores a 70 %), sem, no entanto, pressionar em demasia a etapa de concentração de solvente. Neste sentido, e embora quando se utilizam os 30 mL de solvente de eluição, seja possível obter recuperações de analito melhores, tal situação impõe pressão sobre a etapa de concentração do solvente, aumentando em mais de metade o tempo necessário para a concluir (relativamente ao ensaio efetuado com 20 mL).

5.6.2.3 Efeito do pH da amostra

Tal como na técnica de extração líquido-líquido, foi necessário estudar a importância do pH da amostra na recuperação dos analitos. Os níveis de pH testados, utilizando esta técnica, foram igualmente os valores de 2 e 7. A influência deste parâmetro na recuperação dos analitos apresenta-se na Figura 32. Os referidos ensaios de extração foram realizados em duplicado (com variabilidade máxima de 5 %), à temperatura ambiente e os cartuchos utilizados foram sujeitos a um condicionamento (com 5 mL de metanol seguidos de 5 mL de água), sendo a eluição efetuada com 20 mL de metanol.

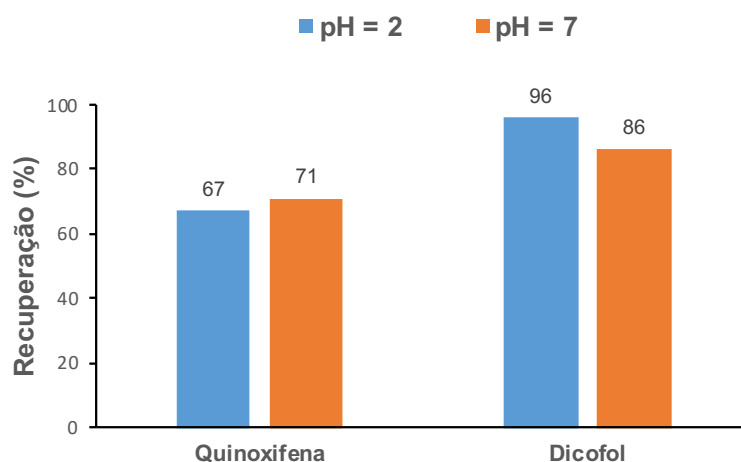


Figura 32. Efeito do pH da amostra na recuperação dos analitos, utilizando cartuchos OASIS HLB

Analisando a Figura 32, verifica-se que para a quinoxifena a acidificação da amostra não contribui significativamente para o aumento da sua recuperação. No caso do dicofol, valores de pH da amostra ácidos apresentam uma melhoria pouco significativa para a recuperação deste analito, relativamente à amostra neutra. Assim, não são evidenciadas vantagens significativas na recuperação obtida com a acidificação da amostra para ambos os analitos.

Sintetizando então a informação relativa à técnica de extração em fase sólida, verifica-se que o método mais apropriado para extrair os dois analitos em conjunto, consiste em manter a amostra a pH neutro, utilizando cartuchos OASIS HLB (condicionados com 5 mL de metanol e 5 mL de água) e efetuando a eluição com 20 mL de metanol. Ainda assim, salienta-se que em termos práticos, o uso desta técnica extrativa em relação à técnica de extração líquido-líquido, apresenta duas vantagens extremamente significativas, nomeadamente:

- Menor consumo de tempo;
- Menor consumo de solventes orgânicos.

Estes dois fatores são muito relevantes, pois qualquer redução em ambos, conduz a ganhos de produtividade e dos custos associados ao trabalho laboratorial. Acresce também, que um menor consumo de solventes propicia ainda uma técnica ambientalmente mais “verde”, pois produz menor quantidade de resíduos.

5.7 Incerteza

A incerteza de uma medição é definida como um parâmetro não negativo que determina a dispersão dos valores atribuídos a uma medida, com base nas informações usadas, como já foi referido atrás. Para a determinação da incerteza de uma medição existem diferentes tipos de abordagem. Todavia, a abordagem passo-a-passo, que consiste na decomposição das várias componentes de incerteza associadas às diferentes etapas de um método, é vulgarmente utilizada para a determinação da incerteza global associada a uma metodologia analítica. Deste modo, operações unitárias, tais como as diluições, as pesagens, as concentrações, a preparação dos padrões e a obtenção da curva de calibração, têm, portanto, associadas uma componente individual de incerteza, que tem de ser avaliada e posteriormente combinada, por forma a permitir conhecer a incerteza global do método (usualmente denominada por incerteza expandida).

Para os métodos desenvolvidos no âmbito deste trabalho (LLE-GC/ECD e SPE-LC-MS) considera-se que as componentes da incerteza mais relevantes correspondem às que estão associadas à precisão e exatidão, sendo que as restantes podem ser consideradas menos significativas (valores inferiores a 5 %).

Na Tabela 14 estão indicadas as componentes de incerteza da precisão e da exatidão associadas às duas metodologias desenvolvidas para a quinoxifena: condições LLE-GC/ECD: 2 extrações sucessivas com 30 mL de *isooctano*, 10 minutos de agitação em agitador mecânico a 200 rpm e 10 minutos em repouso; condições SPE-LC-MS: cartuchos OASIS HLB (condicionamento com 5 mL metanol e 5 mL de água) e eluição com 20 mL de metanol.

Tabela 14. Componentes de incertezas associadas à quinoxifena (a pH = 7), para as duas metodologias estudadas

Metodologia	Componente de Incerteza	
	Precisão (%)	Exatidão (%)
LLE-GC/ECD	4	19

SPE-LC-MS	3	28
------------------	---	----

Na Tabela 15 estão indicadas as componentes de incerteza da precisão e da exatidão associadas às duas metodologias, para o dicofol: condições LLE-GC/ECD: 2 extrações sucessivas com 30 mL de *isooctano*, 10 minutos de agitação em agitador mecânico a 200 rpm e 10 minutos em repouso; condições SPE-LC-MS: cartuchos OASIS HLB (condicionamento com 5 mL metanol e 5 mL de água) e eluição com 20 mL de metanol.

Tabela 15. Componentes de incerteza associadas ao dicofol (a pH = 7), para as duas metodologias testadas

Metodologia	Componente de Incerteza	
	Precisão (%)	Exatidão (%)
LLE-GC/ECD	5	5
SPE-LC-MS	8	14

Após a quantificação das duas componentes de incerteza (precisão e exatidão) é necessário agregá-las, por forma a obter a incerteza combinada, mediante o uso da expressão 6 (ver secção 3.3.6). Esta equação representa, não mais do que, a raiz quadrada da soma dos quadrados das diferentes componentes de incerteza identificadas, para uma determinada metodologia analítica. A incerteza global (ou expandida) obtém-se simplesmente multiplicando o valor da incerteza combinada por um fator de cobertura associado ao nível de confiança estatística requerida pelo nosso método (vulgarmente, 95 % o que corresponde a um fator de cobertura com valor de 2).

A Tabela 16 apresenta a incerteza expandida (U) para cada composto, relativamente às duas metodologias estudadas.

Tabela 16. Incerteza expandida de cada metodologia, associada a cada composto

Metodologias	Incerteza expandida (%)	
	Quinoxifena	Dicofol
LLE-GC/ECD	39	14

SPE-LC-MS	56	34
------------------	----	----

Os resultados da Tabela 16 mostram que para a quinoxifena a variante de análise SPE-LC-MS obtém um valor de incerteza superior à variante LLE-GC/ECD. Para o dicofol, a tendência é semelhante, obtendo-se de modo idêntico uma incerteza maior para a metodologia SPE-LC-MS. Esta situação deriva sobretudo das taxas de recuperação obtidas para ambos os compostos serem inferiores, quando se utiliza a metodologia SPE-LC-MS. Todavia, com exceção da quinoxifena para a variante SPE-LC-MS, os valores de incerteza obtidos são relativamente normais para um método com etapa de preparação de amostra, estando, portanto, em consonância com os valores referenciados na literatura científica (incerteza expandida $\leq 1/3$ do resultado).

6. Conclusões

O presente trabalho teve como objetivo o desenvolvimento e a validação de métodos analíticos, de modo a quantificar pesticidas em matrizes aquosas.

Os pesticidas monitorizados foram a quinoxifena e o dicofol, considerados substâncias prioritárias e perigosas. Para a sua quantificação foram consideradas duas metodologias diferentes, compostas por extração dos analitos para uma fase orgânica e subsequente análise cromatográfica do extrato.

Para a validação das metodologias, foi necessário avaliar aspetos fundamentais, tais como, a razão sinal/ruído, a gama de trabalho utilizada, a linearidade, a sensibilidade, os limiares analíticos, a precisão, a exatidão e a incerteza.

Com base nos resultados do estudo da razão sinal/ruído, foi possível verificar que o sistema de análise que acusa maior resposta à presença dos analitos foi o LC-MS, usando a fonte de ionização APCI em modo positivo.

Em termos de gama de trabalho, linearidade e sensibilidade dos sistemas cromatográficos, pôde verificar-se, que para ambos os analitos, a gama de trabalho apresentou um bom ajuste linear. Dos três sistemas estudados, o LC-MS demonstrou ser o mais sensível para a quinoxifena, conseguindo detetá-la em níveis de concentração da ordem dos 10 ng/L. Todavia, para o dicofol, os resultados mostraram que os sistemas mais sensíveis correspondiam ao GC/ECD e ao GC-MS, sendo que estes sistemas conseguiram quantificar o referido composto ao nível de 50 ng/L. No entanto, foi possível demonstrar que o sistema LC-MS não possui sensibilidade para alcançar estes limiares de quantificação, uma vez, que o LQ obtido para o dicofol correspondeu a 100 ng/L. Relativamente à seletividade, constatou-se que tanto o LC-MS como o GC-MS são sistemas muito seletivos, permitindo portanto, aferir com rigor a identidade dos analitos, situação distinta do sistema GC/ECD, que necessita de um passo adicional para a confirmação da identidade dos compostos. Deste modo, o sistema GC-MS afigura-se como muito interessante para ser usado na confirmação da identidade dos compostos nos ensaios

obtidos por GC/ECD, uma vez, que permite a utilização do mesmo género de solventes, de equivalentes colunas de separação e tem uma sensibilidade semelhante.

No que respeita ao cumprimento da NQA para ambos os compostos, os resultados mostraram ser possível alcançar os valores regulados para a quinoxifena quando se recorre ao uso da técnica SPE-LC-MS (o LQ do método é de 10 ng/L e a NQA menor corresponde a 15 ng/L). Contrariamente, verificou-se que não foi possível cumprir o valor regulado para o dicofol (0,032 ng/L) com qualquer das metodologias desenvolvidas. Neste âmbito, a metodologia que obteve melhor desempenho corresponde à LLE-GC/ECD (com confirmação por GC-MS), cujo limite de quantificação do método foi de 50 ng/L. Ainda assim, o outro método desenvolvido, SPE-LC-MS, consegue quantificar teores de dicofol próximos do anterior (100 ng/L), pelo que não sendo possível o cumprimento dos valores regulados com nenhuma das metodologias estudadas, esta última afigura-se mais interessante pelo facto de permitir maior rapidez e menor consumo de solventes orgânicos.

A dispersão dos valores instrumentais obtidos no intervalo da gama de trabalho foi calculada, para ambos os métodos, através da determinação do CV associado a cada nível de concentração, os quais demonstraram metodologias bastante precisas, com valores de CV inferiores a 10%.

No que diz respeito à avaliação da exatidão, concluiu-se que a metodologia de análise por SPE-LC-MS mais favorável para a determinação dos analitos quinoxifena e dicofol consiste em manter a amostra a pH neutro, proceder à extração utilizando cartuchos OASIS HLB e utilizando o metanol como solvente de eluição. Em alternativa, pode optar-se pela metodologia LLE-GC/ECD (com confirmação por GC-MS), também a pH neutro, constituída por extração líquido-líquido e em que as condições mais favoráveis são o recurso a duas extrações consecutivas com *isooctano*.

No estudo da incerteza, verificou-se que estas são concordantes com a literatura científica, uma vez, que existe a etapa de preparação de amostra, facto que introduz maior grau de incerteza no método devido ao maior número de

operações unitárias utilizadas. No entanto, verifica-se também, que para a quinoxifena foram obtidas incertezas um pouco superiores com qualquer das técnicas desenvolvidas (39 e 56 % para LLE-GC/ECD e SPE-LC-MS, respetivamente), relativamente às obtidas para o dicofol (14 e 34 % para LLE-GC/ECD e SPE-LC-MS, respetivamente).

Assim, este trabalho culminou no desenvolvimento e validação de duas metodologias analíticas para a determinação da quinoxifena e do dicofol em matrizes aquosas, designadamente através da agregação de técnicas, tais como, a LLE-GC/ECD e a SPE-LC-MS. Destas duas metodologias, e com base no exposto anteriormente, verifica-se que aquela que aparenta ser a mais adequada para a determinação ambiental dos analitos, corresponde à SPE-LC-MS. Diversos fatores contribuem para esta escolha, no entanto, os mais relevantes correspondem ao menor consumo de tempo, a ser uma técnica ambientalmente mais “verde” (menor consumo de solventes) e a possibilidade de poder efetuar-se em simultâneo um maior número de extrações de amostras.

7. Perspetivas Futuras

Embora as metodologias desenvolvidas tenham aplicabilidade e possibilitem a determinação de teores vestigiais destes compostos, verifica-se que podem ser ainda mais otimizadas. Neste sentido, sugere-se para abordagens futuras, o estudo e validação de metodologias com base nestas técnicas de preparação de amostras que permitam cumprir os limites regulatórios, em termos de NQA, em particular para o dicofol. Este é um aspeto significativo que pode ser melhorado, através do recurso a novos estudos com sistemas analíticos diferentes dos estudados, por exemplo, o UPLC-MS-MS, que possuindo superior sensibilidade e seletividade, pode possibilitar a quantificação do dicofol na ordem de pg/L.

Uma outra abordagem, que pode ser utilizada futuramente, consiste na incorporação de mais pesticidas nas metodologias desenvolvidas. Neste sentido, os fatores principais a considerar serão sempre as características de PTB dos compostos discriminados na legislação. Por exemplo, pesticidas recentemente introduzidos no referido diploma, cujo a monitorização ambiental é requerida, tais como, o diclorvos, a cibutrina, a aclonifena, o bifenox e a cipermetrina podem ser boas bases iniciais do trabalho.

Finalmente, sugere-se também otimizar a utilização dos recursos necessários para a determinação do dicofol e da quinoxifena, recorrendo às metodologias desenvolvidas. Aspetos tais como a redução do volume de solvente, as operações unitárias utilizadas na preparação de amostra e análise, bem como a possibilidade de injeção direta em sistemas com sensibilidade adequada, podem ter um efeito significativo no consumo dos recursos necessários. Neste âmbito, um dos mais importantes ganhos recairá sempre sobre o tempo necessário para a obtenção dos resultados das amostras, sendo que qualquer melhoria significativa neste campo, trará consigo ganhos de eficiência no consumo dos recursos.

Referências Bibliográficas

1. Quercus. *Agricultura sustentável*. [Online] 19 de junho de 2018. <http://www.quercus.pt/artigos-agricultura-sustentavel/3116-a-agricultura-industrializada>.
2. Nicolopoulou-Stamati, P., Maipas, S., Kotampasi, C., Stamatis, P., Hens, L. Chemical Pesticides and Human Health: The Urgent Need for a New Concept in Agriculture. *Frontiers in Public Health*. 2016, Vol. 4, 148, doi: 10.3389/fpubh.2016.00148.
3. Decreto-Lei n.º 218/2015, de 7 de outubro. s.l. : Ministério do Ambiente e Ordenamento do Território e Energia. Vols. Diário da República: 1ª série - N.º 196 (2015), disponível em www.dre.pt.
4. Agência Portuguesa do Ambiente. [Online] 2018. [Citação: 30 de 11 de 2018.] <https://www.apambiente.pt/index.php>.
5. *Lei n.º 58/2005, de 29 de dezembro*. s.l. : Assembleia da República. Vols. Diário da República: 1ª série - N.º 245 (2005), disponível em www.dre.pt.
6. Dow AgroSciences. *Arithane - Fungicida*. [Online] [Citação: 22 de junho de 2018.] https://www.lusosem.pt/uploads/produtos_ficheiros/rotulo-arithane.pdf?16:38:37.
7. Dow AgroSciences. *Ficha de dados de segurança, Arithane Fungicide*. [Online] 2016. [Citação: 22 de junho de 2018.] https://www.lusosem.pt/uploads/produtos_ficheiros/arithanedec16.pdf?16:38:37.
8. DOW. Product Safety Assessment Quinoxifen. Revisto a 29 de julho de 2014.
9. Quinoxifen. *PubChem Compound Database; CID=3391107*. [Online] National Centre for Biotechnology Information. [Citação: 22 de junho de 2018.] <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/3391107>.
10. Quinoxifen. *Chemical Book*. [Online] [Citação: 22 de junho de 2018.] http://www.chemicalbook.com/ChemicalProductProperty_US_CB7757516.aspx.
11. Dicofol Milenia EC. [Online] Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. [Citação: 22 de junho de 2018.]

http://www.adapar.pr.gov.br/arquivos/File/defis/DFI/Bulas/Inseticidas/DICOFOL_MILENIA_EC.pdf.

12. Dicofol. *PubChem Compound DataBase*; CID=8268. [Online] National Centre for Biotechnology Information. [Citação: 22 de junho de 2018.] <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/8268>.

13. What is Dicofol? *ChemService*. [Online] 7 de abril de 2015. [Citação: 25 de junho de 2018.] <https://www.chemservice.com/news/2015/04/what-is-dicofol/>.

14. Barbera, J. C., Lopez, F. J., Hernandez, F., Medina, J., Pastor, A. Gas Chromatographic Determination of Organochloride Pesticides; Contamination of Dicofol, Fenson and Tetradifon in Fish and Natural Qaters of a Wet Area Beside the Mediterranean Sea. *Environmental Contamination and Toxicology*. 1986, Vols. 36: 211-218.

15. Harris, Daniel C. *Quantitative Chemical Analysis, 8th edition*. New York : W. H. Freeman and Company, 2010.

16. Stevens, J. Agilent Technologies. *QuEChERS 101: The basics and beyond*. [Online] [Citação: 20 de junho de 2018.] https://www.agilent.com/cs/library/eseminars/public/QuEChERS_101-%20The%20Basics%20and%20Beyond.pdf.

17. *Extração em Fase Sólida: Fundamentos Teóricos e Novas Estratégias para Preparação de Fases Sólidas*. Jardim, I. C. S. F. s.l.: Scientia Chromatographica, 2010, Vols. 2, N.º 1, 13-25.

18. Ettre, L. S., Morris, P. J. T. The Saga of the Electron-Capture Detector. *LCGC North America*. [Online] 1 de fevereiro de 2007. [Citação: 26 de junho de 2018.] <http://www.chromatographyonline.com/saga-electron-capture-detector>.

19. Technologies, Agilent. ChemStation Plus. rev. A.0701. 2000.


20. Skoog, W., Holler, C.,. *Fundamentos de Química Analítica*. s.l. : Thomson.

21. ChromAcademy. *Mass Spectrometry: Fundamental LC-MS Introduction*. [Online] Crawford Scientific. [Citação: 25 de junho de 2018.] <http://www.ecs.umass.edu/eve/background/methods/chemical/Openlit/Chromacademy%20LCMS%20Intro.pdf>.

22. Orientação sobre validação de métodos de ensaios químicos, DOQ-CGCRE-008. s.l. : Coordenação Geral da Acreditação, fevereiro, 2010. Vol. Revisão 03.
23. Orientação sobre validação de métodos de ensaios químicos, DOQ-CGCRE-008. s.l. : Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial, junho, 2007. Vol. Revisão 02.
24. Welvaert, M., Rosseel, Y. On the Definition of Signal-to-Noise Ratio and Contrast-To-Noise for fMRI Data. *NCBI*. [Online] [Citação: 21 de junho de 2018.] <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3819355/>.
25. *Water quality - guidance on analytical quality control for chemical and physicochemical water analysis*. s.l. : ISO/TS 13530:2009.
26. *Vocabulário Internacional de Metrologia*. s.l. : Instituto Português da Qualidade, 1ª edição, 2012.
27. *Guia Relacre 13 - Validação de métodos internos de ensaio em análise química*. s.l. : Relacre, fevereiro, 2000.
28. Yalkowsky, S. H., He, Y., Jain, P. *Handbook of Aqueous Solubility Data, Second Edition*. s.l. : CRC Press, 2010.
29. National Centre for Biotechnology Information, PubChem Compound Database. *Methylene Chloride*. [Online] [Citação: 11 de junho de 2018.] <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/6344>.
30. National Centre of Biotechnology Information, PubChem Compound Database. *Ethyl Acetate*. [Online] [Citação: 11 de junho de 2018.] <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/8857>.
31. National Centre of Biotechnology Information, PubChem Compound Database. *2,2,4 - Trimethylpentane*. [Online] [Citação: 11 de junho de 2018.] <http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/10907>.
32. Lide, David R. *CRC Handbook of Chemistry and Physics*. s.l. : CRC Press LLC, 2005.

Anexos

Anexo I – Protocolo de estágio entre as instituições ISEL e APA



PROTOCOLO DE COOPERAÇÃO
ENTRE O INSTITUTO SUPERIOR DE ENGENHARIA DE LISBOA,
A AGÊNCIA PORTUGUESA DO AMBIENTE, I.P.
E A ESTUDANTE CÁTIA VANESSA GOMES LUCAS

Entre

o Instituto Superior de Engenharia de Lisboa, pessoa coletiva nº 600 016 234, com sede na Rua Conselheiro Emídio Navarro, 1, 1959-007 Lisboa, neste ato representado pelo seu Presidente, Professor Doutor Jorge Alberto Mendes de Sousa, adiante designado por ISEL, na qualidade de primeiro outorgante,

a Agência Portuguesa do Ambiente, I.P., pessoa coletiva nº 510 306 624, com sede na Rua da Murgueira, nº9/9ª, 2610-124 Amadora, neste ato representada pelo Presidente do seu Conselho Diretivo, Dr. Nuno Lacasta, adiante designado por APA, na qualidade de segundo outorgante,

e

a estudante **Cátia Vanessa Gomes Lucas**, portador do cartão de cidadão com o número 14106586, NIF 262171562, residente em Rua Agostinho da Silva, n.º 64, 2865-545 Fernão Ferro, Seixal, na qualidade de terceiro outorgante,

é celebrado e mutuamente aceite o Protocolo que se rege pelas cláusulas seguintes:

CLÁUSULA 1ª
Objetivo

1. O presente protocolo tem como objetivo a realização de estágio da estudante do ISEL Cátia Vanessa Gomes Lucas, no âmbito do trabalho final do mestrado em Engenharia da Qualidade e Ambiente.
2. Durante a vigência do estágio a aluna Cátia Vanessa Gomes Lucas mantém o seu estatuto de estudante do ISEL.
3. Em anexo são apresentados o resumo e o plano de trabalho, que constam da proposta de TFM.

CLÁUSULA 2ª
Duração, local e horário

Rua Conselheiro Emídio Navarro 1
1959-007 Lisboa- Portugal
Tel: (+351) 218 317 000
Fax: (+351) 218 317 162
Web: www.isel.pt

GAO.MD.09.03 Pág. 2/3

1. O estágio terá início no dia 14 de fevereiro de 2018 e termina a 13 de julho de 2018.
2. O estágio será realizado nas instalações da APA.

CLÁUSULA 3ª

Orientação do estágio

Os responsáveis pela orientação do estágio devem estabelecer entre si os contactos necessários tendo em vista o bom cumprimento dos objetivos do estágio. São nomeados em representação do ISEL a Professora Doutora Maria Teresa Loureiro dos Santos e em representação da APA o Doutor Pedro Antunes, como orientadores do presente estágio.

CLÁUSULA 4ª

Seguro escolar

A aluna é abrangida pelo seguro escolar, cuja apólice consta em anexo ao presente protocolo e cujo pagamento é da responsabilidade do ISEL.

CLÁUSULA 5ª

Obrigações da estudante

A estudante fica obrigada ao cumprimento de todas as normas estabelecidas pela APA, nomeadamente no que concerne ao sigilo profissional, às regras de utilização e manutenção de recursos materiais colocados à sua disposição e às disposições relativas a segurança e saúde no trabalho.

CLÁUSULA 6ª

Vigência

O presente protocolo é válido durante o período de realização do estágio.

CLÁUSULA 7ª

Disposições finais

1. As dúvidas e omissões, bem como eventuais atualizações deste protocolo, serão resolvidas pelos outorgantes.
2. Feito em três exemplares ficando um exemplar em poder do ISEL, outro em poder da APA e outro da estudante.

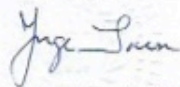
CLÁUSULA 8ª

Aceitação

As partes envolvidas declaram aceitar o presente protocolo, com todas as cláusulas que ficam exaradas, e vão assinar.

Lisboa, 12 de Fevereiro de 2018

Pelo ISEL

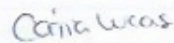


Professor Doutor Jorge Alberto Mendes de Sousa
Presidente do ISEL

Pela APA



Dr. Nuno Lacasta
Presidente do Conselho Diretivo da APA, I.P.



Cátia Vanessa Gomes Lucas
A Estudante

Anexo II – Póster apresentado no Fórum de Engenharia Química e Biológica de 2018



MONITORIZAÇÃO DE COMPOSTOS ORGÂNICOS EM MATRIZES AMBIENTAIS

C. Lucas^{1*}, P. Antunes², M. T. Santos¹

¹ Instituto Superior de Engenharia de Lisboa (Área Departamental de Engenharia Química)
R. Conselheiro Emídio Navarro 1, 1959-007 Lisboa, Portugal

² Agência Portuguesa do Ambiente (Laboratório de Referência do Ambiente)
Rua da Murgueira, 9/9A, Zambujal, 2610-124 Amadora, Portugal



* a37715@alunos.isel.pt

Resumo

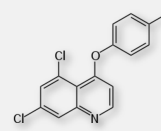
Desenvolvimento e validação de metodologias de análise para a quantificação de compostos orgânicos em matrizes ambientais.

Introdução

A poluição ambiental dos recursos hídricos é um problema cada vez mais preocupante, que além de constituir uma ameaça para os organismos vivos, representa também, um risco significativo para a saúde humana.

Algumas normas de regulação existentes possibilitam limitar a presença de substâncias químicas no ambiente. O Decreto-Lei n.º 218/2015, de 7 de outubro, estabelece as normas de qualidade ambiental, bem como o teor máximo de certos poluentes nas massas de água. O diploma, discrimina ainda (com base no critério PTB – Persistência, Toxicidade e Bioacumulação), a natureza dos poluentes definindo-os como prioritários (reduzir a sua presença no ambiente) ou perigosos (eliminar a sua presença no ambiente).^[1]

Um dos pesticidas que integra o diploma é a Quinoxifena (substância prioritária e perigosa utilizada como fungicida de ação preventiva na cultura da videira).^[1,2]

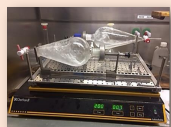


Estrutura da Quinoxifena
Norma de Qualidade Ambiental
15 ng/L^[1]

Materiais e Métodos

Foram testadas e validadas duas técnicas de extração e três sistemas de análise para a Quinoxifena

Extração líquido-líquido
(LLE - Liquid-liquid Extraction)



Extração em fase sólida
(SPE - Solid Phase Extraction)



GC/ECD *Agilent 6890 series* (coluna *Agilent CPSIL 19CB*, 60m x 250mm x 0,25µm)



LC-MS *Agilent 1100 series* (coluna *Agilent PAH Eclipse* 5µm x 4,6mm x 250mm)

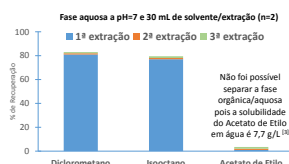


GC-MS *Perkin Elmer Clarus 500* (coluna *Agilent VF-5ms*, 30m x 0,25mm x 0,25 µm)



Resultados e Discussão

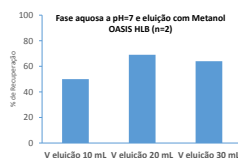
Para a técnica de extração líquido-líquido, foram testados três solventes e avaliada a influência do pH nas recuperações.



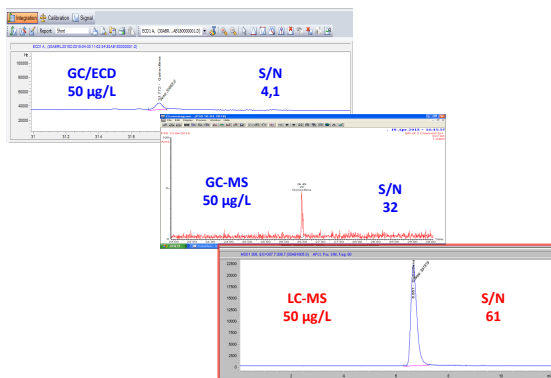
pH	Isooctano	Diclorometano
2	69	114
7	79	81

Para a técnica de extração em fase sólida, foram testados dois cartuchos diferentes e a influência do volume de eluição na recuperação.

Cartucho	10 mL Metanol		20 mL Metanol	
	10 mL	20 mL	10 mL	20 mL
OASIS HLB	50	72	50	72
C18	50	50	50	50



Foram testados três sistemas de análise distintos



Conclusões

- Os solventes *Isooctano* e *Diclorometano* conseguem extrair eficazmente a Quinoxifena com apenas uma extração (30 mL de solvente e 10 minutos de agitação);
- O pH da amostra tem influência na recuperação de Quinoxifena usando a técnica extrativa LLE;
- O cartucho de extração *OASIS HLB* foi o que obteve melhor recuperação de analito para as mesmas condições, quando comparado com o de *C18*;
- Na técnica extrativa por SPE, 20 mL de Metanol são suficientes para eluir a totalidade da Quinoxifena extraída;
- O sistema de análise mais sensível para a identificação/quantificação da Quinoxifena é o LC-MS;
- A metodologia a seguir será extração por SPE (eluição com 20 mL de Metanol) e análise por LC-MS.

Referências:

- Decreto-Lei 218/2015, de 7 de outubro, do Ministério do Ambiente e Ordenamento do Território e Energia, Diário da República: 1ª série – N.º 196 (2015), disponível em www.dre.pt
- Quinoxifena Archives – IQV Agro Portugal, IQV, <https://iqvagro.pt/materia-activa/quinoxifena/>
- Yalkowsky, S.H., He, Y., Jain, P., Handbook of Aqueous Solubility Data, Second Edition, CRC Press, 2010

Agradecimentos: Agência Portuguesa do Ambiente

Anexo III – Lista de material utilizado

Apresenta-se de seguida uma lista do material utilizado no decorrer deste trabalho.

- Balões volumétricos diversos (10, 25 e 50 mL);
- Copos de precipitação diversos (10, 100 e 250 mL);
- Vials de 1,5 mL;
- Tampas de Vials;
- Capsulador;
- Suporte para Vials;
- Micro seringas
- Ampolas de decantação diversas (500 e 1000 mL);
- Frascos de vidro;
- Cartuchos OASIS HLB 6cc, Waters Corporation;
- Cartuchos octadecil (C18), Waters Corporation;
- Tubos de ensaio graduados