

Análise de Compostos Orgânicos Voláteis (COVs) em águas por Micro-Extração em Fase Sólida (SPME) seguida de Cromatografia Gasosa (GC) acoplada a Espectrometria de Massa (MS)

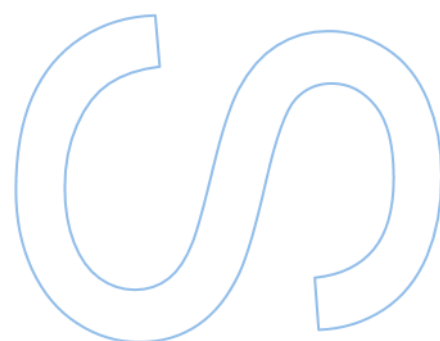
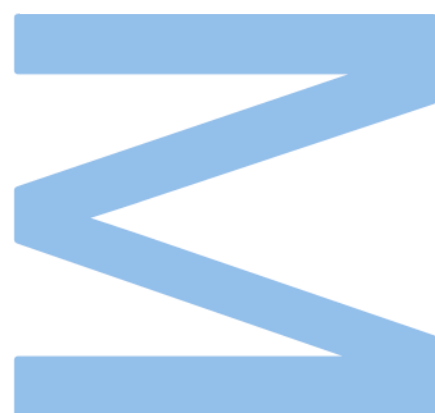
**Alexandre Manuel Ramos Caeiro e
Freitas Pinto**

Mestrado em Biologia e Gestão da Qualidade da Água

Departamento de Biologia

Faculdade de Ciências da Universidade do Porto

2024



Análise de Compostos Orgânicos Voláteis (COVs) em águas por Micro-Extração em Fase Sólida (SPME) seguida de Cromatografia Gasosa (GC) acoplada a Espectrometria de Massa (MS)

**Alexandre Manuel Ramos Caeiro e
Freitas Pinto**

Relatório de Estágio no âmbito do Mestrado em Biologia e
Gestão da Qualidade da Água

Departamento de Biologia

2024

Orientador

Ana Paula de Campos Mucha, Professora Auxiliar Convidada da
Faculdade de Ciências da Universidade do Porto e Membro
Integrado do Centro Interdisciplinar de Investigação Marinha e
Ambiental

Supervisor externo na Entidade de Acolhimento

Maria Augusta Dionísio de Sousa, Responsável de Área de
Química Orgânica – Laboratório, Águas e Energia do Porto, E.M.



Agradecimentos

Ao chegar ao fim mais uma etapa do meu percurso académico, olho para trás e penso em todos aqueles que me foram ajudando nesta aventura. Felizmente, são várias as pessoas a quem eu tenho de agradecer.

Gostaria de começar por agradecer ao Laboratório da Águas e Energia do Porto, na pessoa da sua Diretora, a Ex.^{ma} Eng.^a Adelaide Rocha, por me acolher para a realização do Estágio, e pela proposta do tema sobre o qual incidiu o meu trabalho.

Inicialmente, admito que foram algumas as dúvidas que me levaram a hesitar em aceitar o tema. “Microextração”? “Compostos orgânicos voláteis”? Não me encontrava familiarizado com a temática, pelo que temi que não fosse a pessoa mais indicada para a realização das tarefas que me foram propostas. Nesse momento, o apoio da minha orientadora da Faculdade de Ciências da Universidade do Porto, a Ex.^{ma} Professora Dr.^a Ana Paula Mucha, foi fundamental, na medida em que me fez acreditar nas minhas capacidades em levar a bom porto este trabalho, e me fez ver as mais-valias em realizar o Estágio numa área complementar à da minha formação-base.

No entanto, a execução deste trabalho não teria, de todo, sido possível sem o contributo inestimável dos meus supervisores do Laboratório, a Ex.^{ma} Dr.^a Augusta Sousa e o Ex.^{mo} Dr. Romeu Avó, que foram incansáveis na ajuda prestada ao longo de todo o caminho e me ajudaram a levantar-me nos momentos em que duvidei de mim mesmo.

Neste último ano, tive o privilégio de prosseguir o Mestrado no Laboratório em conjunto com a minha colega e amiga Catarina, e de conhecer pessoas novas que foram também a minha segunda família: a Inês, o Nuno, a Sandra, a Hirondina, a Odília, a Marília, a Carlita, a Eng.^a Cristina, o Eng.^o Augusto, a Isabel e o Sr. Braga, entre outros colegas. Agradeço-vos por me terem feito sentir em casa.

Por fim, queria agradecer às pessoas que dão mais sentido à minha vida. Aos meus pais, por estarem sempre ao meu lado nos bons e nos maus momentos e nunca deixarem de acreditar em mim. Ao meu irmão, o Pedro Miguel, por estar sempre disponível para mim e de ter sido sempre o meu companheiro de aventuras na vida. Ao meu irmão de quatro patas, o Apolo, por ajudar-me todos os dias mesmo sem se aperceber, pela sua simples companhia e amor incondicional. Aos meus amigos, por me proporcionarem tantos momentos de descontração e me ampararem sempre que preciso deles... vocês sabem quem são! Àqueles que hoje já não estão aqui presentes,

mas que nunca deixam de estar comigo em espírito. Espero poder deixar-vos orgulhosos de mim.

A todos vós, obrigado do fundo do meu coração.

Resumo

O Estágio Curricular foi realizado na Área de Química Orgânica do Laboratório da empresa Águas e Energia do Porto, Empresa Municipal (AEdP, E.M.), com início a 18 de setembro de 2023 e término a 31 de agosto de 2024, tendo a carga horária diária sido de aproximadamente 7 horas, com horário de trabalho das 09h30 às 17h30, de segunda-feira a sexta-feira.

O Laboratório da AEdP, E.M. encontra-se acreditado pelo Instituto Português de Acreditação, I.P. (IPAC) para a análise de determinados compostos orgânicos voláteis (COVs), nomeadamente trihalometanos (THMs) – clorofórmio, bromodiclorometano, dibromoclorometano e bromofórmio – tricloroeteno e tetracloroeteno, em água destinada ao consumo humano e águas naturais doces subterrâneas, através da metodologia de microextração em fase sólida em *headspace* e cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa (HS-SPME-GC-MS). Atualmente, o Laboratório encontra-se em processo de acreditação para a análise destes mesmos compostos em águas de piscina e águas naturais doces superficiais pela mesma metodologia.

O principal objetivo do trabalho desenvolvido no âmbito do Estágio Curricular passou pelo desenvolvimento, implementação e validação de métodos analíticos que permitissem a determinação de outros COVs de monitorização obrigatória em água destinada ao consumo humano ao abrigo do Decreto-Lei nº 69/2023 de 21 de agosto que ainda não se encontravam implementados para análise pelo Laboratório, mais concretamente benzeno, 1,2-dicloroetano, cloreto de vinilo e epícloridrina, para amostras de água, através da metodologia de HS-SPME-GC-MS, para posterior acreditação pelo IPAC.

O desenvolvimento dos métodos analíticos envolveu a manipulação de diferentes configurações instrumentais através do *software Chromeleon 7.3.1*, nomeadamente ao nível das etapas de extração, incubação e injeção dos compostos, separação cromatográfica dos mesmos, e espectrometria de massa. Para além disso, no decorrer do desenvolvimento dos métodos, foram sendo testadas duas fibras de SPME diferentes para extração dos compostos, com revestimentos de PDMS e CAR-PDMS. No final, foi implementada a utilização da fibra de SPME com revestimento de CAR-PDMS para a determinação de todos os compostos, uma vez que, para além de conferir uma capacidade de adsorção significativamente superior para todos os compostos testados

– relativamente à fibra de SPME com revestimento de PDMS – tratou-se do único revestimento de entre os dois testados que se mostrou capaz de adsorver a epicloridrina. Este desenvolvimento conduziu à implementação de um método para a determinação conjunta de benzeno, 1,2-dicloroetano, cloreto de vinilo, THMs, tricloroeteno e tetracloroeteno, e de um outro método para a determinação de epicloridrina.

Os Ensaios efetuados para validação de ambos os métodos incidiram sobre os parâmetros de Linearidade, Repetibilidade, Limite de Quantificação, Recuperações, Seletividade e Especificidade, tendo igualmente auxiliado na definição da Gama de Trabalho dos compostos. Os parâmetros de Linearidade, Repetibilidade, Limite de Quantificação, Recuperações, Seletividade e Especificidade foram validados para o método desenvolvido para a determinação de benzeno, 1,2-dicloroetano, cloreto de vinilo, THMs, tricloroeteno e tetracloroeteno em água destinadas ao consumo humano. Os parâmetros de Linearidade, Repetibilidade e Limite de Quantificação foram igualmente validados para o método desenvolvido para a determinação de epicloridrina em água destinada ao consumo humano, não tendo, no entanto, sido validados os parâmetros de Recuperações, Seletividade e Especificidade.

No decorrer do Estágio, foi igualmente possível participar em tarefas de rotina do Laboratório, nomeadamente controlos de inspeção de THMs, tricloroeteno e tetracloroeteno através do método acreditado pelo IPAC para a determinação dos mesmos. Para além disso, foi possível participar em Ensaios Interlaboratoriais conjuntamente com os técnicos da Área de Química Orgânica para avaliação da adequabilidade a uso do método implementado pelo Laboratório para a determinação de THMs, tricloroeteno e tetracloroeteno em água destinada ao consumo humano, bem como do método desenvolvido durante o Estágio para a determinação de benzeno, 1,2-dicloroetano, THMs, tricloroeteno e tetracloroeteno em água destinada ao consumo humano.

Palavras-chave: Água, Compostos Orgânicos Voláteis, Microextração em Fase Sólida, Cromatografia Gasosa, Espectrometria de Massa, *Headspace*, PDMS, CAR-PDMS, Validação

Abstract

The Curricular Internship was conducted at the Organic Chemistry Department of the Laboratory of the Municipal Corporation Águas e Energia do Porto, E.M. (AEdP, E.M.), having started on September 18th 2023 and ended on August 31st 2024, with a daily workload of approximately 7 hours, and working hours from 09:30 AM to 05:30 PM, from Monday to Friday.

The AEdP, E.M. Laboratory is accredited by the Portuguese Institute of Accreditation (IPAC) for the analysis of certain volatile organic compounds (VOCs), namely trihalomethanes (THMs) – chloroform, bromodichloromethane, dibromochloromethane and bromoform – trichloroethene and tetrachloroethene, in drinking water and natural groundwater, using the methodology of solid-phase microextraction in headspace and gas chromatography coupled with mass spectrometry (HS-SPME-GC-MS). Currently, the Laboratory is in the process of obtaining accreditation for the analysis of these same compounds in swimming pool water and natural surface freshwater using the same methodology.

The main objective of the work developed during the Curricular Internship was the development, implementation, and validation of analytical methods that would allow the determination of other VOCs that require mandatory monitoring in drinking water under the Portuguese Decree-Law No. 69/2023 of August 21st, which had not yet been implemented for analysis by the Laboratory, namely benzene, 1,2-dichloroethane, vinyl chloride, and epichlorohydrin in water, using the HS-SPME-GC-MS methodology for subsequent accreditation by IPAC.

The development of the analytical methods involved the manipulation of different instrumental configurations through the *Chromeleon 7.3.1 software*, particularly regarding the stages of compound extraction, incubation, and injection, as well as its chromatographic separation and mass spectrometry. Furthermore, during the development of the methods, two different SPME fibers, coated with PDMS and CAR-PDMS, were tested for the extraction of the compounds. In the end, the use of the SPME fiber coated with CAR-PDMS was implemented for the determination of all compounds, since, in addition to providing a significantly greater adsorption capacity for all tested compounds – in relation to PDMS fiber – it was the only coating among the two tested that was capable of adsorbing epichlorohydrin. This development led to the

implementation of a method for the simultaneous determination of benzene, 1,2-dichloroethane, vinyl chloride, THMs, trichloroethene, and tetrachloroethene, and another method for the determination of epichlorohydrin.

The tests carried out for the validation of both methods focused on the parameters of Linearity, Repeatability, Limit of Quantification, Recovery, Selectivity, and Specificity, which also helped in defining the Working Range of the compounds. The parameters of Linearity, Repeatability, Limit of Quantification, Recovery, Selectivity, and Specificity were validated for the method developed for the determination of benzene, 1,2-dichloroethane, vinyl chloride, THMs, trichloroethene, and tetrachloroethene in drinking water. The parameters of Linearity, Repeatability, and Limit of Quantification were also validated for the method developed for the determination of epichlorohydrin in drinking water; however, the parameters of Recovery, Selectivity, and Specificity were not validated.

During the Internship, it was also possible to participate in routine tasks of the Laboratory, particularly inspection controls of THMs, trichloroethene, and tetrachloroethene using the method accredited by IPAC for their determination. Additionally, it was possible to participate in Interlaboratory Tests along with the technicians from the Organic Chemistry Department to evaluate the suitability for use of the method implemented by the Laboratory for the determination of THMs, trichloroethene, and tetrachloroethene in drinking water, as well as the method developed during the Internship for the determination of benzene, 1,2-dichloroethane, THMs, trichloroethene, and tetrachloroethene in drinking water.

Keywords: Water, Volatile Organic Compounds, Solid-Phase Microextraction, Gas Chromatography, Mass Spectrometry, Headspace, PDMS, CAR-PDMS, Validation

Índice

Lista de Tabelas	x
Lista de Figuras	xii
Lista de Abreviaturas	xix
Lista de Símbolos	xxi
1. Introdução.....	1
1.1. Local de Estágio	1
1.2. Objetivos	4
2. Compostos Orgânicos Voláteis.....	6
2.1. Definição	6
2.2. Fontes naturais e antropogénicas.....	6
2.3. Riscos.....	8
2.4. Compostos orgânicos voláteis de determinação obrigatória na água destinada ao consumo humano.....	9
2.4.1. Trihalometanos.....	9
2.4.2. Tricloroeteno e tetracloroeteno	11
2.4.3. Benzeno	12
2.4.4. 1,2-Dicloroetano.....	13
2.4.5. Cloreto de Vinilo.....	14
2.4.6. Epicloridrina	15
3. Microextração em Fase Sólida e Cromatografia Gasosa acoplada a Espetrometria de Massa.....	15
3.1. Considerações Gerais	15
3.2. Aplicações.....	18
3.3. Funcionamento das técnicas	20
3.3.1. Microextração em Fase Sólida.....	20
3.3.2. Cromatografia Gasosa.....	26
3.3.3. Espetrometria de Massa	30

4. Materiais e Métodos.....	38
4.1. Material e Equipamento.....	38
4.1.1. Material	38
4.1.2. Equipamento.....	39
4.2. Solventes e Reagentes	39
4.2.1. Solventes	39
4.2.2. Reagentes	39
4.2.3. Soluções-Padrão Comerciais.....	39
4.3. Delineamento Experimental.....	40
4.3.1. Traçado da Curva de Calibração	40
4.3.2. Desenvolvimento do Método.....	45
4.3.3. Ensaio para validação dos Métodos.....	58
5. Resultados e Discussão.....	65
5.1. Implementação do método para determinação de benzeno, 1,2-dicloroetano, cloreto de vinilo, THMs, tricloroetano e tetracloroetano	65
5.2. Validação do método para determinação de benzeno, 1,2-dicloroetano, cloreto de vinilo, THMs, tricloroetano e tetracloroetano.....	97
5.2.1. Linearidade	97
5.2.2. Repetibilidade	100
5.2.3. Limite de Quantificação.....	101
5.2.4. Recuperações.....	101
5.2.5. Seletividade	103
5.2.6. Especificidade.....	104
5.2.7. Ensaio Interlaboratorial	105
5.2.8. Gama de Trabalho	107
5.3. Implementação do método para determinação de epícloridrina.....	108
5.4. Validação do método para determinação de epícloridrina	126
5.4.1. Linearidade	126

5.4.2. Repetibilidade	127
5.4.3. Limite de Quantificação.....	127
5.4.4. Seletividade	128
5.4.5. Especificidade.....	128
5.4.6. Gama de Trabalho	129
6. Conclusões finais.....	129
Referências Bibliográficas	135
Anexos	148
Anexo I	149
Anexo II	153
Anexo III	160
Anexo IV	167

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Modo de preparação de soluções-padrão em diferentes concentrações a partir de S.I. 1, S.I. 2 ou S.I. 3, em água desionizada	44
Tabela 2: Modo de preparação de soluções-padrão em diferentes concentrações a partir de S.I. 4, em água desionizada.....	44
Tabela 3: Configurações iniciais do modo de deteção SIM para a determinação de benzeno, 1,2-dicloroetano, THMs, tricloroeteno e tetracloroeteno	52
Tabela 4: Configurações finais do modo de deteção SIM para a determinação de cloreto de vinilo, benzeno, 1,2-dicloroetano, THMs, tricloroeteno e tetracloroeteno	55
Tabela 5: Configurações iniciais do modo de deteção SIM para a determinação de epicloridrina	56
Tabela 6: Resultados do teste <i>Point-to-Point Slope</i> aplicado após análise de soluções-padrão de diferentes COVs através do <i>MIA COVs 24</i>	98
Tabela 7: Resultados do teste de Mandel aplicado após análise de soluções-padrão de diferentes COVs através do <i>MIA COVs 24</i>	99
Tabela 8: Resultados do teste de Análise de Resíduos aplicado após análise de soluções-padrão de diferentes COVs através do <i>MIA COVs 24</i>	100
Tabela 9: Resultados do teste de Repetibilidade aplicado após análise de soluções-padrão de diferentes COVs através do <i>MIA COVs 24</i>	101
Tabela 10: Resultados do teste de Recuperações aplicado após análise de amostras fortificadas com soluções-padrão de diferentes COVs através do <i>MIA COVs 24</i>	103
Tabela 11: Resultados do teste de Seletividade aplicado após análise de soluções-padrão de diferentes COVs através do <i>MIA COVs 24</i>	104
Tabela 12: Resultados do teste de Especificidade aplicado após análise de soluções-padrão de diferentes COVs através do <i>MIA COVs 24</i>	105
Tabela 13: Resultados do Ensaio Interlaboratorial efetuado através do <i>Método 1</i>	106
Tabela 14: Resultados do Ensaio Interlaboratorial efetuado através do <i>Método 2</i>	107
Tabela 15: Gamas de Trabalho validadas para os diferentes COVs	108
Tabela 16: Resultados do teste <i>Point-to-Point Slope</i> aplicado após análise de soluções-padrão de epicloridrina através do <i>MIA ECH 19</i>	126

Tabela 17: Resultados do teste de Mandel aplicado após análise de soluções-padrão de epicloridrina através do <i>MIA ECH 19</i>	126
Tabela 18: Resultados do teste de Análise de Resíduos aplicado após análise de soluções-padrão de epicloridrina através do <i>MIA ECH 19</i>	127
Tabela 19: Resultados do teste de Repetibilidade aplicado após análise de soluções-padrão de epicloridrina através do <i>MIA ECH 19</i>	127
Tabela 20: Resultados do teste de Seletividade aplicado após análise de soluções-padrão de epicloridrina através do <i>MIA ECH 19</i>	128
Tabela 21: Resultados do teste de Especificidade aplicado após análise de soluções-padrão de epicloridrina através do <i>MIA ECH 19</i>	128
Tabela 22: Gama de Trabalho validada para a epicloridrina	129

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Laboratório da empresa Águas e Energia do Porto, E.M	1
Figura 2: Instrumento de SPME-GC-MS conectado a computador	18
Figura 3: Seringa para proteção da fibra.....	21
Figura 4: Amostrador automático	22
Figura 5: Vial e tampa com septo perfurável.....	22
Figura 6: Injetor do cromatógrafo gasoso.....	23
Figura 7: Incubadora.....	24
Figura 8: Ilustração de uma fibra de SPME com revestimento à base de CAR-PDMS	24
Figura 9: Ilustração da técnica de HS-SPME	25
Figura 10: Garrafa de hélio (200 bar) equipada com redutor de caudal e manómetros	27
Figura 11: Redutor de caudal e manómetro para controlo da pressão do gás de arraste	28
Figura 12: Coluna cromatográfica capilar TRB-624	28
Figura 13: Diagrama de um cromatógrafo gasoso (direita) acoplado a um espectrómetro de massa (esquerda)	30
Figura 14: Diagrama da técnica de ionização eletrónica (EI)	32
Figura 15: Diagrama do funcionamento de um quadrupolo.....	34
Figura 16: Diagrama do funcionamento de um triplo quadrupolo	35
Figura 17: Sala de preparação de amostras do Laboratório.....	41
Figura 18: Configurações do amostrador automático para o <i>MIA COVs 24</i>	53
Figura 19: Configurações do injetor do cromatógrafo gasoso para o <i>MIA COVs 24</i>	54
Figura 20: Configurações do gradiente de temperaturas do forno do cromatógrafo gasoso para o <i>MIA COVs 24</i>	54
Figura 21: Configurações do amostrador automático para o <i>MIA ECH 19</i>	57
Figura 22: Cromatogramas das $m/z=51$, $m/z=77$ e $m/z=78$ extraídas através do canal TIC.....	66

Figura 23: Biblioteca de espectros de massa para identificação do benzeno e determinação do seu RT.....	66
Figura 24: Cromatogramas das $m/z=49$, $m/z=62$ e $m/z=64$ extraídas através do canal TIC.....	67
Figura 25: Biblioteca de espectros de massa usada para identificação do 1,2-dicloroetano e determinação do seu RT.....	67
Figura 26: Cromatograma com modo de aquisição SIM gerado através da análise com MIA COVs 1 de solução-padrão a 50,0 µg/L preparado através da S.I. 1 e extraído com fibra PDMS	68
Figura 27: Ampliação do cromatograma com modo de aquisição SIM gerado através da análise com MIA COVs 1 de solução-padrão a 50,0 µg/L preparada através da S.I. 1 e extraída com fibra PDMS	68
Figura 28: Ampliação do cromatograma com modo de aquisição SIM gerado através da análise com MIA COVs 2 de solução-padrão a 50,0 µg/L preparada através da S.I. 1 e extraída com fibra PDMS	69
Figura 29: Cromatograma com modo de aquisição SIM gerado através da análise da solução-padrão com mistura de benzeno, 1,2-dicloroetano, THMs, tricloroetano e tetracloroetano a 50,0 µg/L com a fibra PDMS pelo MIA COVs 2	70
Figura 30: Cromatograma com modo de aquisição SIM gerado através da análise da solução-padrão com mistura de benzeno, 1,2-dicloroetano, THMs, tricloroetano e tetracloroetano a 50,0 µg/L com a fibra CAR-PDMS pelo MIA COVs 2.....	71
Figura 31: Gráfico da intensidade de sinal dos picos cromatográficos dos COVs em função da fibra utilizada.....	71
Figura 32: Cromatograma com modo de aquisição SIM gerado através da análise com MIA COVs 3 de solução-padrão a 10,0 µg/L preparada através da S.I. 1 e extraída com a fibra CAR-PDMS.....	73
Figura 33: Cromatograma com modo de aquisição full scan gerado através da análise com MIA COVs 4 de solução-padrão a 10,0 µg/L preparada através da S.I. 1 e extraída com fibra CAR-PDMS	74
Figura 34: Cromatograma com modo de aquisição full scan gerado através da análise com MIA COVs 5 de solução-padrão a 10,0 µg/L preparada através da S.I. 1 e extraída com fibra CAR-PDMS	75

Figura 35: Cromatograma com modo de aquisição SIM gerado através da análise com <i>MIA COVs 6</i> de solução-padrão a 0,25 µg/L preparada através da S.I. 1 e extraída com fibra PDMS	76
Figura 36: Gráfico da área dos picos cromatográficos dos COVs em função dos tempos de incubação e extração	77
Figura 37: Gráfico da área dos picos cromatográficos dos COVs em função da temperatura de extração	78
Figura 38: Cromatogramas das <i>m/z=62</i> e <i>m/z=64</i> extraídas através do canal TIC	79
Figura 39: Biblioteca de espectros de massas para identificação do cloreto de vinilo e determinação do seu RT.....	79
Figura 40: Cromatograma com modo de aquisição SIM gerado através da análise com <i>MIA COVs 10</i> de solução-padrão a 50,0 µg/L preparada através da S.I. 2 e extraída com fibra PDMS	80
Figura 41: Cromatograma com modo de aquisição SIM gerado através da análise com <i>MIA COVs 11</i> de solução-padrão a 50,0 µg/L preparada através da S.I. 2 e extraída com fibra PDMS	81
Figura 42: Gráfico da área do pico cromatográfico do cloreto de vinilo em função da temperatura de extração	81
Figura 43: Cromatogramas das <i>m/z=62</i> e <i>m/z=64</i> extraídas através do canal TIC	83
Figura 44: Biblioteca de espectros de massas para identificação do cloreto de vinilo...	83
Figura 45: Cromatograma com modo de aquisição SIM gerado através da análise com <i>MIA COVs 12</i> de solução-padrão a 0,25 µg/L preparada através da S.I. 1 e extraída com fibra CAR-PDMS.....	84
Figura 46: Cromatograma com modo de aquisição SIM gerado através da análise com <i>MIA COVs 13</i> de solução-padrão a 0,25 µg/L preparada através da S.I. 1 e extraída com fibra CAR-PDMS.....	85
Figura 47: Cromatograma com modo de aquisição SIM gerado através da análise com <i>MIA COVs 14</i> de solução-padrão a 0,25 µg/L preparada através da S.I. 1 e extraída com fibra CAR-PDMS.....	85

Figura 48: Cromatograma com modo de aquisição SIM gerado através da análise com <i>MIA COVs 15</i> de solução-padrão a 0,25 µg/L preparada através da S.I. 1 e extraída com fibra CAR-PDMS.....	86
Figura 49: Gráfico da área do pico cromatográfico do bromofórmio em função da duração de surge.....	86
Figura 50: Cromatograma com modo de aquisição SIM gerado através da análise com <i>MIA COVs 16</i> de solução-padrão a 0,25 µg/L preparada através da S.I. 1 e extraída com fibra CAR-PDMS.....	87
Figura 51: Cromatograma com modo de aquisição full scan gerado através da análise com <i>MIA COVs 16</i> de solução-padrão a 0,25 µg/L preparada através da S.I. 2 e extraída com fibra CAR-PDMS	88
Figura 52: Cromatograma com modo de aquisição SIM gerado através da análise com <i>MIA COVs 17</i> de solução-padrão a 0,25 µg/L preparada através da S.I. 1 e extraída com fibra CAR-PDMS.....	88
Figura 53: Cromatograma com modo de aquisição full scan gerado através da análise com <i>MIA COVs 17</i> de solução-padrão a 0,25 µg/L preparada através da S.I. 2 e extraída com fibra CAR-PDMS	89
Figura 54: Gráfico da área dos picos cromatográficos dos COVs em função da duração de surge.....	89
Figura 55: Cromatograma com modo de aquisição SIM gerado através da análise com <i>MIA COVs 17</i> de solução-padrão a 0,25 µg/L preparada através da S.I. 3 e extraída com fibra CAR-PDMS.....	90
Figura 56: Cromatograma com modo de aquisição SIM gerado através da análise com <i>MIA COVs 18</i> de solução-padrão a 0,25 µg/L preparada através da S.I. 3 e extraída com fibra CAR-PDMS.....	91
Figura 57: Cromatograma com modo de aquisição SIM gerado através da análise com <i>MIA COVs 19</i> de solução-padrão a 0,25 µg/L preparada através da S.I. 3 e extraída com fibra CAR-PDMS.....	91
Figura 58: Gráfico da área dos picos cromatográficos dos COVs em função do tempo de extração.....	92

Figura 59: Cromatograma com modo de aquisição SIM gerado através da análise com <i>MIA COVs 20</i> de solução-padrão a 0,25 µg/L preparada através da S.I. 3 e extraída com fibra CAR-PDMS.....	93
Figura 60: Ampliação do cromatograma com modo de aquisição SIM gerado através da análise com <i>MIA COVs 20</i> de solução-padrão a 0,25 µg/L preparada através da S.I. 3 e extraída com fibra CAR-PDMS	94
Figura 61: Ampliação do cromatograma com modo de aquisição SIM gerado através da análise com <i>MIA COVs 21</i> de solução-padrão a 0,25 µg/L preparada através da S.I. 3 e extraída com fibra CAR-PDMS	94
Figura 62: Gráfico da área do pico cromatográfico do cloreto de vinilo em função do tempo de extração	95
Figura 63: Cromatograma com modo de aquisição SIM gerado através da análise com <i>MIA COVs 16</i> de solução-padrão a 0,50 µg/L preparada através da S.I. 3 e extraída com fibra CAR-PDMS.....	96
Figura 64: Cromatograma com modo de aquisição SIM gerado através da análise com <i>MIA COVs 24</i> de solução-padrão a 0,50 µg/L preparada através da S.I. 3 e extraída com fibra CAR-PDMS.....	97
Figura 65: Cromatogramas das $m/z=48$, $m/z=57$ e $m/z=62$ obtidos com modo de aquisição full scan através da análise com <i>MIA ECH Inject Liquid 1</i> de solução-padrão a 1000 µg/L preparada a partir da S.I. 4 e extraída com seringa de injeção de líquidos	109
Figura 66: Biblioteca de espectros de massas com identificação do composto 2,2-dimetoxibutano	110
Figura 67: Cromatogramas das $m/z=48$, $m/z=57$ e $m/z=62$ obtidos com modo de aquisição SIM através da análise com <i>MIA ECH Inject Liquid 2</i> de solução-padrão a 1000 µg/L preparado a partir da S.I. 4 e extraído com seringa de injeção de líquidos	110
Figura 68: Biblioteca de espectros de massas usada para identificação da epicloridrina e determinação do seu RT.....	111
Figura 69: Cromatogramas da $m/z=57$ obtidos com modo de aquisição SIM através da análise com <i>MIA ECH Inject Liquid 2</i> de soluções-padrão a 250 µg/L (cima) e 500 µg/L (baixo) preparadas a partir da S.I. 4 e extraídas com seringa de injeção de líquidos	111

Figura 70: Cromatograma da $m/z=57$ obtido com modo de aquisição SIM através da análise com <i>MIA ECH Inject Liquid 2</i> de amostra de metanol injetada com seringa de injeção de líquidos	112
Figura 71: Cromatograma da $m/z=57$ obtido com modo de aquisição SIM através da análise com <i>MIA ECH 1</i> de amostra de branco.....	113
Figura 72: Gráfico da área do pico cromatográfico da epicloridrina em função da temperatura de extração.....	114
Figura 73: Gráfico da área do pico cromatográfico da epicloridrina em função da duração de agitação	115
Figura 74: Gráfico da área do pico cromatográfico da epicloridrina em função do tempo de extração.....	116
Figura 75: Gráfico da área do pico cromatográfico da epicloridrina em função do modo de injeção	117
Figura 76: Curvas de calibração dos iões de quantificação ($m/z=57$) e confirmação ($m/z=49$ e $m/z=62$) da epicloridrina.....	118
Figura 77: Cromatogramas da $m/z=57$ com modo de aquisição SIM gerados através da análise com <i>MIA ECH 19</i> de soluções-padrão entre 0,025 $\mu\text{g/L}$ e 1,0 $\mu\text{g/L}$ preparadas através da S.I. 4 e extraídas com fibra CAR-PDMS.....	118
Figura 78: Cromatogramas da $m/z=57$ com modo de aquisição SIM gerados através da análise com <i>MIA ECH 19</i> de amostras de água desionizada de diferentes origens e engarrafada	119
Figura 79: Curva de calibração da epicloridrina	120
Figura 80: Cromatogramas da $m/z=57$ com modo de aquisição SIM gerados através da análise com <i>MIA ECH 19</i> de amostras de água da torneira com fortificação de soluções-padrão a 0,025 $\mu\text{g/L}$ e 0,20 $\mu\text{g/L}$ preparados através da S.I. 4 e extraídos com fibra CAR-PDMS	121
Figura 81: Cromatogramas das $m/z=49$ e $m/z=62$ com modo de aquisição SIM gerados através da análise com <i>MIA ECH 19</i> de amostras de água da torneira tal e qual, e com fortificação de soluções-padrão a 0,025 $\mu\text{g/L}$ e 0,20 $\mu\text{g/L}$, preparados através da S.I. 4 e extraídos com fibra	121

Figura 82: Cromatogramas da $m/z=57$ com modo de aquisição SIM gerados através da análise com diferentes MIAs de amostras de água da torneira com fortificação de padrão a $0,50 \mu\text{g/L}$, preparado através da S.I. 4 e extraído com fibra CAR-PDMS.....	123
Figura 83: Curvas de calibração de soluções-padrão de epicloridrina preparados em água da torneira e em água desionizada com adição de $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	124
Figura 84: Cromatogramas da $m/z=57$ obtidos com modo de aquisição SIM através da análise com <i>MIA ECH 21</i> de amostra de água desionizada e água desionizada com adição de $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	125
Figura 85: Cromatogramas da $m/z=57$ obtidos com modo de aquisição SIM através da análise com <i>MIA ECH 21</i> de amostra de água da torneira e água da torneira com adição de $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	125

LISTA DE ABREVIATURAS

AEDP	ÁGUAS E ENERGIA DO PORTO
CAR-PDMS	CARBOXENO-POLIDIMETILSILOXANO
CI	IONIZAÇÃO QUÍMICA
COVS	COMPOSTOS ORGÂNICOS VOLÁTEIS
CV	COEFICIENTE DE VARIAÇÃO
DC	CORRENTE CONTÍNUA
DNA	ÁCIDO DESOXIRRIBONUCLEICO
DVB-CAR-PDMS	DIVINILBENZENO-CARBOXENO-POLIDIMETILSILOXANO
EI	IONIZAÇÃO ELETRÓNICA
E.M.	EMPRESA MUNICIPAL
EPA	AGÊNCIA DE PROTEÇÃO AMBIENTAL DOS ESTADOS UNIDOS DA AMÉRICA
ERSAR	ENTIDADE REGULADORA DOS SERVIÇOS DE ÁGUAS E RESÍDUOS
FCUP	FACULDADE DE CIÊNCIAS DA UNIVERSIDADE DO PORTO
GC	CROMATOGRAFIA GASOSA
GC-MS	CROMATOGRAFIA GASOSA ACOPLADA A ESPETROMETRIA DE MASSA
GLC	CROMATOGRAFIA GÁS-LÍQUIDO
GSC	CROMATOGRAFIA GÁS-SÓLIDO
HPLC	CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA
HS	<i>HEADSPACE</i>
HS-SPME	MICROEXTRAÇÃO EM FASE SÓLIDA EM <i>HEADSPACE</i>
HS-SPME-GC-MS	MICROEXTRAÇÃO EM FASE SÓLIDA EM <i>HEADSPACE</i> E CROMATOGRAFIA GASOSA ACOPLADA A ESPETROMETRIA DE MASSA
IARC	AGÊNCIA INTERNACIONAL DE PESQUISA DO CANCRO
IPAC	INSTITUTO PORTUGUÊS DE ACREDITAÇÃO
KH	CONSTANTE DE HENRY
LD	LIMITE DE DETEÇÃO
LQ	LIMITE DE QUANTIFICAÇÃO
MIA	MÉTODO INSTRUMENTAL DE ANÁLISE
MP	MÉTODO DE PROCESSAMENTO

MS	ESPETROMETRIA DE MASSA
NIH	INSTITUTOS NACIONAIS DE SAÚDE DOS ESTADOS UNIDOS DA AMÉRICA
NIST	INSTITUTO NACIONAL DE PADRÕES E TECNOLOGIA DOS ESTADOS UNIDOS DA AMÉRICA
OMS	ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE
ONU	ORGANIZAÇÃO DAS NAÇÕES UNIDAS
PCQA	PROGRAMA DE CONTROLO DE QUALIDADE DA ÁGUA
PDMS	POLIDIMETILSILOXANO
PDMS-DVB	POLIDIMETILSILOXANO-DIVINILBENZENO
PTFE	POLITETRAFLUORETILENO
PVC	POLICLORETO DE VINILO
PVRLA	PLANO DE VALORIZAÇÃO E REABILITAÇÃO DAS LINHAS DE ÁGUA
RF	RADIOFREQUÊNCIA
RT	TEMPO DE RETENÇÃO
S.I.	SOLUÇÃO INTERMÉDIA
SIM	MONITORIZAÇÃO SELETIVA DE IÕES
SMAS	SERVIÇOS MUNICIPALIZADOS DE ÁGUA E SANEAMENTO
SPME	MICROEXTRAÇÃO EM FASE SÓLIDA
THMS	TRIHALOMETANOS
TIC	CROMATOGRAMA IÓNICO TOTAL

LISTA DE SÍMBOLOS

C_2Cl_4	TETRACLOROETENO
CH_4	METANO
C_4H_{10}	ISOBUTANO
C_6H_6	BENZENO
$CHBr_3$	BROMOFÓRMIO
$CHBrCl_2$	BROMODICLOROMETANO
$CHBr_2Cl$	DIBROMOCLOROMETANO
$CHCl_3$	CLOROFÓRMIO
C_2HCl_3	TRICLOROETENO
C_2H_3Cl	CLORETO DE VINILO
$C_2H_4Cl_2$	1,2-DICLOROETANO
C_3H_5ClO	EPICLORIDRINA
CH_3OH	METANOL
CO_2	DIÓXIDO DE CARBONO
H_2	HIDROGÉNIO
He	HÉLIO
N_2	AZOTO
NH_3	AMONÍACO
$Na_2S_2O_3$	TIOSSULFATO DE SÓDIO
$Na_2S_2O_3 \cdot 5H_2O$	TIOSSULFATO DE SÓDIO PENTAHIDRATADO
SiO_2	SÍLICA

1. INTRODUÇÃO

1.1. LOCAL DE ESTÁGIO

O Estágio Curricular foi realizado no Laboratório da empresa Águas e Energia do Porto, Empresa Municipal (AEdP, E.M.) (Figura 1), mais concretamente na Área de Química Orgânica, no âmbito da Unidade Curricular “Estágio”, do 2º ano do Mestrado em Biologia e Gestão da Qualidade da Água, lecionado pela Faculdade de Ciências da Universidade do Porto (FCUP), correspondente ao ano letivo de 2023/2024. Este Estágio teve a duração de aproximadamente 11 meses, tendo tido início a 18 de setembro de 2023 e término a 31 de agosto de 2024. A carga horária diária foi de 7 horas, com horário de trabalho das 09h30 às 17h30, de segunda-feira a sexta-feira.



Figura 1: Laboratório da empresa Águas e Energia do Porto, E.M

A 1 de abril de 1927, foram criados os “Serviços Municipalizados de Água e Saneamento do Porto” (SMAS do Porto), com o objetivo de melhorar a qualidade de vida dos portuenses, bem como o meio ambiente da cidade do Porto, por meio de um serviço de excelência que assegurasse o fornecimento constante de água com qualidade e o tratamento completo das suas águas residuais [1]. No entanto, a necessidade de grandes investimentos ao nível de captação e tratamento de água levaram à constituição de uma empresa de capitais públicos – “Águas do Douro e Paiva” – que, a

partir de janeiro de 1998, passou a garantir o abastecimento “em alta” à Área Metropolitana do Porto [1], isto é, o conjunto de componentes que se encontra a montante da rede de distribuição, fazendo a ligação do meio hídrico ao sistema “em baixa” que, por sua vez, corresponde ao conjunto de componentes que permitem prestar aos consumidores o serviço de abastecimento de água [2]. Com a fundação desta empresa, os SMAS passaram a garantir apenas a distribuição “em baixa” de água na cidade [1].

Em outubro de 2006, surge uma nova alteração ao nível do paradigma do saneamento e ciclo urbano da água no município do Porto: a constituição da empresa “Águas do Porto, Empresa Municipal”, uma empresa municipal cujo capital social é detido, na sua totalidade, pela Câmara Municipal do Porto [1]. Esta empresa veio dar continuidade aos serviços prestados pelos antigos SMAS do Porto, tendo como principal objetivo social a gestão integrada e sustentável de todo o ciclo urbano da água no município do Porto [1]. Em novembro de 2020, junta-se a este objetivo a definição e execução da estratégia energética municipal, passando a empresa a denominar-se de “Águas e Energia do Porto, Empresa Municipal” (AEdP, E.M.) [1]. Deste modo, atualmente, as atividades a que a empresa se dedica passam, nomeadamente, por: distribuição de água (sistema em baixa), drenagem e tratamento de águas residuais (sistemas em baixa e em alta), drenagem de águas pluviais, gestão das linhas de água (rios e ribeiras urbanas), gestão da frente marítima, gestão da energia e promoção da educação ambiental e da sustentabilidade [1].

A AEdP, E.M. garante igualmente, e de forma permanente, a qualidade da água que distribui na cidade [3]. Para tal, a empresa tem um Laboratório que se divide em quatro Áreas: Qualidade e Amostragem, Microbiologia, Química Geral e Química Orgânica. O Laboratório integra a lista de laboratórios aptos, emitida pela Entidade Reguladora dos Serviços de Águas e Resíduos (ERSAR), no âmbito do Decreto-Lei nº 306/2007 de 27 de agosto [4], com as alterações introduzidas pelo Decreto-Lei nº 69/2023 de 21 de agosto [5], entidade esta que aprova igualmente o Programa de Controlo de Qualidade da Água (PCQA) elaborado pelo Laboratório ao abrigo deste mesmo Decreto-Lei [3].

Para além deste programa, o Laboratório elabora e cumpre um Plano de Controlo Operacional, permitindo assim uma avaliação fidedigna e rigorosa da qualidade da água de consumo humano, desde o ponto de entrega até ao consumidor final. Paralelamente ao cumprimento destes dois planos de controlo da qualidade da água para consumo

humano, o Laboratório presta serviços diretamente a consumidores e clientes individuais relacionados com a análise de águas, colaborando igualmente, sempre que solicitado, com a Delegação de Saúde, a Agência Portuguesa do Ambiente, e com a ERSAR [6].

O Laboratório encontra-se reconhecido e acreditado para um conjunto de Atividades desde o ano de 2000, encontrando-se atualmente Acreditado pelo Instituto Português de Acreditação, I.P. (IPAC), segundo a norma NP EN ISO/IEC 17025 [3, 7]. Em Portugal, o IPAC constitui o organismo nacional de acreditação – conforme disposto no Decreto-Lei n.º 23/2011 de 11 de fevereiro [8] – sendo membro da infraestrutura europeia de Acreditação, a *European cooperation for Accreditation* (EA), bem como das estruturas mundiais de Acreditação, a *International Laboratory Accreditation Cooperation* (ILAC) e a *International Accreditation Forum* (IAF) [9]. A atividade de Acreditação prende-se com a avaliação e reconhecimento da competência técnica de entidades para efetuar atividades específicas de avaliação da conformidade, que consiste, nomeadamente, na condução de ensaios, calibrações, inspeções, certificações e verificações [10]. As atividades de avaliação da conformidade visam, normalmente, demonstrar que determinado bem, produto, processo ou serviço cumpre com os requisitos que lhe são aplicáveis [10]; em determinados casos, nomeadamente nos ensaios de análise de água destinada ao consumo humano, a avaliação da conformidade é legalmente exigida, estando, neste caso, relacionada com a garantia de segurança da água e do serviço de abastecimento [10].

A 28 de março de 2018, o Laboratório obteve a Acreditação Flexível Intermédia [3], que admite a capacidade ao Laboratório para implementar novas versões de documentos normativos no âmbito da Acreditação, pressupondo-se que a nova versão apresente características similares à anterior e requeira competências similares, nomeadamente ao nível dos princípios de medição, tecnologia (equipamentos), validação, calibração, controlo da qualidade, aprendizagem e formação [11].

A 26 de agosto de 2020, o Laboratório obteve a Acreditação Flexível Global [3], que permite ao Laboratório definir e manter uma Lista de Ensaios, dentro do enquadramento de competência dado pelo Anexo Técnico, que apresenta os ensaios/tipos de ensaios e produtos/tipos de produtos para os quais se reconhece a competência técnica para o Laboratório atuar [11]. A modalidade de gestão de uma Lista de Ensaios sob Acreditação Flexível Global pode ser Flexível Global Tipo A, que confere ao Laboratório

a capacidade de implementar métodos normalizados e adicioná-los à Lista, ou Flexível Global Tipo B, que confere ao Laboratório a capacidade de implementar métodos desenvolvidos internamente ou adaptados pelo Laboratório e adicioná-los à Lista [11].

O Laboratório da AEdP, E.M. é dotado de Acreditação Flexível Global Tipo B, para os Ensaio de Determinação de Aniões por Cromatografia Iónica (fluoretos, cloretos, fosfatos, nitratos, nitritos e sulfatos) e Determinação de Catiões por Cromatografia Iónica (sódio, potássio, azoto amoniacal, cálcio e magnésio) em águas destinadas ao consumo humano e naturais doces (superficiais e subterrâneas), bem como de Acreditação Flexível Global Tipo B para os Ensaio de Determinação de trihalometanos (THMs) – clorofórmio (CHCl_3), bromodiclorometano (CHBrCl_2), dibromoclorometano (CHBr_2Cl) e bromofórmio (CHBr_3) – bem como de tricloroeteno (C_2HCl_3) e tetracloroeteno (C_2Cl_4) através da metodologia de microextração em fase sólida em *headspace* e cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa (HS-SPME-GC-MS, do inglês *solid-phase microextraction-gas chromatography-mass spectrometry*) em águas destinadas ao consumo humano e águas naturais doces subterrâneas [12, 13]. O estatuto de Laboratório Acreditado é conferido através da implementação de sistemas de garantia da qualidade, ficando sujeito a auditorias externas regulares efetuadas por equipas constituídas por avaliadores externos credenciados.

A atividade principal do Laboratório prende-se com o controlo da qualidade da água do sistema de abastecimento para consumo humano e do sistema de águas residuais [3]. Para além disso, o Laboratório analisa igualmente a qualidade da água balnear, no âmbito do Programa Bandeira Azul, e da água que corre nas ribeiras do Porto, ao abrigo do Plano de Valorização e Reabilitação das Linhas de Água (PVRLA) [3]. A acreditação das colheitas e dos métodos de ensaios realizados pela AEdP, E.M. vem atestar a credibilidade, reconhecer a competência técnica e conferir transparência a todo o processo de avaliação do controlo da qualidade da água analisada, permitindo assim salvaguardar a saúde pública [3].

1.2. OBJETIVOS

Conforme referido anteriormente, o Laboratório da AEdP, E.M., encontra-se acreditado pelo IPAC para a análise de THMs, tricloroeteno e tetracloroeteno, em água destinada ao consumo humano e águas naturais doces subterrâneas, encontrando-se em processo de acreditação para a análise destes mesmos compostos em águas de piscina e águas naturais doces superficiais.

O principal objetivo do presente trabalho passou pelo desenvolvimento, implementação e validação de métodos analíticos que permitissem a determinação de outros compostos orgânicos voláteis (COVs) de monitorização obrigatória em água destinada ao consumo humano ao abrigo do Decreto-Lei nº 69/2023 de 21 de agosto que ainda não se encontravam implementados para análise pelo Laboratório, mais concretamente benzeno (C_6H_6), 1,2-dicloroetano ($C_2H_4Cl_2$), cloreto de vinilo (C_2H_3Cl) e epicloridrina (C_3H_5ClO), para amostras de água através da mesma metodologia (HS-SPME-GC-MS), para posterior acreditação pelo IPAC.

Os THMs, tricloroetano, tetracloroetano, benzeno, 1,2-dicloroetano, cloreto de vinilo e epicloridrina constituem parâmetros a analisar no âmbito dos controlos de inspeção por parte das entidades gestoras para verificação da conformidade da água fornecida numa zona de abastecimento em baixa por uma rede de distribuição, por fontanários, por cisternas móveis ou fixas ou fornecida para uma empresa da indústria alimentar e de águas colocadas à venda em garrafas ou outros recipientes, cujas frequências de monitorização dependem do volume de água distribuída ou produzida diariamente [5].

A condução dos ensaios para validação dos Métodos Instrumentais de Análise (MIAs) desenvolvidos foi efetuada de acordo com o descrito pelo Procedimento Interno do Laboratório *Validação e Verificação de Métodos de Ensaio – Físico-Química* [14] para os métodos aplicados a cromatografia acoplada a espectrometria de massa, bem como pelo *Guia RELACRE 13* [15], baseados na norma internacional para calibração e avaliação de métodos analíticos relativos à qualidade da água ISO 8466-1 [16], publicada e revista em 2021. Os ensaios efetuados incidiram sobre os parâmetros da Linearidade, Repetibilidade, Limite de Quantificação, Recuperações, Seletividade e Especificidade, para definir e validar as Gamas de Trabalho dos diferentes compostos, tendo sido igualmente realizado um Ensaio Interlaboratorial através do método desenvolvido para a determinação de THMs, tricloroetano, tetracloroetano, benzeno e 1,2-dicloroetano.

Para além do desenvolvimento, implementação e validação do método referido, outras atividades desenvolvidas durante o Estágio passaram pela participação em análises de rotina de THMs, tricloroetano e tetracloroetano efetuadas no Laboratório através do método acreditado.

Com o presente trabalho, pretende dar-se continuidade ao trabalho desenvolvido pelo Laboratório no avanço de novos procedimentos e metodologias para assegurar a

avaliação mais fidedigna da qualidade da água, de modo a zelar pela segurança e garantindo a confiança dos habitantes da Área Metropolitana do Porto, bem como dos utilizadores do seu sistema de abastecimento.

2. COMPOSTOS ORGÂNICOS VOLÁTEIS

2.1. DEFINIÇÃO

De acordo com o Conselho da União Europeia, define-se como COV qualquer composto orgânico, bem como a fração de creosoto, que apresente à temperatura de 293,15 K (0 °C) uma pressão de vapor de 0,01 kPa ou mais, ou apresentando uma volatilidade correspondente nas condições particulares de utilização [17], ou ainda como qualquer composto orgânico com uma temperatura de ebulição inicial ≤ 250 °C a uma pressão de 101,3 kPa [18]. Existem ainda outras definições para os COVs, baseadas nomeadamente nos efeitos que estes provocam a nível ambiental; por exemplo, a Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos da América (EPA, do inglês *Environmental Protection Agency*) classifica como COVs os compostos químicos que contribuem para a formação de ozono fotoquímico [19].

Os COVs caracterizam-se por apresentarem elevada volatilidade e mobilidade, bem como forte resistência à degradação, o que lhes permite serem transportados por longas distâncias no meio ambiente após a sua libertação sob a forma gasosa [20]. Entre as principais subclasses de COVs encontram-se os compostos orgânicos halogenados, hidrocarbonetos aromáticos monocíclicos, sulfetos e sulfóxidos orgânicos, acetona e ésteres [21].

Assim, há diferentes características que determinados compostos químicos apresentam que se correlacionam com a volatilidade dos mesmos. Relativamente à pressão de vapor – i.e., a medida de tendência de evaporação de um composto – quanto mais alta esta for, mais volátil será o composto; quanto à temperatura de ebulição, quanto mais alta esta for, menos volátil será o composto [21]. Desta forma, a volatilidade dos compostos pode ser definida e classificada de acordo com a pressão de vapor e temperatura de ebulição dos mesmos.

2.2. FONTES NATURAIS E ANTROPOGÉNICAS

As fontes de emissão de COVs podem ser tanto de origem natural como antropogénica [21]; apesar de, a nível global, estes compostos provirem mais de fontes naturais do que

antropogénicas, é nas áreas urbanas que há uma maior concentração de COVs, pelo que as fontes antropogénicas são aquelas que suscitam maior preocupação [21, 22].

Relativamente às fontes naturais de emissão de COVs, estas incluem a combustão causada por incêndios e vulcanismo, processos anaeróbicos em pântanos e outros sistemas lênticos, e vegetação [23, 24]; de facto, a maior parte das plantas apresenta a capacidade de emitir COVs através de diversos órgãos, tais como frutos, flores, folhas, caule e raízes, enquanto mecanismo de defesa contra insetos, atração de polinizadores, comunicação entre plantas e interações com os seus agentes patogénicos, bem como enquanto resposta a estímulos ambientais como luz, temperatura, cheias e secas [24, 25]. *Fischer e Dott* [26] relataram também COVs de origem microbiana, gerados por metabolitos microbianos transportados pelo ar, bem como por esporos de fungos. Uma outra fonte relevante de emissão de COVs, ainda que despoletada em larga escala pela intervenção humana, é o gado bovino; anualmente, cerca de 1,5 biliões de bovinos criados para a produção de carne a nível global, são responsáveis pela emissão de aproximadamente $1,05 \times 10^{11}$ kg de metano (CH_4) para a atmosfera [27].

Quanto às fontes antropogénicas de emissão de COVs, estas subdividem-se em domésticas e industriais [24]. Entre as fontes domésticas, encontram-se descritas na literatura perfumes, fumo de tabaco, tintas, plásticos, espumas para isolamento e água da torneira previamente sujeita a desinfeção por cloração, entre outras [28, 29]. Entre as fontes industriais, destacam-se resíduos urbanos, tráfego automóvel, indústrias petrolíferas e agricultura, derivado do uso de combustíveis, queima de resíduos agrícolas e uso de COVs enquanto ingredientes inertes em pesticidas [21, 30].

A capacidade de haver contaminação por COVs na água, quer a nível superficial quer a nível subterrâneo, constitui um problema de saúde pública. Globalmente, a água subterrânea constitui uma das fontes de água doce mais importantes, na medida em que é amplamente usada para fins domésticos, agrícolas e industriais [31]; para além disso, aproximadamente um terço da população global depende da água subterrânea para consumo [32], pelo que a salvaguarda deste recurso e a sua proteção contra contaminantes se revela de extrema importância, particularmente em regiões áridas e semiáridas, nas quais a ocorrência de águas superficiais e precipitação são limitadas [33]. Os derrames em tanques sépticos nos quais a matéria orgânica dos efluentes não foi completamente degradada, os aterros sanitários e os resíduos urbanos encontram-se entre os principais focos de contaminação de COVs na água subterrânea [34]. A

atmosfera constitui igualmente uma via de entrada de COVs na água subterrânea através da precipitação [24]; de facto, a água precipitada entra nas zonas de recarga e é posteriormente transportada por difusão na zona não-saturada, levando à possível contaminação destas reservas de água [24].

Uma vez na água subterrânea, os COVs são transportados através de distâncias relativamente longas, devido às suas relativas baixas capacidades de sorção, bem como pela sua resistência à degradação por fenómenos naturais [35]. Comparativamente, os COVs encontram-se usualmente em menores concentrações na água superficial, uma vez que, pelo facto de serem altamente voláteis, evaporam facilmente para a atmosfera, tendo por isso um tempo de residência curto nestas águas [24].

2.3. RISCOS

A nível ambiental, os COVs contribuem de forma direta para o aquecimento global, uma vez que estes gases apresentam a capacidade de absorver radiação infravermelha emitida pela superfície terrestre, aumentando a sua concentração na atmosfera e, consequentemente, a temperatura atmosférica [36]. Estes compostos são também responsáveis por fenómenos que levam ao aumento do efeito de estufa, nomeadamente a formação de oxidantes fotoquímicos ao nível da troposfera – tais como o ozono – e a depleção de ozono ao nível da estratosfera, o que conduz ao aumento da radiação solar que atravessa a atmosfera terrestre [36, 37].

O tipo de efeito e a gravidade despoletados por COVs a nível da saúde humana depende da duração e da concentração de exposição a estes compostos, bem como do tipo específico de COV a que se é exposto [24]. O consumo de água contaminada com COVs indevidamente tratada é potencialmente nocivo, uma vez que estes compostos, bem como os seus intermediários reativos e produtos de decomposição, apresentam propriedades carcinogénicas, mutagénicas e teratogénicas [38, 39]. Para além da via oral, outras vias de exposição aos COVs, tais como através da derme e por inalação, podem ser tão significativas como a via oral, tendo em determinadas situações um impacto ainda mais considerável do que esta [24]. A nível fisiológico, salientam-se ainda outros efeitos nocivos induzidos pelos COVs, nomeadamente patologias renais, hematológicas, neurológicas e hepáticas, bem como irritações oculares, produção de mucosa nasofaríngea, tonturas e dores de cabeça [23].

Em suma, são vários os problemas ambientais e epidemiológicos causados pela emissão de COVs, o que, associado à sua toxicidade e persistência no meio ambiente, faz da análise destes compostos um assunto de interesse crescente e de importância premente no âmbito das ciências ambientais e da saúde pública [21].

2.4. COMPOSTOS ORGÂNICOS VOLÁTEIS DE DETERMINAÇÃO OBRIGATÓRIA NA ÁGUA DESTINADA AO CONSUMO HUMANO

2.4.1. TRIHALOMETANOS

Há aproximadamente cinco décadas atrás, Rook [40] relatou pela primeira vez a formação de subprodutos de desinfecção na água previamente sujeita ao processo de cloração – os THMs. Estes subprodutos correspondem a um grupo de compostos formados quando o cloro usado no processo de desinfecção de água destinada ao consumo humano reage com matéria orgânica presente naturalmente na água em estado bruto, tal como folhas em decomposição e vegetação [40]; desta interação, resulta então a formação de clorofórmio, bromodiclorometano, dibromoclorometano e bromofórmio [40].

Os THMs tratam-se de compostos organohalogenados, pelo que não são degradados nem digeridos pelo ser humano, acumulando-se ao nível dos tecidos adiposos [41]. Estes compostos são potencialmente genotóxicos e mutagénicos para o ser humano, encontrando-se descrito na literatura o desenvolvimento de tumores associado ao consumo contínuo de água com concentrações excessivas dos subprodutos de desinfecção por cloro, nomeadamente ao nível do cólon, retal e da bexiga [42-45]. Para além disso, alguns estudos apontam para uma associação entre a exposição contínua e em concentrações elevadas a estes compostos, em particular ao clorofórmio, e um maior risco na ocorrência de abortos espontâneos e defeitos ao nível dos fetos durante a gestação, tais como atrasos no desenvolvimento [46, 47]; no entanto, não há evidências conclusivas de que os THMs afetem o desenvolvimento da gravidez, e os estudos que relacionam a exposição a concentrações elevadas de THMs com um menor peso dos bebés aquando o seu nascimento são limitados e inconclusivos [41, 48].

A Agência Internacional de Investigação em Cancro (IARC, do inglês *International Agency for Research on Cancer*), pertencente à Organização Mundial da Saúde (OMS) das Nações Unidas (ONU), classifica compostos com base no seu potencial cancerígeno no ser humano em cinco categorias [49]:

Grupo 1: Cancerígeno para o ser humano, existindo evidências suficientes de que o composto pode induzir o desenvolvimento de tumores no ser humano.

Grupo 2A: Provavelmente cancerígeno para o ser humano, existindo evidências fortes mas não conclusivas de que o composto pode induzir o desenvolvimento de tumores no ser humano.

Grupo 2B: Possivelmente cancerígeno para o ser humano, existindo algumas evidências não conclusivas de que o composto pode induzir o desenvolvimento de tumores no ser humano.

Grupo 3: Não classificável como cancerígeno para o ser humano, não existindo evidências de que o composto possa induzir o desenvolvimento de tumores no ser humano.

Grupo 4: Provavelmente não cancerígeno para o ser humano, existindo evidências fortes de que o composto não induz o desenvolvimento de tumores no ser humano.

De acordo com o IARC, o clorofórmio encontra-se categorizado no Grupo 2B (possivelmente cancerígeno), com base em evidências limitadas relativamente ao potencial cancerígeno deste composto no ser humano e em evidências suficientes da sua carcinogenicidade em animais de laboratório [49]. O bromodiclorometano encontra-se igualmente categorizado no Grupo 2B (possivelmente cancerígeno), tendo induzido tanto resultados negativos como positivos em ensaios genotóxicos realizados *in vitro* e *in vivo* em ratos de laboratório [49]. Já o dibromoclorometano e o bromofórmio encontram-se ambos categorizados no Grupo 3 (não classificáveis como cancerígenos), tendo a genotoxicidade destes compostos sido estudada em diversos ensaios que, no entanto, não originaram dados conclusivos [49].

O Decreto-Lei n.º 69/2023 de 21 de agosto [5] estabelece para os THMs o valor paramétrico de 100 µg/L – ou de 80 µg/L no caso das entidades gestoras em alta responsáveis pelo tratamento da água ao nível dos pontos de entrega – sendo estes valores paramétricos correspondentes à soma das concentrações do clorofórmio, bromodiclorometano, dibromoclorometano e bromofórmio na água destinada ao consumo humano.

2.4.2. TRICLOROETENO E TETRACLOROETENO

O tricloroeteno constitui um composto químico que, até à década de 90 do século XX, era amplamente usado como desengordurante de peças metálicas, tendo sido igualmente usado como produto de limpeza a seco entre 1930 e 1950 [50]; atualmente, o seu uso principal é na produção industrial de produtos químicos clorados [50]. Já o tetracloroeteno é um dos solventes clorados mais empregues globalmente, sendo de uso comum na limpeza a seco, desengorduramento de metais e processamento têxtil [50]; no entanto, o seu principal uso atualmente é na produção de clorofluorcarbonetos [50].

Relativamente às vias de exposição mais comuns pela generalidade da população ao tricloroeteno e tetracloroeteno, destacam-se a limpeza a seco e a contaminação ambiental, quer através do ar (contacto com a pele e/ou inalação), quer através da ingestão de água contaminada com estes compostos [50, 51]. Apesar da maior parte das aplicações destes compostos não implicarem um contacto direto entre estes e a água, a sua entrada no meio hídrico torna-se possível devido, num momento inicial, à sua volatilização para a atmosfera e, num momento posterior, a eventuais fenómenos de precipitação, que possibilitam a introdução de tricloroeteno e tetracloroeteno não só em águas superficiais, como também subterrâneas, por infiltração e percolação da água no subsolo.

Uma vez no organismo, o tricloroeteno conjuga-se com a glutathione, formando metabolitos com propriedades genotóxicas, nomeadamente ao nível das células renais, o que pode conduzir ao desenvolvimento de carcinomas [50]. No caso do tetracloroeteno, encontram-se descritos efeitos tóxicos deste composto ao nível dos sistemas nervoso central, renal, digestivo, imune e circulatório [52, 53]; para além disso, diferentes estudos epidemiológicos correlacionaram a exposição a tetracloroeteno com o desenvolvimento de vários tipos de cancro, nomeadamente da bexiga, esófago, rins e colo do útero, bem como de linfomas não Hodgkin [50].

De acordo com o IARC, o tricloroeteno encontra-se categorizado no Grupo 1 (cancerígeno), admitindo como suficientes os dados epidemiológicos disponíveis que associam a exposição a este composto ao desenvolvimento de cancro nos rins [49]. Já o tetracloroeteno encontra-se categorizado no Grupo 2A (provavelmente cancerígeno), tendo por base diferentes estudos epidemiológicos e toxicológicos no ser humano e em animais de laboratório, que correlacionam o desenvolvimento de tumores,

particularmente no fígado, bem como neurotoxicidade, com a exposição por inalação a este composto [49].

O Decreto-Lei n.º 69/2023 de 21 de agosto [5] estabelece para o tricloroeteno e tetracloroeteno o valor paramétrico de 10 µg/L, que corresponde à soma das concentrações de ambos os compostos na água destinada ao consumo humano.

2.4.3. BENZENO

O benzeno corresponde ao composto aromático mais simples, sendo a sua estrutura molecular um anel com seis átomos de carbono, cada um ligado a um átomo de hidrogénio; esta estrutura constitui a base para todos os hidrocarbonetos aromáticos, uma vez que todos eles apresentam pelo menos um anel de benzeno, também denominado de anel aromático [54, 55]. O benzeno é um excelente solvente, sendo usado no fabrico de plásticos, resinas, fibras sintéticas, corantes, detergentes, medicamentos e pesticidas [55].

O benzeno é um componente de produtos petrolíferos, nomeadamente gasolina, pelo que as emissões de fumo de viaturas automóveis e das indústrias petrolíferas conduzem à presença deste composto na atmosfera, o que faz com que a inalação seja a principal via de exposição ao benzeno [55-57]. Para além dos produtos petrolíferos, o benzeno também se encontra presente no fumo de tabaco, pelo que os indivíduos fumadores ou que estão habitualmente expostos a fumo de tabaco têm uma exposição superior a este composto [57]. Entre as fontes naturais de emissão de benzeno, destacam-se as emissões resultantes de incêndios [55]. Tal como referido anteriormente para o tricloroeteno e tetracloroeteno, apesar deste composto se encontrar sobretudo na atmosfera, a presença de benzeno na água torna-se possível devido à ocorrência de precipitação, por exemplo.

A exposição aguda a concentrações elevadas de benzeno afeta o ser humano sobretudo ao nível do sistema nervoso central [49]. A exposição crónica a concentrações mais baixas deste composto encontra-se também associada ao desenvolvimento de doenças do sistema hematopoiético, nomeadamente leucemia e anemia aplásica [57].

De acordo com o IARC, o benzeno encontra-se categorizado no Grupo 1 (cancerígeno), tendo por base diferentes evidências, nomeadamente a indução de tumores em animais de laboratório após exposição ao composto por via oral e inalação, e a verificação de

anomalias hematológicas em animais de laboratório expostos a benzeno similares às reportadas no ser humano [49]; para além disso, verificou-se que o benzeno conduz a aberrações cromossómicas *in vivo* em diferentes espécies, nomeadamente no ser humano [49].

O Decreto-Lei n.º 69/2023 de 21 de agosto [5] estabelece para o benzeno o valor paramétrico de 1,0 µg/L na água destinada ao consumo humano.

2.4.4. 1,2-DICLOROETANO

O 1,2-dicloroetano é um hidrocarboneto alifático halogenado, bem como um solvente sintético altamente volátil, usado predominantemente como intermediário na síntese de cloreto de vinilo, mas também de outros compostos, nomeadamente 1,1,1-tricloroetano, tricloroeteno e percloroetileno [58, 59]. O 1,2-dicloroetano pode ser encontrado na composição de diferentes materiais, tais como gasolina, plásticos, borrachas, lubrificantes, corantes e pesticidas [58, 60]. A exposição ao 1,2-dicloroetano dá-se sobretudo devido às emissões para a atmosfera – nomeadamente através do tráfego automóvel – e aos efluentes industriais, de entre os quais possíveis descargas no meio hídrico [59].

Diversos estudos epidemiológicos apontam para uma potencial associação entre a exposição crónica a produtos químicos contendo 1,2-dicloroetano com o aumento do risco de desenvolvimento de cancro no ser humano, nomeadamente do cérebro, estômago e pâncreas, bem como ao nível dos sistemas linfático e hematopoiético [61-63].

De acordo com o IARC, o 1,2-dicloroetano encontra-se categorizado no Grupo 2B (possivelmente cancerígeno); de facto, em diferentes ensaios com animais de laboratório, a exposição a este composto conduziu a um aumento significativo de diferentes tipos de tumores, sendo que a evidência aponta para este composto ser potencialmente genotóxico [49].

O Decreto-Lei n.º 69/2023 de 21 de agosto [5] estabelece para o 1,2-dicloroetano o valor paramétrico de 3,0 µg/L na água destinada ao consumo humano.

2.4.5. CLORETO DE VINILO

O cloreto de vinilo é um composto altamente reativo e tóxico, sendo produzido a partir de matérias-primas minerais e orgânicas, nomeadamente cloreto de sódio e óleos [64, 65]. Este químico é amplamente usado a nível industrial na síntese de policloreto de vinilo (PVC), um dos polímeros sintéticos de plástico com mais aplicações a nível global [65].

As vias de exposição mais comuns ao cloreto de vinilo pela generalidade da população dão-se através da inalação de ar contaminado com este composto, sobretudo em áreas próximas de indústrias ligadas à produção ou uso deste composto, ingestão de água ou outras bebidas, comida, e medicação embaladas em materiais contendo PVC, e absorção através da pele de produtos cosméticos embalados em materiais contendo PVC [66]. O PVC é também comumente empregue na composição de tubagens usadas em linhas de distribuição de água destinada ao consumo humano, pelo que há a possibilidade do cloreto de vinilo, usado na síntese deste polímero, possa ser lixiviado das tubagens para a água, resultando numa outra possível fonte de contaminação para o ser humano [67].

Em 1974 foi publicado um artigo [68] que sugeria uma correlação entre o desenvolvimento de angiossarcomas hepáticos em trabalhadores industriais e a exposição a grandes concentrações durante longos períodos de tempo ao cloreto de vinilo e materiais produzidos a partir deste a que os trabalhadores eram sujeitos. Após este estudo, surgiram outros trabalhos epidemiológicos que apontavam para a evidência de que o cloreto de vinilo era cancerígeno para o ser humano aquando uma exposição crónica a concentrações elevadas deste composto [69-72], o que conduziu a uma maior regulação na produção de PVC e aplicação de cloreto de vinilo nas indústrias no mundo ocidental [66].

De acordo com o IARC, o cloreto de vinilo encontra-se categorizado no Grupo 1 (cancerígeno), devido à existência de evidência suficiente relativa à correlação entre a exposição a grandes concentrações deste composto durante longos períodos de tempo pela população industrial com a indução de carcinogenicidade, nomeadamente cancro do fígado, angiossarcomas e carcinomas hepatocelulares [49]. Para além disso, a evidência aponta também para os metabolitos do cloreto de vinilo serem genotóxicos, interagindo diretamente com o DNA [49].

O Decreto-Lei n.º 69/2023 de 21 de agosto [5] estabelece para o cloreto de vinilo o valor paramétrico de 0,50 µg/L na água destinada ao consumo humano.

2.4.6. EPICLORIDRINA

A epicloridrina é globalmente usada como um precursor químico na produção de glicerina, plásticos, resinas epóxi e outros produtos químicos [73]. Uma vez libertada para o meio ambiente sem o tratamento adequado, a epicloridrina pode infiltrar-se nos sistemas municipais de distribuição de água, causando poluição e possivelmente contaminando os utilizadores da rede [74].

A epicloridrina é tóxica quer para o ser humano quer para outros animais através de diferentes vias de exposição, nomeadamente ingestão, inalação e contacto através da pele, sendo rapidamente absorvida pelo organismo por qualquer uma destas vias [75, 76]. Por um lado, a exposição aguda a doses elevadas de epicloridrina pode causar inchaço dos tecidos e bolhas na pele, bem como ardor nos olhos e garganta, consoante o local de contacto com o composto [77, 78]. Por outro lado, entre os efeitos a longo prazo resultantes de uma exposição crónica descrevem-se doenças cardíacas, genotoxicidade e potencial indução de cancro, conforme relatado num ensaio com animais de laboratório [79].

De acordo com o IARC, a epicloridrina encontra-se categorizada no Grupo 2A (provavelmente cancerígeno), baseado em evidências sólidas, embora não conclusivas, de que este composto induz carcinomas das células escamosas da pele na cavidade nasal após inalação, bem como cancro do estômago após exposição via oral [49].

O Decreto-Lei n.º 69/2023 de 21 de agosto [5] estabelece para a epicloridrina o valor paramétrico de 0,10 µg/L na água destinada ao consumo humano.

3. MICROEXTRAÇÃO EM FASE SÓLIDA E CROMATOGRAFIA GASOSA ACOPLADA A ESPETROMETRIA DE MASSA

3.1. CONSIDERAÇÕES GERAIS

Nas últimas décadas, a análise de COVs em amostras de água tem-se revelado como uma das tarefas mais importantes a ser realizada no âmbito da monitorização ambiental [24]. Os efeitos adversos associados à contaminação por COVs ao nível da saúde humana levaram à necessidade de desenvolvimento de técnicas analíticas simples, rápidas e fidedignas para a determinação destes compostos em amostras de água

destinadas ao consumo humano [80]; no entanto, a natureza altamente volátil dos COVs limita as técnicas analíticas que podem ser aplicadas na quantificação destes compostos [21]. A cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa (GC-MS, do inglês *gas chromatography-mass spectrometry*) consiste numa técnica analítica que permite a separação de compostos numa dada amostra para posterior deteção, sendo uma das técnicas analíticas desenvolvidas mais eficazes na determinação da presença e quantificação de COVs em água [23].

As metodologias analíticas que envolvem cromatografia gasosa para determinação de compostos em água envolvem uma etapa prévia para extrair e concentrar os analitos, tais como microextração em fase sólida (SPME), podendo esta ser executada em *headspace* (HS-SPME, do inglês *headspace solid-phase microextraction*) ou por imersão da fibra na amostra [80]. Entende-se por *headspace* (HS), ou espaço de cabeça, o volume preenchido apenas por ar que se encontra acima da amostra que se pretende analisar contida no frasco (ou *vial*), no qual ocorrem fenómenos de partição dos analitos entre a amostra a analisar e o ar, e entre o ar e o revestimento da fibra de SPME, funcionando o ar que se encontra dentro do *vial* como uma barreira entre a fibra e a amostra, de modo a proteger a fibra e eliminar contaminações por compostos de elevado peso molecular e outros interferentes não voláteis que possam estar presentes na amostra [81-83].

A técnica de SPME foi desenvolvida por Pawliszyn e colaboradores em 1990 [84], consistindo numa técnica que junta, num só passo, a extração e a pré-concentração dos compostos presentes numa dada amostra, de modo a serem posteriormente detetados e quantificados. Esta técnica é ambientalmente sustentável, uma vez que requer volumes reduzidos de amostra e não necessita do uso de solventes orgânicos para extrair os analitos, indo assim ao encontro da tendência do compromisso sustentável assumido por um crescente número de laboratórios de análise ambientais, que privilegiam o uso de técnicas que se enquadrem no conceito de química verde (ou *green chemistry*) [85]. Outras características do SPME fazem desta uma das técnicas preparativas mais usadas pelos laboratórios para análise de matrizes ambientais, nomeadamente a sua elevada capacidade de extração e pré-concentração de compostos, o facto de ser mais rápida do que outras técnicas clássicas de preparação de amostras, bem como apresentar procedimentos simples de utilização, que podem ser automatizados ou semi-automatizados [85]. Derivado destas vantagens, o SPME tornou-se numa das técnicas de extração preferenciais para acoplar com cromatografia

gasosa (GC) para a análise de COVs [86]; de facto, as amostras que apresentam os analitos a serem extraídos por SPME – por exemplo, amostras de água – são compatíveis com GC, uma vez que esta matriz é largamente reduzida ou eliminada através do processo de microextração, o que é essencial para a realização de análises em GC [86].

A técnica de GC foi desenvolvida por Martin e Synge em 1941 [87], tendo tido a sua primeira aplicação na separação de uma série de ácidos gordos em 1951 [88]. Esta foi uma das primeiras técnicas de separação cromatográfica a ser desenvolvida e, desde a sua criação, registou um rápido desenvolvimento e uma influência crescente em aplicações inovadoras, tendo sido o primeiro instrumento analítico a ser controlado por um computador [89]. Atualmente, a técnica de GC continua a desempenhar um papel importante na identificação e quantificação de poluentes ubíquos no meio ambiente, sendo uma das técnicas mais difundidas globalmente no campo da química analítica [89, 90]; a popularidade desta técnica prende-se com uma série de características favoráveis que lhe são intrínsecas, nomeadamente o facto de apresentar uma elevada seletividade, sensibilidade e poder de resolução, boa exatidão e precisão, e permitir a análise de compostos numa gama ampla de concentrações [91, 92]. Quando combinada com a técnica de espectrometria de massa (MS), fornece informações analíticas viáveis e conclusivas que permitem a identificação e quantificação de uma gama ampla de contaminantes orgânicos presentes em amostras ambientais [90].

A técnica de MS tornou-se numa ferramenta integral na área multidisciplinar de ciências da vida, desde que J.J. Thomson lançou as bases para o desenvolvimento de espectrómetros de massa em 1897 [93], ao demonstrar a existência de eletrões e medir as suas razões massa/carga (m/z) através de técnicas de deflexão. Esta técnica permite a deteção e quantificação de compostos presentes numa dada matriz, tendo por base a formação de iões (ionização), que possibilitam gerar espectros de massa que são característicos de cada molécula [91]; existem diferentes métodos e fontes de ionização, sendo a ionização eletrónica (EI, do inglês *electron ionization*) – concebida por Dempster [94] e aperfeiçoada por Bleakney [95] e Nier [96] – um dos métodos de ionização mais usados em MS na área de química orgânica [92]. A técnica de MS é uma das ferramentas analíticas mais poderosas, reunindo atributos que a levam a ser aplicada em cada vez mais campos científicos, nomeadamente elevada seletividade, sensibilidade, exatidão, limites de deteção, velocidade e diversidade de aplicações [92].

As técnicas de GC e GC-MS apresentam uma maior sensibilidade e limites de detecção (ppb) quando comparadas com outras técnicas para determinação de COVs [24]; estas técnicas são, conforme referido anteriormente, usualmente acopladas a uma etapa prévia de extração e concentração de analitos, sendo o HS-SPME uma das técnicas ideais para a extração e concentração de COVs, devido à volatilidade dos mesmos [97]. Ao serem aplicadas em conjunto, esta técnica denomina-se de HS-SPME-GC-MS; esta tratou-se da metodologia usada para a detecção e quantificação dos analitos relatados previamente, em amostras de água, durante o trabalho desenvolvido no âmbito do Estágio (Figura 2).



Figura 2: Instrumento de SPME-GC-MS conectado a computador

3.2. APLICAÇÕES

As aplicações da técnica de SPME incluem monitorização ambiental, análises clínicas, farmacêuticas e forenses, da indústria de alimentos, sabores e fragrâncias, bem como análises laboratoriais e *in situ*, sendo a escolha do modo de microextração por SPME – em *headspace* ou por imersão – baseada na composição da amostra, na volatilidade dos compostos que se pretende determinar, e na afinidade para a matriz [98]. A extração em *headspace* deve ser aplicável para analitos de média a elevada volatilidade, sendo ideal para a extração de COVs em amostras de água; para além disso, apresenta a vantagem de reduzir a quantidade de interferentes extraídos da amostra analisada e de prevenir contaminações na fibra de SPME usada para a extração dos compostos [98].

Até ao presente, a maior parte das aplicações da técnica de SPME foram desenvolvidas para utilização com GC, embora possa ser usada conjuntamente com outras técnicas de separação de compostos, tais como cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC, do inglês *high-performance liquid chromatography*) e eletroforese capilar [98].

A técnica de SPME pode ser usada para diferentes matrizes ambientais e para a extração de diferentes tipos de compostos [99]; de facto, esta técnica demonstra-se adequada para a amostragem de contaminantes ambientais presentes no ar, água e solo para análise em GC-MS, tais como COVs, pesticidas, policlorobifenilos (PCBs) e compostos organometálicos, entre outros [83, 99-104]. Dadas as múltiplas vantagens oferecidas pela técnica de SPME, tais como simplicidade de utilização, o facto de ser uma técnica “verde”, permitir uma análise relativamente rápida, e integrar a extração e pré-concentração dos compostos numa só etapa, esta tem sido o foco de atenção para a análise de amostras de água ao longo dos anos, mantendo-se uma técnica popular no seio da comunidade científica [105].

Conforme referido, após a extração dos analitos, há diferentes técnicas de separação e identificação dos mesmos que podem ser implementadas, sendo a técnica de GC-MS a mais comum para este fim na análise de COVs em amostras ambientais [106]. Esta técnica é uma das mais atrativas e poderosas para análises de rotina de determinados poluentes orgânicos ubíquos, devendo-se o elevado número de aplicações desta técnica à eficácia da separação dos analitos presentes na amostra proporcionada pela técnica de GC, bem como às boas informações qualitativas e elevada sensibilidade oferecidas pela técnica de MS [106]. Tradicionalmente, há diferentes famílias de contaminantes ambientais analisados através de GC-MS, nomeadamente COVs, hidrocarbonetos aromáticos policíclicos, PCBs, dibenzo-p-dioxinas policloradas, dibenzofuranos policlorados, pesticidas e outros contaminantes orgânicos, tais como éteres difenólicos polibromados, ácido protocatecuico e toxafeno [90].

Por sua vez, a técnica de MS tem vindo a evoluir desde há mais de 100 anos, passando de ser uma mera ferramenta usada por físicos para estudar o comportamento dos iões, para uma tecnologia integral nos ramos das ciências da vida e da saúde, na medida em que permite uma análise eficiente a nível qualitativo e quantitativo de moléculas-alvo presentes numa determinada amostra [91]; para além da análise de matrizes ambientais para a deteção e quantificação dos analitos desejados, encontram-se descritas na literatura outras aplicações da técnica de MS, nomeadamente ciências forenses,

análises toxicológicas para despiste de drogas, autenticidade alimentar e investigação biomédica e farmacêutica [107-111].

A metodologia de HS-SPME-GC-MS, que concilia as diferentes etapas de extração e concentração de analitos para posterior separação, deteção e quantificação, funciona de forma automatizada e encontra-se atualmente firmemente estabelecida [80, 112]. Com efeito, foram realizados, nos últimos anos, Ensaaios Interlaboratoriais a uma escala global que permitiram rever e confirmar a norma internacional ISO 17943:2016 [81], que especifica o método para a determinação de diferentes COVs, tais como hidrocarbonetos halogenados, THMs, componentes da gasolina (nomeadamente BTEXs e os éteres MTBE e ETBE), naftaleno, 2-etil-4-metil-1,3-dioxolano e substâncias altamente odoríferas, como geosmina e 2-metilisoborneol – os químicos responsáveis pela maior parte de surgimentos de sabores e odores estranhos de origem biológica em água potável à escala global [113] – através da metodologia de HS-SPME-GC-MS, para diferentes matrizes de água, mais concretamente água destinada ao consumo humano, águas naturais doces superficiais e subterrâneas e águas residuais tratadas [114], o que vem atestar o reconhecimento e aceitação internacional do uso desta técnica para a análise de COVs em amostras de água.

3.3. FUNCIONAMENTO DAS TÉCNICAS

Conforme referido anteriormente, a metodologia de HS-SPME-GC-MS funciona através de diferentes técnicas analíticas conjugadas entre si, cada uma com uma finalidade específica no processo de análise de uma dada amostra e com modos de funcionamento próprios. De todo modo, esta metodologia segue uma ordem fixa para a análise de cada amostra, sendo a primeira técnica a ser aplicada a de HS-SPME, para extração e concentração dos COVs presentes na amostra através de uma fibra de SPME, seguindo-se a técnica de GC para separação dos compostos extraídos para posterior deteção e quantificação pela técnica de MS.

3.3.1. MICROEXTRAÇÃO EM FASE SÓLIDA

A técnica de SPME consiste num processo de extração e concentração de analitos aplicável a uma grande variedade de matrizes – nomeadamente amostras de ar, água e solo – baseado em equilíbrios de partição multifásicos, através de fenómenos de difusão e adsorção destes para o revestimento de uma fibra de SPME com o objetivo final de se atingirem condições que permitam quantificar os analitos-alvo presentes na

amostra analisada [98, 99]. O procedimento de SPME – efetuado expondo a fibra de SPME à amostra por um período de tempo predeterminado – pode ser realizado através dos modos básicos de execução de imersão ou de extração em *headspace*, tendo a escolha do modo de execução um impacto significativo nos processos cinéticos de extração dos compostos [98].

O *design* básico do instrumento de SPME consiste numa fibra – tipicamente de sílica fundida, e revestida por um material polimérico sorvente – inserida num pequeno tubo metálico inoxidável com um êmbolo deslizante, semelhante a uma seringa, para proteção da fibra [86, 98, 115] (Figura 3).



Figura 3: Seringa para proteção da fibra

A seringa encontra-se montada, por sua vez, num amostrador automático (Figura 4), que se encontra equipado com um medidor de profundidade ajustável, permitindo controlar, por um lado, a profundidade a que a seringa pode penetrar o *vial* no momento da extração e, por outro lado, a profundidade a que a seringa pode penetrar o injetor do cromatógrafo gasoso nos momentos de dessorção dos compostos extraídos da amostra e de limpeza da fibra de SPME, evitando-se assim que a fibra atinja obstáculos e se parta [98].



Figura 4: Amostrador automático

Os *vials* usados para armazenar as amostras a analisar encontram-se selados por uma tampa metálica com uma abertura na qual se encontra um septo perfurável (Figura 5); nestes casos, o septo do *vial* é penetrado primeiro pela seringa – com a fibra de SPME na posição retraída – e o êmbolo baixa, expondo a fibra à amostra, ocorrendo a partição dos analitos para o material sorvente a envolver a fibra durante um tempo predeterminado, voltando depois a ser recolhida para o interior da seringa [98].



Figura 5: Vial e tampa com septo perfurável

Quando a técnica de GC é usada para separação dos analitos, a fibra é inserida num injetor (Figura 6) a uma temperatura elevada, ao nível do qual ocorre dessorção térmica dos analitos adsorvidos pela fibra [98].



Figura 6: Injetor do cromatógrafo gasoso

Ao longo da primeira década após a invenção da técnica de SPME, foram realizadas inovações subsequentes baseadas no instrumento original. Entre as inovações mais notáveis destaca-se o desenvolvimento da técnica de SPME com vibração [116], cujo design inclui um mecanismo de vibração – denominado de incubadora (Figura 7) – no qual o *vial* é inserido e perfurado pela seringa contendo a fibra de SPME, fornecendo uma alternativa à convencional agitação manual das amostras e permitindo uma redução significativa do tempo necessário para os compostos atingirem o equilíbrio durante o processo de extração dos mesmos da amostra [86, 116]. A manipulação das condições de vibração e da temperatura de extração são definidas pelo técnico analista, devendo ser otimizadas de modo a melhorar a eficiência de extração dos compostos que se pretendem analisar.



Figura 7: Incubadora

A fase de extração em SPME consiste num sólido sorvente, tipicamente de elevada porosidade, de modo a aumentar a área de superfície disponível para que ocorra a adsorção dos analitos presentes na amostra [98]. Atualmente, existem diferentes fibras disponíveis comercialmente, diferenciando-se pelo material polimérico que as reveste, nomeadamente polidimetilsiloxano (PDMS), poliacrilato, carboxeno-polidimetilsiloxano (CAR-PDMS), polidimetilsiloxano-divinilbenzeno (PDMS-DVB) e divinilbenzeno-CAR-polidimetilsiloxano (DVB-CAR-PDMS), entre outras, sendo a escolha do revestimento essencial no estabelecimento do método de HS-SPME, e dependente da natureza química dos analitos-alvo [80] (Figura 8 [117]).

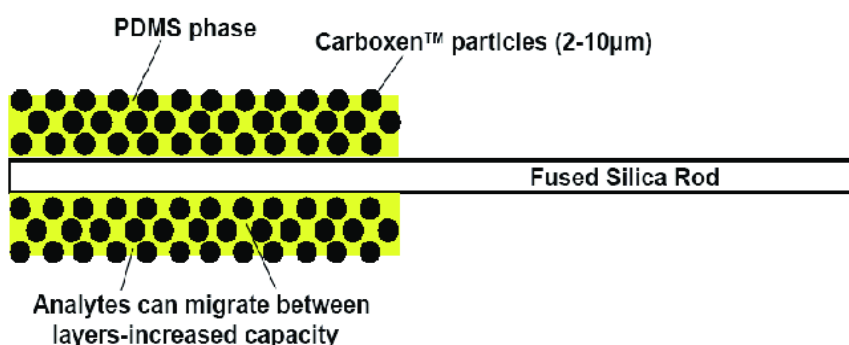


Figura 8: Ilustração de uma fibra de SPME com revestimento à base de CAR-PDMS

Fonte: [117]

A técnica de HS-SPME é comumente empregue para a análise de COVs em amostras de água, havendo neste modo três fases a considerar, nomeadamente a própria amostra a analisar, o *headspace* e a fase estacionária, que consiste, tipicamente, num material polimérico sorvente a revestir uma pequena fibra de sílica fundida [98]; após exposição da fibra de SPME à amostra, os compostos nela presentes são adsorvidos pela fase estacionária da fibra até que se atinja um equilíbrio no sistema, isto é, quando a velocidade de passagem dos compostos da amostra para o *headspace* e deste para a fase estacionária da fibra forem iguais [98] (Figura 9 [118]).

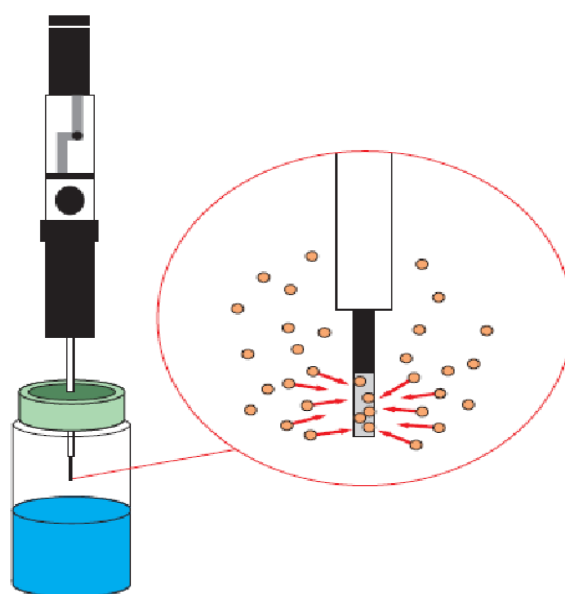


Figura 9: Ilustração da técnica de HS-SPME

Fonte: [118]

Caracteristicamente, os compostos apresentam uma constante denominada de *constante de Henry* (K_H) – ou coeficiente de partição água/ar – correspondente à razão entre a pressão parcial do composto no ar e a concentração desse mesmo composto na água, a uma determinada temperatura [119]. Em HS-SPME, se K_H de um composto for alta, a sua concentração em *headspace* também será alta, resultando num tempo de extração mais rápido; por outro lado, se K_H de um composto for baixa, o tempo de extração será mais longo [98]. No entanto, existem determinados fatores que condicionam os processos cinéticos de extração dos compostos, nomeadamente a temperatura de extração, uma vez que determina a pressão de vapor dos compostos em *headspace*. De facto, um aumento da temperatura de extração faz com que o tempo de equilíbrio do composto seja atingido mais rapidamente, uma vez que induz o aumento

de K_H do composto, bem como o aumento do coeficiente de difusão, correspondente à velocidade de difusão de dado composto de uma zona mais concentrada para outra menos concentrada, num determinado período de tempo [98]. Como tal, é importante otimizar devidamente a temperatura de extração de modo a conduzir a tempos de equilíbrio mais curtos que permitam, ainda assim, uma quantificação adequada dos compostos. Existem ainda outros fatores que influenciam a velocidade com que os compostos atingem o equilíbrio, nomeadamente a adição de sal, um processo conhecido como *salting out*; com efeito, os COVs dissolvem-se pior em amostras de água cujas moléculas estejam ligadas a iões dissolvidos, pelo que a solubilidade destes compostos diminui com o aumento de quantidade de sal na água [120].

Tipicamente, o processo de HS-SPME é considerado completo quando a concentração dos analitos atinge um equilíbrio entre a matriz, *headspace* o revestimento da fibra [85]; no entanto, em muitos casos, quando o tempo necessário para os analitos atingirem o equilíbrio é demasiado longo, a quantificação destes pode ser feita em condições de pré-equilíbrio. Nestes casos, revela-se fundamental garantir condições constantes na etapa de HS-SPME, nomeadamente o tempo e temperatura de extração, volume de *headspace*, profundidade de imersão da fibra no *vial*, pH, adição de sal e condições de agitação, de modo a que o ponto de equilíbrio intermédio também seja constante, garantindo boa reprodutibilidade entre diferentes ensaios [98].

3.3.2. CROMATOGRAFIA GASOSA

Após a extração e concentração dos compostos presentes na amostra a analisar através de HS-SPME, a etapa seguinte passa pela separação dos mesmos para que possam ser detetados e quantificados, o que pode ser conseguido, nomeadamente, através da técnica de GC. Fundamentalmente, esta técnica tem como base de funcionamento uma fase móvel gasosa (ou gás de arraste) que transporta os compostos extraídos da amostra através de uma fase estacionária a revestir a coluna cromatográfica inserida no forno do cromatógrafo gasoso, na qual os compostos são separados através de diferentes fatores termodinâmicos e cinéticos [115, 121].

A escolha do gás de arraste passa usualmente por gases inertes, tais como hélio (He), azoto (N_2) ou hidrogénio (H_2); no entanto, há outros gases ou misturas de gases que podem ser usados, dependendo da amostra e dos compostos que se pretendem analisar, bem como do detetor utilizado [115, 121]. O gás de arraste deve ter uma

elevada pureza (igual ou superior a 99,995%), uma vez que as impurezas presentes podem degradar a fase estacionária [121]; o He é o gás de arraste mais comum, já que é compatível com a maior parte dos detetores e permite uma elevada resolução [115]. Usualmente, o gás é fornecido a partir de uma garrafa equipada com um redutor de caudal, para regular a pressão, e manómetros, que indicam a pressão a que o gás se encontra na garrafa e na linha de gás (Figura 10).



Figura 10: Garrafa de hélio (200 bar) equipada com redutor de caudal e manómetros

O fluxo do gás de arraste que sai da linha de gás e entra no cromatógrafo gasoso é usualmente separado em dois fluxos diferentes, sendo um dos fluxos destinado ao transporte dos compostos extraídos da amostra, e outro para a purga do cromatógrafo gasoso. Este fluxo é igualmente mantido sob controlo através de um redutor de caudal e um manómetro (Figura 11), enquanto os instrumentos analíticos mais avançados se encontram equipados com reguladores de pressão e medição controlados eletronicamente [121].



Figura 11: Redutor de caudal e manómetro para controlo da pressão do gás de arraste

Os compostos extraídos da amostra e injetados no injetor do cromatógrafo gasoso são transportados pelo gás de arraste através da coluna cromatográfica (Figura 12), que se encontra acondicionada num forno cuja temperatura é controlada através de um *software*, de acordo com o gradiente de temperaturas programado pelo operador.

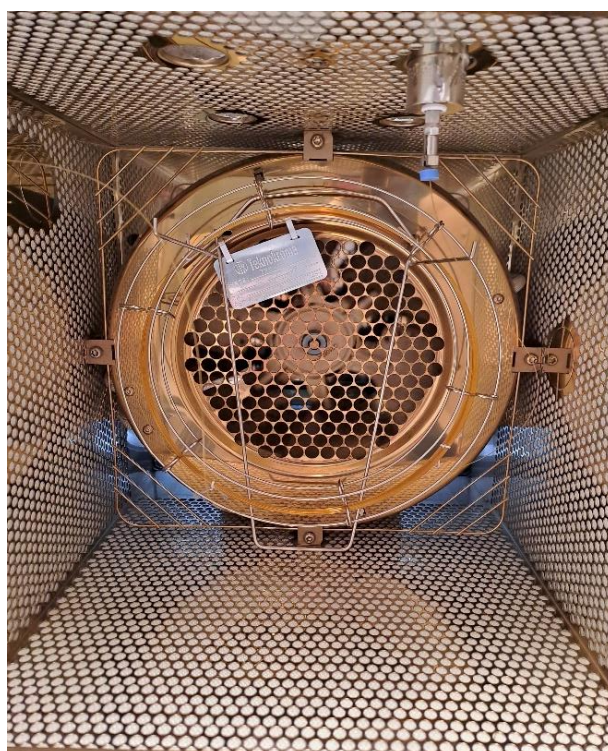


Figura 12: Coluna cromatográfica capilar TRB-624

Ao nível da fase estacionária que reveste a coluna cromatográfica, as forças intermoleculares entre os compostos extraídos da amostra e os grupos funcionais da fase estacionária conduzem a fenómenos de interação, que influenciam a forma como os compostos serão separados e o seu tempo de retenção (RT, do inglês *retention time*) na coluna cromatográfica [121]. A técnica de GC pode ser classificada de acordo com a fase estacionária usada, subdividindo-se em cromatografia gás-líquido (GLC, do inglês *gas-liquid chromatography*) ou cromatografia gás-sólido (GSC, do inglês *gas-solid chromatography*), caso a fase estacionária a revestir a coluna cromatográfica se trate de um líquido ou de um sólido, respetivamente [121].

Para além da fase estacionária usada, a técnica de GC pode também ser classificada em duas classes diferentes por razões instrumentais práticas: GC com coluna empacotada e GC com coluna capilar [115, 121]. As colunas capilares são tipicamente à base de sílica (SiO_2) fundida e revestidas por poliamida – um polímero termoplástico resistente a temperaturas de até 350 °C – para suporte e proteção da humidade atmosférica [115]. Já as colunas empacotadas contêm partículas finas de um suporte sólido – tipicamente de sílica silanizada – revestidas por uma fase estacionária líquida não-volátil, podendo também o próprio sólido ser a fase estacionária [115]. Comparativamente, as colunas capilares fornecem maior resolução, tempos de análise mais curtos e maior sensibilidade do que as colunas empacotadas; por outro lado, as colunas empacotadas têm capacidade para suportar um maior volume de injeção, embora forneçam picos cromatográficos com pior definição, tempos de retenção dos compostos mais longos e menor resolução [115].

Em GC-MS, a extremidade terminal da coluna cromatográfica sai do forno e é acoplada ao espectrómetro de massa através de uma interface selada a vácuo, de modo aos compostos serem detetados à medida que vão saindo da coluna [115, 121] (Figura 13 [122]).

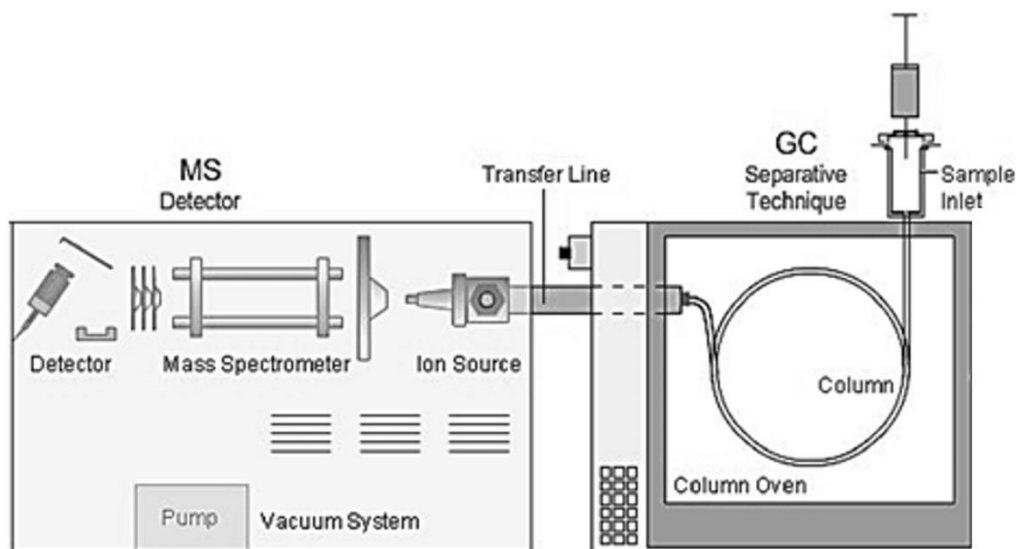


Figura 13: Diagrama de um cromatógrafo gasoso (direita) acoplado a um espectrômetro de massa (esquerda)

Fonte: [122]

3.3.3. ESPETROMETRIA DE MASSA

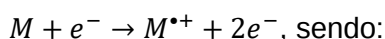
Após a etapa de separação cromatográfica dos compostos, é necessário proceder à sua deteção. Tal é possível através de instrumentos analíticos de deteção, cuja função é a de gerar uma resposta à presença dos compostos separados, à medida que saem da coluna cromatográfica, devendo ser registrável, reproduzível e quantitativa [121]; esta resposta deve produzir um sinal proporcional à quantidade de cada composto, e ser linear ao longo da Gama de Trabalho desejada para os diferentes compostos [121]. A natureza da amostra, o grau de sensibilidade requerido e o modo da técnica cromatográfica que se pretende implementar constituem os fatores principais a ter em consideração na escolha do detetor [121].

O detetor ideal deve ainda cumprir com diversos requisitos, nomeadamente: não alterar a resolução cromatográfica, isto é, não misturar compostos previamente separados; ter a máxima sensibilidade possível; ser universal, ou seja, ser capaz de detetar a totalidade dos compostos eluídos; fornecer a máxima informação estrutural possível, de modo a permitir a identificação dos compostos eluídos; ser seletivo, ou seja, possibilitar a identificação dos analitos numa mistura; fornecer um sinal proporcional à concentração do composto; ter um fator de resposta constante ou, pelo menos, previsível; ter um rácio custo/desempenho tão baixo quanto possível; não danificar as amostras; não produzir

artefactos e permitir a deconvolução de picos cromatográficos nos seus constituintes [92].

Os espectrómetros de massa devem sempre apresentar na sua constituição uma entrada através da qual são introduzidos os compostos a analisar; uma fonte de ionização para produzir iões a partir dos compostos extraídos; um ou vários analisadores de massa para separar os diferentes iões formados de acordo com as suas razões m/z ; um detetor para detetar e quantificar os iões provenientes do analisador através da sua conversão em sinais elétricos e, por fim, um sistema de processamento de dados para gerar espectros de massa [92].

A primeira etapa a ser realizada na análise de compostos por espectrometria de massa é a produção de iões em fase gasosa a partir destes, conseguida, nomeadamente, através de EI, podendo esta reação ser representada pela expressão [92]:

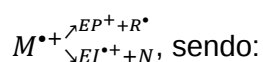


M: composto molecular

$M^{\bullet+}$: ião molecular

e^- : eletrão

O ião molecular formado passa, usualmente, por fragmentações subseqüentes; sendo um radical catiónico com um número ímpar de eletrões, este pode fragmentar-se de modo a gerar quer um radical e um ião com um número par de eletrões, quer uma molécula e um novo radical catiónico, podendo esta reação ser representada pela expressão [92]:



$M^{\bullet+}$: ião molecular

EP^+ : ião com n.º par de eletrões

$R^{\bullet}$: radical

$EI^{\bullet+}$: ião com n.º ímpar de eletrões

N: molécula com carga neutra

Estes dois tipos de iões primários formados a partir do composto molecular ionizado apresentam diferentes propriedades químicas, podendo, cada um, sofrer fragmentações subsequentes. Todos os iões gerados são separados pelo espectrómetro de massa de acordo com as suas razões m/z , sendo os compostos presentes na amostra posteriormente identificados de acordo com o espectro de massa das respetivas fragmentações. Todos os espectrómetros de massa devem funcionar sob condições de vácuo e, conseqüentemente, de baixa pressão; tal é necessário de modo aos iões atingirem o detetor sem sofrerem colisões com outras moléculas gasosas [92]. De facto, estas colisões iriam gerar um desvio na trajetória e os iões iriam perder a sua carga ao chocar contra as paredes do instrumento; por outro lado, as colisões entre iões e moléculas iriam levar a reações indesejadas e, conseqüentemente, aumentariam a complexidade dos espectros gerados [92].

Existem diversas técnicas de ionização usadas em espectrometria de massa, sendo os aspetos mais importantes a ter em consideração aquando da escolha da mesma a energia interna transferida durante o processo de ionização e as propriedades físico-químicas dos analitos que serão ionizados [92]. Enquanto determinadas técnicas de ionização são muito energéticas e causam fragmentações extensas, outras são menos energéticas e apenas produzem iões das espécies moleculares [92].

Conforme referido anteriormente, a técnica de EI é uma das técnicas mais populares de ionização em espectrometria de massa; esta técnica consiste num filamento aquecido a emitir eletrões, que são acelerados em direção a um ânodo, colidindo contra as moléculas gasosas extraídas da amostra, causando a sua fragmentação e a formação de novos iões [92] (Figura 14 [123]).

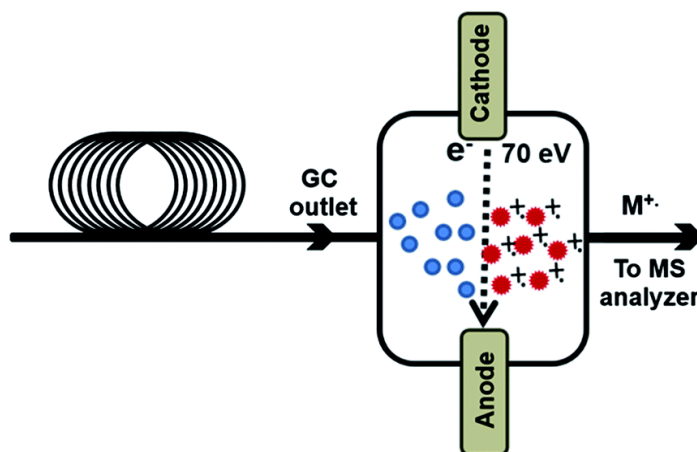


Figura 14: Diagrama da técnica de ionização eletrónica (EI)

Fonte: [123]

Esta técnica é amplamente usada na análise de compostos orgânicos, bem como de diversas moléculas na fase gasosa; no entanto, caracteriza-se por induzir uma fragmentação extensa dos compostos, pelo que os iões moleculares nem sempre são observados [92]. Em média, é produzido um ião por cada 1000 moléculas que entram na fonte de ionização sob as condições típicas do espectrómetro, de 70 eV [92]; para além disso, durante o processo de ionização, são transferidos entre 10 a 20 eV para as moléculas e, uma vez que 10 eV é tipicamente suficiente para ionizar a maior parte das moléculas orgânicas, a energia em excesso conduz a uma fragmentação extensa [92]. Esta fragmentação pode ser útil, na medida em que fornece informação estrutural relativamente à identificação de analitos desconhecidos [92].

Uma outra técnica popular de ionização em espectrometria de massa é a ionização química (CI, do inglês *chemical ionization*), concebida por Munson e Field em 1966 [124]. A técnica de CI consiste na produção de iões ao nível da fonte de ionização através da colisão dos analitos com os iões de um gás reagente, tipicamente metano, amoníaco (NH_3) ou isobutano (C_4H_{10}) [125]. Os iões produzidos através de CI têm pouca energia em excesso, havendo uma menor fragmentação dos compostos, comparando com a técnica de EI; assim, os espectros obtidos são mais simples e as espécies moleculares são facilmente identificadas, o que torna a técnica de CI complementar à de EI [92].

A segunda etapa a ser realizada na análise de compostos por espectrometria de massa passa pela separação dos iões em fase gasosa formados através do analisador de massa, de acordo com as suas razões m/z ; no entanto, uma vez que em espectrometria de massa a maior parte dos iões formados têm carga elementar (i.e., $z=1$), usualmente o valor de m/z é equivalente ao valor da própria massa molecular [92, 115]. Existem diferentes tipos de analisadores de massas disponíveis, tendo em comum o facto de todos eles usarem campos elétricos – estáticos ou dinâmicos – e/ou magnéticos, para separar os iões; no entanto, a maior parte das diferenças entre os analisadores mais comuns reside na forma como estes campos são aplicados para efetuar a separação destes, existindo diferentes princípios de separação, nomeadamente a energia cinética dos iões, as suas razões m/z e a sua velocidade [92]. Os analisadores de massas podem ser agrupados em duas classes principais de acordo com a forma como permitem a transmissão dos iões. Por um lado, os analisadores *scanner* transmitem os iões com diferentes massas de forma sucessiva ao longo de uma escala temporal, podendo estes analisadores ser instrumentos de setor magnético ou quadrupolos [92]. Por outro lado,

existem analisadores que permitem a transmissão simultânea de todos os iões, tais como os *time of flight*, *ion trap* ou *orbitrap* [92].

Entre os analisadores de massa de uso mais comum encontram-se os quadrupolos, cujo princípio foi descrito por Paul e Steinweger em 1953 [126], na Universidade de Bonn, na Alemanha; desde aí, o quadrupolo foi desenvolvido para se tornar num instrumento analítico disponível comercialmente. O princípio básico do funcionamento do quadrupolo consiste na separação de iões de acordo com as suas razões m/z , através da estabilidade da trajetória dos mesmos enquanto se movimentam ao longo de campos elétricos oscilantes [92]. Cada quadrupolo é composto por quatro barras metálicas cilíndricas posicionadas paralelamente e de forma equidistante a um eixo central, às quais são aplicadas uma corrente contínua (DC, do inglês *direct current*) e uma corrente elétrica alternada de radiofrequência (RF), tendo cada par de barras opostas a mesma carga elétrica [106]. Os campos elétricos oscilantes são usados para estabilizar ou desestabilizar os iões de forma seletiva, à medida que estes atravessam um campo de corrente RF; cada par de barras oposta encontra-se conectada eletricamente, sendo aplicada uma voltagem de corrente alternada RF entre as barras [106]. Por sua vez, é sobreposta uma voltagem DC sobre a voltagem RF, fazendo com que os iões adotem uma trajetória irregular e oscilante, à medida que percorrem o espaço entre as barras [92] (Figura 15 [127]).

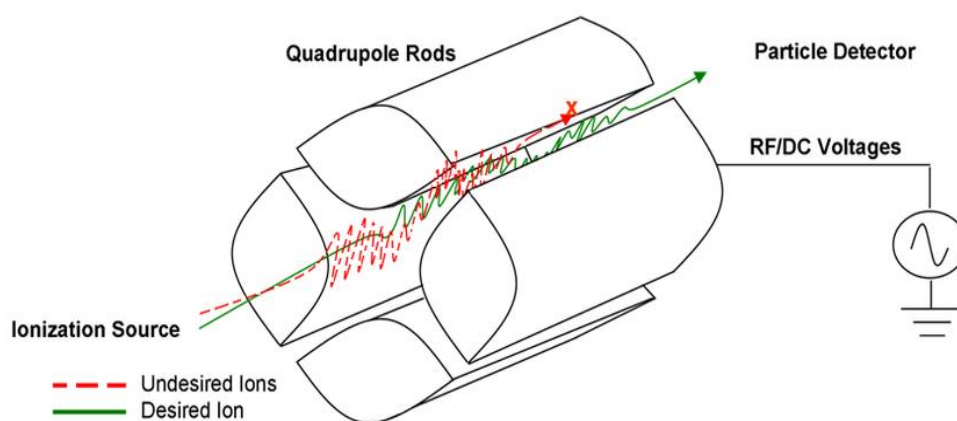


Figura 15: Diagrama do funcionamento de um quadrupolo

Fonte: [127]

Apenas os iões com valores específicos de m/z – selecionados pelo operador – conseguem efetuar uma trajetória estável, o que lhes permite atingir o detetor; já os iões com outros valores de m/z têm uma trajetória instável e, conseqüentemente, colidem com as barras – perdendo a sua carga e impossibilitando a sua deteção – ou são ejetados do analisador [92]. Os quadrupolos são por vezes denominados de filtros de massas, devido à sua capacidade de selecionar iões com valores específicos de m/z para análise, o que é conseguido alterando a polaridade e as voltagens aplicadas às barras [106].

Os espectrómetros de massa podem ser constituídos por múltiplos quadrupolos, denominando-se, neste caso, de espectrómetros de massa em *tandem*, sendo o triplo quadrupolo um exemplo de um analisador de massa usado neste tipo de espectrómetros [92]. Apesar da sua denominação, existem apenas dois analisadores de massa a operar num triplo quadrupolo; de facto, este é constituído por um primeiro quadrupolo, separado por uma zona de colisão de iões – designado por segundo quadrupolo ou célula de colisão, podendo ainda ser um hexapolo, octapolo, etc. – e um terceiro quadrupolo que se encontra em série com o primeiro [92]. Este tipo de espectrómetro de massa em *tandem* conduz a uma maior especificidade de deteção dos compostos, na medida em que força os iões moleculares protonados, selecionados pelo primeiro quadrupolo, a fragmentarem-se novamente, através da colisão com um gás não-reactivo, na célula de colisão; os produtos desta colisão são posteriormente separados pelo terceiro quadrupolo [92] (Figura 16 [128]). Uma das abordagens gerais a adotar na análise através de espectrómetros de massa em tandem é a de selecionar os valores de m/z dos iões moleculares-alvo pretendidos, para serem selecionados pelo primeiro quadrupolo, e programar o segundo quadrupolo para monitorizar apenas os valores predeterminados de m/z dos iões fragmentados [92].

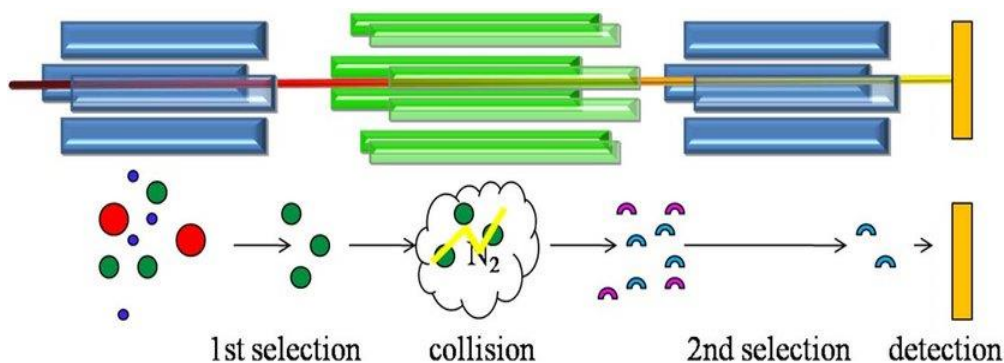


Figura 16: Diagrama do funcionamento de um triplo quadrupolo

Fonte: [128]

A terceira etapa a ser realizada na análise de compostos por espectrometria de massa é a deteção e quantificação dos iões. Tal sucede à medida que os iões passam pelo analisador de massas, sendo depois detetados pelo detetor; este gera posteriormente uma corrente elétrica proporcional à abundância dos iões, que são representados por picos cromatográficos no cromatograma gerado [92, 115].

O espectrómetro de massa encontra-se acoplado a um computador, que realiza o tratamento de dados digitais, enquanto o espectrómetro de massa produz e recebe dados analógicos; como tal, é necessário uma interface de modo a converter um tipo de dados no outro. Para tal, a interface recebe, condiciona e digitaliza os sinais analógicos – emitidos por um feixe eletrónico, uma corrente iónica, diferentes temperaturas ou voltagens – provenientes do espectrómetro de massa e envia-os para o computador, funcionando como um conversor analógico-digital, que regista os dados recebidos como valores de m/z e de intensidade de sinal dos picos cromatográficos, por exemplo. Por sua vez, o conversor transmite para o espectrómetro de massa voltagens analógicas necessárias para o seu funcionamento e que são determinadas pelo computador de acordo com os valores introduzidos pelo operador, funcionando como um conversor digital-analógico [92].

Os computadores devem apresentar *softwares* que lhes permitam a realização de determinadas tarefas, nomeadamente programas de aquisição de dados. Independentemente da técnica de ionização ou do método cromatográfico usado, existem dois modos de aquisição: *full scan* e monitorização seletiva de iões (SIM, do inglês *selected-ion monitoring*) [92]. No modo de *full scan*, são adquiridos espectros de massa completos repetidamente, entre dois valores de massas extremos, num tempo de varrimento (ou *dwell time*) especificado, isto é, a duração de monitorização de cada ião com diferentes razões m/z . Através deste método de aquisição, é gerado um cromatograma iónico total (TIC, do inglês *total ion chromatogram*), que corresponde à soma total das intensidades de m/z para RTs específicos [92]. Já no modo SIM, o instrumento mede a corrente iónica dos valores de m/z selecionados – que são características do composto de interesse – numa determinada janela temporal que contenha o RT expectável do composto; neste modo, o espectrómetro de massa não realiza o varrimento na gama de massas completa, alternando a procura apenas nos

valores de m/z configurados para os analitos, conduzindo assim a níveis superiores de sensibilidade e seletividade relativamente ao modo *full scan* [129].

O modo SIM é tipicamente utilizado para a determinação quantitativa de compostos específicos numa mistura complexa, sobretudo quando os compostos se encontram presentes em concentrações baixas; apesar deste modo apresentar sensibilidade ao nível de picogramas/litro (10^{-12} g/L, ou 1 ppq), esta sensibilidade encontra-se altamente dependente da matriz que contém os compostos de interesses e das interferências que são produzidas, pelo que, geralmente, apenas é possível detetar compostos até ao nível dos nanogramas/litro (10^{-9} g/L, ou 1 ppt) [129].

Após a aquisição dos dados, o *software* deve gerar um cromatograma de massas, que consiste num gráfico contendo a abundância de iões correspondentes a determinados valores de m/z em função do tempo; o operador pode, então, seleccionar qualquer pico cromatográfico do cromatograma e obter o espectro de massa correspondente. Os espectros de massa gerados permitem a análise qualitativa das amostras, na medida em que permitem identificar os compostos presentes, comparando-os com os espectros de massa contidos em bibliotecas online. Usando a mesma energia de ionização, a fragmentação dos compostos será sempre a mesma, o que permite criar as bibliotecas de espectros de massa para comparação e identificação de compostos. Como tal, conforme referido anteriormente, em GC-MS o valor padronizado de energia de ionização é de 70 eV, uma vez que permite a fragmentação de todas as moléculas orgânicas [92, 115, 121].

Entre as bibliotecas existentes, encontra-se a base de dados de espectros de massa NIST/EPA/NIH; nesta, a coleção original dos espectros e informação relacionada é produzida pelo Instituto Nacional de Padrões e Tecnologia dos Estados Unidos da América (NIST, do inglês *National Institute of Standards and Technology*), com a assistência de consultores especializados da EPA e dos Institutos Nacionais de Saúde dos Estados Unidos da América (NIH, do inglês *National Institutes of Health*) contendo, atualmente, cerca de 394 000 espectros de aproximadamente 347 100 compostos [130]. Quando o espectro do composto é identificado, a pesquisa é dada por terminada; no entanto, é importante ter em consideração o facto de que os isómeros do mesmo composto apresentam frequentemente espectros de massa idênticos e que, por vezes, diferentes compostos apresentam por vezes espectros de massa bastante semelhantes [92, 106].

Para além da análise qualitativa, é também feita a análise quantitativa, cujo objetivo é correlacionar a intensidade dos picos cromatográficos com a quantidade do composto presente na amostra. Conhecendo a estrutura e o espectro de massa dos compostos cujas concentrações se pretende determinar, é possível usar como sinal um ou vários iões específicos desses compostos, sendo importante escolhê-los de entre os que apresentam maior massa; de facto, a intensidade do sinal depende da abundância iónica e da sua massa, sendo expectável que os picos mais intensos correspondentes a massas superiores sejam mais característicos das moléculas-alvo do que os iões com massas inferiores [92].

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. MATERIAL E EQUIPAMENTO

4.1.1. MATERIAL

- Vials de vidro âmbar 32 × 11,65 mm de 2,5 mL para injeção de líquidos e armazenamento de soluções-padrão comerciais
- Vials de vidro transparente 75,5 × 22,5 mm de 20 mL para extração por *headspace* e armazenamento de soluções intermédias (S.I.)
- Tampas de rosca magnética com abertura central para *vials* de 20 mL
- Septos de politetrafluoretileno (PTFE) e silicone com tampa de 9 mm e abertura central de 6 mm para uso em *vials* de 2 mL
- Septos de PTFE e silicone com abertura central de 17,5 mm para uso em *vials* de 20 mL
- Microseringas de vidro borossilicato de 10 µL, 25 µL, 50 µL e 250 µL das marcas *Innovatile Labor Systeme* e *SETonic GmbH*
- Fibras para SPME de sílica fundida, 24 Ga, com revestimento de PDMS com 100 µm de espessura, da marca *Supelco*
- Fibras para SPME de sílica fundida, 24 Ga, com revestimento de CAR-PDMS com 75 µm de espessura, da marca *Supelco*
- Material de uso corrente de laboratório (micropipetas, pipetas volumétricas, pipetador automático, pipetas Pasteur, gobelés, balões volumétricos, vidros de relógio, espátulas)

4.1.2. EQUIPAMENTO

- Amostrador automático modelo Thermo TriPlus RSH, da marca *Thermo Fisher Scientific*
- Cromatógrafo gasoso modelo TRACE 1300, da marca *Thermo Fisher Scientific*, equipado com injetor *split/splitless* e coluna capilar TRB-624 30 m × 0,25 mm × 1,4 µm da marca Teknokroma
- Espetrómetro de massa modelo ISQ 7000 com quadrupolo simples, da marca *Thermo Fisher Scientific*
- Gás de arraste: hélio (99,9992%)
- *Software Chromeleon 7.3.1*
- *Software MS Search 2.2.*
- *Software Microsoft Excel*
- Sistema de purificação de água Direct-Q® 3 UV Tipo 1 com microfiltro *Millipak® Express 20*, da marca *Merck Millipore*
- Sistema de purificação de água Labaqua Trace com microfiltro *point-of-use*, da marca *BioSan*
- Frigorífico combinado com compartimento frigorífico mantido a 3 ± 3 °C e compartimento de congelação mantido a -20 ± 5 °C, da marca *Liebherr*
- Balança analítica, da marca *Mettler AT200*

4.2. SOLVENTES E REAGENTES

4.2.1. SOLVENTES

- Água desionizada (H₂O)
- Metanol (CH₃OH) (≥99,9%) LiChrosolv® Gradient Grade for Liquid Chromatography, da marca *Supelco*

4.2.2. REAGENTES

- Tiosulfato de sódio pentahidratado (Na₂S₂O₃·5H₂O), da marca *VWR Chemicals*

4.2.3. SOLUÇÕES-PADRÃO COMERCIAIS

- Solução-padrão comercial de mistura de 25 COVs EPA Method 624.1 UltiMix VOC Mixture (1,1-dicloroetano (99,98%), diclorometano (99,9%), trans-1,2-dicloroetano (99,7%), 1,1-dicloroetano (98,1%), clorofórmio (99,8%), 1,1,1-tricloroetano (99%),

- tetracloroeto de carbono (100%), benzeno (99,99%), 1,2-dicloroetano (99,9%), tricloroeteno (100%), 1,2-dicloropropano (99,6%), bromodiclorometano (99,2%), cis-1,3-dicloropropeno (99,5%), tolueno (100%), trans-1,3-dicloropropeno (98,8%), 1,1,2-tricloroetano (99,6%), tetracloroeteno (100%), dibromoclorometano (98,6%), clorobenzeno (99,9%), etilbenzeno (100%), bromofórmio (99,3%), 1,1,2,2-tetracloroetano (99,6%), 1,3-diclorobenzeno (99,5%), 1,4-diclorobenzeno (99,9%), 1,2-diclorobenzeno (99,8%)), 1 mL a 2000 µg/mL, da marca *Dr. Ehrenstorfer* (P1)
- Solução-padrão comercial de cloreto de vinilo (99%) em metanol P&T (99%), 1 mL a 2000 µg/mL, da marca *Restek* (P2)
 - Solução-padrão comercial de epicloridrina (99%) em acetonitrilo, 5 mL a 100 µg/mL, da marca *NEOCHEMA* (P3)

4.3. DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

Conforme referido no Capítulo 1, o Laboratório da AEdP, E.M. encontra-se acreditado pelo IPAC para a análise de THMs, tricloroeteno e tetracloroeteno em amostras de água destinada ao consumo humano e águas naturais doces subterrâneas, encontrando-se em processo de acreditação para a análise destes mesmos compostos em águas de piscinas e águas naturais doces superficiais. Tendo sido o principal objetivo do presente trabalho o desenvolvimento, implementação e validação de métodos analíticos que permitissem a determinação de benzeno, 1,2-dicloroetano, cloreto de vinilo e epicloridrina em amostras de água através da metodologia de HS-SPME-GC-MS para posterior acreditação pelo IPAC, procedeu-se à otimização de diferentes parâmetros instrumentais de modo a que a totalidade ou alguns destes compostos pudessem ser analisados conjuntamente com os compostos referidos que já se encontram acreditados para análise num mesmo método instrumental de análise e, posteriormente, procedeu-se à realização de ensaios para validação dos métodos.

4.3.1. TRAÇADO DA CURVA DE CALIBRAÇÃO

4.3.1.1. PREPARAÇÃO DE SOLUÇÃO INTERMÉDIA

Uma das etapas do processo de desenvolvimento do método instrumental de análise dos COVs mencionados prendeu-se com a preparação de soluções intermédias a partir de soluções-padrão comerciais. A solução intermédia corresponde à solução inicial – a partir da qual serão preparadas as soluções-padrão de calibração – contendo os compostos que se pretendem determinar em quantidade conhecida. As soluções

intermédias e soluções-padrão de calibração foram sendo preparadas na sala de preparação de amostras do Laboratório (Figura 17).



Figura 17: Sala de preparação de amostras do Laboratório

A S.I. 1 foi preparada a partir de uma solução-padrão comercial P1, que se encontrava armazenada em *vials* de 1 mL e conservada no congelador, mantido a uma temperatura de -20 ± 5 °C (com prazo máximo de utilização de ca. 2 meses após abertura, sendo necessário usar novas soluções-padrão comerciais após esse período). Num momento diferente do Estágio, foi preparada a S.I. 2 a partir da solução-padrão comercial P2, que se encontrava armazenada e conservada nas mesmas condições e com condições de validade de utilização semelhantes às da solução-padrão comercial P1. Num outro momento diferente do Estágio, foi preparada a S.I. 3 a partir das soluções-padrão comerciais P1 e P2 em conjunto.

As S.I. foram sendo preparadas em metanol a partir de P1, P2 ou de P1+P2, armazenadas em *vials* de 20 mL e conservadas no congelador, mantido a uma temperatura de -20 ± 5 °C (com prazo máximo de utilização de ca. 1 mês após ser preparada, sendo necessário voltar a prepará-la nas mesmas condições após esse período):

- Para um balão volumétrico de 100 mL, com cerca de 90 mL de metanol, prepara-se a solução intermédia pipetando 100 µL da solução P1 (S.I. 1), 100 µL da solução P2

(S.I. 2) ou 100 μ L da solução P1 + 100 μ L da solução P2 (S.I. 3), com uma micropipeta, cuja ponta é imersa no metanol;

- O balão volumétrico é aferido com metanol e homogeneizado, obtendo-se uma solução intermédia com os analitos a 2000 μ g/L;
- A solução intermédia é transferida para 5 *vials* de 20 mL, que ficam conservados no congelador.

A S.I. 4 foi preparada a partir da solução-padrão comercial P3, que se encontrava armazenada num frasco de 5 mL e conservada no frigorífico, mantido a uma temperatura de 3 ± 3 °C:

A solução intermédia é preparada em metanol a partir de P3 e armazenada no próprio balão volumétrico em que é preparada, sendo conservada no congelador, mantido a uma temperatura de -20 ± 5 °C:

- Para um balão volumétrico de 20 mL, prepara-se a solução intermédia pipetando 200 μ L da solução P3 com uma micropipeta, cuja ponta é imersa no metanol;
- O balão volumétrico é aferido com metanol e homogeneizado, obtendo-se uma solução intermédia a 1000 μ g/L do analito.

4.3.1.2. PREPARAÇÃO DE SOLUÇÕES-PADRÃO DE CALIBRAÇÃO

A partir das S.I. foram sendo preparadas soluções-padrão de calibração. O objetivo destas soluções-padrão é a determinação da razão matemática, na Gama de Trabalho avaliada para cada composto, entre a intensidade de sinal medida pelo equipamento e a quantidade dos analitos presentes numa dada amostra de água. Para tal, é necessário a verificação através de uma curva de calibração; esta curva permite calcular a quantidade dos analitos a determinar em amostras de composição desconhecida, confirmar a especificidade do método instrumental de análise e definir a sua sensibilidade.

De modo a traçar a curva de calibração, são preparadas amostras com volumes iguais, embora contendo o(s) composto(s)-alvo em diferentes concentrações – soluções-padrão de calibração – e analisadas por HS-SPME-GC-MS, de modo a que a intensidade do sinal de resposta correspondente a cada concentração preparada seja medida. Por sua vez, a amostra que se pretende analisar é analisada por HS-SPME-GC-MS em igual volume e sem quaisquer modificações ao nível das condições analíticas, e a intensidade de sinal é medida, sendo assim determinada a concentração

do(s) composto(s)-alvo por comparação com a curva de calibração, através do *software Chromeleon*. Uma vez que os volumes introduzidos são iguais, existe uma relação de proporcionalidade entre as intensidades de resposta e a quantidade do(s) composto(s)-alvo presente(s) na amostra, desde que a intensidade do sinal de resposta se mantenha linear ao longo da gama de concentrações e que, idealmente, a intensidade de sinal seja de zero (0) a uma concentração de zero (0).

A partir das S.I. são preparadas soluções-padrão de calibração por diluição em água desionizada, contendo, entre outros compostos, e dependendo da S.I. utilizada, THMs, tricloroeteno, tetracloroeteno, benzeno, 1,2-dicloroetano e cloreto de vinilo, conforme representado pela Tabela 1. A S.I. 4 é igualmente utilizada para a preparação de soluções-padrão de calibração por diluição em água desionizada, contendo epicloridrina, conforme representado pela Tabela 2.

As soluções-padrão são preparadas em água desionizada a partir das soluções-intermédias, sempre que seja necessário efetuar uma curva de calibração:

- Para as soluções-padrão preparadas em volume final de 50 mL, é introduzido com uma microseringa o volume necessário da solução intermédia em água desionizada contida num balão volumétrico de 50 mL;
- O balão volumétrico é aferido com água desionizada e homogeneizado, obtendo-se a solução-padrão de calibração na concentração desejada;
- São pipetados 10 mL desse volume com uma pipeta volumétrica para um *vial* de 20 mL, imediatamente fechado com uma tampa de rosca magnética contendo um septo de PTFE e silicone perfurável;
- Para as soluções-padrão preparadas em volume final de 10 mL, são pipetados 10 mL de água desionizada para um *vial* de 20 mL, e introduzido com uma microseringa o volume necessário da solução intermédia, sendo imediatamente fechado com uma tampa de rosca magnética contendo um septo de PTFE e silicone perfurável.

Durante a preparação das soluções-padrão, as microseringas eram limpas com metanol, que era posteriormente rejeitado num recipiente para solventes orgânicos não-halogenados.

Tabela 1: Modo de preparação de soluções-padrão em diferentes concentrações a partir de S.I. 1, S.I. 2 ou S.I. 3, em água desionizada

Solução-Padrão de Calibração (µg/L)	Volume de S.I. (µL)	Volume Final (mL)
0,1 ¹	2,5	50
0,25 ²	6,25	50
0,40	2	10
0,50 ³	2,5	10
0,60	3	10
0,80	4	10
1,0	5	10
2,0	10	10
3,0	15	10
4,0	20	10
5,0	25	10
6,0	30	10
8,0	40	10
10,0	50	10
20,0	100	10
30,0	150	10
40,0	200	10
50,0	250	10
¹ Limite de Quantificação do cloreto de vinilo		
² Limite de Quantificação do benzeno e 1,2-dicloroetano		
³ Limite de Quantificação dos THMs, tricloroeteno e tetracloroeteno		

Tabela 2: Modo de preparação de soluções-padrão em diferentes concentrações a partir de S.I. 4, em água desionizada

Solução-Padrão de Calibração (µg/L)	Volume de S.I. (µL)	Volume Final (mL)
0,025 ¹	1,25	50
0,05	2,5	50
0,10	5,0	50
0,20	2,0	10
0,30	3,0	10
0,40	4,0	10
0,50	5,0	10
¹ Limite de Quantificação da epicloridrina		

4.3.2. DESENVOLVIMENTO DO MÉTODO

4.3.2.1. METODOLOGIA DE ANÁLISE E SOFTWARE UTILIZADO

As soluções-padrão e amostras preparadas ao longo do desenvolvimento do método foram analisadas através da metodologia de HS-SPME-GC-MS; as fibras de SPME usadas – PDMS e CAR-PDMS – extraíam os compostos por HS-SPME, pelo que não contactavam diretamente com a solução, ocorrendo a partição dos analitos da água para a fibra no volume de 10 mL de *headspace* dos *vials*. Posteriormente, os analitos extraídos eram separados pela técnica de GC ao nível da coluna cromatográfica, tendo sido usado uma coluna capilar TRB-624, de polaridade intermédia, pelo facto de ser adequada à análise de COVs, devido à sua afinidade para estes compostos. Por fim, os compostos eram detetados pelo espetrómetro de massa, equipado com um quadrupolo simples.

O *software Chromeleon* foi usado para criar os MIAs, nos quais eram definidos os parâmetros instrumentais do amostrador automático TriPlus RSH, tais como a velocidade (mm/s) a que a seringa contendo a fibra furava os septos dos *vials* contendo as amostras e soluções-padrão a analisar, o tempo de extração (min), o uso de incubadora e as suas condições ao nível da temperatura (°C), tempo de incubação (min) e tempo de agitação (s); do injetor do cromatógrafo, tais como a temperatura do injetor (°C) e o modo de injeção (*split*, *splitless*, *splitless with purge*); da temperatura do forno no qual se encontrava a coluna, onde era definido o gradiente de temperaturas ao longo da análise, e do espetrómetro de massa, tais como o modo de aquisição (SIM, *full scan*), a gama de massas a analisar, o tempo de análise, os analitos e as suas *m/z*. Os MIAs eram definidos previamente a cada sequência de análise, e inseridos na folha de sequência do *software*.

O mesmo *software* foi usado para criar métodos de processamento (MPs), nos quais eram definidos os compostos que se pretendiam determinar, os seus iões de quantificação e confirmação, os seus RTs na coluna cromatográfica – correspondentes ao momento da análise em que surgem os picos cromatográficos desses compostos no cromatograma – e as concentrações teóricas das soluções-padrão de calibração, necessários para traçar as curvas de calibração em cada análise. Os MPs podiam ser definidos previamente ou após a análise de cada sequência e eram igualmente inseridos na folha de sequência do *software*, sendo necessários para a identificação e quantificação dos analitos nas soluções-padrão e amostras analisadas.

4.3.2.2. ANÁLISE DOS ESPETROS DE MASSA DOS COMPOSTOS A DETERMINAR

Numa fase inicial do desenvolvimento do método, procedeu-se à análise dos espectros de massa dos compostos que se pretendiam determinar, de modo a selecionar os iões a serem identificados pelo espectrómetro de massa. Para cada um dos analitos, selecionou-se um valor de m/z correspondente ao ião de quantificação, que é usado para quantificar o analito e que permite gerar a sua curva de calibração; de igual modo, foram selecionados um ou mais valores de m/z correspondentes aos iões de confirmação do analito, usados para identificar o analito e confirmar a sua presença na amostra. Os valores de m/z correspondentes aos iões de quantificação e de confirmação dos compostos eram introduzidos nos métodos instrumentais de análise, elaborados através do *software Chromeleon*, de forma a que o espectrómetro de massa procedesse à determinação dos analitos específicos no modo de aquisição SIM.

Para analisar os espectros de massa dos compostos que se pretendiam determinar através do método desenvolvido foi usado o *software MS Search 2.2*, da NIST. O espectro de massa de determinado composto consiste num gráfico que representa os valores de m/z no eixo x e a intensidade ou abundância relativa dos valores de m/z no eixo y; quanto mais elevada for a quantidade de determinado ião que se forma caracteristicamente, maior será a altura do pico correspondente no espectro de massa desse composto. Os espectros de massa representam o padrão de fragmentação dos compostos, sendo o pico que representa o ião não fragmentado do composto – denominado de ião molecular – assinalado pela ponta de uma seta, nos espectros de massa da NIST. Os restantes picos correspondem aos iões fragmentados que se formam pelo impacto eletrónico sobre a molécula no espectrómetro de massa e, frequentemente, alguns destes são mais abundantes do que o próprio ião molecular, sobretudo em moléculas que se fragmentam facilmente [131].

A escolha dos iões de quantificação e de confirmação para os analitos baseou-se não só na análise dos espectros de massa de cada um, como na análise dos cromatogramas gerados ao longo do desenvolvimento dos métodos de análise. De facto, a intensidade de sinal e área dos picos cromatográficos, a sua forma e a presença de interferentes foram outros fatores a ter em consideração na escolha dos valores de m/z para iões de quantificação e de confirmação dos analitos. Para além disso, entre os picos mais intensos devem ser escolhidos como iões de quantificação e confirmação os que

apresentam valores de m/z superiores, uma vez que são menos afetados pela interferência de moléculas ubíquas no ambiente – , tais como dióxido de carbono (CO_2), que apresenta massa molar de 44 g mol^{-1} [132] e azoto (N_2), que apresenta massa molar de 28 g mol^{-1} [133] – e moléculas que se possam encontrar em quantidades vestigiais nas fibras de SPME usadas para extrair os compostos devido ao contexto laboratorial específico, tais como metanol (CH_3OH), que apresenta massa molar de 32 g mol^{-1} [134] e que é usado para limpeza das microseringas usadas para preparação das soluções-padrão de calibração e na preparação das soluções intermédias, pelo que se pode encontrar em quantidades vestigiais.

As Figuras AI.1 a AI.10 do Anexo I mostram os espetros de massa dos analitos do método de análise desenvolvido, encontrando-se indicado os valores de m/z correspondentes aos iões de quantificação e de confirmação que foram definidos para cada uma das moléculas.

4.3.2.3. FIBRAS DE SPME UTILIZADAS

Para o estudo da determinação dos COVs em amostras de água pelo método a desenvolver, foram utilizadas fibras de SPME para extração por HS-SPME com dois revestimentos diferentes; a primeira fibra a ser testada apresentava revestimento de PDMS (100 μm de espessura), tendo posteriormente sido testada uma fibra com revestimento de CAR-PDMS (75 μm de espessura). Previamente à primeira utilização destas fibras, foi necessário proceder ao condicionamento das mesmas ao nível do injetor do cromatógrafo gasoso, de modo a ativar as suas fases estacionárias, e remover quaisquer impurezas presentes, de acordo com as especificações de temperatura e tempo indicadas pelo fabricante. Assim, a fibra PDMS foi condicionada ao nível do injetor com uma duração de dessorção de 30 min, a uma temperatura de 250°C , enquanto a fibra CAR-PDMS foi condicionada com o mesmo tempo de dessorção, a uma temperatura de 300°C . Conforme as fibras ficavam degradadas, era necessário proceder ao condicionamento de novas fibras, nas mesmas condições.

A fibra PDMS constituía a fibra usada no método desenvolvido pelo Laboratório, validado e acreditado pelo IPAC para a análise de THMs, tricloroeteno e tetracloroeteno, pelo que se testou a sua utilização na análise dos restantes COVs de monitorização obrigatória na água destinada ao consumo humano numa fase inicial. O PDMS constitui um material apolar, pelo que a utilização de fibras revestidas por este material é

adequada à análise de compostos com polaridade reduzida, bem como à análise de classes específicas de compostos, tais como COVs [135, 136].

Foi também testada a fibra CAR-PDMS; este tipo de fibras, revestidas por diferentes materiais, têm uma maior capacidade de retenção de compostos, sendo o revestimento de CAR-PDMS recomendado para a extração de analitos mais pequenos, nomeadamente benzeno, 1,2-dicloroetano, cloreto de vinilo e epicloridrina, que apresentam massa molar inferior à dos diferentes THMs, tricloroetano e tetracloroetano [135]. O carboxeno é um material poroso à base de carbono com uma elevada área de superfície (ca. $1200 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$), encontrando-se descrito na literatura como sendo adequado à extração de compostos com baixo ponto de ebulição, permitindo, no entanto, a adsorção de uma gama ampla de compostos devido à presença de poros de diferentes dimensões (micro-, meso- e macroporos) [135]. O CAR-PDMS constitui um material com baixa polaridade, pelo que a utilização de fibras revestidas por este material é igualmente adequada à análise de compostos com polaridade reduzida [136]. Para além disso, as fibras à base de CAR-PDMS são recomendadas para a extração de uma gama ampla de COVs, sendo frequentemente usadas em investigações de carácter exploratório para o desenvolvimento de métodos [137].

A comparação de ambas as fibras foi feita usando os mesmos MIAs, para a análise de soluções-padrão da mesma matriz, preparadas nas mesmas condições e com os mesmos compostos em concentrações iguais, tendo sido comparadas as intensidades de sinal ou áreas dos picos cromatográficos correspondentes a cada composto analisado.

4.3.2.4. OTIMIZAÇÃO DOS PARÂMETROS INSTRUMENTAIS

4.3.2.4.1. DETERMINAÇÃO DO TEMPO DE RETENÇÃO DOS ANALITOS

Uma das primeiras etapas no desenvolvimento do método foi a determinação do RT dos analitos na coluna cromatográfica, coincidente com o máximo (ou *ápex*) do pico cromatográfico respetivo no cromatograma. Para tal, foram preparadas, em momentos diferentes do Estágio, S.I.s para serem analisadas em *full scan*. Primeiramente, preparou-se a S.I. 1 a partir da solução-padrão comercial com mistura de COVs, a uma concentração 2000 µg/L ; num outro momento diferente do Estágio, preparou-se a S.I. 2 a partir da solução comercial de cloreto de vinilo, a uma concentração de 2000 µg/L . Eventualmente, passou a preparar-se a S.I. 3 a partir de ambas as soluções comerciais,

em conjunto. Por fim, foi preparada a S.I. 4 a partir de uma solução comercial de epicloridrina, a uma concentração de 1000 µg/L; este composto foi preparado numa solução intermédia separadamente dos outros analitos, uma vez que a sua análise implicava condições instrumentais de análise diferentes das requeridas pelos restantes compostos.

Inicialmente, foram determinados os RTs do benzeno e do 1,2-dicloroetano. A partir da S.I. 1, foi preparada uma solução-padrão em metanol a uma concentração de 500 µg/L num *vial* de 2,5 mL; esta solução-padrão foi posteriormente analisada por GC-MS em modo *full scan*, tendo sido injetado um volume de 1,0 µL desta solução-padrão no cromatógrafo por uma seringa de injeção de líquidos e analisada de acordo com os parâmetros instrumentais definidos pelo Laboratório para a análise de THMs, tricloroetano e tetracloroetano ao nível da injeção no cromatógrafo, gradiente de temperaturas e espectrometria de massa.

As configurações relativas à injeção da amostra encontravam-se programadas de modo a que fosse injetado no cromatógrafo um volume de 1,0 µL de amostra, com penetração da seringa até 0,2 mm acima do fundo do *vial*, enquanto as relativas ao injetor do cromatógrafo se encontravam de modo a este estar a uma temperatura de 250 °C, com modo de injeção em *splitless* durante os primeiros 2 minutos com um fluxo de He de 20,0 mL/min, encontrando-se o gás de purga com um fluxo de 5,0 mL/min.

Por outro lado, o gradiente de temperatura do forno apresentava três patamares e duas rampas de temperatura. O primeiro patamar encontrava-se configurado para manter a temperatura do forno a 30 °C durante os primeiros 2 min da corrida; após este patamar, encontrava-se uma rampa de temperatura, configurada de modo a atingir 120 °C, a um gradiente de 10 °C/min. Seguia-se um segundo patamar, configurado para manter a temperatura atingida de 120 °C durante 1 min, após o qual uma segunda rampa de temperatura se encontrava configurada para atingir 220 °C, a um gradiente de 40 °C/min. Um terceiro patamar mantinha o forno a esta temperatura, durante 3 min, terminando a corrida ao fim de 17,5 min.

Por fim, o espectrómetro de massa encontrava-se configurado para realizar a deteção dos compostos através do modo *full scan*, adquirindo todos os iões entre as $m/z=35$ e $m/z=350$ com um *dwell time* de 0,2 min.

Posteriormente, foram extraídos os cromatogramas correspondentes a três das m/z mais intensas de ambos os compostos de acordo com os dados da biblioteca de espectros da NIST, a partir do canal TIC. Para ambos os compostos, foram sobrepostos os três cromatogramas gerados, de modo a identificar o pico cromatográfico correspondente ao analito, que corresponde àquele que apresenta o mesmo RT nos diferentes cromatogramas. Por fim, usou-se o *software Chromeleon* para comparar o espectro de massa do pico cromatográfico com a biblioteca da NIST, permitindo a identificação do composto com um determinado grau probabilístico de correspondência, bem como o seu RT.

Num momento diferente, após a preparação da S.I. 2 a 2000 $\mu\text{g/L}$, procedeu-se igualmente à determinação do RT do cloreto de vinilo. Preparou-se uma solução-padrão a partir desta S.I. a 50,0 $\mu\text{g/L}$, tendo sido analisada por HS-SPME-GC-MS com uma fibra PDMS, numa fase inicial. O modo de análise foi em *full scan* e em SIM, tendo sido definidas duas das m/z mais intensas deste composto para comparação com a biblioteca de espectros do *software Chromeleon* e, assim, identificar o composto e determinar o seu RT.

Por fim, num outro momento diferente do Estágio, preparou-se uma S.I. de epicloridrina a 1000 $\mu\text{g/L}$, tendo sido diretamente pipetado 1 mL desta solução para um *vial* de 2,5 mL; esta solução-padrão foi posteriormente analisada por GC-MS em modo *full scan*, tendo sido injetado um volume de 1,0 μL desta solução-padrão no cromatógrafo por uma seringa de injeção de líquidos e analisada de acordo com os parâmetros instrumentais semelhantes definidos para a análise de THMs, tricloroeteno e tetracloroeteno, diferindo apenas ao nível do gradiente de temperaturas e espectrometria de massa. Relativamente ao gradiente de temperaturas, este diferia na medida em que o patamar inicial se mantinha a uma temperatura de 35 °C, enquanto o espectrómetro de massa se encontrava a monitorizar uma gama menor de iões em *full scan*, compreendidos entre $m/z=35$ e $m/z=150$.

Posteriormente, foram extraídas, a partir do canal TIC, três das m/z mais intensas deste composto de acordo com os dados da biblioteca de espectros da NIST, tendo sido sobrepostos os cromatogramas gerados para cada um, de modo a identificar o pico cromatográfico correspondente à epicloridrina. O *software Chromeleon* foi posteriormente usado para identificar o composto, por comparação com a biblioteca de espectros, e determinar o seu RT.

Uma vez que o método instrumental de análise inicial para a determinação dos analitos foi desenvolvido com as mesmas condições do método implementado para a determinação de THMs, tricloroeteno e tetracloroeteno, os RTs destes compostos e janelas de aquisição, bem como as suas m/z correspondentes aos iões de quantificação e confirmação, já se encontravam definidos, foram usados os valores implementados para os compostos referidos, numa fase inicial.

Os RTs dos compostos determinados foram inseridos nos MIAs e MPs desenvolvidos inicialmente. No entanto, a modificação dos MIAs ao longo do processo de desenvolvimento dos mesmos, nomeadamente ao nível da configuração dos gradientes de temperatura do forno, bem como das configurações de injeção, conduzia à alteração dos RTs dos compostos. Como tal, os RTs dos compostos necessitavam de ser reconfigurados ao nível dos MIAs e MPs, conforme necessário.

4.3.2.4.2. MODIFICAÇÃO DOS MIAS

4.3.2.4.2.1. MIA PARA DETERMINAÇÃO DE BENZENO, 1,2-DICLOROETANO, CLORETO DE VINILO, THMS, TRICLOROETENO E TETRACLOROETENO

Conforme referido, partiu-se do MIA implementado pelo Laboratório para a determinação de THMs, tricloroeteno e tetracloroeteno em amostras de água destinada ao consumo humano, para o desenvolvimento do novo MIA para determinação de benzeno, 1,2-dicloroetano e cloreto de vinilo, bem como dos outros COVs mencionados, por HS-SPME-GC-MS. Assim, foi feita uma primeira versão do MIA (*MIA COVs 1*) com condições instrumentais semelhantes, ao nível do amostrador automático, injetor, forno e espectrómetro de massa, através do *software Chromeleon*.

Com este método, o amostrador automático encontrava-se configurado de modo a que o *vial* contendo a amostra ou padrão a ser analisado fosse incubado durante 10 min – alternando entre estar a agitar durante 30 s a uma velocidade de 250 rpm, e entre estar parado durante 30 s – a uma temperatura de 40 °C; a incubadora encontrava-se configurada para se manter a esta temperatura mesmo não estando a ser utilizada. Simultaneamente, a seringa – acoplada ao amostrador automático – expunha a fibra de SPME, extraíndo os compostos do *headspace* durante 10 min, após perfurar o septo a uma velocidade de 20 mm/s. Após este período, a seringa contendo a fibra era inserida no injetor, a uma velocidade de 40 mm/s e profundidade de 40 mm, ficando os compostos a serem desorvidos durante 5 min. O tempo de análise encontrava-se configurado para 17,5 min.

O injetor do cromatógrafo encontrava-se configurado para uma temperatura de 250 °C, com modo de injeção em splitless durante 2 min, e em split durante o restante tempo de análise e até à seguinte injeção, com um fluxo de He de 20,0 mL/min. O gás de purga apresentava um fluxo de 5,0 mL/min.

O gradiente de temperatura do forno apresentava as mesmas condições da implementada para a injeção direta, referidas anteriormente.

O espectrómetro de massa encontrava-se configurado para realizar a deteção dos analitos simultaneamente através dos modos *full scan* e SIM. No modo *full scan*, o espectrómetro de massa encontrava-se a adquirir todos os iões entre as $m/z=45$ e $m/z=350$, enquanto no modo SIM se encontrava configurado para detetar os compostos tendo por base os seus RTs e iões de quantificação e confirmação, conforme apresentado na Tabela 3.

Tabela 3: Configurações iniciais do modo de deteção SIM para a determinação de benzeno, 1,2-dicloroetano, THMs, tricloroetano e tetracloroetano

Composto	Iões			Tempo de Retenção (min)
	Quantificação	Confirmação 1	Confirmação 2	
Clorofórmio	$m/z = 83$	$m/z = 85$	$m/z = 47$	6,90
Benzeno	$m/z = 78$	$m/z = 51$	$m/z = 77$	7,40
1,2-Dicloroetano	$m/z = 62$	$m/z = 64$	$m/z = 49$	7,40
Tricloroetano	$m/z = 130$	$m/z = 132$	$m/z = 95$	8,20
Bromodiclorometano	$m/z = 83$	$m/z = 85$	$m/z = 129$	8,90
Tetracloroetano	$m/z = 166$	$m/z = 164$	$m/z = 131$	10,40
Dibromoclorometano	$m/z = 127$	$m/z = 129$	$m/z = 79$	10,80
Bromofórmio	$m/z = 173$	$m/z = 171$	$m/z = 252$	12,70

O desenvolvimento e otimização de novos MIAs, a partir do *MIA COVs 1*, permitiu chegar a uma versão final do método para determinação do cloreto de vinilo, benzeno,

1,2-dicloroetano, THMs, tricloroeteno e tetracloroeteno por HS-SPME-GC-MS, o *MIA COVs 24*.

Com este método, o amostrador automático encontrava-se configurado de modo a que o *vial* contendo a amostra ou padrão a ser analisado fosse incubado durante 30 s a uma velocidade de 250 rpm e a uma temperatura de 30 °C; a incubadora encontrava-se configurada para se manter a esta temperatura mesmo não estando a ser utilizada. Após os 30 s, a seringa acoplada ao amostrador automático, expunha a fibra, extraindo os compostos do *headspace* durante 10 min, após perfurar o septo a uma velocidade de 20 mm/s, ficando a agitar durante 30 s a 250 rpm e parado durante 30 s, alternadamente. Após este período, a seringa contendo a fibra era introduzida no injetor automático, a uma velocidade de 40 mm/s e profundidade de 40 mm, ficando os compostos a serem desorvidos durante 5 min. O tempo de análise encontrava-se configurado para 17,0 min (Figura 18).

The screenshot shows the configuration interface for the automatic sampler, specifically the 'Fiber Conditioning' tab. The settings are as follows:

- Desorb port:** Injector: Injector A {Injector 1}
- Sample vial parameters:**
 - Needle speed in vial (mm/sec): 20
 - Extract time (min): 10,0
 - Progressive extract time (min): 1,0
- Sampling vial depth:** Sampling depth mode: Standard
- Injection:**
 - Injector depth (mm): 40
 - Penetration speed (mm/sec): 40
 - Desorb time (min): 5,0
- Analysis time:** Analysis time (min): 17,0
- Mode:** Incubation mode: Constant
- Incubation:**
 - Use agitator: ☒
 - Agitator temperature (°C): ☒ 30
 - Agitator wait for readiness: ☒
 - Agitator standby temp (°C): ☒ 30
 - Incubation time (min): 0,5
 - Agitation speed (rpm): 250
 - Agitator on (sec): 30
 - Agitator off (sec): 30
- GC sync start mode:** Start mode: When needle enters injection

Figura 18: Configurações do amostrador automático para o *MIA COVs 24*

O injetor do cromatógrafo encontrava-se configurado para uma temperatura de 250 °C, com modo de injeção em *splitless* durante 2 min, estando ainda configurado para *splitless with surge* nos 0,25 min iniciais desses 2 min, com uma pressão de *surge* de 250,0 kPa; durante o restante tempo de análise e até à seguinte injeção, o modo de

injeção encontrava-se configurado para *split*, com um fluxo de He de 20,0 mL/min. O gás de purga apresentava um fluxo de 5,0 mL/min (Figura 19).

Temperature Settings

☒ Enable temperature control ⓘ

Temperature: ⓘ [0...450 °C]

Inlet Parameters

Operating mode ⓘ

☒ Split flow control ⓘ

Split flow ⓘ [5,0...1250,0 ml/min]

Split ratio

Splitless time ⓘ [0,00...999,99 min]

☒ Purge flow control ⓘ

Purge flow ⓘ [0,500...50,000 ml/min]

☒ Constant septum purge ⓘ

Stop purge for ⓘ [0,00...999,99 min]

Surge pressure ⓘ [5,00...1000,00 kPa]

Surge duration ⓘ [0,00...999,99 min]

Figura 19: Configurações do injetor do cromatógrafo gasoso para o MIA COVs 24

O gradiente de temperatura do forno apresentava três patamares e duas rampas de temperatura. O primeiro patamar encontrava-se configurado para manter a temperatura do forno a 35 °C durante os primeiros 2 min da corrida; após este patamar, encontrava-se uma rampa de temperatura, configurada de modo a atingir 120 °C, a um gradiente de 10 °C/min. Seguia-se um segundo patamar, configurado para manter a temperatura atingida de 120 °C durante 1 min, após o qual uma segunda rampa de temperatura se encontrava configurada para atingir 220 °C, a um gradiente de 40 °C/min. Um terceiro patamar mantinha o forno a esta temperatura, durante 3 min, terminando a corrida ao fim de 17,0 min (Figura 20).

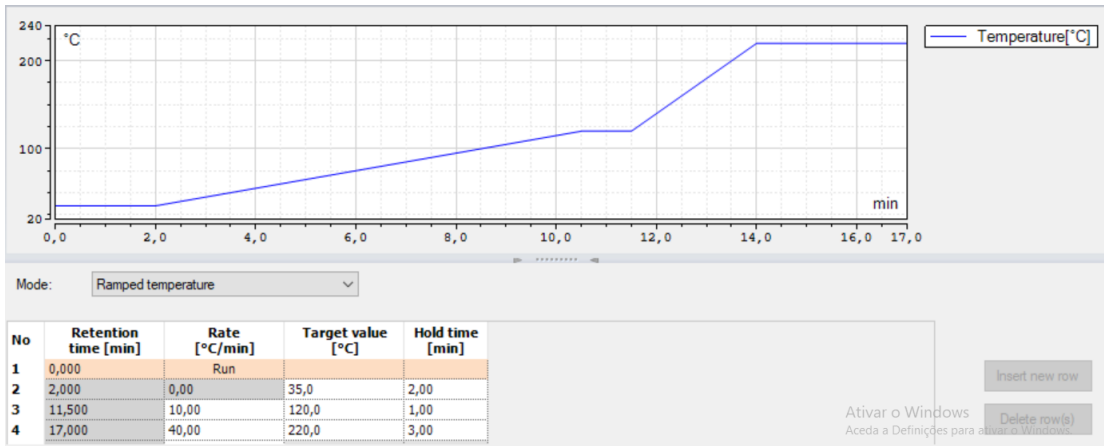


Figura 20: Configurações do gradiente de temperaturas do forno do cromatógrafo gasoso para o MIA COVs 24

O espectrómetro de massa encontrava-se configurado para realizar a deteção dos analitos simultaneamente através dos modos *full scan* e SIM. No modo *full scan*, o espectrómetro de massa encontrava-se a adquirir todos os iões entre as $m/z=35$ e $m/z=350$, enquanto no modo SIM se encontrava configurado para detetar os compostos tendo por base os seus RTs e iões de quantificação e confirmação, conforme apresentado na Tabela 4.

Tabela 4: Configurações finais do modo de deteção SIM para a determinação de cloreto de vinilo, benzeno, 1,2-dicloroetano, THMs, tricloroeteno e tetracloroeteno

Composto	Iões			Tempo de Retenção (min)
	Quantificação	Confirmação 1	Confirmação 2	
Cloreto de Vinilo	$m/z = 62$	$m/z = 64$		1,50
Clorofórmio	$m/z = 83$	$m/z = 85$	$m/z = 47$	6,00
Benzeno	$m/z = 78$	$m/z = 51$	$m/z = 77$	6,80
1,2-Dicloroetano	$m/z = 62$	$m/z = 64$	$m/z = 49$	6,81
Tricloroeteno	$m/z = 130$	$m/z = 132$	$m/z = 95$	7,50
Bromodiclorometano	$m/z = 83$	$m/z = 85$	$m/z = 129$	8,20
Tetracloroeteno	$m/z = 166$	$m/z = 164$	$m/z = 131$	9,90
Dibromoclorometano	$m/z = 127$	$m/z = 129$	$m/z = 79$	10,30
Bromofórmio	$m/z = 173$	$m/z = 171$	$m/z = 252$	12,30

4.3.2.4.2.2. MIA PARA DETERMINAÇÃO DE EPICLORIDRINA

Após a otimização dos parâmetros do MIA para a determinação de cloreto de vinilo, benzeno, 1,2-dicloroetano, THMs, tricloroeteno e tetracloroeteno, foi necessário desenvolver um MIA para a determinação de epicloridrina, através do *software Chromeleon*.

A primeira versão do MIA (*MIA ECH 1*) desenvolvido para análise por HS-SPME-GC-MS foi feita nas mesmas condições instrumentais do *MIA COVs 24* relativamente ao injetor e forno, tendo sido somente efetuadas alterações ao nível do amostrador automático e espectrómetro de massa.

Relativamente às configurações do *MIA COVs 24*, aumentou-se o tempo de extração de 10,0 min para 60,0 min de modo a aumentar a probabilidade de se atingir o equilíbrio da epicloridrina entre a matriz, *headspace* e fibra de SPME e, desse modo, aumentar a intensidade de sinal do composto; por outro lado, aumentou-se o tempo em que o *vial* se encontrava a agitar na incubadora, de modo a promover a passagem da epicloridrina da fase líquida para gasosa. Assim, com este método, o amostrador automático encontrava-se configurado de modo a que o *vial* contendo a amostra ou padrão a ser analisado fosse incubado durante 30 s a uma velocidade de 250 rpm e a uma temperatura de 30 °C; a incubadora encontrava-se configurada para se manter a esta temperatura mesmo não estando a ser utilizada. Após os 30 s, a seringa acoplada ao amostrador automático expunha a fibra, extraíndo os compostos do *headspace* durante 60 min, após perfurar o septo a uma velocidade de 20 mm/s, ficando a agitar durante 30 s a 250 rpm e parado durante 10 s, alternadamente. Após este período, a seringa contendo a fibra era introduzida no injetor automático, a uma velocidade de 40 mm/s e profundidade de 40 mm, ficando os compostos a serem desorvidos durante 5 min. O tempo de análise encontrava-se configurado para 17,0 min.

O espectrómetro de massa encontrava-se configurado para realizar a deteção da epicloridrina simultaneamente através dos modos *full scan* e SIM. No modo *full scan*, o espectrómetro de massa encontrava-se a adquirir todos os iões entre as $m/z=45$ e $m/z=150$, enquanto no modo SIM se encontrava configurado para detetar a epicloridrina tendo por base o seu RT e iões de quantificação e confirmação, conforme apresentado na Tabela 5.

Tabela 5: Configurações iniciais do modo de deteção SIM para a determinação de epicloridrina

Composto	Iões			Tempo de Retenção (min)
	Quantificação	Confirmação 1	Confirmação 2	
Epicloridrina	$m/z = 57$	$m/z = 49$	$m/z = 62$	9,00

O desenvolvimento e otimização de novos MIAs, a partir do *MIA ECH 1*, permitiu chegar a uma versão final do método para determinação de epicloridrina por HS-SPME-GC-MS, o *MIA ECH 19*.

Com este método, o amostrador automático encontrava-se configurado de modo a que o *vial* contendo a amostra ou solução-padrão a ser analisada fosse incubado durante 30 s a uma velocidade de 250 rpm e a uma temperatura de 35 °C; a incubadora encontrava-se configurada para se manter à temperatura de 30 °C quando não se encontrava a ser utilizada. Após os 30 s, a seringa acoplada ao amostrador automático expunha a fibra de SPME, extraíndo os compostos por *headspace*, no *vial*, durante 35 min, após perfurar o septo a uma velocidade de 20 mm/s, ficando a agitar durante 59 s a 250 rpm e parado durante 1 s, alternadamente. Após este período, a seringa contendo a fibra era introduzida ao nível do injetor automático, a uma velocidade de 40 mm/s e profundidade de 40 mm, ficando os compostos a serem desorvidos durante 5 min. O tempo de análise encontrava-se configurado para 17,0 min (Figura 21).

Parameters	Fiber Conditioning	Washes
Desorb port		
Injector:	Injector A {Injector 1}	
Sample vial parameters		
Needle speed in vial (mm/sec):	20	
Extract time (min):	35,0	
Progressive extract time (min):	1,0	
Sampling vial depth		
Sampling depth mode:	Standard	
Injection:		
Injector depth (mm):	40	
Penetration speed (mm/sec):	40	
Desorb time (min):	5,0	
Analysis time		
Analysis time (min):	17,0	
Mode		
Incubation mode:	Constant	
Incubation		
Use agitator:	☒	
Agitator temperature (°C):	☒ 35	
Agitator wait for readiness:	☒	
Agitator standby temp (°C):	☒ 30	
Incubation time (min):	0,5	
Agitation speed (rpm):	250	
Agitator on (sec):	59	
Agitator off (sec):	1	
GC sync start mode		
Start mode:	When needle enters injection	

Figura 21: Configurações do amostrador automático para o *MIA ECH 19*

O método final para a determinação de epicloridrina manteve as condições do injetor, gradiente de temperaturas do forno e espectrómetro de massa, relativamente ao método inicialmente testado para a determinação deste composto.

4.3.3. ENSAIOS PARA VALIDAÇÃO DOS MÉTODOS

Após o desenvolvimento do MIA para a determinação do benzeno, 1,2-dicloroetano, cloreto de vinilo, THMs, tricloroeteno e tetracloroeteno (*MIA COVs 24*), bem como do MIA para a determinação de epicloridrina (*MIA ECH 19*), foi necessário proceder aos diferentes ensaios para validação de ambos os métodos e determinação das Gamas de Trabalho dos analitos, através da metodologia de HS-SPME-GC-MS, após extração dos compostos pela fibra CAR-PDMS.

Uma vez que os MIAs desenvolvidos para a determinação dos analitos se trataram de métodos com curvas de calibração lineares, para avaliação das Gamas de Trabalho foi também efetuada a análise visual do ajuste entre os pontos de calibração de mais de 5 retas de calibração para cada analito, conjuntamente com o coeficiente de determinação (R^2), devendo este apresentar um valor superior a 0,99. De acordo com a ISO 8466-1 [16], cada calibração deve começar com a seleção de uma faixa preliminar de trabalho; assim, para cada analito, pretendeu-se que a Gama de Trabalho se iniciasse num valor de Limite de Quantificação (LQ) inferior a 30% do valor paramétrico – conforme exigido pela Legislação – e que fosse adequado ao uso, até um limite superior que permitisse manter a Linearidade da Gama.

4.3.3.1. LINEARIDADE

A Linearidade consiste num parâmetro caracterizador de validação exigido apenas em métodos com curvas de calibração lineares. Para a condução dos ensaios de validação dos MIAs relativos ao parâmetro da Linearidade, foram sendo preparadas soluções-padrão de calibração, a começar em 0,025 µg/L para a epicloridrina, 0,10 µg/L para o cloreto de vinilo, 0,25 µg/L para o benzeno e 1,2-dicloroetano e 0,50 µg/L para THMs, tricloroeteno e tetracloroeteno, até uma concentração que permitisse ir ao encontro dos critérios de aceitação. Os testes *Point-to-Point Slope*, Mandel e Análise de Resíduos foram efetuados para avaliação deste parâmetro.

4.3.3.1.1. POINT-TO-POINT SLOPE

De modo a estimar a Linearidade através do teste *Point-to-Point Slope*, é calculado o declive b_i a partir do conjunto de dados, entre dois pontos consecutivos. No caso de uma função de calibração linear, é expectável que haja um declive constante; neste caso, os declives calculados devem distribuir-se perto da mediana. Uma Gama não

linear no início ou no fim é identificada havendo desvios da mediana dos declives b_m a aumentarem ou diminuírem sistematicamente.

Para a avaliação da Linearidade, são traçadas as diferenças ($\Delta b_{i-m} = b_i - b_m$) entre os declives b_i e a mediana dos declives b_m num diagrama; se a Gama avaliada for linear, as diferenças deverão distribuir-se perto de zero (0) de forma não sistemática. Para a validação deste teste, o valor de Δb_{i-m} – correspondente ao declive entre os valores das áreas dos picos cromatográficos dos analitos de duas soluções-padrão preparadas em concentrações consecutivas – deve situar-se entre um valor mínimo = mediana dos valores de Δb_{i-m} calculados – 25% da mediana dos declives b_i , e um valor máximo = mediana dos valores de Δb_{i-m} calculados + 25% da mediana dos declives b_i .

4.3.3.1.2. TESTE DE MANDEL

A verificação da Linearidade através do teste de Mandel é efetuada por comparação da função da curva de 1º grau com a função da curva de 2º grau, sendo que:

a) função da curva de 1º grau:

$$y = a + bx$$

b) coeficiente de variação CV_{y1} da função de calibração linear:

$$CV_{y1} = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^N (y_i - \hat{y})^2}{N-2}} = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^N [y_i - (a + bx_i)]^2}{N-2}}$$

c) função da curva de 2º grau:

$$y = a + bx + cx^2$$

d) coeficiente de variação CV_{y2} da função da curva de 2º grau:

$$CV_{y2} = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^N (y_i - \hat{y})^2}{N-3}} = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^N [y_i - (a + bx_i + cx_i^2)]^2}{N-3}}$$

A diferença da soma (DS^2) das raízes quadradas dos coeficientes de variação (com grau de liberdade $f = 1$) é calculada a partir dos coeficientes de variação CV_{y1} e CV_{y2} :

$$DS^2 = (N-2) \times CV_{y1}^2 - (N-3) \times CV_{y2}^2$$

O grau de liberdade de DS^2 é dado por: $(N-2) - (N-3) = 1$

O valor de teste do F calculado (VT) é determinado para o teste de F:

$$VT = \frac{DS^2}{CV_{y2}^2}$$

E posteriormente comparado com o valor da tabela da distribuição F de Fisher-Snedecor para o nível de significância $\alpha = 0,05$ para $f_1 = 1$ e $f_2 = N-3$.

Por um lado, se $VT < F_{(f1,f2)95\%}$, então a diferença entre DS^2 e CV_{y2}^2 não é significativa, pelo que a função de calibração se assume como sendo linear na Gama de Trabalho avaliada. Por outro lado, se $VT > F_{(f1,f2)95\%}$, então a diferença entre DS^2 e CV_{y2}^2 é significativa, pelo que a função de calibração se assume como não sendo linear, ajustando-se melhor através de uma função de calibração de 2º grau na Gama de Trabalho avaliada.

4.3.3.1.3. ANÁLISE DE RESÍDUOS

A Análise de Resíduos incide igualmente sobre a curva de calibração gerada para os compostos. Através deste teste, para cada concentração de solução-padrão preparada, obtém-se um valor da área do pico cromatográfico estimado, bem como da razão entre a área do pico experimental e a área do pico estimado; posteriormente, é feito o cálculo do desvio relativo (%) desta razão, devendo o valor situar-se entre -20% e 20% para a avaliação ser aceite.

4.3.3.2. REPETIBILIDADE

O ensaio de Repetibilidade visa a precisão do MIA, pelo que pretende avaliar a dispersão de resultados entre ensaios independentes, repetidos sobre uma mesma amostra ou solução-padrão. Para esta avaliação, devem ser executados pelo menos 5 replicados para cada concentração avaliada, correspondentes a ambos os extremos da Gama de Trabalho. Para a aceitação deste parâmetro, a média da concentração das soluções-padrão preparadas deve apresentar um coeficiente de variação (CV) $\leq 25\%$.

O parâmetro da Repetibilidade foi avaliado preparando soluções-padrão correspondentes a ambos os extremos das Gamas dos analitos validadas, executando 10 replicados para cada concentração testada.

4.3.3.3. LIMITE DE QUANTIFICAÇÃO

O LQ é validado experimentalmente através dos cálculos de Precisão Intermédia – por exemplo, através da estimativa do desvio-padrão relativo ou do CV – bem como do erro

relativo médio em relação à concentração tomada como referência, não devendo exceder $\pm 25\%$.

É igualmente possível estabelecer uma relação teórica entre o Limite de Detecção (LD) e o LQ, dado por: $LQ = 3 \cdot LD$, de acordo com a norma internacional relativa ao controlo de qualidade analítico para análises químicas e físico-químicas da água [138].

O LQ dos analitos foi avaliado através do Ensaio de Repetibilidade, através dos cálculos do coeficiente de variação, bem como do erro relativo médio, das concentrações dos analitos nas soluções-padrão preparadas ao nível do LQ.

4.3.3.4. RECUPERAÇÕES

O ensaio de Recuperações visa a exatidão do MIA, e é realizado preparando pelo menos 5 replicados de amostras reais fortificadas, quer ao nível do LQ, quer a uma concentração correspondente a meio da Gama de Trabalho, devendo o valor da taxa de recuperação situar-se entre 70 – 120%, com um $CV \leq 25\%$.

Idealmente, a fortificação da amostra deve ser realizada de forma a minimizar o volume adicionado da solução-padrão usada no ensaio de Recuperações, de modo a tornar desprezável o possível efeito da diluição da amostra provocada pela adição da solução-padrão. Como tal, é recomendável que os valores da adição da solução-padrão sejam feitos numa proporção máxima de 1 mL para 100 mL de amostra, isto é, com um fator de diluição de 1%, de modo a ser considerada desprezável o potencial efeito da referida diluição na amostra ensaiada. Nestes casos, o cálculo da taxa de recuperação é feito através da equação:

$$LFM (\%) = \frac{[AF - A] \times 100}{Pa}$$

Sendo:

LFM = Ensaio de recuperação de amostras com matriz real

AF = Concentração do analito na amostra fortificada

A = Concentração do analito na amostra sem fortificação

Pa = Concentração do Padrão adicionado para fortificação da amostra

Para avaliação do parâmetro de Recuperações recorreu-se a amostras reais de água destinada ao consumo humano, tendo-se usado água da torneira da copa do Laboratório para este fim. Para a preparação da amostra, adicionou-se a um balão volumétrico de 1 L 80,0 mg de tiosulfato de sódio pentahidratado ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) – usado para remover o cloro residual, adicionado na etapa de tratamento da água [139] – sendo aferido no final com água da torneira.

Posteriormente, realizaram-se fortificações sobre a amostra, que consistiu na adição das diferentes S.I. – consoante o(s) composto(s) a analisar – em volumes que permitissem a determinação dos analitos à concentração correspondente ao LQ, bem como a uma concentração correspondente a meio da Gama de Trabalho dos mesmos, numa amostra real. As fortificações correspondentes ao meio da Gama para a realização do ensaio de Recuperações foram de 0,40 µg/L para o cloreto de vinilo, 2,50 µg/L para o benzeno, 1,2-dicloroetano, tricloroeteno e tetracloroeteno, 5,0 µg/L para a Gama Baixa de THMs e 30,0 µg/L para a Gama Alta de THMs.

4.3.3.5. SELETIVIDADE

Foi também avaliada a Seletividade do método, que corresponde à capacidade do método em identificar um determinado analito na presença de interferentes. Para tal, calcularam-se os rácios das áreas dos picos cromatográficos entre os iões de quantificação e os iões de confirmação definidos para cada composto, bem como os seus CVs, quer em soluções-padrão preparadas em água desionizada, quer em amostras reais. A razão entre as áreas obtidas para os iões de quantificação e de confirmação deve ser o mais próxima possível de 1, devendo os iões de quantificação apresentar uma maior área do que os iões de confirmação. É fundamental que o valor deste rácio seja constante ao longo da Gama de Trabalho a validar, uma vez que um dos requisitos para a identificação dos compostos é o de que o rácio dos iões nas amostras analisadas se situe no intervalo de $\pm 25\%$ relativamente ao rácio médio dos iões nas soluções-padrão de calibração preparadas nessa mesma sessão de análise.

Através deste parâmetro, procurou verificar-se a capacidade do método desenvolvido em identificar os analitos, isto é, em distingui-los uns dos outros bem como dos interferentes presentes na matriz.

4.3.3.6. ESPECIFICIDADE

A Especificidade consiste na capacidade do método em quantificar um analito em particular numa mistura complexa sem interferência de outros componentes, com a garantia de que a grandeza medida provém apenas do analito. De modo a avaliar a Especificidade dos MIAs desenvolvidos, compararam-se as áreas de picos cromatográficos gerados pela análise de soluções-padrão preparadas ao nível do LQ dos analitos, com as áreas de picos cromatográficos de *brancos* analisados na mesma sequência.

De modo a este ensaio de Especificidade ser validado, a média da área dos picos cromatográficos dos *brancos* deve ser inferior a 1/3 da área do pico cromatográfico dos analitos nas soluções-padrão preparadas ao nível dos seus LQs, isto é, inferior ao LD do método. Para além disso, a Especificidade do método foi igualmente avaliada através da sua capacidade em quantificar os analitos em amostras reais.

4.3.3.7. ENSAIOS INTERLABORATORIAIS

Assim como o ensaio de Recuperações, os Ensaios Interlaboratoriais visam avaliar a exatidão do MIA desenvolvido; estes consistem na organização, realização e avaliação de ensaios sobre a mesma amostra (ou similares) ou material por pelo menos dois Laboratórios diferentes. A participação em Ensaios Interlaboratoriais permite aos Laboratórios avaliar a adequabilidade ao uso dos métodos de ensaio.

Os resultados obtidos pelo Laboratório nos Ensaios Interlaboratoriais em que participa devem ser objeto de uma análise cuidada, da qual resulta um plano de ações corretivas. A avaliação do desempenho do Laboratório é feita pela entidade organizadora, sendo, em geral, usada a fórmula Z-Score para este fim, dada pela equação:

$$Z\text{-Score} = \frac{X_{lab} - X_v}{S}$$

Sendo:

X_{lab} = valor obtido pelo Laboratório

X_v = valor aceite como verdadeiro, isto é, o estabelecido no Ensaio Interlaboratorial

S = unidade de desvio, podendo corresponder ao desvio-padrão da média dos Laboratórios no Ensaio Interlaboratorial, a incerteza de X_v , ou outro desvio que assente em critérios de exigência da entidade organizadora.

A avaliação pode ser feita de acordo com a seguinte escala de pontuação, de acordo com a norma internacional usada como critério para a determinação do desempenho dos laboratórios a todas as partes interessadas na competência técnica das organizações provedoras de ensaios de proficiência [140]:

$|Z| \leq 2$: Satisfatório

$2 < |Z| \leq 3$: Questionável

$|Z| > 3$: Insatisfatório

Nesta escala, o Laboratório deve apresentar *Z-Scores* inferiores a 2; caso o Laboratório apresente dois resultados consecutivos questionáveis, ou um resultado insatisfatório, deverá ser aberta uma ficha de trabalho não-conforme, de modo a apurar a causa dos erros e justificar os resultados apresentados.

Foram realizados Ensaio Interlaboratoriais do tipo *Aquacheck*, da empresa *LGC*, em conjunto com o *Técnico A* e o *Técnico B* da Área de Química Orgânica. Os Ensaio foram realizados seguindo o protocolo AQ-ORG-1, e serviram para avaliar a precisão do método de ensaio acreditado ao Laboratório para a determinação de THMs, tricloroeteno e tetracloroeteno (*Método 1*), bem como do método de ensaio desenvolvido no âmbito do Estágio para a determinação de benzeno, 1,2-dicloroetano, THMs, tricloroeteno e tetracloroeteno (*Método 2*), através do cálculo do erro relativo, apresentado como *Z-Score*.

Para a realização do Ensaio Interlaboratorial para avaliação do *Método 1*, cada técnico preparou uma fortificação da amostra de água doce subterrânea fornecida pela empresa *LGC*, adicionando a um balão volumétrico de 500 mL aferido com a amostra 50 µL da solução PT-AQ-6A igualmente fornecida pela empresa, contendo na sua composição THMs, tricloroeteno, tetracloroeteno, 1,2-dicloroetano e tetracloreto de carbono. Uma vez que os compostos se encontravam em concentrações desconhecidas, foram preparadas amostras para análise sem diluição, com diluição de 10x e diluição de 20x, de modo a aumentar a probabilidade de que os compostos pudessem ser analisados nas Gamas de Trabalho a validar.

De igual modo, para a realização do Ensaio Interlaboratorial para avaliação do *Método 2*, cada técnico preparou uma fortificação da amostra de água doce subterrânea fornecida pela empresa *LGC*, adicionando a um balão volumétrico de 500 mL aferido

com a amostra 50 µL da solução PT-AQ-6A e 50 µL da solução PT-AQ-6C, contendo na sua composição benzeno, entre outros compostos. Nesta solução, os compostos encontravam-se igualmente em concentrações desconhecidas, pelo que também foram preparadas amostras sem diluição, com diluição de 10x e diluição de 20x.

Em ambos os casos, foram preparadas soluções-padrão de calibração, bem como soluções-padrão de controlo, usadas para determinar a concentração dos analitos na amostra e validar os resultados, respetivamente. As soluções-padrão de controlo são preparadas a partir de soluções comerciais semelhantes às usadas para preparação das soluções-padrão de calibração, devendo as concentrações dos analitos apresentar um desvio relativo de até $\pm 25\%$ em relação aos valores obtidos através da curva de calibração gerada, de modo aos resultados serem validados.

Uma vez disponibilizados os valores aceites como verdadeiros relativos à concentração dos analitos nas soluções fornecidas, estes foram comparados com os resultados obtidos por cada técnico, de modo a verificar os Z-Scores obtidos.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. IMPLEMENTAÇÃO DO MÉTODO PARA DETERMINAÇÃO DE BENZENO, 1,2-DICLOROETANO, CLORETO DE VINILO, THMS, TRICLOROETENO E TETRACLOROETENO

Conforme referido anteriormente, numa primeira fase foram determinados os RTs do benzeno e do 1,2-dicloroetano. Para a determinação do RT do benzeno, sobrepôs-se os cromatogramas extraídos através do canal TIC das $m/z=78$, $m/z=77$ e $m/z=51$ (Figura 22) – correspondentes a três dos iões com maior intensidade do espectro de massa do benzeno – e, posteriormente, procedeu-se à identificação do composto por comparação do espectro de massa do pico mais provável do cromatograma do ião que gerou uma maior intensidade de sinal ($m/z=78$) com a biblioteca de espectros de massa do *software Chromeleon*, tendo-se identificado o benzeno com um grau probabilístico de correspondência de 46,86% e um RT de 7,44 min (Figura 23). O grau probabilístico de correspondência relativamente baixo do benzeno deveu-se à presença do ião de $m/z=62$, comum aos espectros de massa deste composto e do 1,2-dicloroetano; uma vez que os picos cromatográficos de ambos os compostos se encontravam sobrepostos, houve interferência na identificação do benzeno.

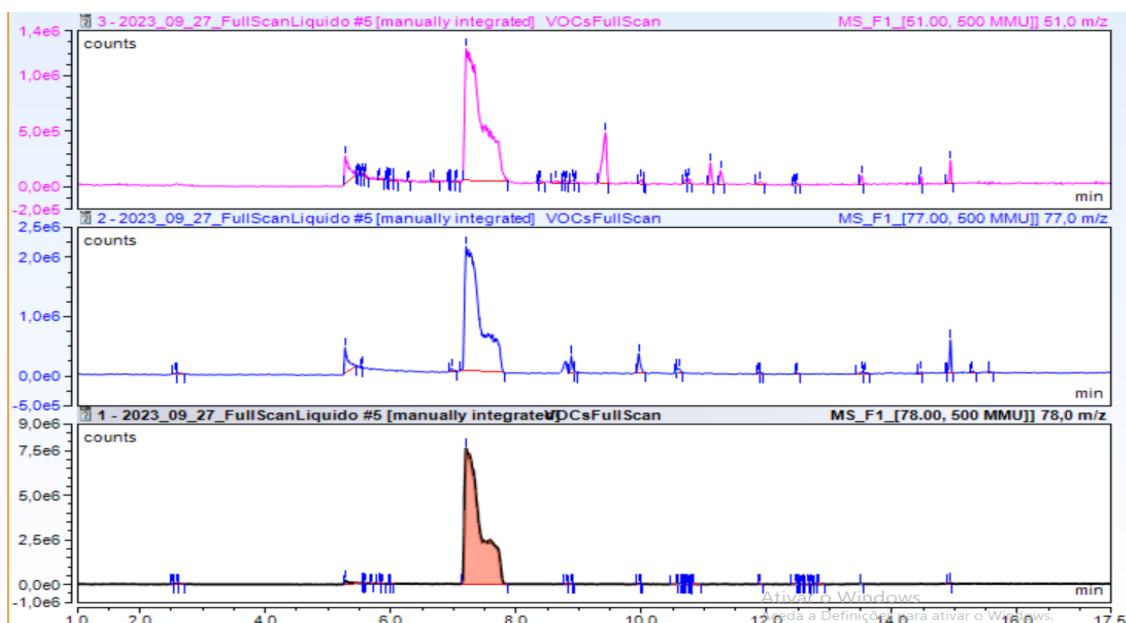


Figura 22: Cromatogramas das $m/z=51$, $m/z=77$ e $m/z=78$ extraídas através do canal TIC

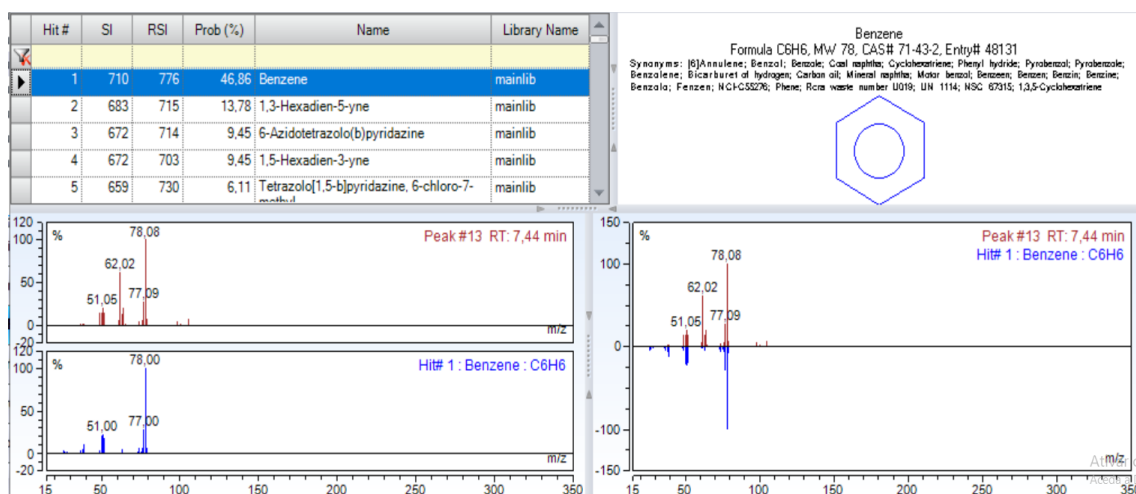


Figura 23: Biblioteca de espectros de massa para identificação do benzeno e determinação do seu RT

O mesmo procedimento foi realizado para a determinação do RT do 1,2-dicloroetano; sobrepos-se os cromatogramas extraídos através do canal TIC das $m/z=49$, $m/z=62$ e $m/z=64$ (Figura 24) – correspondentes a três dos iões com maior intensidade do espectro de massa do 1,2-dicloroetano – e, posteriormente, procedeu-se à identificação do composto por comparação do espectro de massa do pico mais provável do cromatograma do ião que gerou maior intensidade de sinal ($m/z=62$) com a biblioteca de espectros de massa do *software Chromeleon*, tendo-se identificado o 1,2-dicloroetano com um grau probabilístico de correspondência de 96,32% e um RT de 7,44 min (Figura 25).

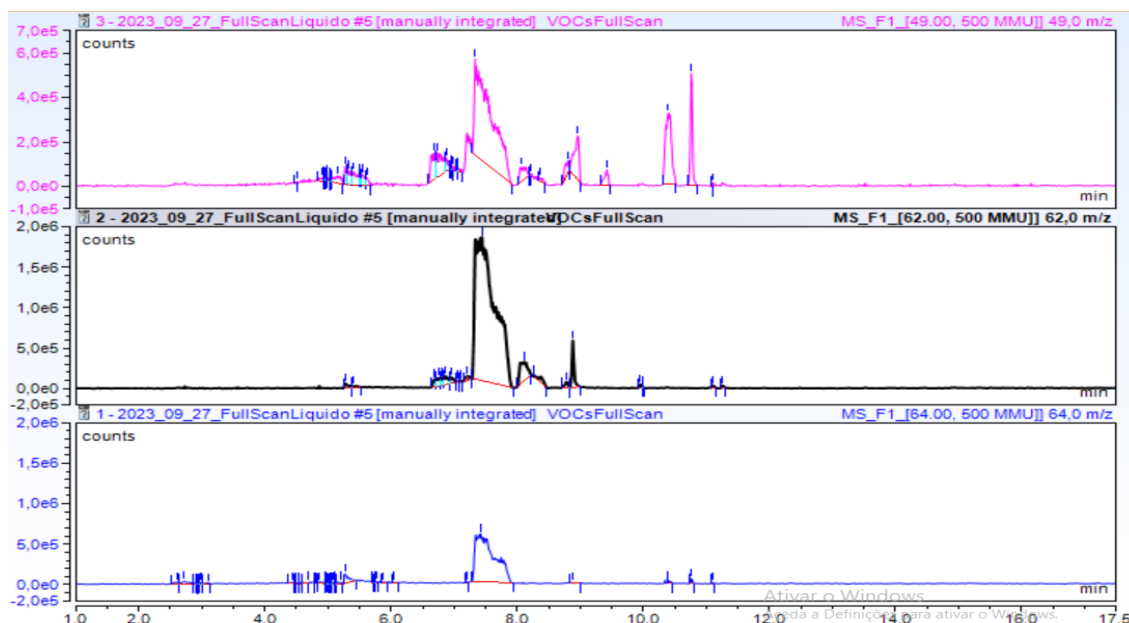


Figura 24: Cromatogramas das $m/z=49$, $m/z=62$ e $m/z=64$ extraídas através do canal TIC

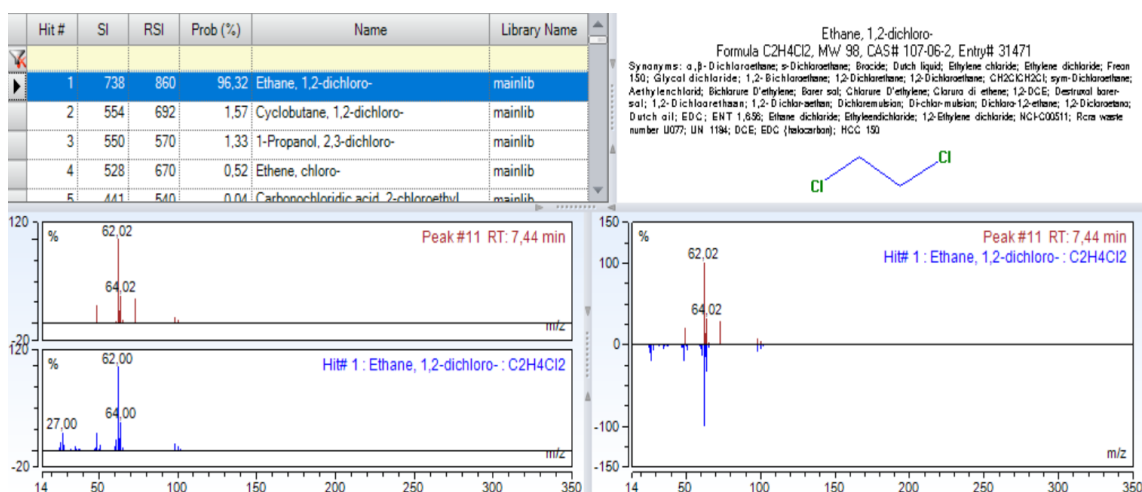


Figura 25: Biblioteca de espectros de massa usada para identificação do 1,2-dicloroetano e determinação do seu RT

Uma vez determinados os RTs do benzeno e do 1,2-dicloroetano, todas as análises realizadas posteriormente para a determinação de benzeno, 1,2-dicloroetano, cloreto de vinilo, THMs, tricloroetano e tetracloroetano foram efetuadas através da técnica de HS-SPME-GC-MS, diferindo apenas na fibra utilizada em cada ensaio. Numa fase inicial, preparou-se uma solução-padrão com mistura de THMs, tricloroetano, tetracloroetano, benzeno e 1,2-dicloroetano a 50,0 µg/L para analisar através do MIA desenvolvido pelo Laboratório e acreditado para análise de THMs, tricloroetano e tetracloroetano em amostras de água destinadas ao consumo humano (*MIA COVs 1*), recorrendo a uma fibra PDMS e através do modo de aquisição em SIM e *full scan* (Figura 26).

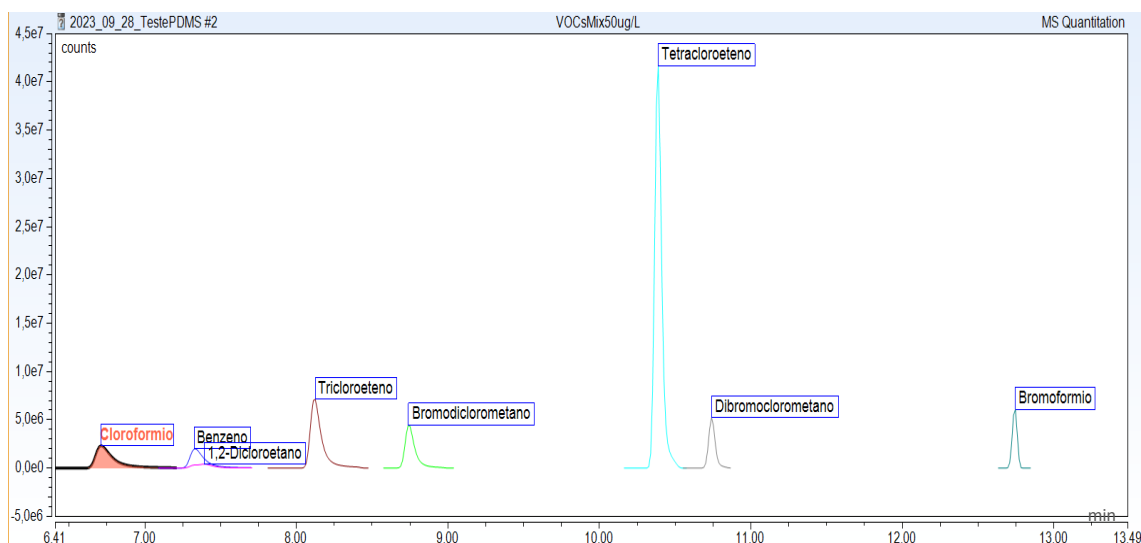


Figura 26: Cromatograma com modo de aquisição SIM gerado através da análise com MIA COVs 1 de solução-padrão a 50,0 µg/L preparado através da S.I. 1 e extraído com fibra PDMS

Através da análise dos picos cromatográficos, verificou-se que o benzeno e o 1,2-dicloroetano saíam coeluíduos, isto é, os seus picos cromatográficos sobrepunham-se. Para além disso, constatou-se que, por um lado, a intensidade de sinal do 1,2-dicloroetano era bastante reduzida – pelo facto da fibra PDMS ter uma fraca capacidade de extração de compostos com baixo peso molecular – e, por outro lado, o seu pico cromatográfico não apresentava uma boa definição, i.e. não era alto e estreito (Figura 27).

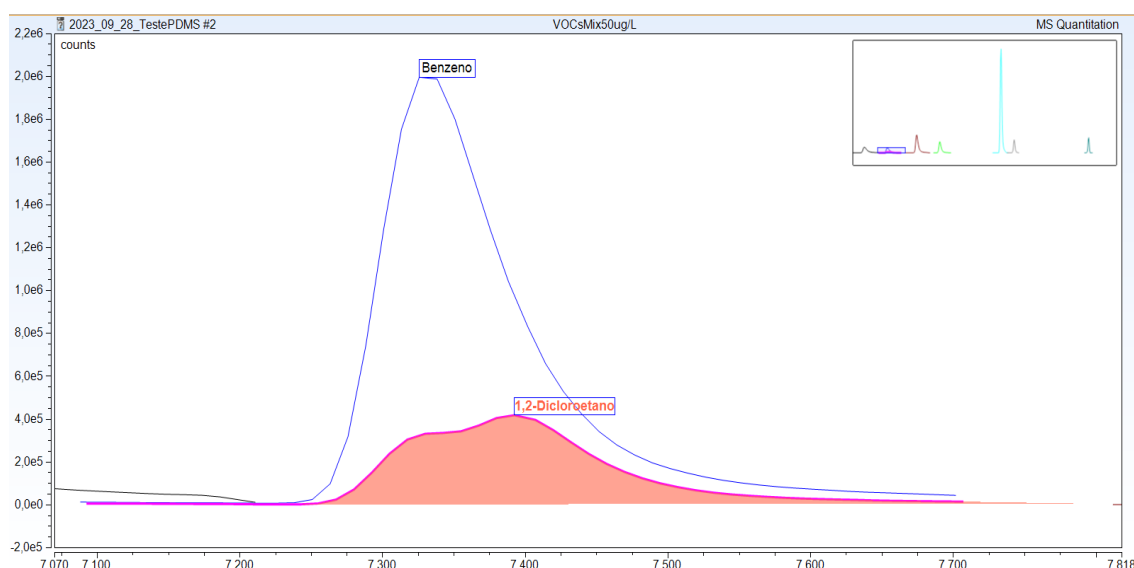


Figura 27: Ampliação do cromatograma com modo de aquisição SIM gerado através da análise com MIA COVs 1 de solução-padrão a 50,0 µg/L preparada através da S.I. 1 e extraída com fibra PDMS

De modo a tentar promover a separação dos picos cromatográficos e uma melhoria na definição do pico cromatográfico do 1,2-dicloroetano, procedeu-se a uma primeira alteração do MIA inicial, que passou pelo aumento da temperatura inicial do forno do cromatógrafo gasoso de 30 °C para 35 °C, mantendo um patamar a essa temperatura durante 2 min, seguido de incrementos de temperatura iguais aos implementados no MIA anterior, ou seja, uma rampa de temperatura a 10 °C/min até se atingirem 120 °C, mantendo um patamar a essa temperatura durante 1 min, seguido de uma nova rampa de temperatura a 40 °C/min até se atingirem 220 °C, mantendo um patamar a essa temperatura durante 3 min, terminando a corrida (*MIA COVs 2*). Com o *MIA COVs 2*, analisou-se uma solução-padrão a 50,0 µg/L preparada a partir da S.I. 1 através do modo de aquisição em *full scan*, tendo posteriormente sido extraídas as $m/z=78$ e $m/z=62$ para determinação do benzeno e do 1,2-dicloroetano, respetivamente. Apesar deste aumento de temperatura inicial não ter promovido a separação do benzeno e do 1,2-dicloroetano, verificou-se uma melhoria na definição do pico cromatográfico do 1,2-dicloroetano (Figura 28).

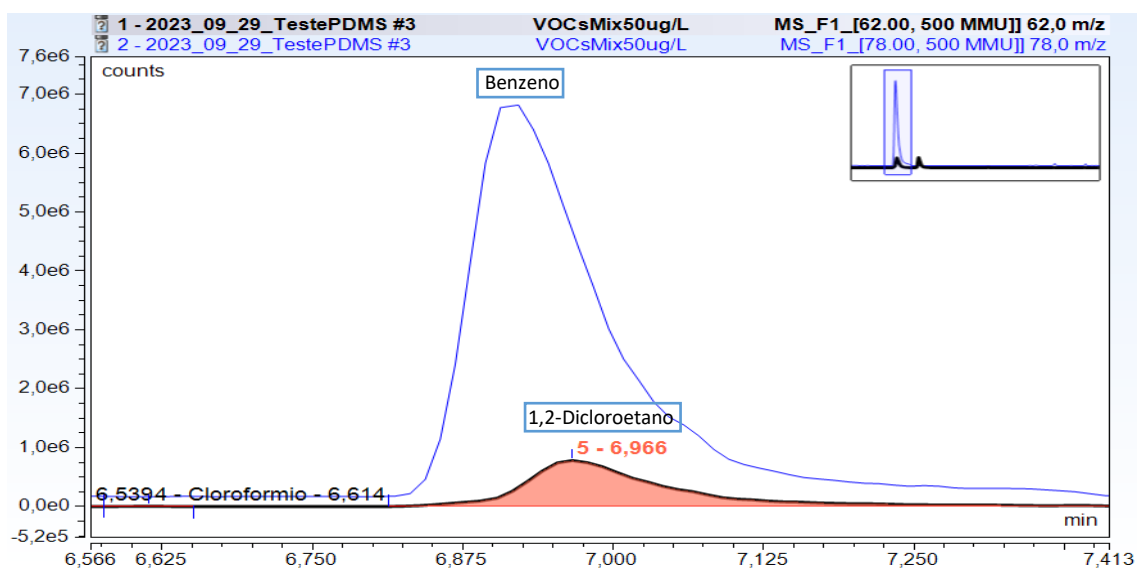


Figura 28: Ampliação do cromatograma com modo de aquisição SIM gerado através da análise com *MIA COVs 2* de solução-padrão a 50,0 µg/L preparada através da S.I. 1 e extraída com fibra PDMS

Uma vez que se verificou uma melhoria do pico cromatográfico do 1,2-dicloroetano através do *MIA COVs 2* relativamente ao *MIA COVs 1*, optou-se por desenvolver os MIAs seguintes com a alteração ao nível do patamar inicial de temperatura supramencionada. Deste modo, prepararam-se soluções-padrão a 50,0 µg/L a partir da

S.I. 1, para serem extraídas pela fibra PDMS e CAR-PDMS através do *MIA* COVs 2, com modo de aquisição em SIM e *full scan*. Visualizando os cromatogramas gerados através das fibra PDMS (Figura 29) e CAR-PDMS (Figura 30), verificou-se um arraste dos picos cromatográficos no cromatograma gerado pela análise com a fibra CAR-PDMS; tal deve-se ao facto de a fibra CAR-PDMS apresentar uma maior capacidade de extração de COVs relativamente à fibra PDMS e, como tal, o *MIA* não se encontrava devidamente desenvolvido a nível das configurações instrumentais para análises nas quais ocorre uma maior adsorção de compostos por parte da fibra.

Para além disso, alguns dos picos cromatográficos, nomeadamente os mais voláteis – particularmente, clorofórmio, benzeno, 1,2-dicloroetano e bromodiclorometano – não foram adquiridos na totalidade, uma vez que as janelas de aquisição no modo SIM se encontravam configuradas para durações inferiores, determinadas previamente de acordo com os picos cromatográficos gerados pelas análises realizadas através do *MIA* COVs 2 e recorrendo à fibra PDMS. Deste modo, a capacidade de extração de ambas as fibras foi avaliada comparando as alturas dos picos cromatográficos dos compostos, indicativas da intensidade de sinal dos mesmos, e determinou-se o coeficiente de variação da intensidade de sinal de cada composto analisado, tendo-se verificado que a fibra CAR-PDMS conferiu uma intensidade de sinal significativamente superior (CV>25%) relativamente à fibra PDMS (Figura 31).

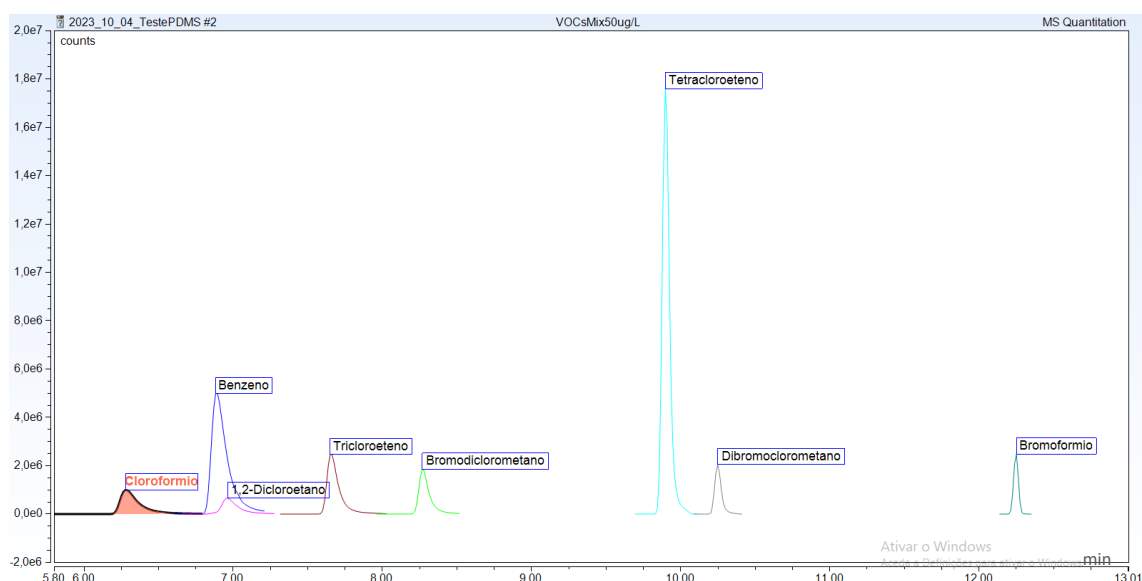


Figura 29: Cromatograma com modo de aquisição SIM gerado através da análise da solução-padrão com mistura de benzeno, 1,2-dicloroetano, THMs, tricloroetano e tetracloroetano a 50,0 µg/L com a fibra PDMS pelo *MIA* COVs 2

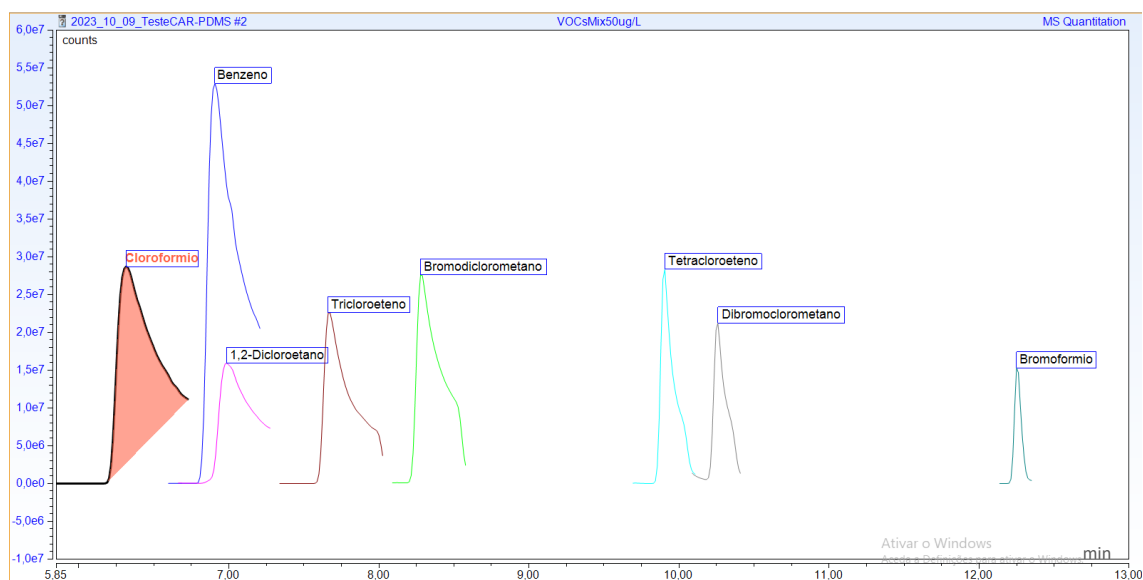


Figura 30: Cromatograma com modo de aquisição SIM gerado através da análise da solução-padrão com mistura de benzeno, 1,2-dicloroetano, THMs, tricloroetano e tetracloroetano a 50,0 µg/L com a fibra CAR-PDMS pelo MIA COVs 2

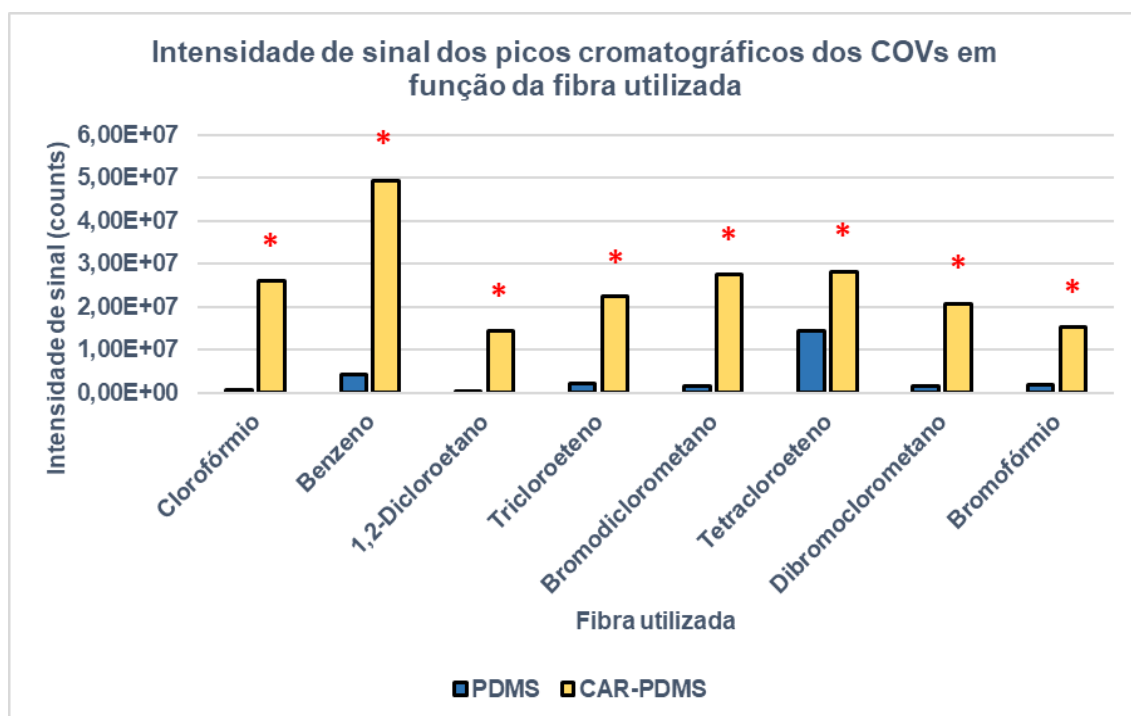


Figura 31: Gráfico da intensidade de sinal dos picos cromatográficos dos COVs em função da fibra utilizada

Legenda: (*) = diferença estatisticamente significativa

Apesar da extração dos compostos com a fibra CAR-PDMS ter conferido uma intensidade de sinal significativamente superior dos picos cromatográficos, não resolveu o problema da coeluição do benzeno e do 1,2-dicloroetano; assim, continuou a proceder-se a novas configurações instrumentais do MIA. Num dos novos MIAs testados, ajustou-se a janela de aquisição dos picos cromatográficos de modo a serem devidamente adquiridos, e procedeu-se à alteração do gradiente de temperaturas; manteve-se o patamar inicial de 35 °C durante 2 min, seguido de uma única rampa de temperatura, de modo a atingir 220 °C com um incremento de 15 °C/min (*MIA COVs 3*). Com a implementação de uma única rampa de temperatura, procurou-se avaliar de que modo influenciava, por um lado, a definição dos picos cromatográficos e, por outro lado, os RTs dos compostos. Para além disso, com o aumento do incremento da rampa de temperatura de 10 °C/min para 15 °C/min, procurou verificar-se igualmente se conferia uma melhor separação do benzeno e do 1,2-dicloroetano.

Deste modo, procedeu-se à análise de soluções-padrão a uma concentração de 10,0 µg/L preparadas a partir da S.I. 1 para serem analisadas através do *MIA COVs 3* com uma fibra CAR-PDMS, através do modo de aquisição em SIM e *full scan*. Através da análise do cromatograma gerado com este MIA (Figura 32), verificou-se com base nos novos RTs dos compostos, que estes saíam mais rapidamente da coluna cromatográfica, o que seria vantajoso do ponto de vista operacional, na medida em que encurtaria o tempo de análise de cada amostra. No entanto, verificou-se que, por um lado, os picos cromatográficos dos compostos se mantinham com arraste e fraca definição, e, por outro lado, o benzeno e o 1,2-dicloroetano se mantinham coeluídos.

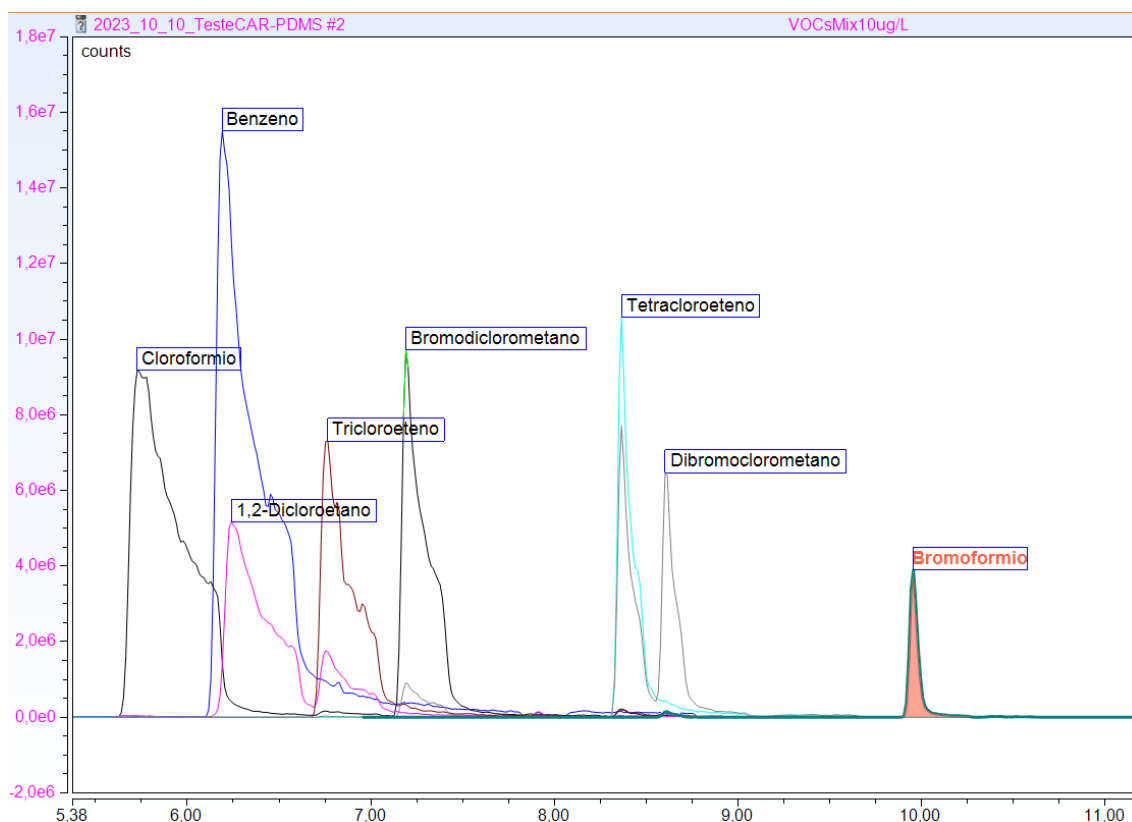


Figura 32: Cromatograma com modo de aquisição SIM gerado através da análise com *MIA COVs 3* de solução-padrão a 10,0 µg/L preparada através da S.I. 1 e extraída com a fibra CAR-PDMS

Uma vez que os problemas apontados se mantinham com o *MIA COVs 3*, voltou a desenvolver-se um novo MIA, testando um gradiente de temperaturas diferentes; voltou a manter-se o patamar inicial de 35 °C durante 2 min, seguido de uma rampa de temperatura isotérmica, de modo a atingir uma temperatura de 40 °C com um incremento de 0,4 °C/min, e terminando com uma outra rampa de temperatura a 40 °C/min até atingir 220 °C, mantendo um patamar a essa temperatura durante 3 min (*MIA COVs 4*). Com a rampa de temperatura isotérmica, procurou manter-se o forno a uma temperatura aproximadamente constante durante uma duração mais longa, de modo a promover a separação do benzeno e do 1,2-dicloroetano através do fator das suas diferentes afinidades para a fase estacionária da coluna cromatográfica, ao invés das suas diferentes temperaturas de ebulição.

Foi então feita uma análise de soluções-padrão preparadas a uma concentração de 10,0 µg/L a partir da S.I. 1 para serem analisados através do *MIA COVs 4* com uma fibra CAR-PDMS, através do modo de aquisição em *full scan*, tendo posteriormente sido extraídas a partir do canal TIC as $m/z=78$ e $m/z=62$ para determinação do benzeno e 1,2-dicloroetano, respetivamente. Através da análise do cromatograma gerado com este

MIA (Figura 33), verificou-se que o benzeno e o 1,2-dicloroetano se mantinham coeluídos e com arraste dos seus picos cromatográficos e, para além disso, saíam bastante mais tardiamente da coluna cromatográfica, relativamente ao que sucedia com os MIAs desenvolvidos anteriormente.

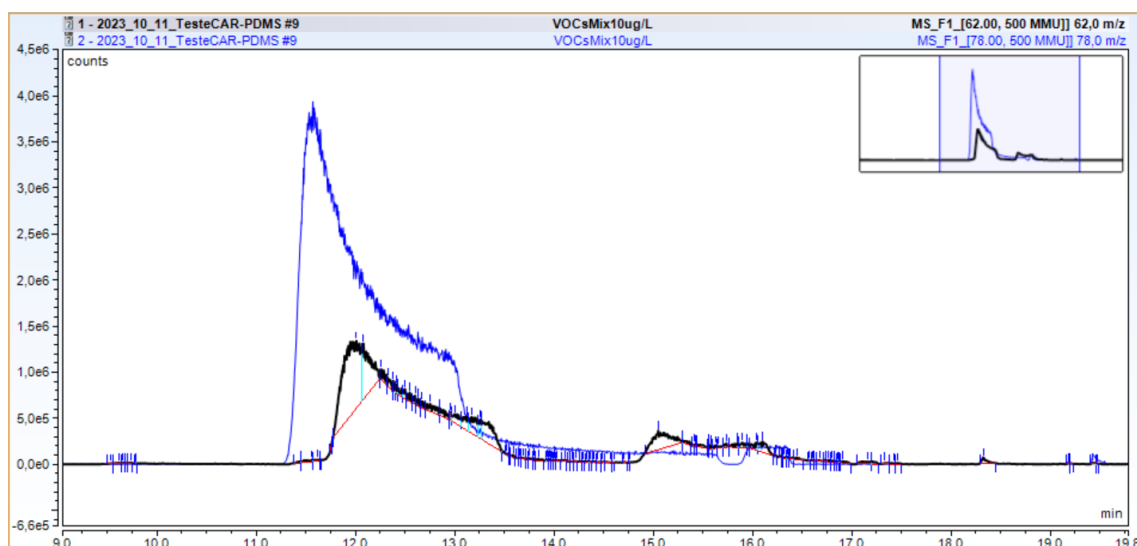


Figura 33: Cromatograma com modo de aquisição full scan gerado através da análise com MIA COVs 4 de solução-padrão a 10,0 µg/L preparada através da S.I. 1 e extraída com fibra CAR-PDMS

Deste modo, foi desenvolvido um novo MIA, voltando a manipular-se o gradiente de temperatura do forno. Manteve-se o patamar inicial de 35 °C durante 2 min, seguido de uma rampa de temperatura a 10 °C/min até se atingir 70 °C, mantendo-se um patamar a essa temperatura durante 4 min, seguido de uma nova rampa de temperatura a 10 °C/min até se atingir 120 °C, mantendo-se um patamar a essa temperatura durante 1 min, terminando com uma última rampa de temperatura a 40 °C/min até se atingir 220 °C, e um último patamar a essa temperatura durante 3 min (MIA COVs 5). Essencialmente, este gradiente de temperatura foi desenvolvido à semelhança do implementado para o MIA COVs 2, mas de modo a manter um patamar adicional à temperatura de 70 °C; esta alteração foi implementada na medida em que se verificou que, através do MIA COVs 2, a temperatura do forno se encontrava a aproximadamente 70 °C no momento correspondente aos RTs do benzeno e do 1,2-dicloroetano, isto é, correspondia à temperatura à qual estes compostos saíam da coluna cromatográfica. Assim, acrescentou-se um patamar de 4 min – para promover a separação dos referidos compostos tendo por base as suas diferentes afinidades à coluna cromatográfica – à temperatura de 70 °C.

Realizou-se uma análise de soluções-padrão preparadas a uma concentração de 10 µg/L a partir da S.I. 1 com uma fibra CAR-PDMS para serem analisadas através do MIA COVs 5, através do modo de aquisição em *full scan*, tendo posteriormente sido extraídas a partir do canal TIC as $m/z=78$ e $m/z=62$ para determinação do benzeno e 1,2-dicloroetano, respetivamente. Através da análise do cromatograma gerado com este MIA (Figura 34), verificou-se que, apesar das alterações efetuadas, o benzeno e o 1,2-dicloroetano se mantinham coeluídos e com arraste dos seus picos cromatográficos saindo, no entanto, mais cedo do que através do MIA COVs 4.

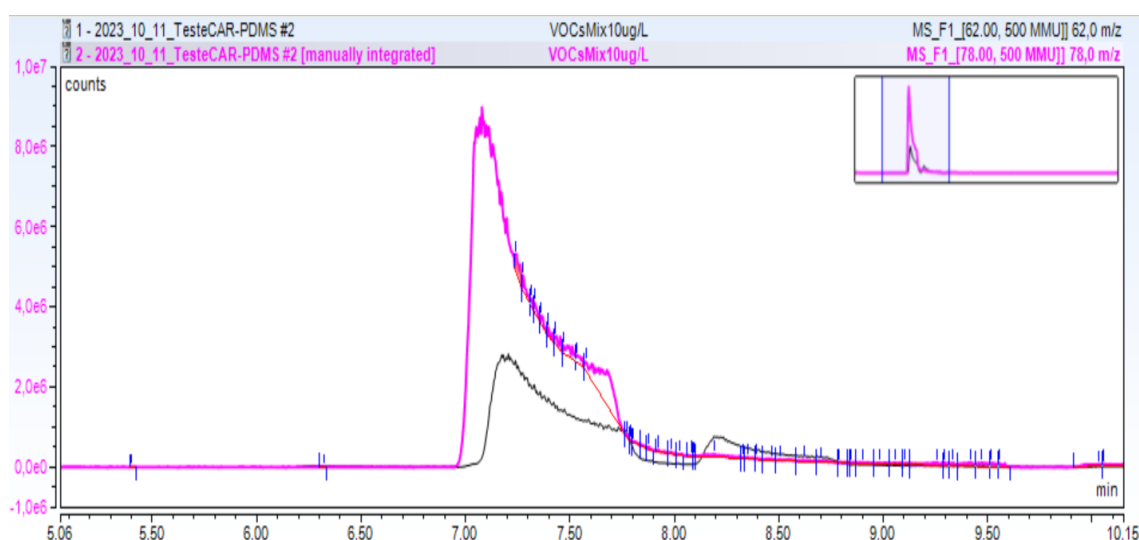


Figura 34: Cromatograma com modo de aquisição full scan gerado através da análise com MIA COVs 5 de solução-padrão a 10,0 µg/L preparada através da S.I. 1 e extraída com fibra CAR-PDMS

Uma vez que o MIA testado até então a gerar picos cromatográficos com melhor definição fora o MIA COVs 2, partiu-se das configurações instrumentais definidas para este MIA para o desenvolvimento de novos MIAs. No entanto, uma vez que os picos cromatográficos gerados através das análises efetuadas com a fibra CAR-PDMS apresentavam pior definição e mais arraste relativamente aos picos cromatográficos gerados através das análises efetuadas com a fibra PDMS, resolveu proceder-se às análises seguintes com a fibra PDMS, não obstante o facto de gerar picos com intensidade de sinal significativamente inferior. Deste modo, tornava-se mais perceptível verificar de que modo as diferentes configurações instrumentais testadas conferiam melhorias, quer através da verificação visual dos cromatogramas, quer através da comparação das áreas dos picos cromatográficos entre diferentes MIAs.

Foi então mantido o gradiente de temperaturas implementado com o *MIA COVs 2*, e foram testadas configurações diferentes noutros parâmetros instrumentais, nomeadamente ao nível da extração dos compostos. Até então, os MIAs desenvolvidos encontravam-se configurados de modo a haver um tempo de incubação de 10 min, durante o qual o *vial* contendo a amostra a analisar se encontrava na incubadora, ficando, alternadamente, a agitar e parado em períodos sucessivos de 30 s, de modo a promover uma partição mais acelerada dos compostos presentes na amostra para o *headspace*, e deste para a fibra; após este tempo, iniciava-se a extração dos analitos por *headspace* através da fibra durante 10 min, período após o qual ocorria a dessorção dos analitos ao nível do injetor do cromatógrafo gasoso.

Uma primeira alteração testada ao nível das configurações referentes à etapa de extração dos compostos foi a redução do tempo de incubação de 10 min para 0,5 min (correspondente à duração mínima de incubação configurável) e o aumento do tempo de extração de 10 min para 19,5 min (*MIA COVs 6*), de modo a que a duração da etapa de HS-SPME do *MIA COVs 6* e do *MIA COVs 2* fossem iguais, para que esta condicionante não interferisse na análise dos resultados. Realizaram-se análises de soluções-padrão preparadas a uma concentração de 0,25 µg/L (correspondente ao LQ que se pretendia atingir para a determinação do benzeno e do 1,2-dicloroetano) a partir da S.I. 1 com uma fibra PDMS para serem analisados através dos *MIA COVs 2* e *MIA COVs 6*, através do modo de aquisição em SIM e *full scan*. Compararam-se as áreas dos picos cromatográficos gerados com o *MIA COVs 2* e com o *MIA COVs 6* (Figura 35) e verificou-se que não havia diferença significativa nas áreas dos picos cromatográficos dos compostos analisados com ambos os métodos (Figura 36).

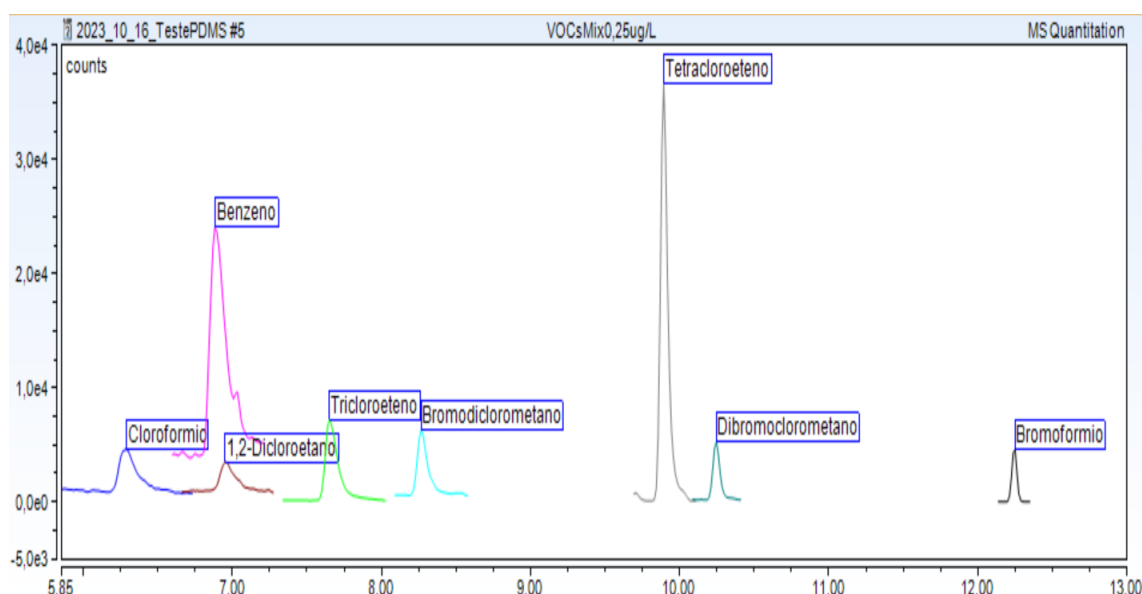


Figura 35: Cromatograma com modo de aquisição SIM gerado através da análise com *MIA COVs 6* de solução-padrão a 0,25 µg/L preparada através da S.I. 1 e extraída com fibra PDMS

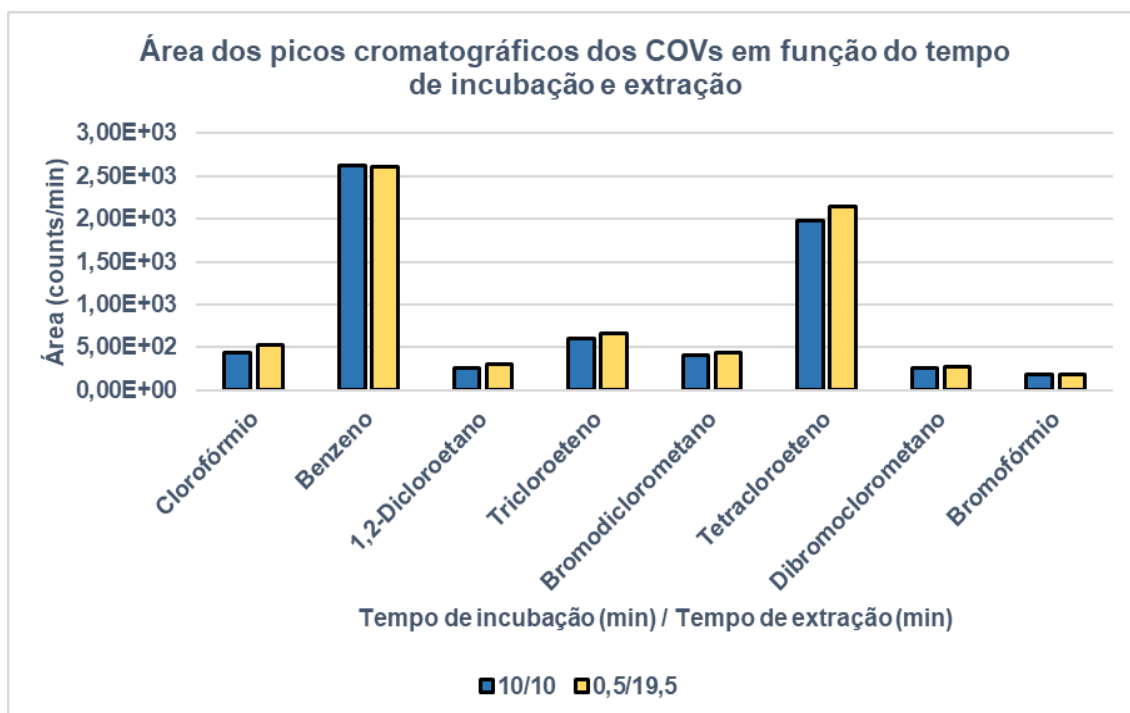


Figura 36: Gráfico da área dos picos cromatográficos dos COVs em função dos tempos de incubação e extração

Uma vez que não se verificaram diferenças significativas ao nível das áreas dos compostos, optou-se por manter as condições de 0,5 min de incubação e 19,5 min de extração, de modo a reduzir o tempo de incubação do *vial*, durante o qual não ocorre partição de analitos para a fibra. Foram então testadas outras configurações, ainda referentes à etapa de extração dos compostos, nomeadamente ao nível da temperatura de extração, correspondente à temperatura à qual a incubadora se encontra durante os momentos de incubação e de extração dos compostos.

Até então, a temperatura de extração encontrava-se configurada para 40 °C, pelo que se testou verificar de que modo uma diminuição para 30 °C (MIA COVs 7) e um aumento para 50 °C (MIA COVs 8) influenciava a área dos picos cromatográficos. Deste modo, foram analisadas soluções-padrão preparadas a uma concentração de 0,25 µg/L a partir da S.I. 1 com uma fibra PDMS para serem analisadas através dos MIA COVs 6, MIA COVs 7 e MIA COVs 8, através do modo de aquisição em SIM e *full scan*.

Compararam-se as áreas dos picos cromatográficos gerados com o MIA COVs 6 e com o MIA COVs 7, tendo-se verificado que a diminuição da temperatura de extração para 30 °C não teve influência significativa na área dos picos cromatográficos (Figura 37). Compararam-se igualmente as áreas dos picos cromatográficos gerados com o MIA

COVs 6 e com o MIA COVs 8, tendo-se verificado que o aumento da temperatura de extração para 50 °C provocou uma diminuição da área dos picos cromatográficos, de forma estatisticamente significativa ($CV > 25\%$) para o tricloroeteno e tetracloroeteno relativamente à verificada com uma temperatura de extração de 30 °C (Figura 37).

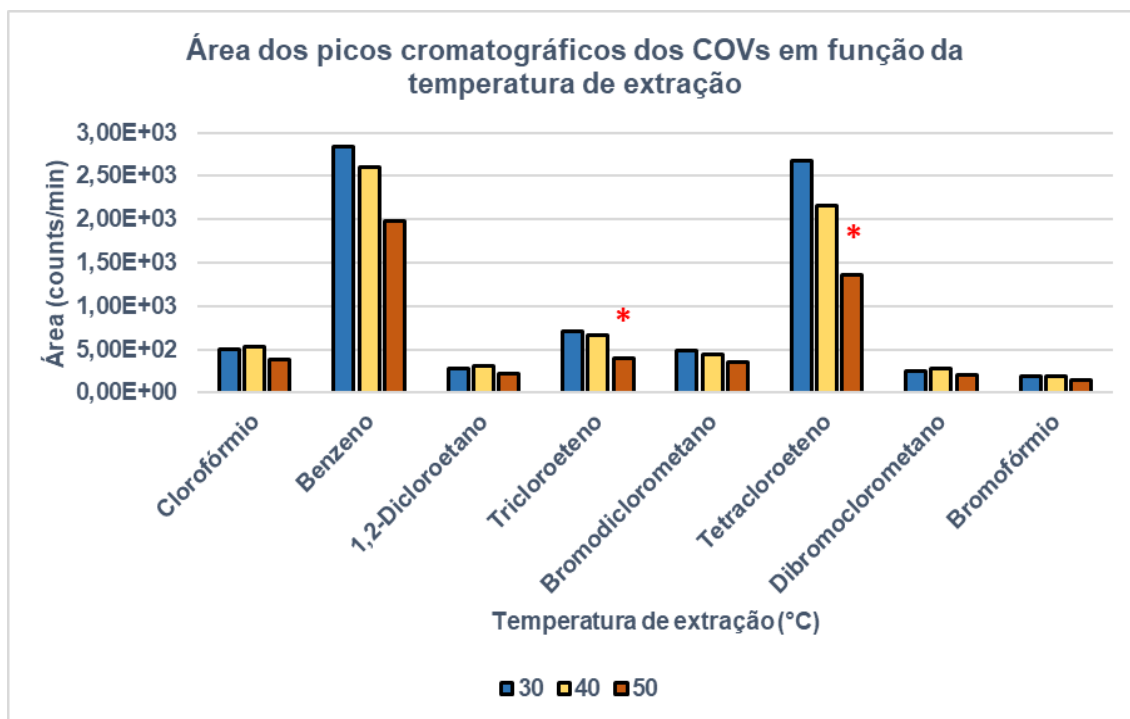


Figura 37: Gráfico da área dos picos cromatográficos dos COVs em função da temperatura de extração

Legenda: (*) = diferença estatisticamente significativa relativamente à área gerada pela temperatura de 30 °C

Neste momento do Estágio, foi preparada a S.I. 2, pelo que se continuou a configurar os MIAs tendo em consideração os parâmetros ideais para a determinação conjunta do cloreto de vinilo com os restantes COVs até aí analisados. Numa fase inicial, foi necessário proceder à determinação do RT do cloreto de vinilo; para tal, preparou-se uma solução-padrão a uma concentração de 50,0 µg/L a partir da S.I. 2 para ser analisado em *full scan* através de um novo MIA (MIA COVs 9) e com uma fibra PDMS. Este MIA apresentava as configurações instrumentais semelhantes às desenvolvidas para o MIA COVs 7; no entanto, antecipou-se o momento de início da análise em *full scan* de 5,5 min para 1 min, uma vez que se previa que o cloreto de vinilo saísse da coluna cromatográfica bastante mais cedo do que os restantes compostos, pelo facto de ser mais volátil.

Uma vez analisado a solução-padrão através do MIA COVs 9, sobrepôs-se os cromatogramas extraídos através do canal TIC das $m/z=62$ e $m/z=64$ (Figura 38) –

correspondentes a dois dos picos com maior intensidade do espectro de massa do cloreto de vinilo – e, posteriormente, procedeu-se à identificação do composto por comparação do espectro de massa do pico mais provável do cromatograma do ião que gerou uma maior intensidade de sinal ($m/z=62$) com a biblioteca de espectros de massa do *software Chromeleon*, tendo-se identificado o cloreto de vinilo com um grau probabilístico de correspondência de 38,96% e um RT de 2,37 min (Figura 39).

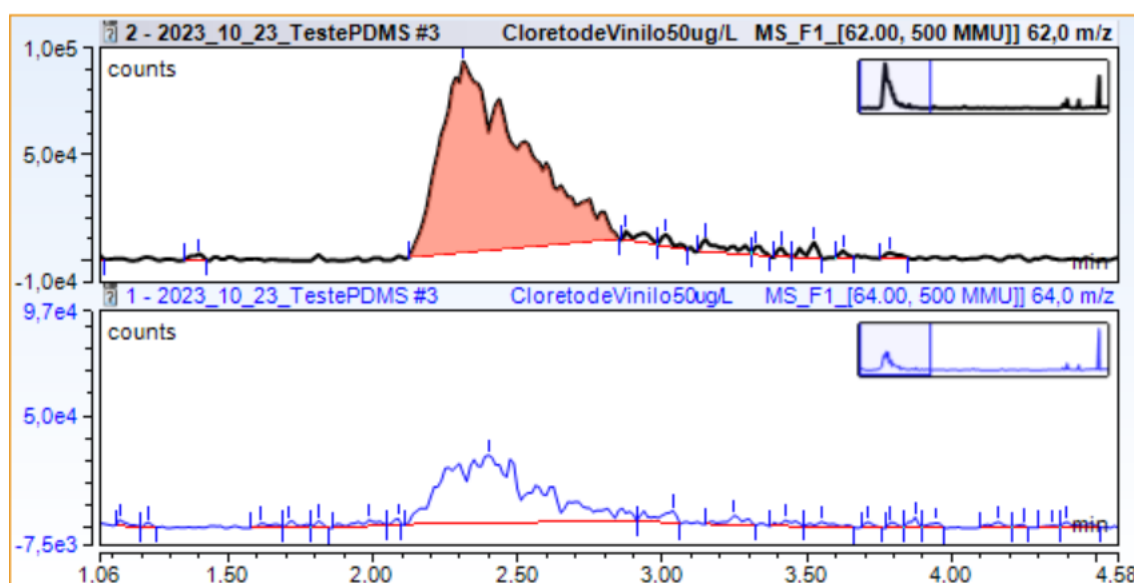


Figura 38: Cromatogramas das $m/z=62$ e $m/z=64$ extraídas através do canal TIC

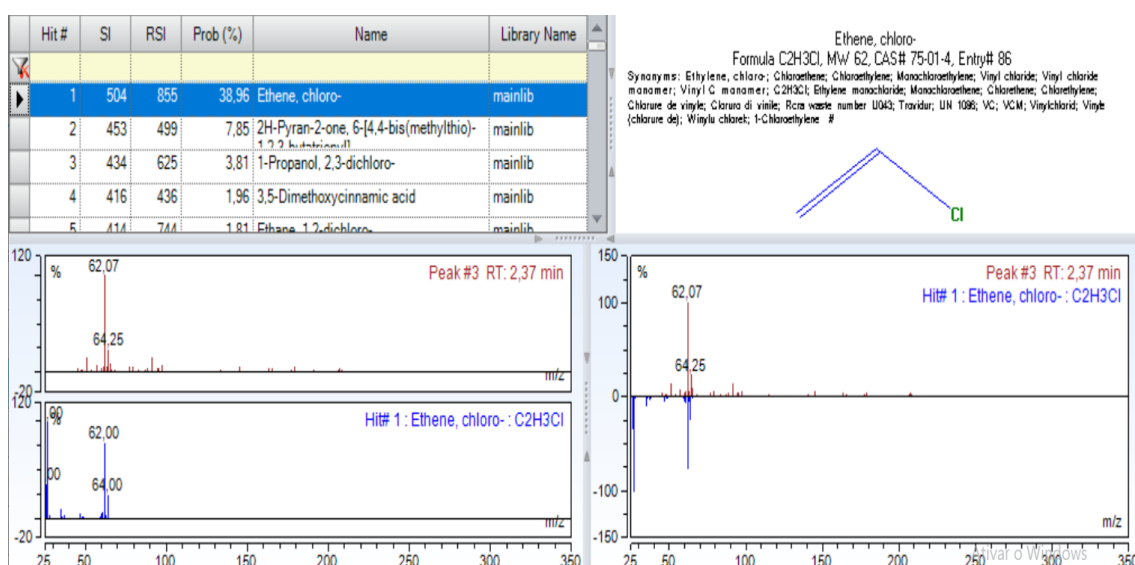


Figura 39: Biblioteca de espectros de massas para identificação do cloreto de vinilo e determinação do seu RT

Após determinação do RT do cloreto de vinilo, procurou verificar-se de que modo a área dos seus picos cromatográficos eram influenciados por diferentes temperaturas de extração. Deste modo, desenvolveram-se dois MIAs com modos de aquisição em *full scan* e SIM para a determinação do cloreto de vinilo e dos restantes compostos, com as restantes configurações instrumentais otimizadas até então – nomeadamente ao nível dos gradientes de temperatura do cromatógrafo gasoso e dos tempos de incubação e extração – e com temperaturas de extração de 30 °C (*MIA COVs 10*) e 40 °C (*MIA COVs 11*), uma vez que se trataram das temperaturas ideais testadas para os COVs analisados até então. Foram então analisadas soluções-padrão contendo cloreto de vinilo a uma concentração de 50,0 µg/L com uma fibra PDMS, através de ambos os MIAs referidos.

Através da análise visual dos cromatogramas gerados com o *MIA COVs 10* (Figura 40) e *MIA COVs 11* (Figura 41), verificou-se que os picos cromatográficos do cloreto de vinilo encontravam-se definidos de forma igualmente satisfatória, embora com um ligeiro arraste. Procedeu-se igualmente à comparação das áreas dos picos cromatográficos gerados através de ambos os MIAs, tendo-se verificado que a temperatura de extração de 30 °C conferia uma área superior do pico cromatográfico do cloreto de vinilo em comparação com a temperatura de extração de 40 °C (Figura 42). Embora a diferença não tenha sido estatisticamente significativa, encontrávamo-nos a analisar uma solução-padrão a uma concentração de 50,0 µg/L, i.e., 500x superior ao valor do LQ que pretendíamos atingir para o cloreto de vinilo (0,10 µg/L), pelo que esta diferença de área poderia tratar-se de um fator suficientemente relevante para a deteção do composto face a outros possíveis interferentes ao nível do seu LQ.

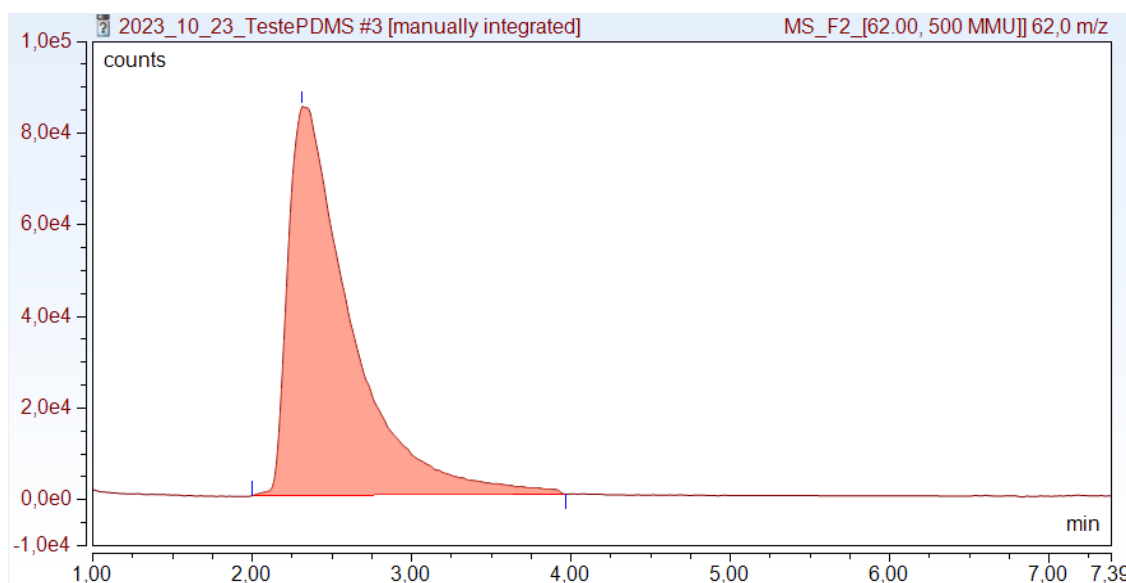


Figura 40: Cromatograma com modo de aquisição SIM gerado através da análise com *MIA COVs 10* de solução-padrão a 50,0 µg/L preparada através da S.I. 2 e extraída com fibra PDMS

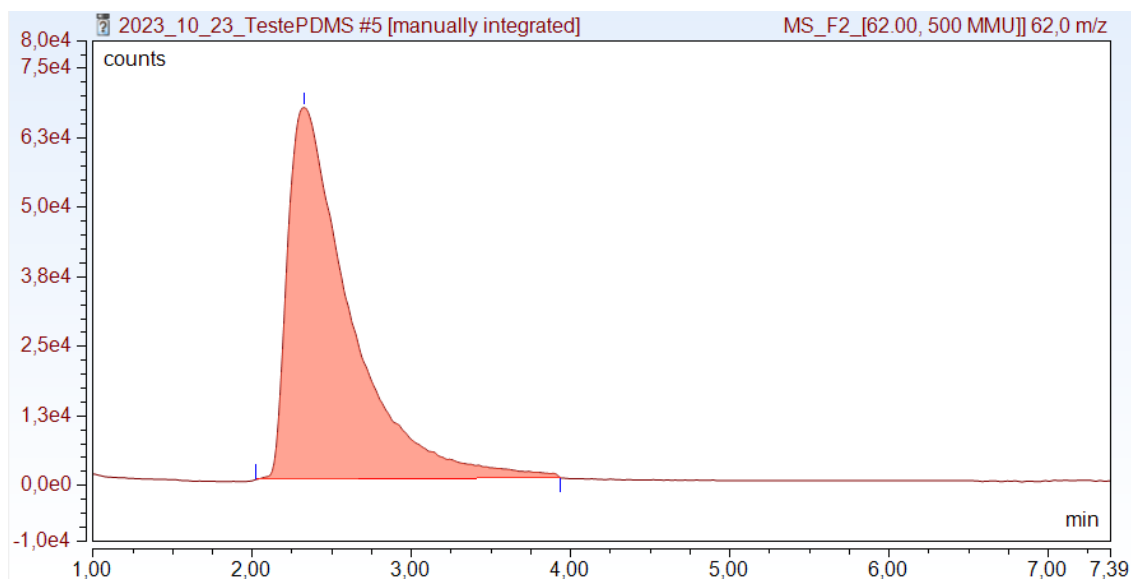


Figura 41: Cromatograma com modo de aquisição SIM gerado através da análise com MIA COVs 11 de solução-padrão a 50,0 µg/L preparada através da S.I. 2 e extraída com fibra PDMS

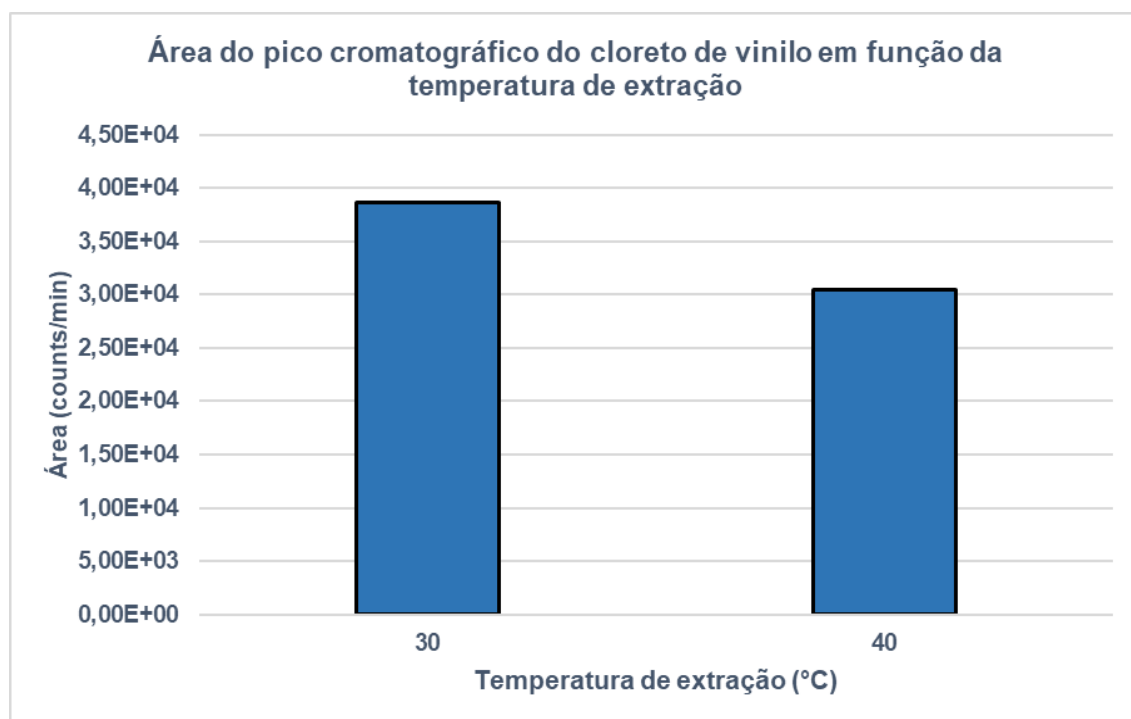


Figura 42: Gráfico da área do pico cromatográfico do cloreto de vinilo em função da temperatura de extração

Deste modo, para o desenvolvimento dos MIAs seguintes partiu-se das configurações instrumentais otimizadas ao nível do gradiente de temperaturas do cromatógrafo gasoso, do tempo de incubação de 0,5 min e da temperatura de extração de 30 °C. A escolha de 30 °C como temperatura de extração para o desenvolvimento dos MIAs seguintes prendeu-se, por um lado, com o facto das áreas dos picos cromatográficos do benzeno, 1,2-dicloroetano, THMs, tricloroeteno e tetracloroeteno extraídos às temperaturas de 30 °C e 40 °C não apresentarem diferenças significativas e, por outro lado, o cloreto de vinilo constituir o fator limitante no desenvolvimento dos MIAs seguintes, pelo facto de apresentar o menor LQ entre os COVs a determinar. Assim, considerou-se 30 °C como sendo a temperatura ótima para a extração dos compostos, pelo facto da área do pico cromatográfico do composto limitante ter sido superior quando a sua extração se deu a esta temperatura.

De seguida, procurou verificar-se de que modo um encurtamento do tempo de extração de 19,5 min para uma duração inferior influenciava os cromatogramas gerados a diferentes níveis, nomeadamente RTs dos compostos, definição dos picos cromatográficos e coeluição do benzeno e 1,2-dicloroetano. Para o desenvolvimento dos MIAs seguintes, decidiu voltar a usar-se a fibra CAR-PDMS para a extração dos compostos, uma vez que a análise efetuada para a determinação do RT do cloreto de vinilo com a fibra PDMS houvera gerado um pico cromatográfico mal definido e com um grau probabilístico de correspondência baixo, o que indicava a fraca capacidade de adsorção do cloreto de vinilo, mesmo a uma concentração 500x superior àquela que se pretendia determinar para o referido composto.

Foi então criado um MIA com uma duração de extração de 10 min (*MIA COVs 12*) para análise de uma solução-padrão contendo cloreto de vinilo a 50,0 µg/L, através dos modos de aquisição em SIM e *full scan*. Com as novas condições, voltou a identificar-se o cloreto de vinilo através da técnica aplicada para a mesma finalidade através da fibra PDMS. Verificou-se que, apesar do tempo de extração ter sido inferior àquele implementado aquando da determinação do RT e identificação do cloreto de vinilo com a fibra PDMS, o pico cromatográfico apresentou uma maior intensidade de sinal e uma definição superior (Figura 43), tendo igualmente sido identificado com um grau probabilístico de correspondência significativamente superior (Figura 44). Tal demonstrou-se indicativo da maior capacidade de extração de compostos mais voláteis, como é o caso do cloreto de vinilo, através da fibra CAR-PDMS comparativamente à fibra PDMS.

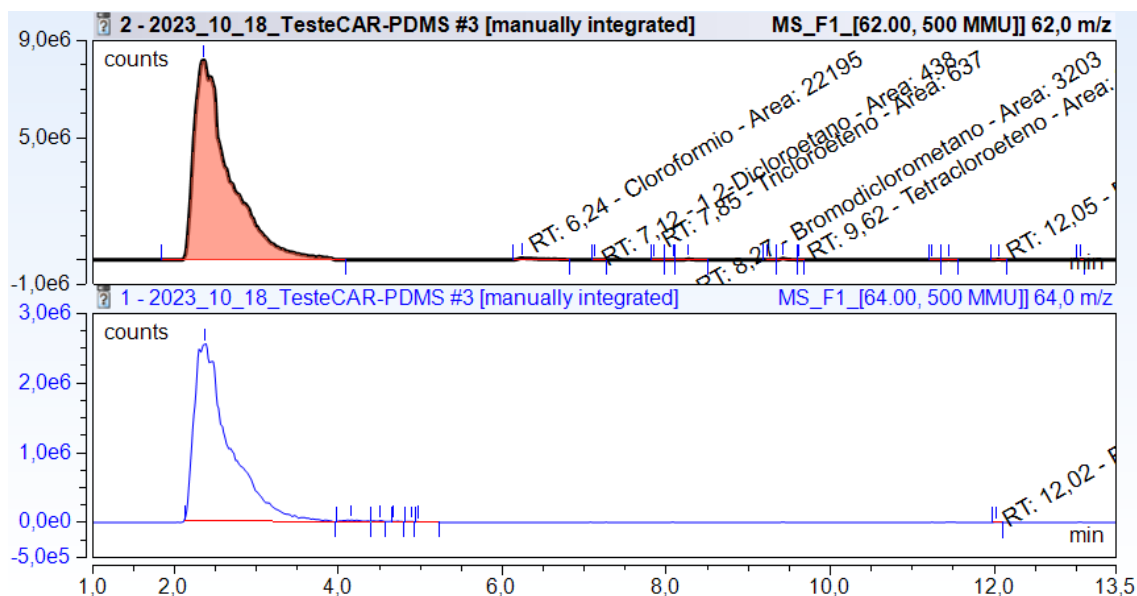


Figura 43: Cromatogramas das $m/z=62$ e $m/z=64$ extraídas através do canal TIC

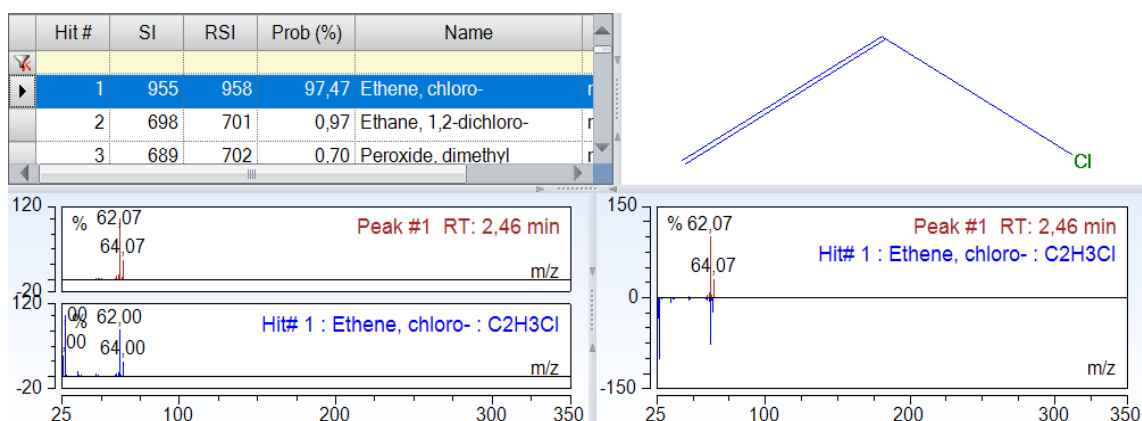


Figura 44: Biblioteca de espectros de massas para identificação do cloreto de vinilo

Através do MIA COVs 12 foi igualmente analisado uma solução-padrão contendo os restantes COVs a uma concentração de 0,25 µg/L através dos modos de aquisição em SIM e *full scan*. Visualizando o cromatograma gerado (Figura 45), verificou-se que o benzeno e o 1,2-dicloroetano se mantinham coeluídos e, tal como o que sucedia anteriormente com a análise dos COVs recorrendo à fibra CAR-PDMS, verificou-se que os picos cromatográficos gerados apresentavam pior definição e mais arraste, quando comparado com os compostos extraídos com a fibra PDMS. Para além disso, constatou-se que os picos cromatográficos não foram adquiridos na totalidade, uma vez que as janelas de aquisição não se encontravam devidamente configuradas para o MIA criado.

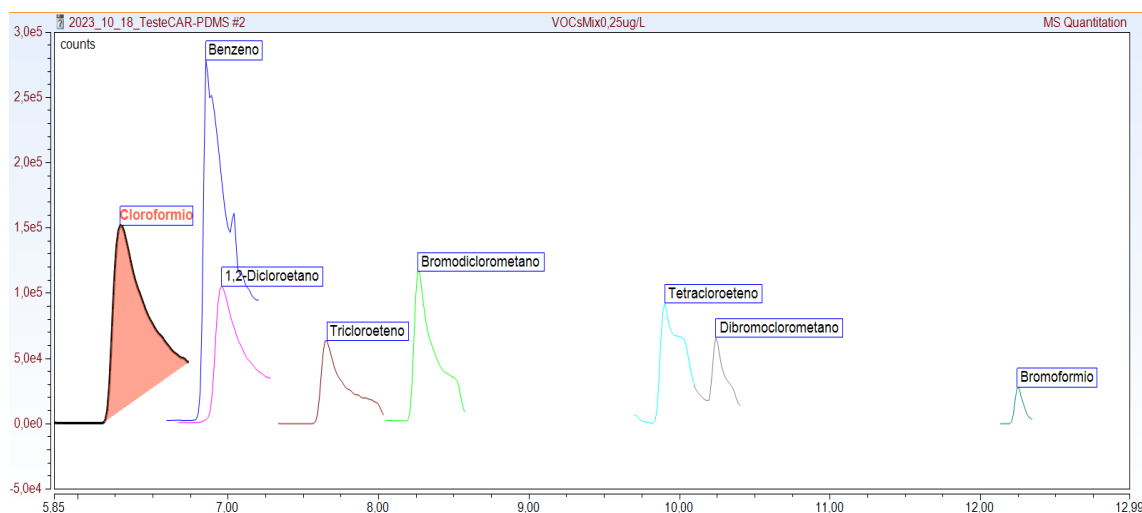


Figura 45: Cromatograma com modo de aquisição SIM gerado através da análise com MIA COVs 12 de solução-padrão a 0,25 µg/L preparada através da S.I. 1 e extraída com fibra CAR-PDMS

De todo modo, optou-se por manter as configurações instrumentais otimizadas para o MIA COVs 12 e testar novas configurações ao nível de outros parâmetros, nomeadamente no modo de injeção dos compostos no injetor do cromatógrafo gasoso. Até então, a injeção encontrava-se definida para os 2 min iniciais serem feitos em modo *splitless*, e a restante duração da injeção em modo *split*. De modo a tentar resolver o arraste dos picos cromatográficos, testou substituir-se o modo *splitless* pelo modo *splitless with surge*; este modo aplica uma pressão determinada pelo operador com uma duração igualmente determinada pelo operador, de modo a coincidir com o momento em que ocorre a injeção em *splitless*, o que provoca a aceleração da transferência dos compostos para a coluna cromatográfica [141].

Assim, foram criados três novos MIAs, cada um com uma pressão de *surge* de 250 kPa, diferindo entre eles relativamente à duração de *surge*: 0,50 min (MIA COVs 13), 1,0 min (MIA COVs 14) e 1,5 min (MIA COVs 15), e foram preparadas soluções-padrão a uma concentração de 0,25 µg/L a partir da S.I. 1 para serem analisados através dos diferentes MIAs.

Verificou-se que a introdução do modo *splitless with surge* antecipou o RT dos compostos mais voláteis e que, com o aumento da duração de *surge*, os picos cromatográficos saíam gradualmente com pior definição e mais arraste (Figuras 46 – 48). Uma vez que o bromoformio se trata do composto menos volátil de entre os COVs analisados, o seu pico cromatográfico foi pouco afetado pela introdução de *surge*, contrariamente aos restantes compostos. Deste modo, comparou-se somente a área

dos picos cromatográficos do bromofórmio, tendo-se verificado que não havia diferenças significativas entre os diferentes MIAs (Figura 49).

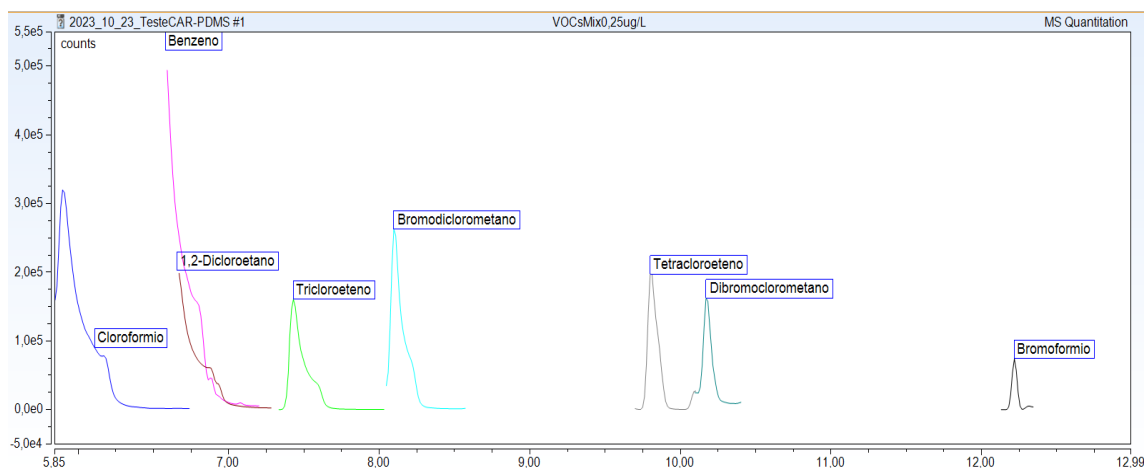


Figura 46: Cromatograma com modo de aquisição SIM gerado através da análise com MIA COVs 13 de solução-padrão a 0,25 µg/L preparada através da S.I. 1 e extraída com fibra CAR-PDMS

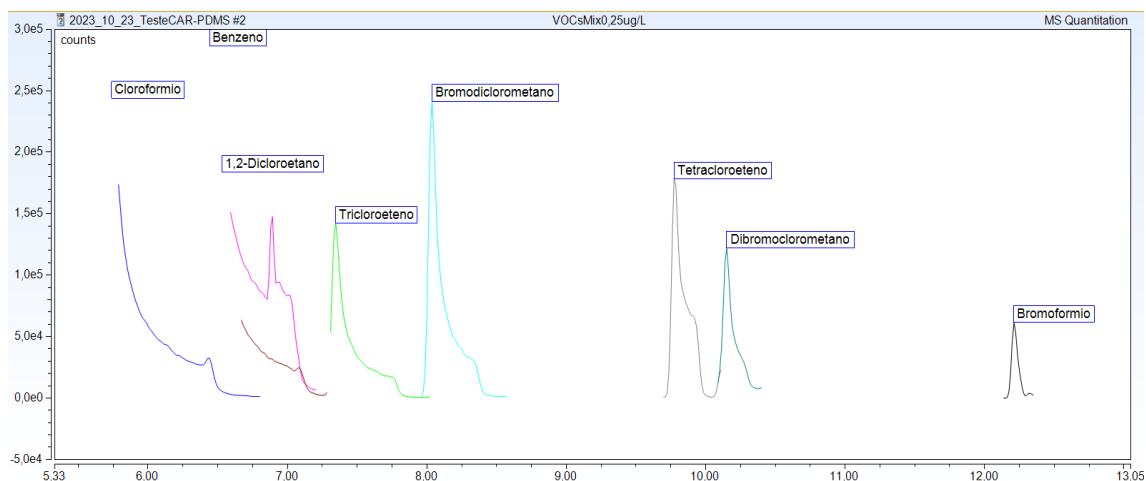


Figura 47: Cromatograma com modo de aquisição SIM gerado através da análise com MIA COVs 14 de solução-padrão a 0,25 µg/L preparada através da S.I. 1 e extraída com fibra CAR-PDMS

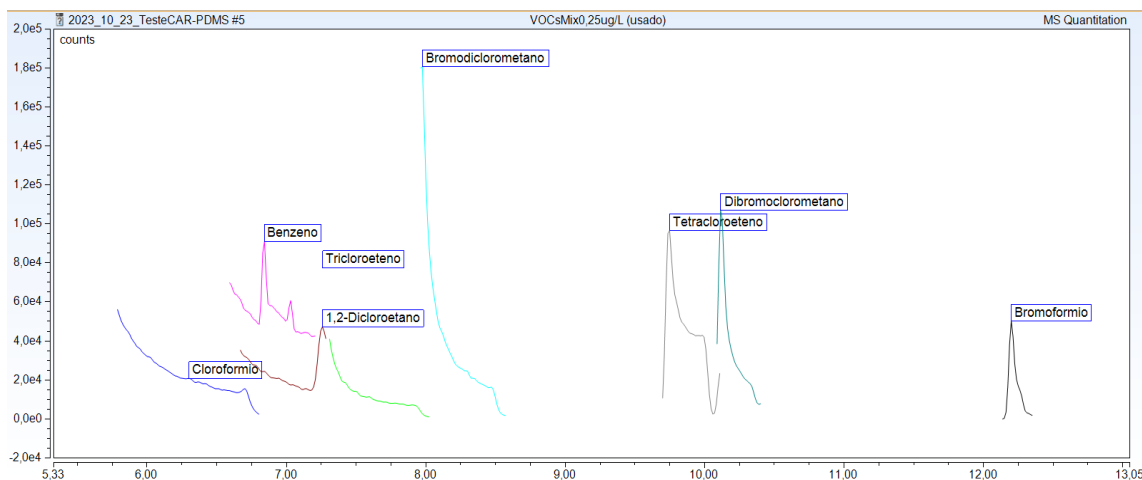


Figura 48: Cromatograma com modo de aquisição SIM gerado através da análise com MIA COVs 15 de solução-padrão a 0,25 µg/L preparada através da S.I. 1 e extraída com fibra CAR-PDMS

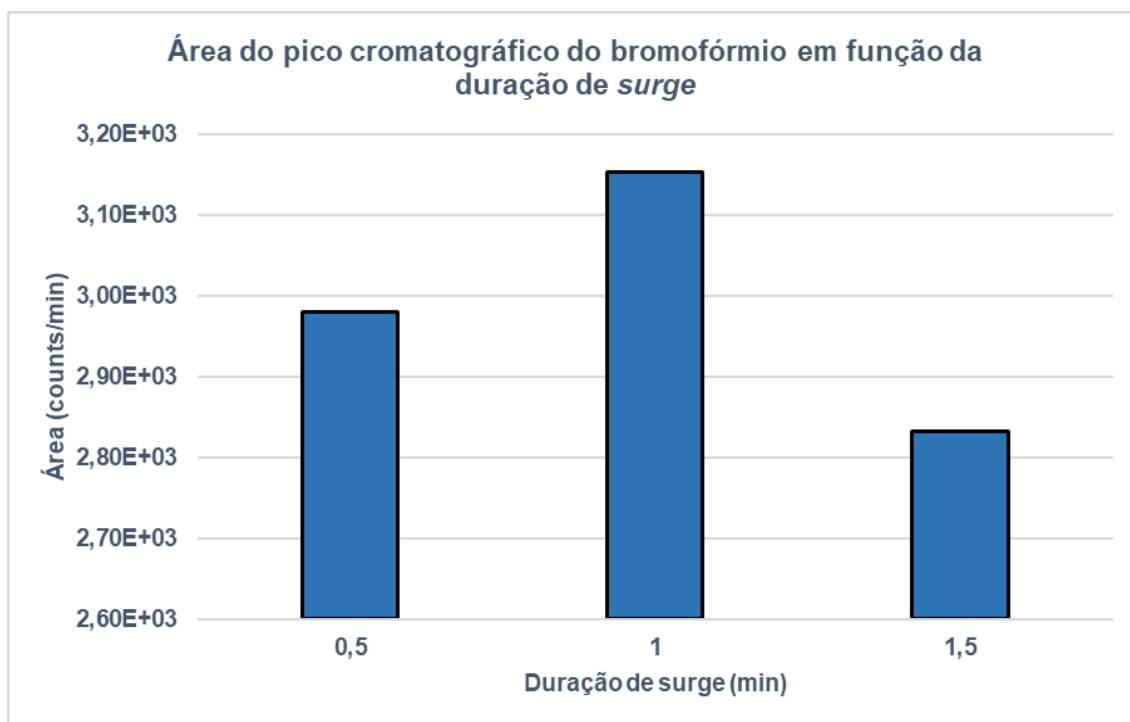


Figura 49: Gráfico da área do pico cromatográfico do bromofórmio em função da duração de surge

Uma vez que se verificou que quanto maior a duração de *surge*, pior era a definição dos picos cromatográficos, testou diminuir-se a duração de *surge* para 0,25 min (MIA COVs 16) e 0,15 min (MIA COVs 17), mantendo a pressão de 250 kPa e ajustando os RTs e janelas de aquisição dos compostos; foram então preparadas soluções-padrão a uma

concentração de 0,25 µg/L a partir da S.I. 1 para serem analisados através de ambos os MIAs.

Verificou-se através da análise visual dos cromatogramas gerados que a diminuição da duração de *surge* melhorou significativamente a definição dos picos cromatográficos, e que o benzeno e 1,2-dicloroetano saíram mais separados (Figuras 50 e 52). Para além disso, compararam-se as áreas dos picos cromatográficos de modo a perceber se as diferentes durações de *surge* conferiam diferenças significativas entre elas, tendo-se constatado que, com uma duração de *surge* de 0,25 min, a área dos picos foi significativamente superior em relação a uma duração de *surge* de 0,15 min para todos os COVs com exceção do clorofórmio, cuja área do pico cromatográfico diminuiu significativamente (Figura 54). O cloreto de vinilo foi igualmente analisado através dos *MIA COVs 16* e *MIA COVs 17*, tendo-se preparado soluções-padrão a uma concentração de 0,25 µg/L a partir da S.I. 2 para serem analisados por ambos os MIAs através do modo de aquisição em *full scan*, tendo posteriormente sido extraída a $m/z=62$ a partir do canal TIC em ambos os cromatogramas (Figuras 51 e 53). Através da verificação das áreas dos picos cromatográficos do cloreto de vinilo gerados com ambos os MIAs, constatou-se que a área foi significativamente superior a uma duração de *surge* de 0,25 min em relação a uma duração de *surge* de 0,15 min (Figura 54).

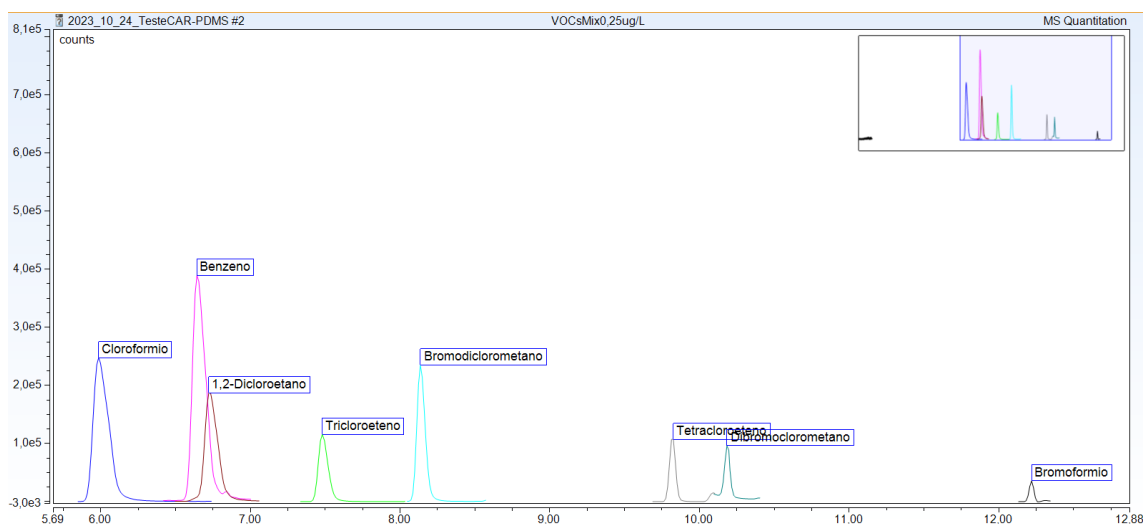


Figura 50: Cromatograma com modo de aquisição SIM gerado através da análise com *MIA COVs 16* de solução-padrão a 0,25 µg/L preparada através da S.I. 1 e extraída com fibra CAR-PDMS

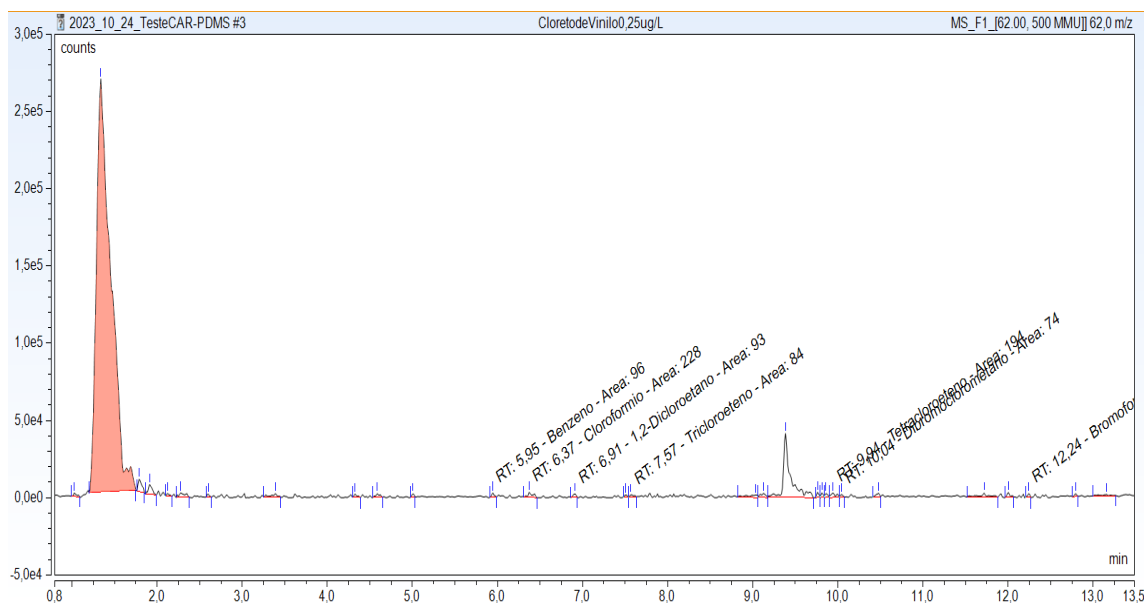


Figura 51: Cromatograma com modo de aquisição full scan gerado através da análise com MIA COVs 16 de solução-padrão a 0,25 µg/L preparada através da S.I. 2 e extraída com fibra CAR-PDMS

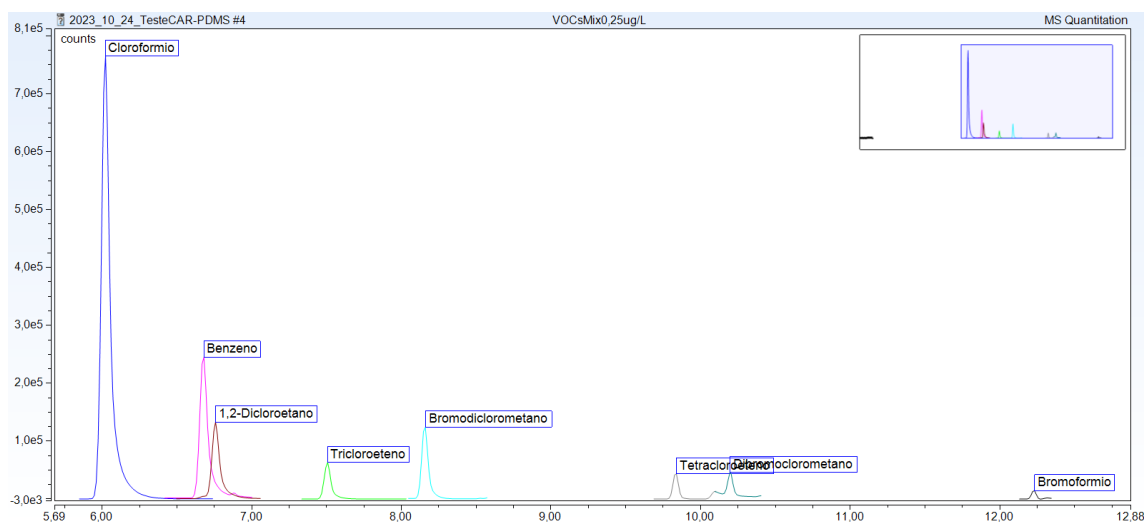


Figura 52: Cromatograma com modo de aquisição SIM gerado através da análise com MIA COVs 17 de solução-padrão a 0,25 µg/L preparada através da S.I. 1 e extraída com fibra CAR-PDMS

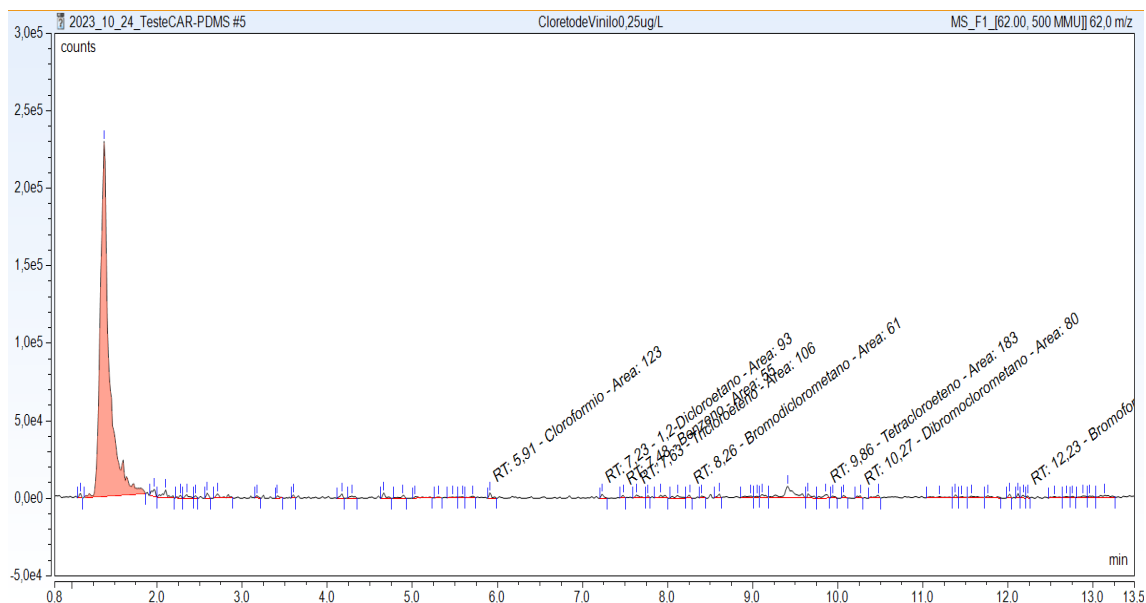


Figura 53: Cromatograma com modo de aquisição full scan gerado através da análise com MIA COVs 17 de solução-padrão a 0,25 µg/L preparada através da S.I. 2 e extraída com fibra CAR-PDMS

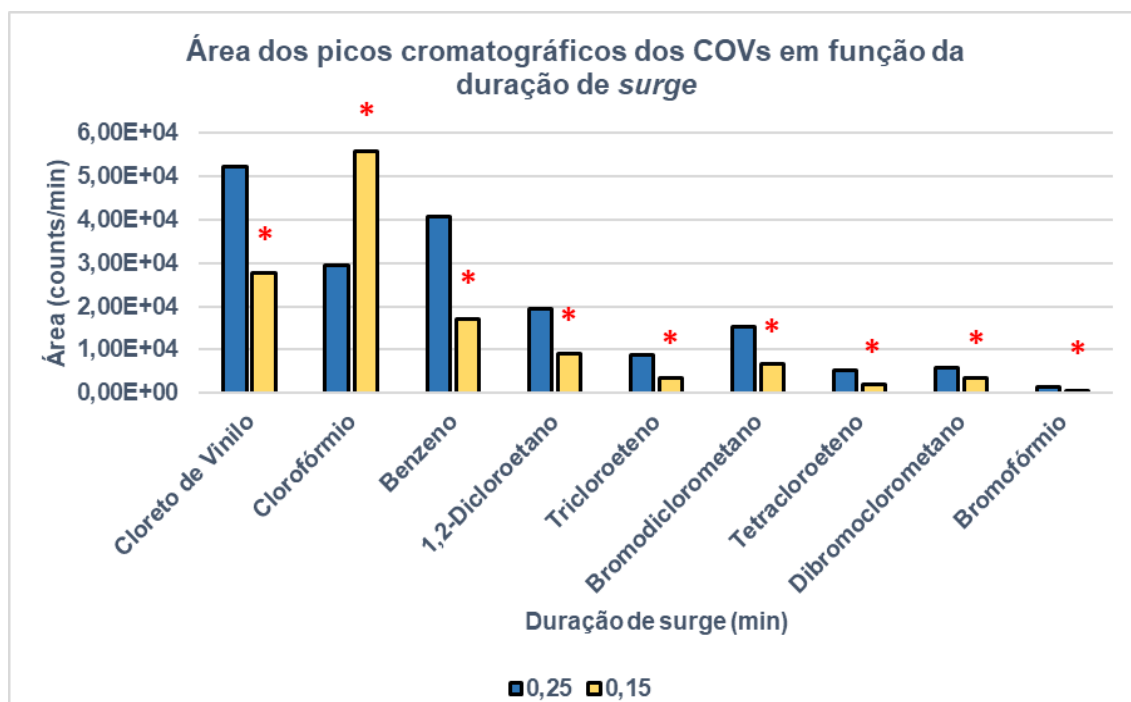


Figura 54: Gráfico da área dos picos cromatográficos dos COVs em função da duração de surge

Legenda: (*) = diferença estatisticamente significativa

Apesar das áreas dos picos cromatográficos serem significativamente superiores para a maior parte dos compostos a uma duração de *surge* de 0,25 min, optou-se por proceder à criação de novos MIAs com a duração de *surge* de 0,15 min, pelo facto de,

através desta duração, o benzeno e o 1,2-dicloroetano saírem mais separados. Assim, foram testadas configurações diferentes noutros parâmetros instrumentais, nomeadamente ao nível do tempo de extração, com o intuito de aumentar a área dos picos cromatográficos.

Para tal, foram preparadas soluções-padrão a uma concentração de 0,25 µg/L a partir da S.I. 3, de modo a que o cloreto de vinilo, benzeno, 1,2-dicloroetano, THMs, tricloroeteno e tetracloroeteno fossem analisados conjuntamente. Voltou a analisar-se os compostos através do *MIA COVs 17* com modo de aquisição em SIM e *full scan*, e desenvolveram-se novos MIAs a partir deste, aumentando o tempo de extração para 15 min (*MIA COVs 18*) e 20 min (*MIA COVs 19*), para serem analisados através dos modos de aquisição em SIM e *full scan*.

Através da análise dos cromatogramas gerados através dos diferentes MIAs (Figuras 55 – 57), verificou-se que o pico cromatográfico do dibromoclorometano surgia agarrado ao pico cromatográfico do tetracloroeteno, e que o pico cromatográfico do bromofórmio surgia com ruído.

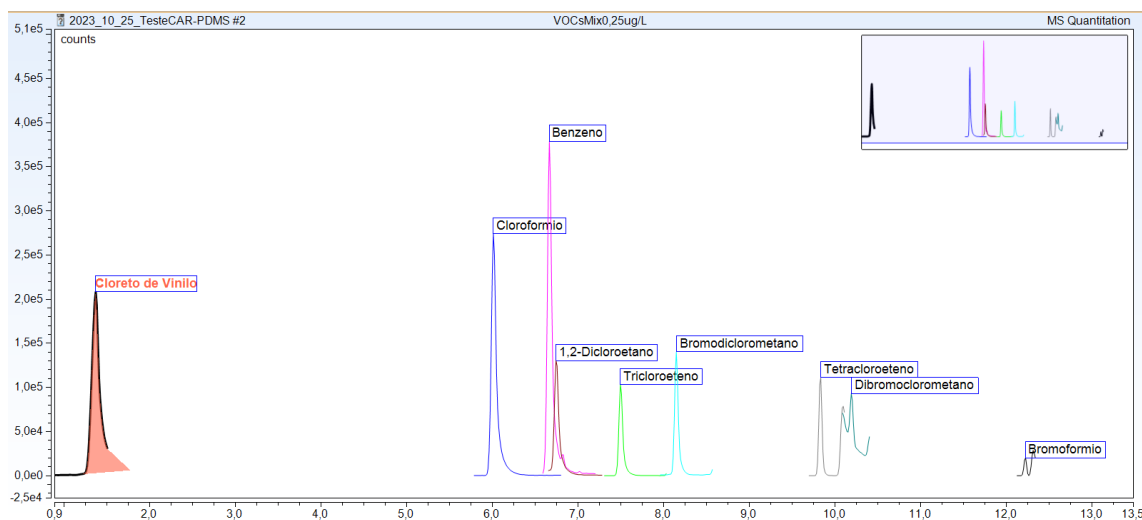


Figura 55: Cromatograma com modo de aquisição SIM gerado através da análise com *MIA COVs 17* de solução-padrão a 0,25 µg/L preparada através da S.I. 3 e extraída com fibra CAR-PDMS

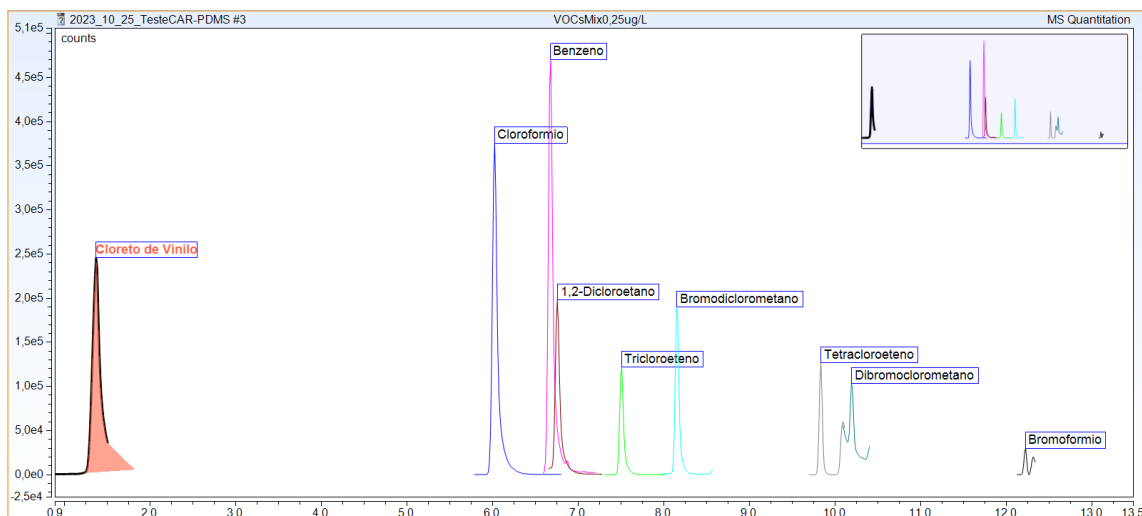


Figura 56: Cromatograma com modo de aquisição SIM gerado através da análise com *MIA COVs 18* de solução-padrão a 0,25 µg/L preparada através da S.I. 3 e extraída com fibra CAR-PDMS

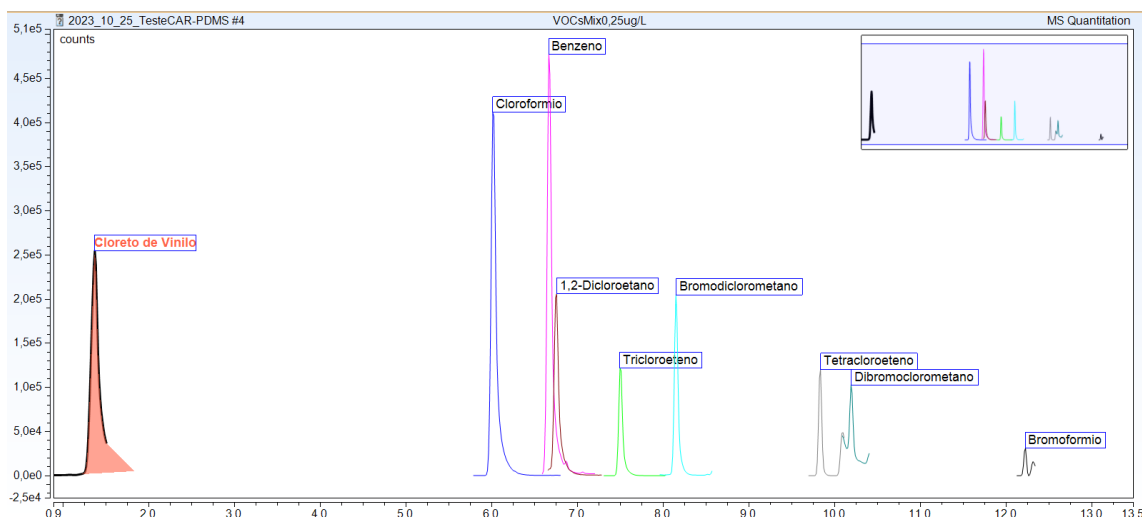


Figura 57: Cromatograma com modo de aquisição SIM gerado através da análise com *MIA COVs 19* de solução-padrão a 0,25 µg/L preparada através da S.I. 3 e extraída com fibra CAR-PDMS

De modo a comparar devidamente as áreas dos picos cromatográficos que apresentavam uma fraca definição, estes foram integrados manualmente. Verificou-se que aumentando o tempo de extração de 10 min para 15 min, as áreas dos picos cromatográficos do 1,2-dicloroetano e do bromoformio aumentavam significativamente. No entanto, para estes compostos, o aumento do tempo de extração de 15 min para 20 min não conferiu um aumento significativo das áreas dos seus picos cromatográficos (Figura 58).

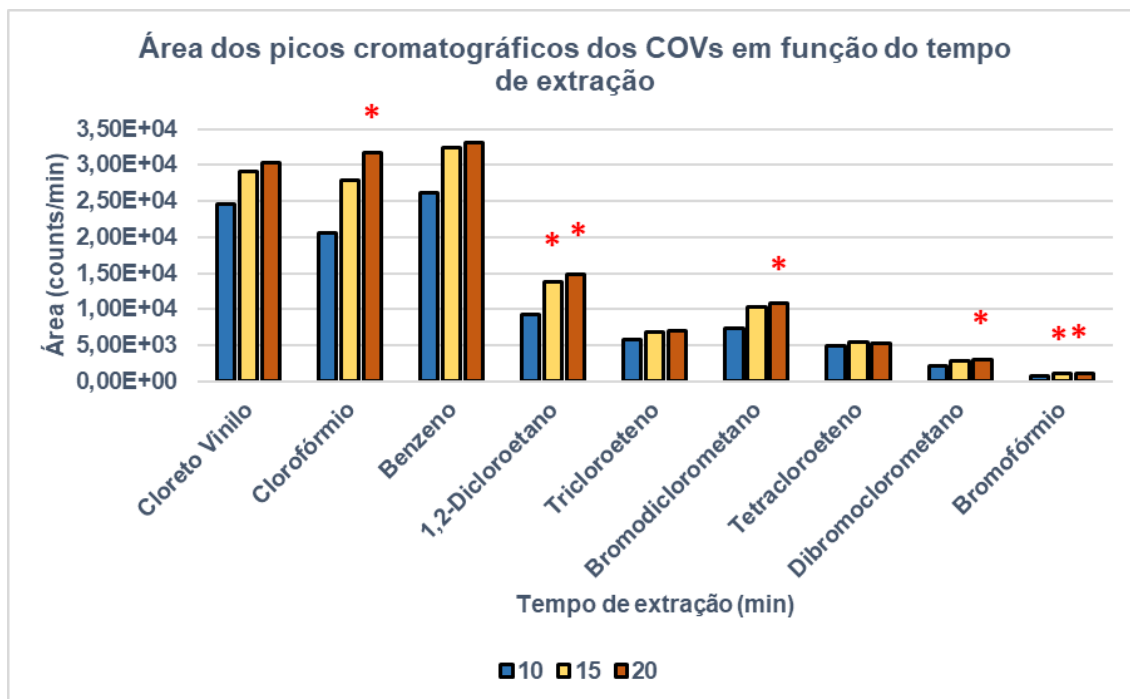


Figura 58: Gráfico da área dos picos cromatográficos dos COVs em função do tempo de extração

Legenda: (*) = diferença estatisticamente significativa relativamente à área gerada pelo tempo de extração de 10 min

Apesar de se ter verificado um aumento da área dos picos cromatográficos dos COVs analisados aumentando o tempo de extração, optou-se por estabelecer para o desenvolvimento dos MIAs seguintes o tempo de extração de 10 min, por dois principais motivos. Por um lado, o MIA a desenvolver destinava-se a análises de rotina, pelo que o tempo de análise deve ser reduzido de modo a analisar o maior número possível de amostras no menor tempo possível. Por outro lado, as áreas dos picos cromatográficos gerados através dos MIAs com tempo de extração de 10 min conferiam áreas suficientemente robustas a uma concentração de 0,25 µg/L, correspondente ao LQ que se pretendia atingir para o benzeno e 1,2-dicloroetano e próximo do LQ que se pretendia atingir para o cloreto de vinilo (0,10 µg/L). No entanto, uma vez que as áreas dos picos cromatográficos de todos os COVs analisados aumentaram com o aumento da duração da extração, conclui-se que o equilíbrio dos compostos da água para o *headspace* e do *headspace* para a fibra de SPME não era atingido.

Para além de se optar por desenvolver os MIAs seguintes com o tempo de extração de 10 min, optou-se igualmente por voltar a estabelecer uma duração de *surge* de 0,25 min, uma vez que, apesar de não ter separado tão bem o benzeno do 1,2-dicloroetano quando comparado com uma duração de *surge* de 0,15 min, separava-os

suficientemente bem para serem detetados pelo espectrómetro de massa e, ademais, gerava picos cromatográficos com uma maior área, pelo que se pretendia compensar a perda de área dos picos cromatográficos associada ao tempo de extração de 10 min.

A partir dos parâmetros instrumentais otimizados até então, criaram-se dois novos MIAs com pressões de *surge* inferior e superior àquela testada até então (250 kPa), de modo a verificar se conferiam alterações ao nível dos picos cromatográficos, nomeadamente ao nível da definição destes. Foi então desenvolvido um MIA com pressão de *surge* de 200 kPa (*MIA COVs 20*) e outro com pressão de *surge* de 300 kPa (*MIA COVs 21*), e analisaram-se soluções-padrão preparadas a 0,25 µg/L a partir da S.I. 3 através de ambos os MIAs. Verificou-se que, diminuindo a pressão de *surge*, o pico do dibromoclorometano saía com pior definição (Figura 59) e que os picos do benzeno e 1,2-dicloroetano continuavam a não estar completamente coeluídos (Figura 60); por outro lado, com o aumento da pressão de *surge*, o benzeno e o 1,2-dicloroetano ficavam mais coeluídos (Figura 61).

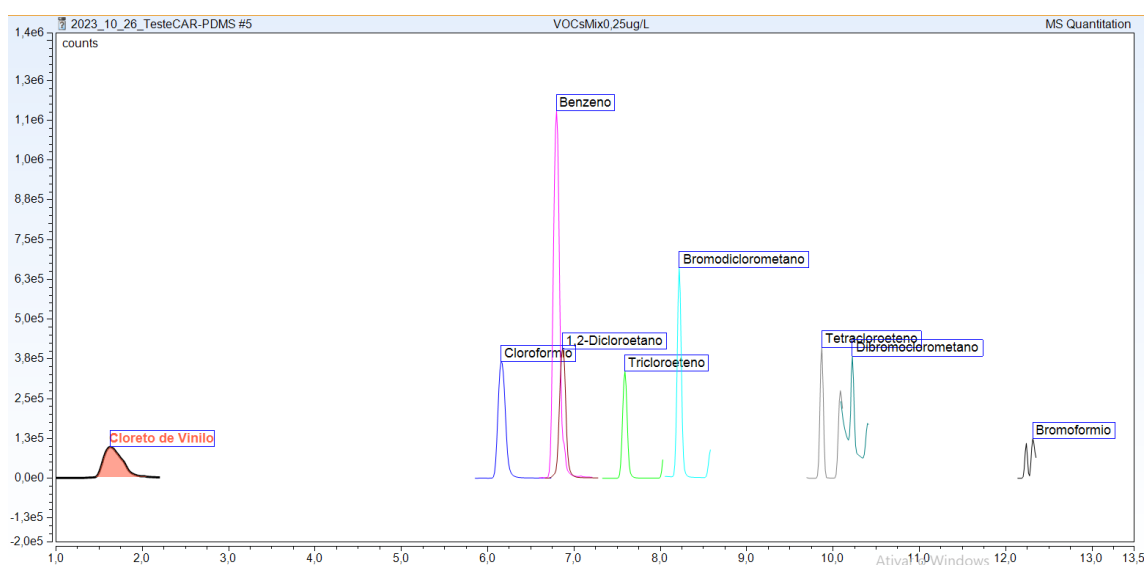


Figura 59: Cromatograma com modo de aquisição SIM gerado através da análise com *MIA COVs 20* de solução-padrão a 0,25 µg/L preparada através da S.I. 3 e extraída com fibra CAR-PDMS

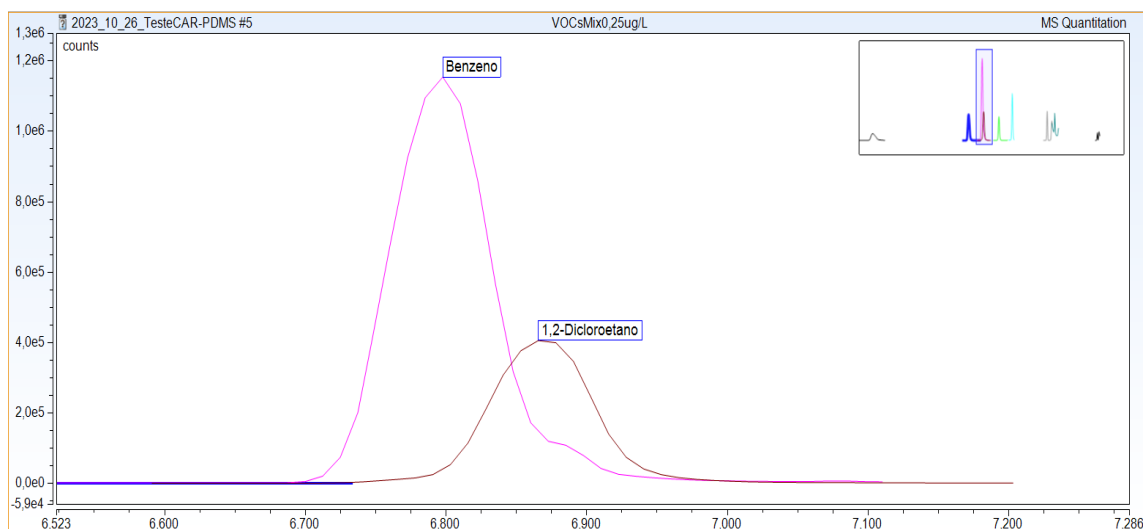


Figura 60: Ampliação do cromatograma com modo de aquisição SIM gerado através da análise com *MIA COVs 20* de solução-padrão a 0,25 µg/L preparada através da S.I. 3 e extraída com fibra CAR-PDMS

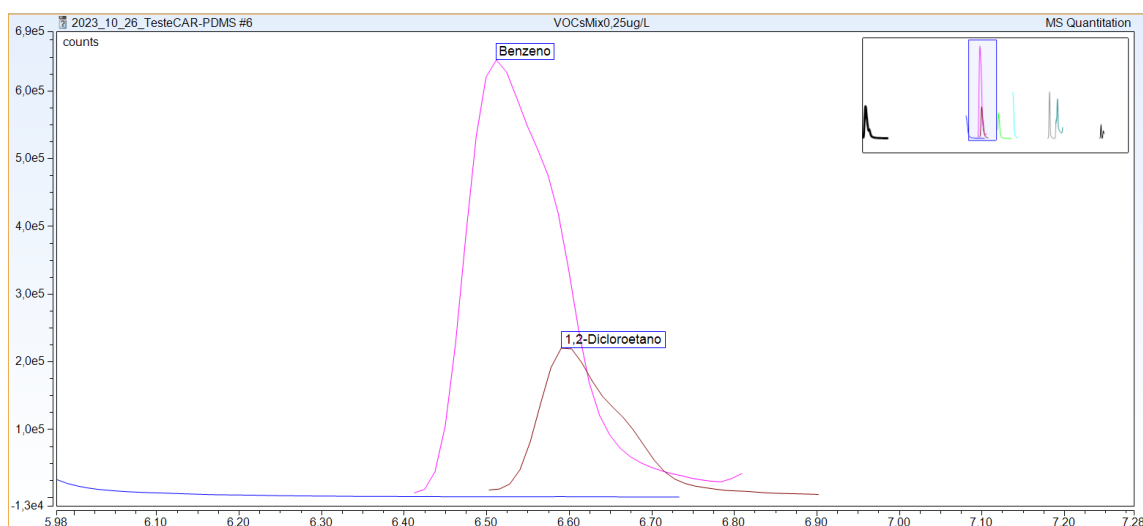


Figura 61: Ampliação do cromatograma com modo de aquisição SIM gerado através da análise com *MIA COVs 21* de solução-padrão a 0,25 µg/L preparada através da S.I. 3 e extraída com fibra CAR-PDMS

Face aos cromatogramas gerados, optou-se por manter a pressão de surge a 250 kPa. Uma vez que o MIA desenvolvido até então a conferir uma melhor qualidade cromatográfica fora o *MIA COVs 16*, foram criados dois novos MIAs a partir deste, de modo a testar de que forma um aumento ao nível do tempo de extração de 10 min para 15 min (*MIA COVs 22*) e 20 min (*MIA COVs 23*) influenciava o pico cromatográfico do cloreto de vinilo. Foram então preparadas soluções-padrão a 0,10 µg/L a partir da S.I. 3, de modo a corresponder ao LQ que se pretendia atingir para o cloreto de vinilo, tendo sido posteriormente analisadas através do *MIA COVs 16*, *MIA COVs 22* e *MIA COVs 23*.

Procedeu-se à comparação das áreas dos picos cromatográficos do cloreto de vinilo gerados através dos MIAs referidos, tendo-se constatado que o tempo de extração de 10 min conferiu uma maior área do pico cromatográfico (Figura 62). Apesar desta diferença não ter sido estatisticamente significativa, o facto de se estar a testar as condições ao nível do LQ do composto tornava particularmente relevante perceber qual a configuração instrumental que conferia uma maior área do pico cromatográfico do cloreto de vinilo, independentemente do seu significado estatístico, uma vez que poderia ser suficiente para a identificação e quantificação deste composto face a outros possíveis interferentes.

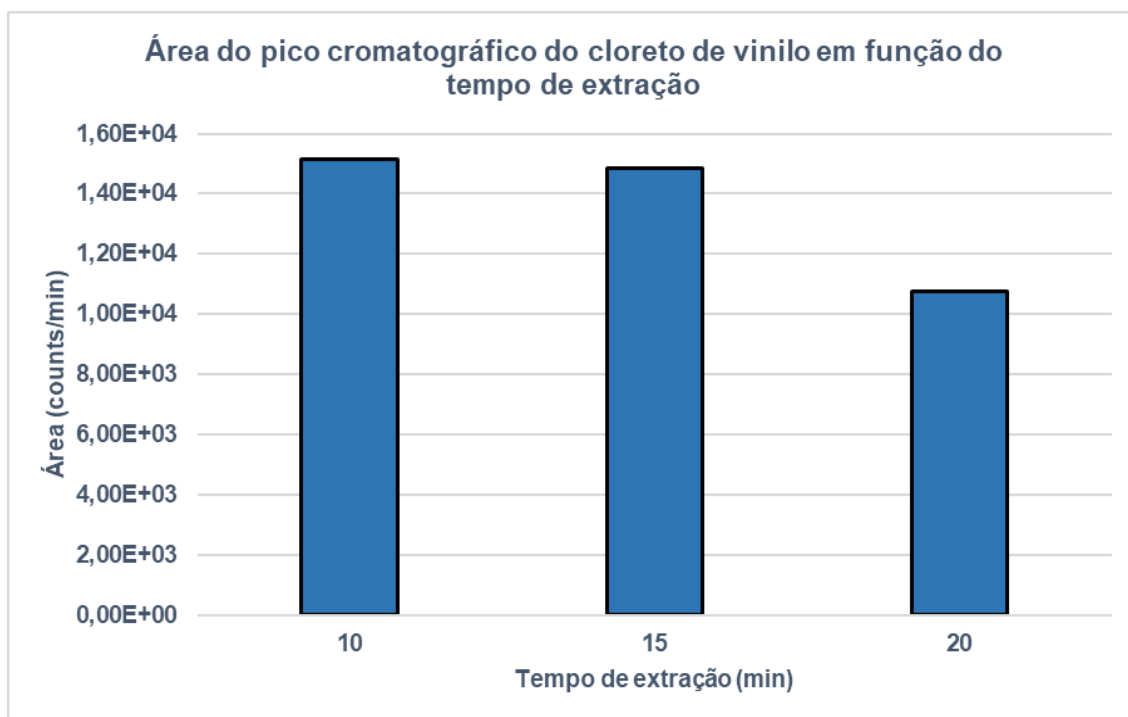


Figura 62: Gráfico da área do pico cromatográfico do cloreto de vinilo em função do tempo de extração

Deste modo, optou-se por manter o tempo de extração de 10 min e os restantes parâmetros instrumentais otimizados para o desenvolvimento do MIA final para a determinação de benzeno, 1,2-dicloroetano, cloreto de vinilo, THMs, tricloroetano e tetracloroetano em amostras de água (*MIA COVs 24*). As alterações finais prenderam-se com a alteração do ião de quantificação do dibromoclorometano da $m/z=129$ para a $m/z=127$; tal deveu-se ao facto do tetracloroetano apresentar igualmente no seu espectro de massa um pico intenso correspondente à $m/z=129$, pelo que interferia com a aquisição cromatográfica de ambos os compostos, já que estavam parcialmente

coeluídos (Figura 63). Para além disso, encurtaram-se as janelas de aquisição do dibromoclorometano de 2 min para 1 min, e do bromofórmio de 1 min para 0,6 min, de modo a ser adquirido cromatograficamente somente estes analitos, sem presença de interferentes.

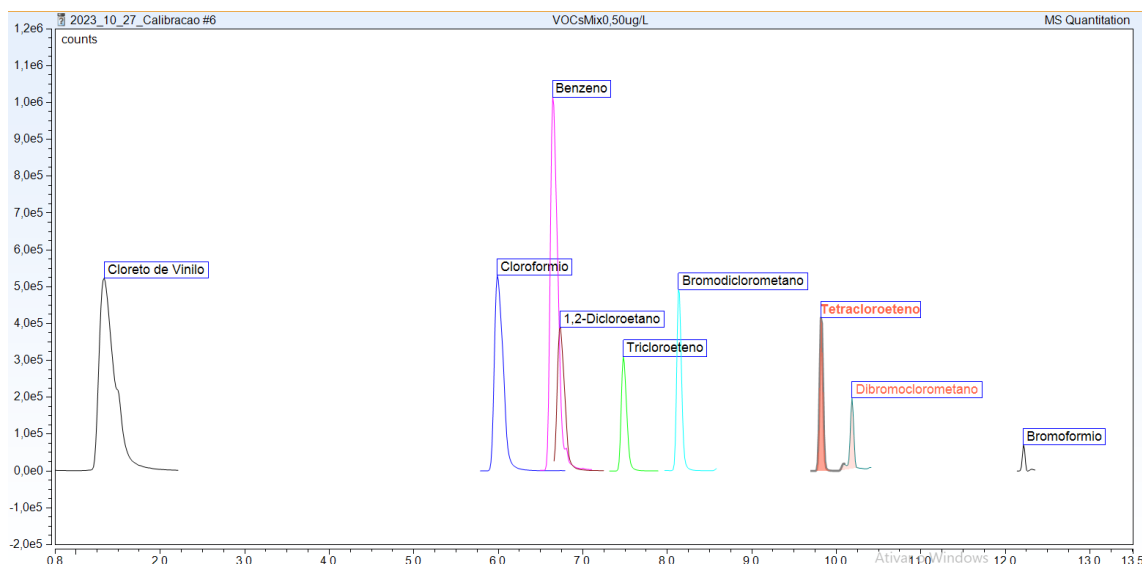


Figura 63: Cromatograma com modo de aquisição SIM gerado através da análise com *MIA COVs 16* de solução-padrão a 0,50 µg/L preparada através da S.I. 3 e extraída com fibra CAR-PDMS

Assim, preparou-se uma solução-padrão 0,50 µg/L a partir da S.I. 3, de modo a ser representativo de uma concentração que se encontrava na Gama de Trabalho prevista para todos os COVs analisados através do *MIA COVs 24*, tendo-se verificado através do cromatograma gerado que os picos cromatográficos apresentavam boa definição e tinham pouco arraste (Figura 64); apesar dos picos cromatográficos do benzeno e do 1,2-dicloroetano não se separarem na totalidade, apresentavam RTs ligeiramente diferentes e m/z correspondentes aos iões de quantificação e confirmação diferentes, pelo que eram corretamente determinados.

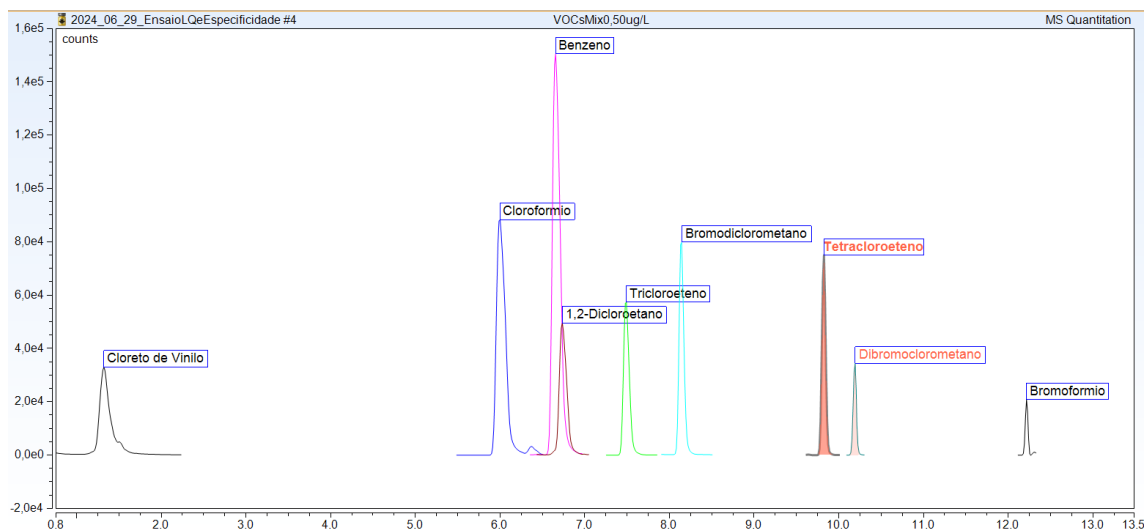


Figura 64: Cromatograma com modo de aquisição SIM gerado através da análise com MIA COVs 24 de solução-padrão a 0,50 µg/L preparada através da S.I. 3 e extraída com fibra CAR-PDMS

Relativamente ao MIA COVs 1, o MIA COVs 24 diferiu, ao nível da técnica de HS-SPME, no material a revestir a fibra de SPME – tendo-se alterado de PDMS para CAR-PDMS – na temperatura de extração – que foi reduzida de 40 °C para 30 °C – e no tempo de incubação do vial – que foi reduzido de 10 min para 30 s. Ao nível da técnica de GC, o modo de injeção nos 2 min iniciais foi alterado de *splitless* para *splitless with surge*. Por fim, ao nível da técnica de MS, foi acrescentada a deteção e quantificação do cloreto de vinilo, tendo-se verificado também alterações ao nível dos RTs dos compostos, bem como do ião de quantificação do dibromoclorometano.

5.2. VALIDAÇÃO DO MÉTODO PARA DETERMINAÇÃO DE BENZENO, 1,2-DICLOROETANO, CLORETO DE VINILO, THMS, TRICLOROETENO E TETRACLOROETENO

5.2.1. LINEARIDADE

A Linearidade dos compostos foi avaliada através dos testes *Point-to-Point Slope*, Mandel e Análise de Resíduos, realizados com o *software Microsoft Excel*. Conforme referido anteriormente, a Gama de Trabalho a validar para cada composto devia iniciar-se no LQ respetivo para cada um, até uma concentração que fosse adequada a uso. Uma vez que, de entre os analitos, os THMs eram aqueles que se esperava que ocorressem em maior quantidade em amostras reais, procurou-se que as Gamas de Trabalho destes terminassem a uma concentração superior, de modo a conseguir quantificar diretamente estes compostos a concentrações mais altas, sem necessidade

de proceder a diluições das amostras. No entanto, uma vez que as curvas de calibração dos THMs não eram lineares entre os limites inferior e superior testados, este intervalo foi dividido em duas Gamas lineares para cada composto.

5.2.1.1. POINT-TO-POINT SLOPE

Através da aplicação do teste *Point-to-Point Slope* ao valor das áreas dos picos cromatográficos dos COVs, verificou-se que, para todos eles, os valores de Δb_{i-m} se situaram entre os valores mínimos (%) e máximos (%) admissíveis para cada um, correspondentes a $mediana_{\Delta b_{i-m}} - 0,25 \times mediana_{declive b_i}$ e $mediana_{\Delta b_{i-m}} + 0,25 \times mediana_{declive b_i}$, respetivamente (Tabela 6). Este método de avaliação auxiliou na validação do parâmetro de Linearidade, pelo facto de não se terem verificado desvios da mediana dos declives b_m a aumentarem ou diminuïrem sistematicamente, conforme ilustrado pelas Figuras AII.2 a AII.14 do Anexo II.

Tabela 6: Resultados do teste *Point-to-Point Slope* aplicado após análise de soluções-padrão de diferentes COVs através do MIA COVs 24

Composto	Gama de Trabalho (µg/L)	Δb_{i-m} Mínimo	Δb_{i-m} Máximo	Mediana _{bi} - 25%	Mediana _{bi} + 25%
Cloreto de Vinilo	0,10 - 1,0	0,0	7871,0	-10724,0	10724,0
Benzeno	0,25 - 5,0	0,0	7330,0	-9667,0	9667,0
1,2-Dicloroetano	0,25 - 5,0	0,0	-3532,0	-3797,0	3797,0
Tricloroetano	0,50 - 5,0	0,0	-2629,0	-3015,0	3015,0
Tetracloroetano	0,50 - 5,0	0,0	898,0	-2216,0	2216,0
Clorofórmio	0,50 - 10,0	0,0	-3875,0	-4971,0	4971,0
	10,0 - 50,0	104,0	-2149,0	-2688,0	2688,0
Bromodiclorometano	0,50 - 10,0	0,0	1624,0	-2495,0	2495,0
	10,0 - 50,0	500,0	1267,0	-1911,0	1911,0
Dibromoclorometano	0,50 - 10,0	0,0	-425,0	-825,0	825,0
	10,0 - 50,0	52,0	295,0	-685,0	685,0
Bromofórmio	0,50 - 10,0	0,0	276,0	-327,0	327,0
	10,0 - 50,0	76,0	245,0	-404,0	404,0

5.2.1.2. TESTE DE MANDEL

Através da aplicação do Teste de Mandel ao valor das áreas dos picos cromatográficos dos COVs, verificou-se que, para todos eles, o valor de VT foi inferior ao valor de $F_{(1,5)95\%}$

(Tabela 7). Como tal, confirmou-se que a função de calibração linear conduziu a um bom ajuste dos pontos experimentais.

Tabela 7: Resultados do teste de Mandel aplicado após análise de soluções-padrão de diferentes COVs através do MIA COVs 24

Composto	Gama de Trabalho (µg/L)	VT	$F_{(1,5)95\%}$
Cloreto de Vinilo	0,10 - 1,0	1,63	10,13
Benzeno	0,25 - 5,0	0,57	10,13
1,2-Dicloroetano	0,25 - 5,0	0,86	10,13
Tricloroetano	0,50 - 5,0	0,9	10,13
Tetracloroetano	0,50 - 5,0	1,53	10,13
Clorofórmio	0,50 - 10,0	6,42	10,13
	10,0 - 50,0	0,93	18,51
Bromodiclorometano	0,50 - 10,0	0,21	10,13
	10,0 - 50,0	0,49	18,51
Dibromoclorometano	0,50 - 10,0	8,18	10,13
	10,0 - 50,0	1,20	18,51
Bromofórmio	0,50 - 10,0	0,25	10,13
	10,0 - 50,0	0,60	18,51

5.2.1.3. ANÁLISE DE RESÍDUOS

Através da aplicação do Teste de Análise de Resíduos ao valor das áreas dos picos cromatográficos dos COVs, verificou-se que, para todos eles, o desvio relativo da razão entre estes e o valor das áreas estimadas através da curva de calibração se situou entre -20% e 20%, conforme indicado pela Tabela 8 e ilustrado pelas Figuras AIII.2 a AIII.14 do Anexo III. Como tal, este método de avaliação serviu igualmente para validar o parâmetro da Linearidade dos COVs.

Tabela 8: Resultados do teste de Análise de Resíduos aplicado após análise de soluções-padrão de diferentes COVs através do MIA COVs 24

Composto	Gama de Trabalho (µg/L)	Desvio Mínimo (%)	Desvio Máximo (%)
Cloreto de Vinilo	0,10 - 1,0	-0,2	-9,4
Benzeno	0,25 - 5,0	1,3	17,0
1,2-Dicloroetano	0,25 - 5,0	0,9	8,3
Tricloroetano	0,50 - 5,0	-2,0	9,2
Tetracloroetano	0,50 - 5,0	1,1	-3,4
Clorofórmio	0,50 - 10,0	-0,1	-19,7
	10,0 - 50,0	0,1	2,3
Bromodiclorometano	0,50 - 10,0	0,3	-18,0
	10,0 - 50,0	-0,2	6,3
Dibromoclorometano	0,50 - 10,0	0,2	19,8
	10,0 - 50,0	0,10	4,6
Bromofórmio	0,50 - 10,0	-0,7	-5,2
	10,0 - 50,0	0,60	-3,7

5.2.2. REPETIBILIDADE

Após terem sido analisados 5 soluções-padrão correspondentes aos extremos das Gamas de Trabalho a validar, procedeu-se ao cálculo da média das concentrações de cada nível analisado, tendo de seguida sido calculado o erro relativo médio e o CV de cada conjunto de dados. Verificou-se que os valores calculados relativos ao erro relativo médio e ao CV se situaram entre $\pm 25\%$, o que permitiu validar a Repetibilidade na Gama de Trabalho estudada (Tabela 9).

Tabela 9: Resultados do teste de Repetibilidade aplicado após análise de soluções-padrão de diferentes COVs através do MIA COVs 24

Composto	Padrões Analisados (µg/L)	Valor Médio Obtido (µg/L)	Erro Relativo Médio (%)	Coefficiente de Variação (%)
Cloreto de Vinilo	0,1	0,09	-10,5	2,28
	1,0	1,05	5,49	2,05
Benzeno	0,25	0,23	-7,65	16,6
	5,0	5,59	11,7	5,61
1,2-Dicloroetano	0,25	0,22	-11,5	7,46
	5,0	4,95	-0,90	4,89
Tricloroetano	0,5	0,51	1,89	1,52
	5,0	5,25	4,96	6,05
Tetracloroetano	0,5	0,54	8,79	2,99
	5,0	5,17	3,32	5,27
Clorofórmio	0,5	0,52	3,05	5,23
	10,0	8,33	-16,7	5,26
	50,0	48,1	-3,79	5,10
Bromodichlorometano	0,5	0,59	18,5	2,87
	10,0	8,35	-16,5	3,41
	50,0	42,9	-14,2	8,11
Dibromoclorometano	0,5	0,61	22,0	1,33
	10,0	8,41	-15,9	2,36
	50,0	43,4	-13,1	9,43
Bromofórmio	0,5	0,59	17,2	2,91
	10,0	9,55	-4,52	1,59
	50,0	42,8	-14,4	8,91

5.2.3. LIMITE DE QUANTIFICAÇÃO

O parâmetro do LQ dos COVs foi validado simultaneamente com o parâmetro da Repetibilidade, na medida em que os valores do erro relativo médio e do CV relativos ao valor médio das soluções-padrão preparadas ao nível do LQ se situaram entre $\pm 25\%$ (Tabela 9).

5.2.4. RECUPERAÇÕES

No Ensaio de Recuperações foram preparadas 6 amostras de água da torneira fortificada ao nível do LQ e num valor intermédio das Gammas de Trabalho a validar para os diferentes analitos, assim como uma amostra de água da torneira sem fortificação.

Posteriormente, com os dados obtidos através da análise das fortificações, foram calculadas as Taxas de Recuperações dos analitos, bem como o CV das Recuperações.

Constatou-se que o Ensaio de Recuperações permitiu validar o cloreto de vinilo, o benzeno, o 1,2-dicloroetano, o tricloroetano, o tetracloroetano e o bromofórmio, uma vez que o valor global das suas Recuperações se situou entre 70-120%, com CVs $\leq 25\%$, sem necessidade de remover valores considerados como aberrantes (ou *outliers*). No entanto, apesar de o Ensaio de Recuperações ter sido igualmente validado para o clorofórmio, bromodiclorometano e dibromoclorometano, consideraram-se os valores ao nível do LQ como *outliers*, pelo que foram ignorados no cálculo das Taxas de Recuperações e do coeficiente de variação (Tabela 10).

O facto de o clorofórmio, bromodiclorometano e dibromoclorometano terem apresentado valores aberrantes ao nível do LQ deveu-se ao facto de a amostra de água da torneira analisada apresentar estes compostos numa concentração consideravelmente acima das correspondentes às fortificações a este nível. De facto, a concentração do analito ao nível do LQ, comparado com a concentração do analito na amostra de água sem fortificação, era de apenas 4,42% para o clorofórmio, 5,95% para o bromodiclorometano e 11,4% para o dibromoclorometano. Por outro lado, verificou-se que as Recuperações que não apresentavam valores considerados aberrantes correspondiam às fortificações preparadas nas quais os analitos se encontravam em concentração aproximada ou superior à verificada na amostra real.

Tabela 10: Resultados do teste de Recuperações aplicado após análise de amostras fortificadas com soluções-padrão de diferentes COVs através do MIA COVs 24

Composto	Concentração na Amostra (µg/L)	Fortificação da Amostra (µg/L)	Recuperação Média da Fortificação (%)	CV da Fortificação (%)	Recuperação Média Global (%)	CV Global (%)
Cloreto de Vinilo	0,00	0,1	105,1	2,71	116,5	10,0
		0,4	127,8	2,14		
Benzeno	0,07	0,25	100,5	10,6	104,6	10,3
		2,5	108,6	9,10		
1,2-Dicloroetano	0,00	0,25	113,5	7,62	114,8	6,0
		2,5	116,1	3,55		
Tricloroetano	0,20	0,5	84,1	15,5	92,7	15,4
		2,5	101,2	9,37		
Tetracloroetano	0,15	0,5	84,6	12,6	92,6	13,2
		2,5	100,6	7,39		
Clorofórmio	11,3	0,5	-	-	99,5	20,2
		5,0	78,3	23,98		
		30,0	110,2	8,82		
Bromodiclorometano	8,40	0,5	-	-	83,2	16,94
		5,0	72,5	12,48		
		30,0	90,4	13,4		
Dibromoclorometano	4,38	0,5	-	-	88,3	11,26
		5,0	84,9	9,57		
		30,0	91,2	11,4		
Bromofórmio	0,55	0,5	76,6	17,0	85,8	13,2
		5,0	90,9	5,12		
		30,0	89,8	9,31		

5.2.5. SELETIVIDADE

Para a verificação da Seletividade do método, prepararam-se soluções-padrão na Gama de Trabalho que se pretendia validar para os analitos, tendo-se procedido ao cálculo da média do rácio das áreas dos picos cromatográficos entre os iões de quantificação e os iões de confirmação definidos para cada composto, bem como os CVs destes valores, que foram inferiores a 25% (Tabela 11). Para além disso, a Seletividade do método foi igualmente comprovada através da identificação dos analitos presentes em amostras reais.

Tabela 11: Resultados do teste de Seletividade aplicado após análise de soluções-padrão de diferentes COVs através do MIA COVs 24

Composto	Iões			Rácio					
	Quantificação	Confirmação 1	Confirmação 2	Quant / Confirm 1			Quant / Confirm 2		
				Média	Desv. Pad.	C.V. (%)	Média	Desv. Pad.	C.V. (%)
Cloreto de Vinilo	m/z = 62	m/z = 64		2,99	0,348	11,62			
Benzeno	m/z = 78	m/z = 51	m/z = 77	2,85	0,130	4,55	4,14	0,097	2,34
1,2-Dicloroetano	m/z = 62	m/z = 64	m/z = 49	3,30	0,095	2,88	2,39	0,107	4,50
Tricloroetano	m/z = 130	m/z = 132	m/z = 95	1,04	0,016	1,57	0,83	0,014	1,66
Tetracloroetano	m/z = 166	m/z = 164	m/z = 131	1,31	0,029	2,23	1,46	0,034	2,36
Clorofórmio	m/z = 83	m/z = 85	m/z = 47	1,55	0,051	3,31	2,24	0,148	6,61
Bromodichlorometano	m/z = 83	m/z = 85	m/z = 129	1,52	0,055	3,63	10,61	0,550	5,18
Dibromochlorometano	m/z = 127	m/z = 129	m/z = 79	0,80	0,028	3,47	1,87	0,072	3,86
Bromofórmio	m/z = 173	m/z = 171	m/z = 252	1,87	0,074	3,92	11,13	0,517	4,65

5.2.6. ESPECIFICIDADE

Para a realização do Ensaio de Especificidade, foram verificadas, numa determinada sequência de análise, as áreas dos picos cromatográficos dos diferentes COVs nas soluções-padrão correspondentes aos respetivos LQs, bem como nos *brancos* usados nessa mesma sequência. O Ensaio de Especificidade foi validado para os COVs analisados, uma vez que a média da área dos picos cromatográficos dos *brancos* foi inferior a 1/3 da área do pico cromatográfico dos analitos nas soluções-padrão preparadas ao nível dos seus LQs, ou seja, foi inferior ao LD do método (Tabela 12). Para além disso, a correta quantificação dos analitos em amostras reais, comprovada, nomeadamente, através do Ensaio de Recuperações, permitiu atestar a adequada Especificidade do método.

Tabela 12: Resultados do teste de Especificidade aplicado após análise de soluções-padrão de diferentes COVs através do MIA COVs 24

Composto	Área LQ (counts/min)	Área Branco (counts/min)						Área Média Branco/ Área LQ
		#1	#2	#3	#4	#5	#6	
Cloreto de Vinilo	1696,895	394,833	377,535	379,380	408,044	282,019	449,675	0,225
Benzeno	5675,083	160,186	94,911	1239,651	1041,216	63,425	1206,506	0,112
1,2-Dicloroetano	2047,161	19,788	8,585	134,099	92,726	0,212	84,073	0,028
Tricloroetano	4593,426	40,556	18,133	335,696	211,285	8,836	249,857	0,031
Tetracloroetano	3893,799	154,130	61,559	2064,137	1472,326	31,637	1754,797	0,237
Clorofórmio	10786,503	823,233	281,187	464,876	379,136	399,093	346,194	0,042
Bromodiclorometano	5366,069	24,606	9,075	207,716	153,721	92,792	143,078	0,020
Dibromoclorometano	1555,121	13,719	6,952	157,882	113,851	30,642	120,883	0,048
Bromofórmio	777,241	19,756	23,472	292,942	172,746	7,728	172,138	0,148

5.2.7. ENSAIO INTERLABORATORIAL

Em fevereiro de 2024, foram realizados Ensaios Interlaboratoriais de modo a avaliar o método implementado pelo Laboratório para a determinação de THMs, tricloroetano e tetracloroetano (*Método 1*), bem como o método desenvolvido para a determinação do benzeno, 1,2-dicloroetano, THMs, tricloroetano e tetracloroetano (*Método 2*), conjuntamente com o técnico analista A e o técnico analista B, pertencentes à Área de Química Orgânica do Laboratório.

5.2.7.1. MÉTODO 1

Todos os intervenientes do Laboratório que participaram neste Ensaio obtiveram resultados satisfatórios para a determinação do tricloroetano, tetracloroetano, bromodiclorometano, dibromoclorometano e bromofórmio, na medida em que se verificaram resultados de $|Z| \leq 2$. Contudo, foi obtido um resultado insatisfatório para a determinação do clorofórmio, uma vez que se verificou um resultado de $|Z| > 3$; no entanto, os técnicos analistas A e B apresentaram resultados satisfatórios para a

determinação deste composto, na medida em que obtiveram resultados de $|Z| \leq 2$ (Tabela 13).

Tabela 13: Resultados do Ensaio Interlaboratorial efetuado através do Método 1

Composto	Valor Real ($\mu\text{g/L}$)	Valor Determinado ($\mu\text{g/L}$)			Z Score		
		Estagiário	Analista A	Analista B	Estagiário	Analista A	Analista B
Tricloroeteno	2,71	2,62	2,90	2,48	-0,18	0,38	-0,46
Tetracloroeteno	11,79	11,64	11,07	11,15	-0,13	-0,61	-0,54
Clorofórmio	115,70	162,00	127,30	130,10	4,00	1,00	1,24
Bromodiclorometano	102,70	123,20	104,10	104,50	2,00	0,14	0,18
Dibromoclorometano	78,00	88,70	78,50	77,90	1,37	0,06	-0,01
Bromofórmio	89,30	92,00	82,20	81,70	0,30	-0,80	-0,85

5.2.7.2. MÉTODO 2

Nesse mesmo mês, foi realizado o mesmo Ensaio Interlaboratorial, embora de modo a avaliar o método desenvolvido para a determinação de benzeno, 1,2-dicloroetano, THMs, tricloroeteno e tetracloroeteno. Todos os intervenientes do Laboratório que participaram neste Ensaio obtiveram resultados satisfatórios para a determinação do benzeno, 1,2-dicloroetano, tricloroeteno, clorofórmio, bromodiclorometano e dibromoclorometano, na medida em que se verificaram resultados de $|Z| \leq 2$. Para a determinação do tetracloroeteno e bromofórmio, foi obtido um resultado satisfatório conjuntamente com o técnico analista B; no entanto, o técnico analista A apresentou resultados questionáveis na determinação destes compostos, na medida em que obteve resultados de $2 < |Z| \leq 3$ (Tabela 14).

Tabela 14: Resultados do Ensaio Interlaboratorial efetuado através do Método 2

Composto	Valor Real (µg/L)	Valor Determinado (µg/L)			Z Score		
		Estagiário	Analista A	Analista B	Estagiário	Analista A	Analista B
Benzeno	1,03	1,03	1,06	1,07	-0,03	0,28	0,33
1,2-Dicloroetano	2,63	2,73	2,73	2,69	0,38	0,39	0,25
Tricloroetano	2,71	2,77	2,91	2,98	0,12	0,41	0,53
Tetracloroetano	11,79	13,21	9,16	10,40	1,21	-2,23	-1,18
Clorofórmio	115,70	119,00	108,62	107,44	0,20	-0,61	-0,71
Bromodichlorometano	102,70	99,41	87,14	113,35	-0,32	-1,52	1,04
Dibromoclorometano	78,00	89,93	62,43	77,30	1,53	-2,00	-0,09
Bromofórmio	89,30	87,72	64,76	77,76	-0,18	-2,75	-1,29

5.2.8. GAMA DE TRABALHO

Após aplicação dos Ensaios de Validação anteriores, e através da preparação de diferentes soluções-padrão de calibração após o desenvolvimento do *MIA COVs 24* – com avaliação visual do ajuste da correlação entre os pontos das curvas de calibração, com auxílio do valor de R^2 – foram determinadas as Gamas de Trabalho dos diferentes COVs, de acordo com o apresentado na Tabela 15. Em Anexo, encontram-se apresentadas curvas de calibração representativas de cada composto (Figuras AIV.2 a AIV.14 do Anexo IV).

Tabela 15: Gamas de Trabalho validadas para os diferentes COVs

Composto	Gama de Trabalho (µg/L)	R ²
Cloreto de Vinilo	0,10 - 1,0	0,9965
Benzeno	0,25 - 5,0	0,9983
1,2-Dicloroetano	0,25 - 5,0	0,9971
Tricloroetano	0,50 - 5,0	0,9978
Tetracloroetano	0,50 - 5,0	0,9993
Clorofórmio	0,50 - 10,0	0,9987
	10,0 - 50,0	0,9981
Bromodiclorometano	0,50 - 10,0	0,9992
	10,0 - 50,0	0,9976
Dibromoclorometano	0,50 - 10,0	0,9986
	10,0 - 50,0	0,9991
Bromofórmio	0,50 - 10,0	0,9992
	10,0 - 50,0	0,9983

5.3. IMPLEMENTAÇÃO DO MÉTODO PARA DETERMINAÇÃO DE EPICLORIDRINA

Após o desenvolvimento do MIA para a determinação de benzeno, 1,2-dicloroetano, cloreto de vinilo, THMs, tricloroetano e tetracloroetano, e aplicação dos Ensaio para validação do mesmo, foi necessário desenvolver um outro MIA para a determinação de epicloridrina.

Numa primeira fase, procedeu-se à determinação do RT deste composto; para tal, criou-se um MIA a partir do implementado para a análise de COVs através da seringa de injeção de líquidos, alterando o gradiente de temperaturas do forno, de modo a ficar igual ao otimizado para a determinação dos restantes COVs, e encurtando também a gama de massas a analisar em *full scan* de 35 – 350 m/z para 35 – 150 m/z (*MIA ECH Inject Liquid 1*). Apesar de alguns dos iões com maior intensidade da epicloridrina se situarem na gama de 25 – 35 m/z, determinados compostos ubíquos na atmosfera – nomeadamente dióxido de carbono (CO₂) e azoto (N₂) – apresentam igualmente iões

nessa gama, pelo que o início da análise em *full scan* a partir da m/z 25 poderia conduzir a interferências na identificação e quantificação da epicloridrina, devido à presença de CO_2 e N_2 vestigiais no detetor.

Após a análise de uma solução-padrão de epicloridrina preparada a 1000 $\mu\text{g/L}$, sobrepõem-se os cromatogramas extraídos através do canal TIC das $m/z=49$, $m/z=57$ e $m/z=62$ (Figura 65) – correspondente a três dos iões com maior intensidade do espectro de massa da epicloridrina na gama referida anteriormente – e, posteriormente, procedeu-se a uma tentativa de identificação do composto por comparação do espectro de massa do pico mais provável do cromatograma do ião que gerou maior intensidade de sinal ($m/z=57$) com a biblioteca de espectros de massa do *software Chromeleon*. Apesar dos três iões apresentarem o mesmo RT, o composto identificado com um maior grau probabilístico de correspondência não se tratou do analito, mas sim de um interferente identificado como 2,2-dimetoxibutano (Figura 66), pelo que foi necessário proceder a outras alterações e à criação de um novo MIA para a identificação da epicloridrina.

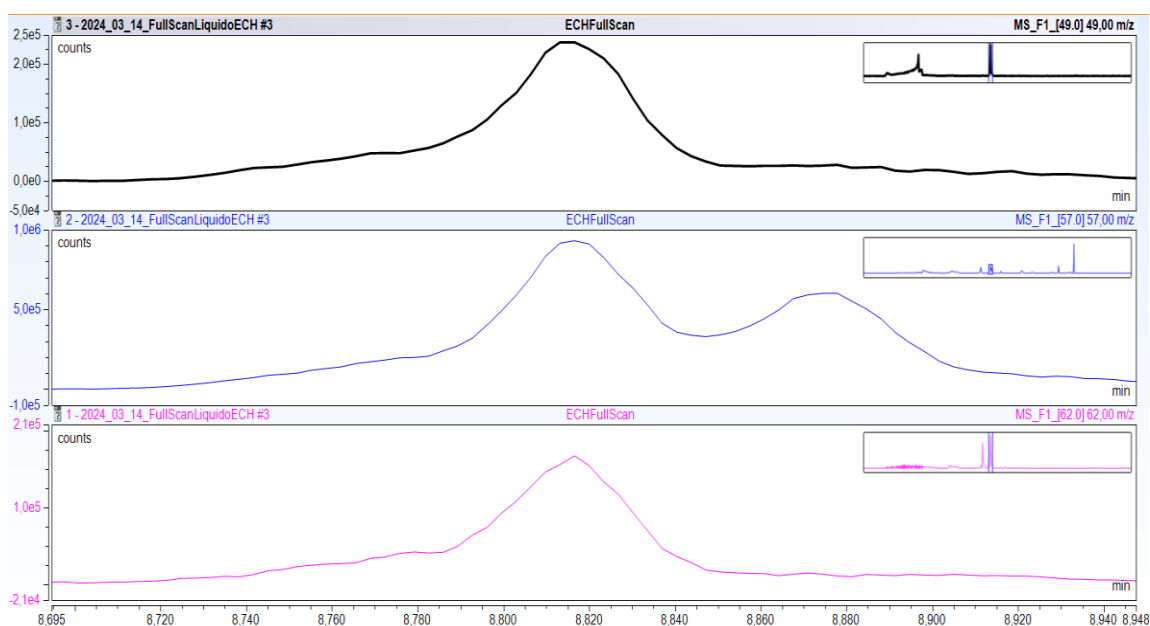


Figura 65: Cromatogramas das $m/z=48$, $m/z=57$ e $m/z=62$ obtidos com modo de aquisição full scan através da análise com MIA ECH Inject Liquid 1 de solução-padrão a 1000 $\mu\text{g/L}$ preparada a partir da S.I. 4 e extraída com seringa de injeção de líquidos

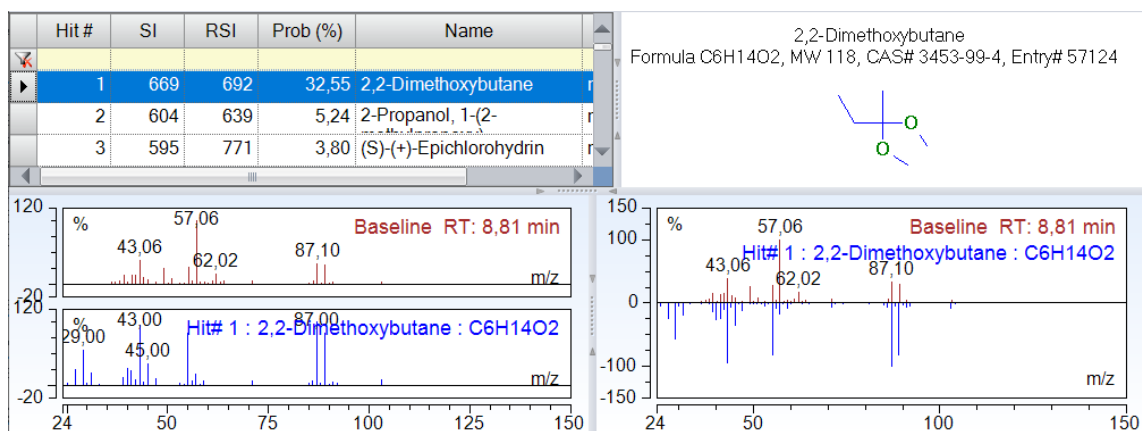


Figura 66: Biblioteca de espectros de massas com identificação do composto 2,2-dimetoxibutano

Deste modo, foi introduzido o modo SIM para a identificação dos iões $m/z=49$, $m/z=57$ e $m/z=62$, com RT de 9 min e janela de aquisição de 2 min, para obter os cromatogramas das m/z características da epicloridrina sem interferências de outras m/z . Para além disso, encurtou-se a gama de massas a analisar em *full scan* de 35 – 150 m/z para 45 – 150 m/z (*MIA ECH Inject Liquid 2*), para reduzir o ruído causado pelos iões com m/z inferiores às escolhidas para a determinação de epicloridrina. Voltou a analisar-se uma solução-padrão de epicloridrina preparada a 1000 $\mu\text{g/L}$ (Figura 67), e foi efetuado o mesmo procedimento para identificação do composto; através da análise do padrão com o *MIA ECH Inject Liquid 2*, o composto era identificado como sendo a epicloridrina ou o seu estereoisómero (clorometil)oxirano, com um grau probabilístico de correspondência total de 98,57% e um RT de 8,77 min (Figura 68).

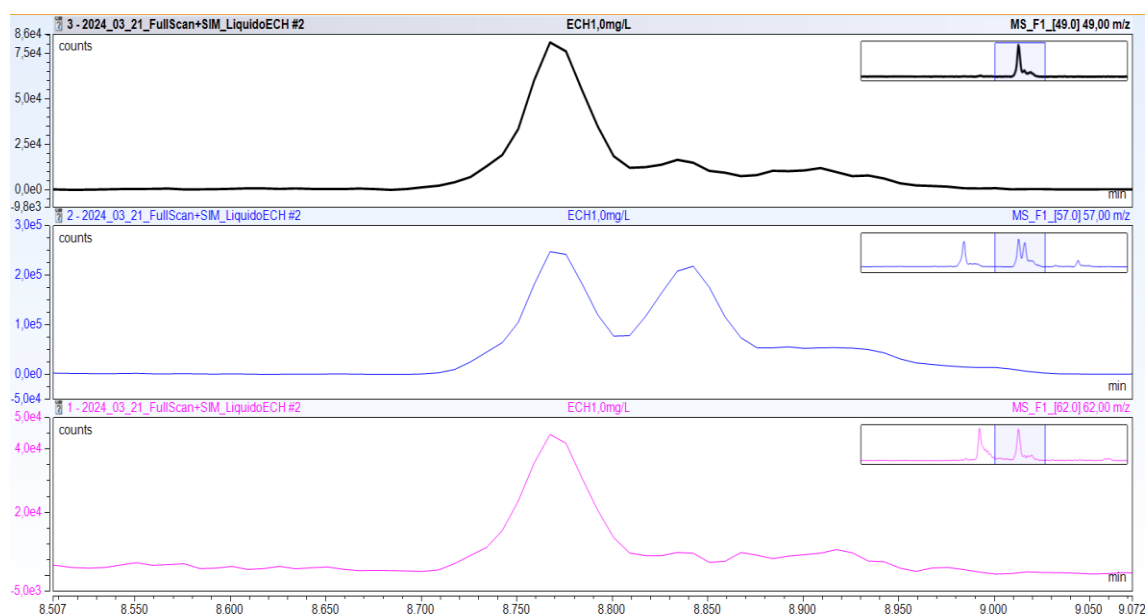


Figura 67: Cromatogramas das $m/z=48$, $m/z=57$ e $m/z=62$ obtidos com modo de aquisição SIM através da análise com *MIA ECH Inject Liquid 2* de solução-padrão a 1000 $\mu\text{g/L}$ preparado a partir da S.I. 4 e extraído com seringa de injeção de líquidos

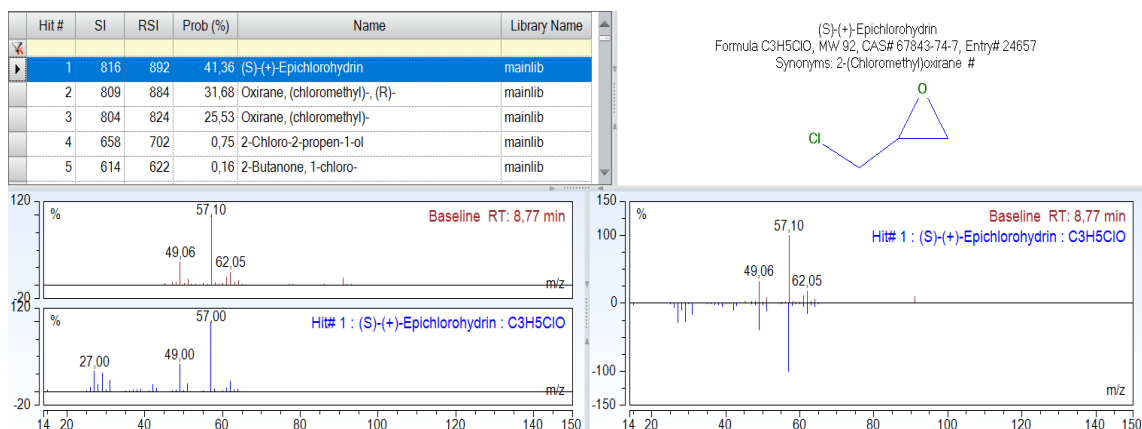


Figura 68: Biblioteca de espectros de massas usada para identificação da epicloridrina e determinação do seu RT

No entanto, verificou-se que no cromatograma da $m/z=57$ continuava a surgir um interferente junto ao pico cromatográfico da epicloridrina; comparou-se o espectro de massa do pico cromatográfico do interferente com a biblioteca de espectros do *software Chromeleon*, tendo o *software* voltado a identificá-lo como o composto 2,2-dimetoxibutano, com um grau probabilístico de correspondência de 96,36%. Testou-se diminuir a concentração de epicloridrina nas soluções-padrão analisadas para 500 µg/L e 250 µg/L para verificar o que sucedia ao pico cromatográfico do interferente, tendo-se constatado que, independentemente da concentração de padrão analisado, a intensidade do pico permanecia igual (Figura 69).

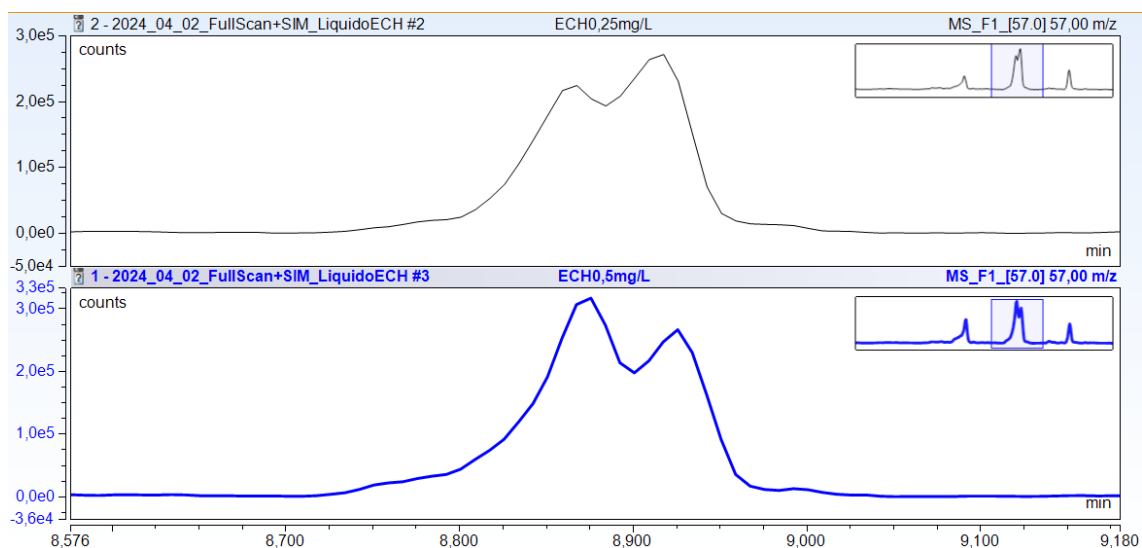


Figura 69: Cromatogramas da $m/z=57$ obtidos com modo de aquisição SIM através da análise com MIA ECH Inject Liquid 2 de soluções-padrão a 250 µg/L (cima) e 500 µg/L (baixo) preparadas a partir da S.I. 4 e extraídas com seringa de injeção de líquidos

Foi também analisado o cromatograma gerado após a injeção de metanol pela seringa de injeção de líquidos, tendo-se verificado que o interferente de $m/z=57$ continuava a surgir (Figura 70) e a ser igualmente identificado como 2,2-dimetoxibutano, com um grau probabilístico de correspondência de 95,77%. Deste modo, constatou-se que o interferente poderia ser proveniente quer do solvente usado para a preparação das soluções-padrão, quer de outra fonte, nomeadamente da borracha que compõe os septos usados nas tampas dos *vials*.

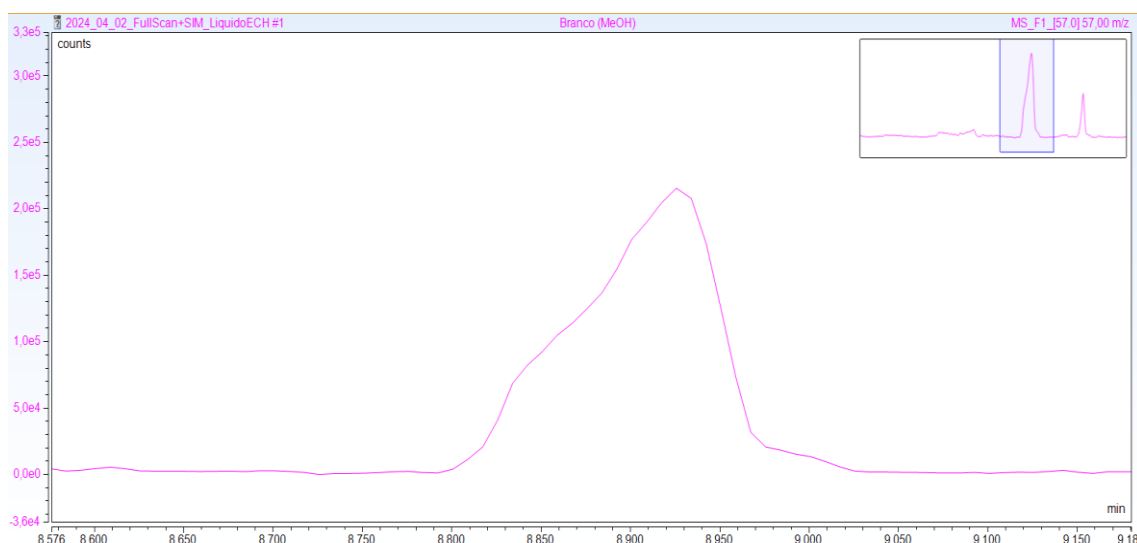


Figura 70: Cromatograma da $m/z=57$ obtido com modo de aquisição SIM através da análise com *MIA ECH Inject Liquid 2* de amostra de metanol injetada com seringa de injeção de líquidos

Uma vez que a epícloridrina já tinha sido identificada e o seu RT determinado, todas as análises realizadas posteriormente para a determinação deste composto foram efetuadas através da técnica de HS-SPME-GC-MS. Numa fase inicial, foi criado um MIA a partir do MIA final implementado para a análise dos restantes COVs, diferindo nalgumas configurações instrumentais (*MIA ECH 1*). Ao nível do tempo de extração, aumentou-se a duração em que a fibra se encontrava a extrair os compostos de 10 min para 60 min, de modo a aumentar a probabilidade de se atingir o equilíbrio; para além disso, reduziu-se a duração em que o *vial* se encontrava parado na incubadora de 30 s para 10 s, uma vez que o aumento da duração de agitação promove o estabelecimento de um equilíbrio de fases mais rápido; por fim, alteraram-se as configurações ao nível do espetrómetro de massa de modo a que a epícloridrina fosse o único analito a ser determinado, com base no RT estabelecido.

A partir do *MIA ECH 1* e com modo de aquisição em SIM e *full scan*, analisou-se uma solução-padrão preparada a 250 µg/L, tendo-se usado uma fibra CAR-PDMS para extrair os compostos; foram também analisados nas mesmas condições dois brancos preparados a partir de água desionizada, tendo a um deles sido acrescentado 2,5 mL de metanol – correspondente ao volume de metanol utilizado na preparação do padrão a 250 µg/L – de modo a perceber se o metanol se correlacionava com a presença do interferente. Através do cromatograma gerado através da análise do padrão, constatou-se que o interferente de $m/z=57$ deixava de surgir. Por outro lado, o cromatograma da $m/z=57$ do branco mostrava um interferente com RT próximo da epicloridrina (Figura 71), embora diferente do que fora identificado até aí; já no cromatograma do branco com metanol voltava a surgir o pico cromatográfico do composto 2,2-dimetoxibutano, embora com uma intensidade de sinal bastante mais baixa do que a do pico cromatográfico da epicloridrina.

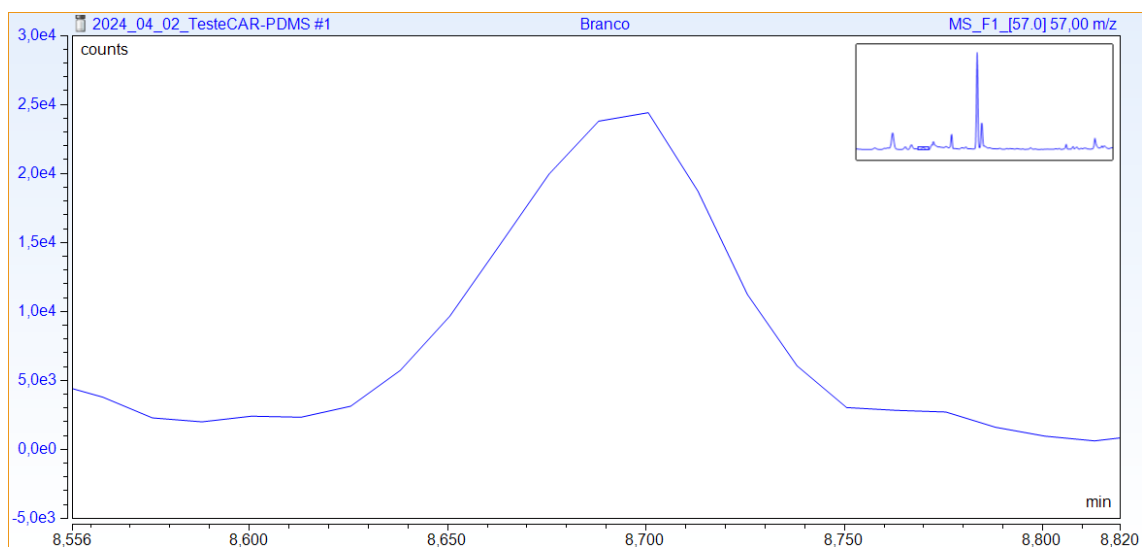


Figura 71: Cromatograma da $m/z=57$ obtido com modo de aquisição SIM através da análise com *MIA ECH 1* de amostra de branco

Através do *MIA ECH 1*, voltaram-se a analisar soluções-padrão de epicloridrina em concentrações mais baixas, nomeadamente a 10,0 µg/L, 0,50 µg/L e 0,025 µg/L, correspondente ao LQ que se pretendia atingir para a determinação deste composto. Às concentrações de 10,0 µg/L e 0,50 µg/L o pico cromatográfico da epicloridrina continuava a surgir e a ser corretamente identificado; no entanto, à concentração de 0,025 µg/L o pico cromatográfico da epicloridrina deixava de surgir, impossibilitando a identificação do composto. Uma vez que o pico cromatográfico da epicloridrina

continuava a surgir e a ser corretamente identificado à concentração de 0,50 µg/L, foi essa a concentração usada na preparação das soluções-padrão durante a otimização das condições de HS-SPME.

Uma primeira alteração ao MIA ECH 1 passou por variar a temperatura de extração de modo a verificar de que modo afetava a área do pico cromatográfico do composto. Assim, criaram-se diferentes MIAs (*MIA ECH 2* a *MIA ECH 5*) com várias temperaturas de extração entre 30 °C e 70 °C, tendo-se analisado soluções-padrão de epicloridrina através destes. Por comparação das áreas dos picos cromatográficos da epicloridrina gerados através dos diferentes MIAs, constatou-se que a temperatura de extração de 35 °C induziu uma área superior relativamente às verificadas com as outras temperaturas de extração (Figura 72).

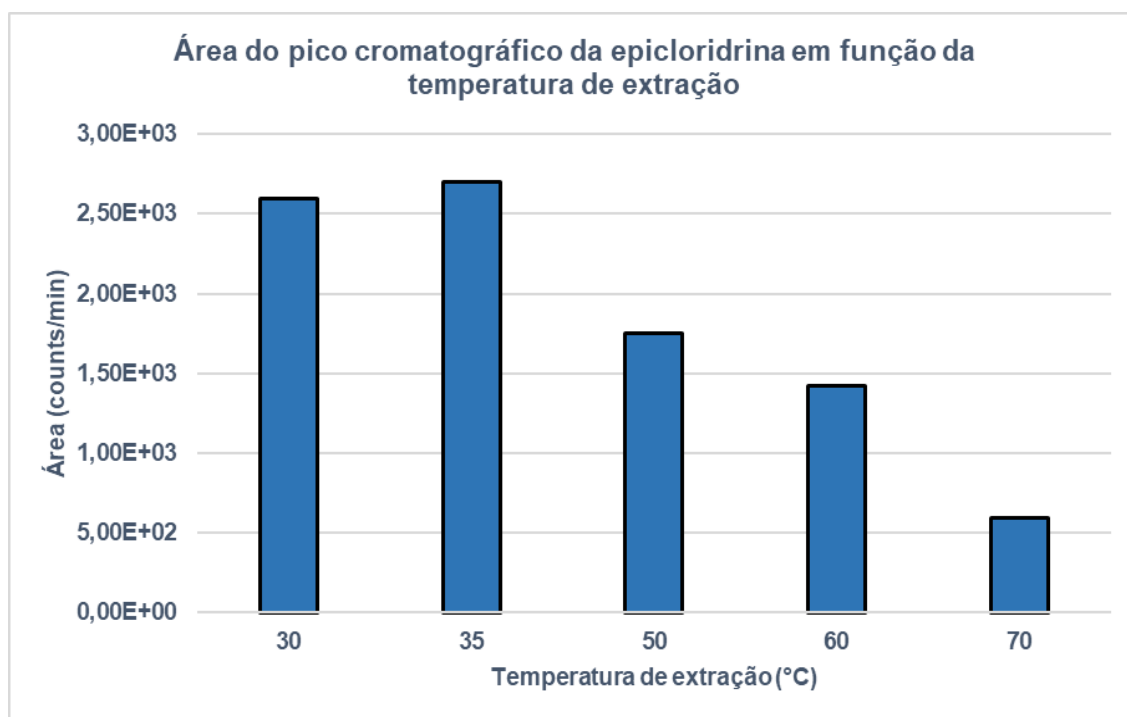


Figura 72: Gráfico da área do pico cromatográfico da epicloridrina em função da temperatura de extração

Assim, estabeleceu-se a temperatura de extração de 35 °C para o desenvolvimento dos MIAs seguintes. Após a otimização deste parâmetro instrumental, criaram-se novos MIAs para avaliar de que modo os diferentes tempos de agitação dos *vials* na incubadora influenciavam a área do pico cromatográfico da epicloridrina. Por um lado, diminuiu-se o tempo de agitação, de modo a que o *vial* ficasse a agitar e parado em períodos sucessivos de 30 s (*MIA ECH 6*); por outro lado, aumentou-se o tempo de

agitação, de modo a que o *vial* ficasse a agitar durante 59 s e parado durante 1 s em períodos sucessivos ao longo da duração da incubação (*MIA ECH 7*). Foram então analisadas soluções-padrão de epicloridrina através do *MIA ECH 2*, *MIA ECH 6* e *MIA ECH 7*, e constatou-se que a melhor configuração era a que passava por uma duração de 59 s a agitar seguido de 1 s parado, uma vez que induziu a maior área do pico cromatográfico da epicloridrina (Figura 73). Apesar do aumento da área nestas condições não ter sido significativamente superior ao verificado com as outras condições, o facto do valor das áreas dos picos cromatográficos serem tão baixos poderia fazer com que esta pequena melhoria fosse o suficiente para atingir o LQ requerido pela Legislação para o composto.

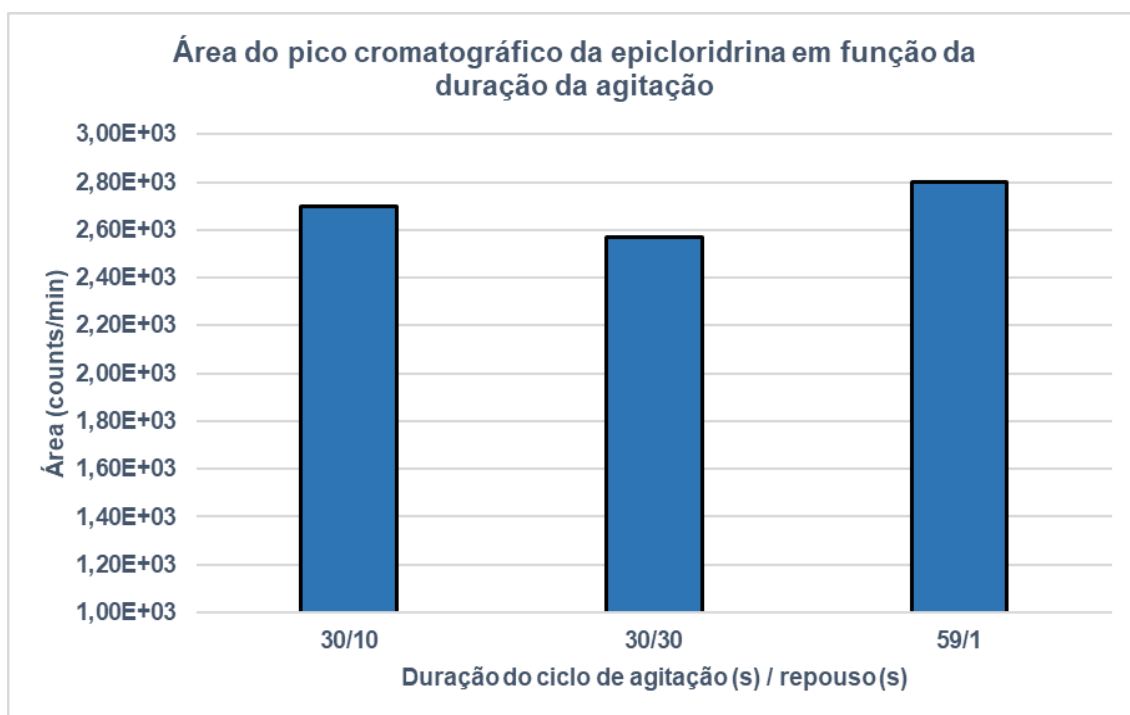


Figura 73: Gráfico da área do pico cromatográfico da epicloridrina em função da duração de agitação

Após otimização das configurações instrumentais ao nível da temperatura de extração e duração do ciclo de agitação/repouso do *vial* na incubadora, criaram-se novos MIAs (*MIA ECH 8* a *MIA ECH 17*), com diferentes tempos de extração entre 15 min e 60 min, para análise de soluções-padrão de epicloridrina, de modo a verificar de que forma a área do pico cromatográfico deste composto se alterava. Constatou-se que a área do pico cromatográfico da epicloridrina aumentou gradualmente até aos 55 min, pelo que se pressupôs que o equilíbrio da epicloridrina era atingido durante esse período (Figura

74). No entanto, considerou-se a duração de 55 min como sendo excessiva para implementação em análises de rotina; como tal, estabeleceu-se um tempo de extração de 15 min para o desenvolvimento dos MIAs seguintes, uma vez que induziu uma área do pico cromatográfico da epicloridrina considerada suficientemente robusta.

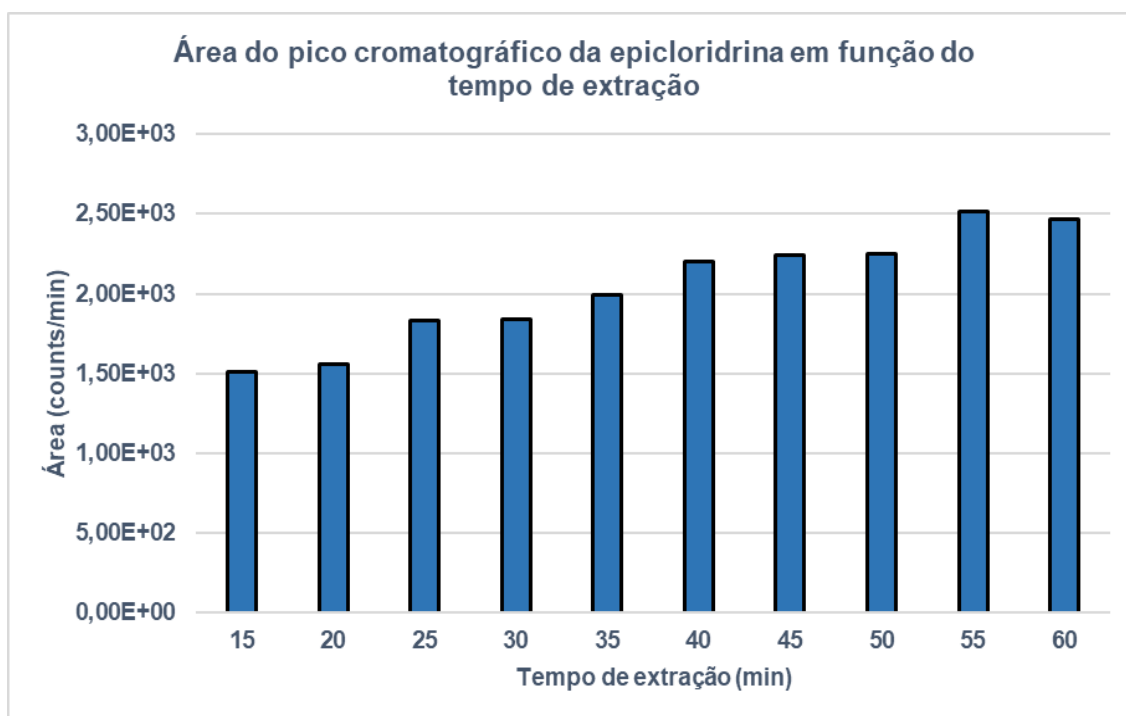


Figura 74: Gráfico da área do pico cromatográfico da epicloridrina em função do tempo de extração

Foi igualmente testado um modo de injeção diferente para verificar de que modo influenciava a área do pico cromatográfico da epicloridrina. Até esse momento, o modo de injeção encontrava-se definido como *splitless with surge*, com pressão de *surge* de 250 kPa e duração de 0,25 min; criou-se então um novo MIA com modo de injeção em *splitless*, mantendo as restantes configurações instrumentais otimizadas inalteradas (MIA ECH 18). Analisaram-se duas soluções-padrão de epicloridrina através do MIA ECH 8 e MIA ECH 18, e verificou-se que a área do pico cromatográfico do composto diminuiu ao alterar o modo de injeção de *splitless with surge* para *splitless* (Figura 75). Como tal, o modo de injeção otimizado manteve-se como *splitless with surge* com pressão de *surge* de 250 kPa e duração de 0,25 min.

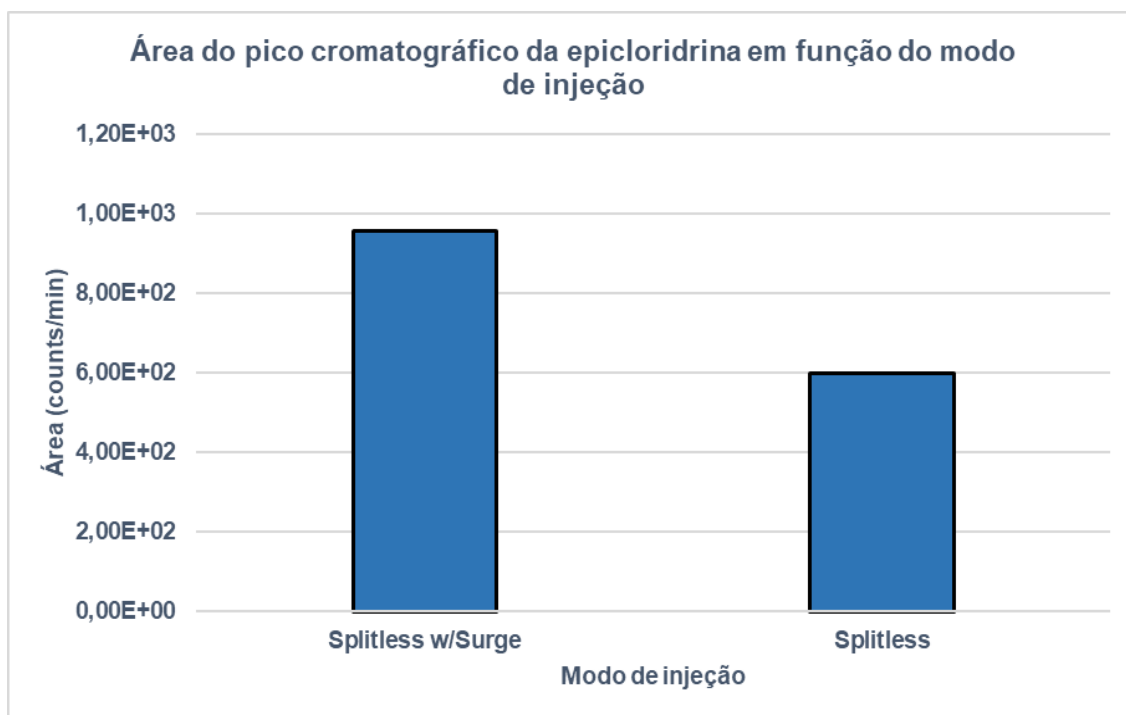


Figura 75: Gráfico da área do pico cromatográfico da epicloridrina em função do modo de injeção

Através do *MIA ECH 8*, analisaram-se soluções-padrão de epicloridrina recorrendo à fibra usada até aí para a extração dos compostos – CAR-PDMS – bem como à fibra PDMS, de modo a comparar a eficiência de ambas na extração do analito. Através da análise dos cromatogramas verificou-se que, enquanto com a fibra CAR-PDMS era possível detetar e quantificar a epicloridrina, com a fibra PDMS o analito não era detetado nem quantificado. Como tal, estabeleceu-se definitivamente o uso da fibra CAR-PDMS para extração do composto.

Prepararam-se soluções-padrão de calibração na Gama que pretendíamos validar para a curva de calibração do analito. No entanto, uma vez que pretendíamos atingir o LQ da epicloridrina (0,025 µg/L) pela primeira vez, alterou-se o tempo de extração de 15 min para 35 min (*MIA ECH 19*), de modo a aumentar a área do pico cromatográfico, e tendo em conta uma duração de extração adequada.

Uma vez preparadas e analisadas as soluções-padrão de epicloridrina na Gama completa, verificou-se que, para o ião de quantificação usado até aí ($m/z=57$), as áreas do pico cromatográfico do analito eram semelhantes entre as concentrações de 0,025

$\mu\text{g/L}$ e $0,1 \mu\text{g/L}$, não sucedendo o mesmo para os iões de confirmação $m/z=49$ e $m/z=62$, que apresentavam uma boa dispersão da área dos picos cromatográficos das soluções-padrão em toda a Gama (Figura 76).

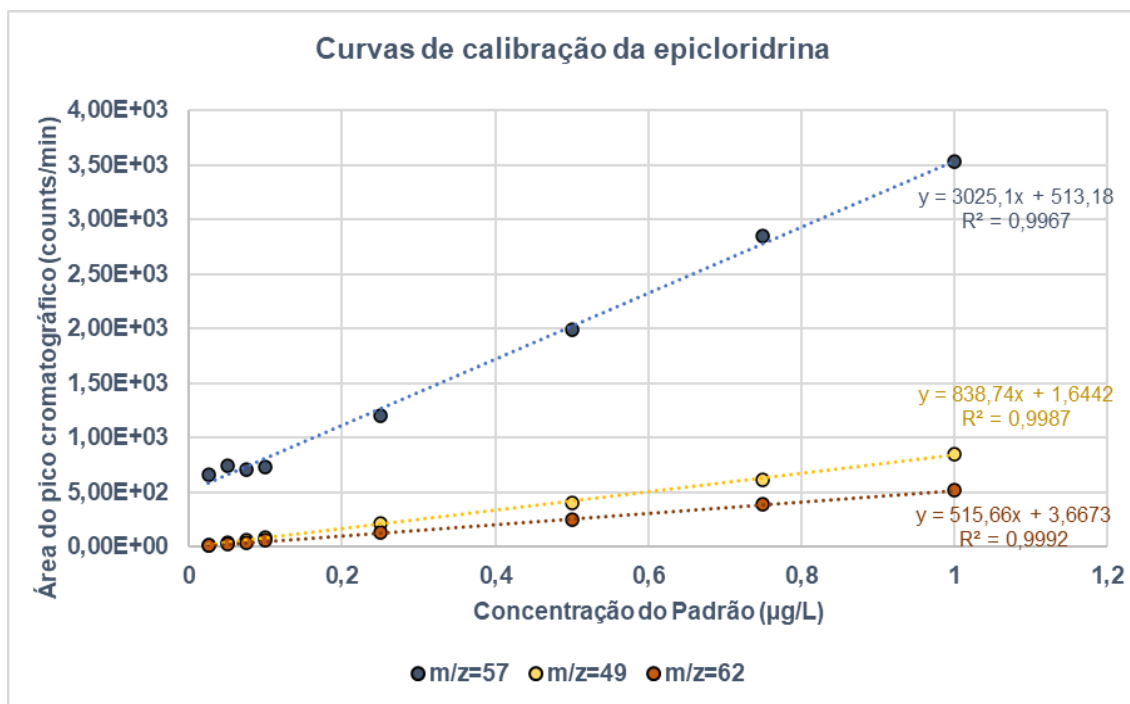


Figura 76: Curvas de calibração dos iões de quantificação ($m/z=57$) e confirmação ($m/z=49$ e $m/z=62$) da epicloridrina

Após análise das retas de calibração, verificou-se que nos cromatogramas da $m/z=57$ dos *brancos* surgiam picos cromatográficos de um interferente, não sucedendo o mesmo nos cromatogramas dos iões de confirmação. Através da observação dos cromatogramas da $m/z=57$ de cada solução-padrão de epicloridrina analisada, constatou-se que entre as concentrações de $0,025 \mu\text{g/L}$ e $0,075 \mu\text{g/L}$ a intensidade de sinal do pico cromatográfico do interferente se sobrepunha ao do analito, apresentando intensidade de sinal semelhante à concentração de $0,10 \mu\text{g/L}$, e deixando de se sobrepor a partir da concentração de $0,25 \mu\text{g/L}$ (Figura 77).

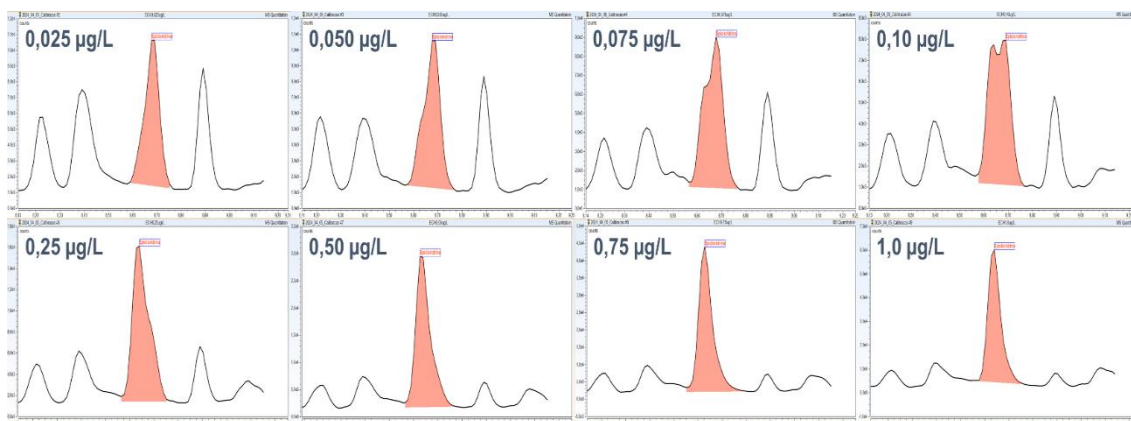


Figura 77: Cromatogramas da $m/z=57$ com modo de aquisição SIM gerados através da análise com MIA ECH 19 de soluções-padrão entre $0,025 \mu\text{g/L}$ e $1,0 \mu\text{g/L}$ preparadas através da S.I. 4 e extraídas com fibra CAR-PDMS

Até então, a água desionizada usada para preparação dos *brancos* e das soluções-padrão era proveniente do equipamento de água desionizada instalado na Área de Química Orgânica, pelo que se procedeu à análise de amostras de água desionizada provenientes de equipamentos de água desionizada instalados noutras Áreas do Laboratório – nomeadamente Química Geral e Microbiologia – de modo a verificar se o interferente com $m/z=57$ também surgia. Foi também analisada uma amostra de água engarrafada para o mesmo fim. Para além disso, voltou a analisar-se uma amostra de água desionizada proveniente do equipamento de água desionizada de Química Orgânica após os filtros e a lâmpada UV do equipamento terem sido trocados.

Através do *MIA ECH 19*, foram então analisadas amostras de água desionizada de Química Orgânica, Química Geral, Microbiologia e de água engarrafada, e verificou-se que a intensidade do pico cromatográfico do interferente era significativamente inferior na água desionizada proveniente do equipamento de água desionizada da Área de Microbiologia, pelo que passou a ser a água usada para a preparação de *brancos* e soluções-padrão de epicloridrina (Figura 78).

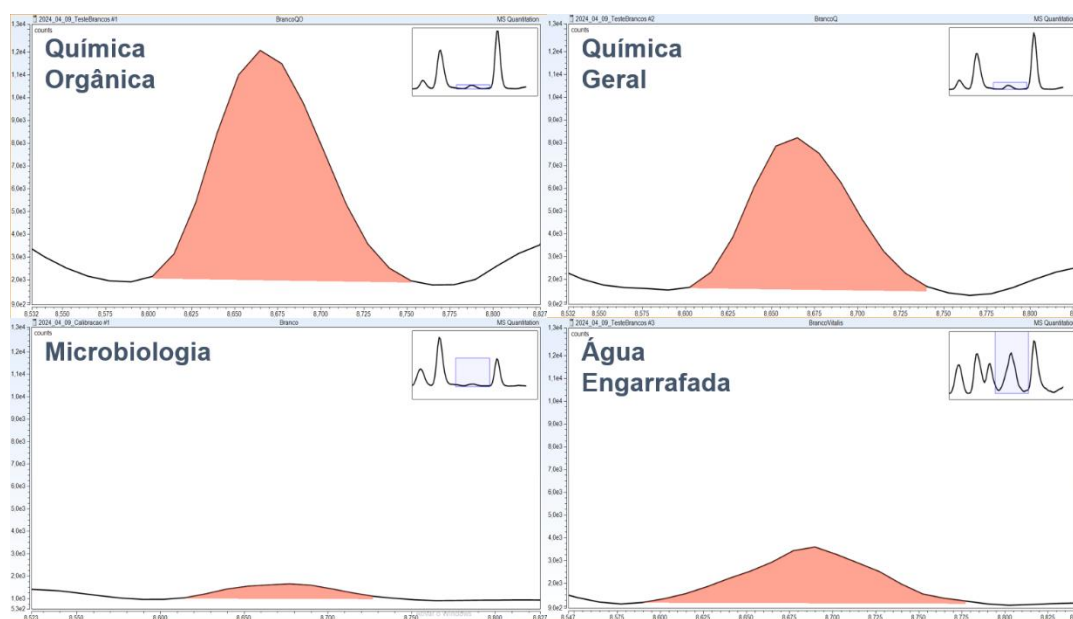


Figura 78: Cromatogramas da $m/z=57$ com modo de aquisição SIM gerados através da análise com *MIA ECH 19* de amostras de água desionizada de diferentes origens e engarrafada

Voltaram a ser preparadas soluções-padrão de epicloridrina na Gama que se pretendia validar, usando água desionizada proveniente do equipamento de água desionizada de água da Área de Microbiologia. A curva de calibração da $m/z=57$ gerada após análise

das soluções-padrão através do *MIA ECH 19* demonstrou que a intensidade de sinal do pico cromatográfico do interferente deixava de se sobrepor à do pico cromatográfico da epícloridrina ao nível das soluções-padrão preparados a concentrações mais baixas (Figura 79). Para além disso, a área dos picos cromatográficos das soluções-padrão apresentavam uma boa dispersão em toda a Gama, pelo que se definiu o *MIA ECH 19* para a condução de ensaios destinados à validação do método.

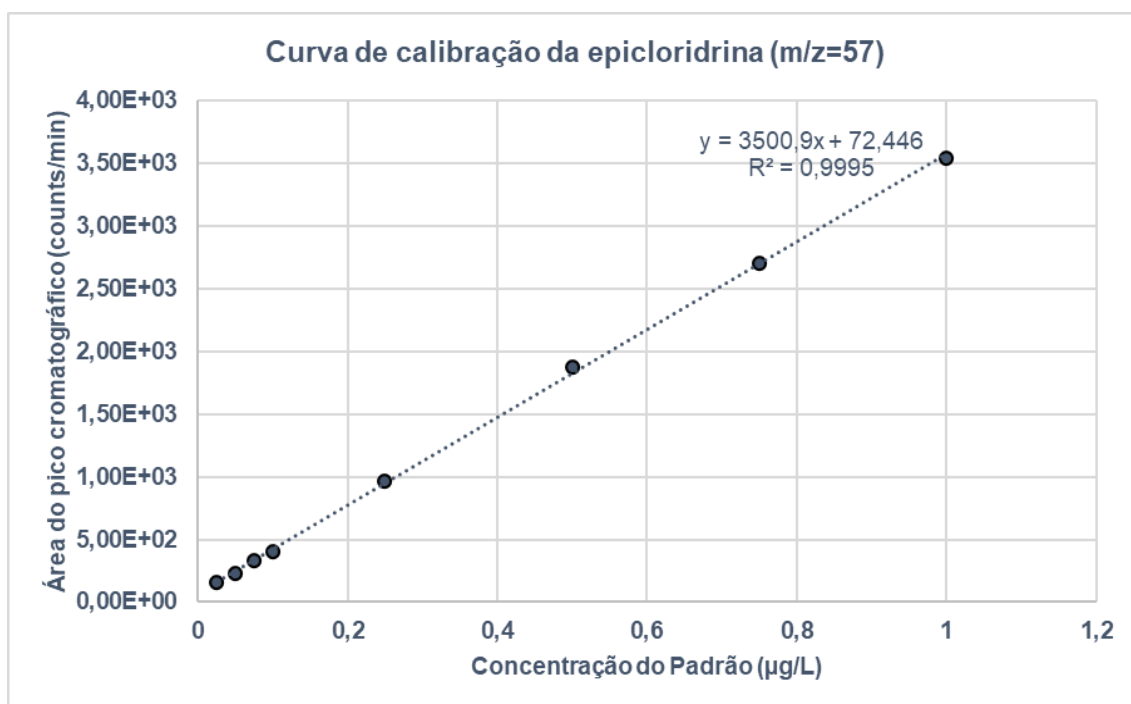


Figura 79: Curva de calibração da epícloridrina

Após realização de ensaios para avaliação da Linearidade, Repetibilidade, LQ e Especificidade do *MIA ECH 19*, realizou-se um ensaio para avaliação de Recuperações, recorrendo a amostras de água da torneira proveniente da copa do Laboratório, representativa da matriz de água destinada ao consumo humano. Após a condução do ensaio, verificou-se que no cromatograma gerado através da análise da amostra de água da torneira surgia um pico cromatográfico de $m/z=57$ correspondente a um interferente com RT de 8,67 min, aproximado ao RT de 8,69 min observado para a epícloridrina.

Procedeu-se igualmente à verificação dos cromatogramas gerados através da análise de amostras de água preparadas com fortificações de soluções-padrão ao nível do LQ (0,025 µg/L) e a meio da Gama de Trabalho da epícloridrina (0,20 µg/L). Constatou-se que na amostra com fortificação de 0,025 µg/L o pico cromatográfico de $m/z=57$ do

interferente se sobrepunha completamente ao da epicloridrina; já na amostra com fortificação de 0,20 µg/L o pico cromatográfico de $m/z=57$ da epicloridrina apresentava uma intensidade de sinal ligeiramente superior à do interferente, embora surgissem coeluídos (Figura 80).

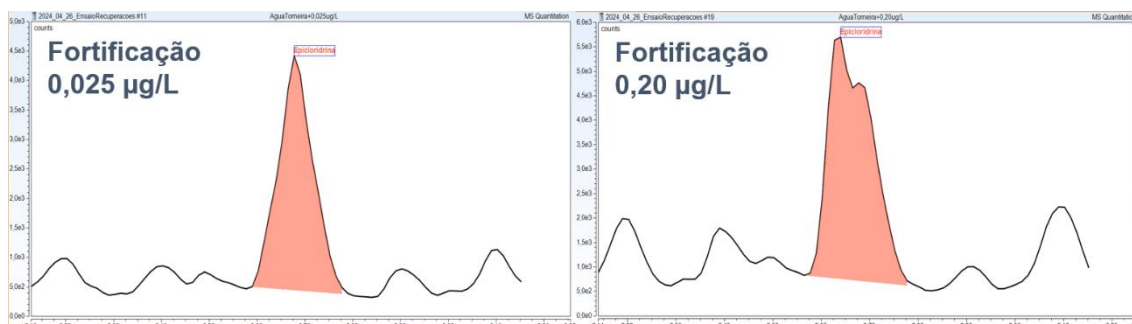


Figura 80: Cromatogramas da $m/z=57$ com modo de aquisição SIM gerados através da análise com *MIA ECH 19* de amostras de água da torneira com fortificação de soluções-padrão a 0,025 µg/L e 0,20 µg/L preparados através da S.I. 4 e extraídos com fibra CAR-PDMS

Uma vez que o interferente apresentava um ião comum ao usado para a quantificação da epicloridrina ($m/z=57$), procurou-se perceber se apresentava igualmente iões comuns aos usados para confirmação do analito. Foram então extraídos os cromatogramas do 1º ião de confirmação ($m/z=49$) e do 2º ião de confirmação ($m/z=62$) da epicloridrina, e constatou-se que o pico cromatográfico do interferente continuava a surgir em ambas as situações na amostra de água da torneira, na amostra com fortificação de 0,025 µg/L e na amostra com fortificação de 0,20 µg/L, com uma intensidade de sinal que não permitia a sobreposição dos picos cromatográficos dos iões de confirmação da epicloridrina (Figura 81).

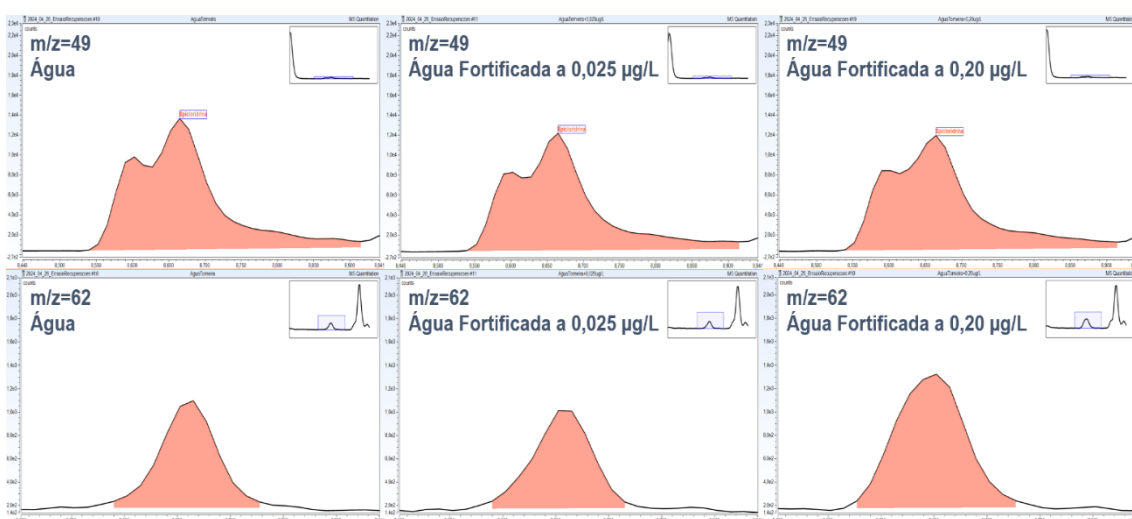


Figura 81: Cromatogramas das $m/z=49$ e $m/z=62$ com modo de aquisição SIM gerados através da análise com *MIA ECH 19* de amostras de água da torneira tal e qual, e com fortificação de soluções-padrão a 0,025 µg/L e 0,20 µg/L, preparados através da S.I. 4 e extraídos com fibra

Visto que o interferente apresentava um RT próximo ao da epicloridrina e iões comuns aos usados para a determinação do analito, com uma intensidade de sinal que impedia a sua identificação e quantificação em amostras reais ao nível do LQ requerido pela Legislação e a meio da sua Gama de Trabalho, foi necessário proceder ao desenvolvimento de um MIA que permitisse separá-lo do interferente.

Assim, comparando o RT da epicloridrina e do interferente com o gradiente de temperaturas que se encontrava definido, determinou-se que o forno se encontrava a uma temperatura de aproximadamente 100 °C no momento em que os compostos saíam da coluna cromatográfica. Foi então alterado o gradiente de temperaturas do forno, mantendo um patamar inicial a 35 °C durante 2 min, mas alterando a primeira rampa de temperatura, de modo a atingir uma temperatura inferior àquela a que o forno se encontrava no momento em que os compostos saíam da coluna cromatográfica (95 °C). Manteve-se um patamar a 95 °C durante 3 min, de modo a tentar promover a separação do analito e do interferente com base nas diferentes afinidades de ambos para a fase estacionária da coluna cromatográfica, mantendo-se as restantes configurações do gradiente de temperaturas inalteradas (*MIA ECH 20*).

Foi criado um outro MIA baseado no *MIA ECH 20*, mas alterando o gradiente de temperaturas de modo a que o forno atingisse um patamar aos 85 °C em vez de 95 °C (*MIA ECH 21*). Com este MIA, pretendeu-se verificar se uma temperatura inferior promovia melhor a separação da epicloridrina do interferente comparativamente a uma temperatura mais aproximada daquela a que o forno se encontrava no momento em que os compostos saíam da coluna cromatográfica.

Por fim, desenvolveu-se simultaneamente um MIA com um gradiente de temperaturas igual ao testado até então, mas acelerando o incremento de temperatura desde o patamar inicial de 35 °C até ao patamar de 120 °C de 10 °C/min para 20 °C/min (*MIA ECH 22*). O princípio deste MIA era o mesmo dos *MIA ECH 20* e *MIA ECH 21* – promover a separação da epicloridrina do interferente através das diferentes afinidades dos compostos para a fase estacionária da coluna cromatográfica – embora com uma duração inferior de interação entre os compostos e a coluna, para avaliar de que modo influenciava a retenção destes pela fase estacionária.

Foram preparadas amostras de água da torneira fortificadas a 0,50 µg/L para serem analisadas através do *MIA ECH 19* e dos três novos MIAs desenvolvidos, de modo a comparar os picos cromatográficos de $m/z=57$ gerados entre eles (Figura 82). Em

comparação com o cromatograma gerado pelo *MIA ECH 19*, verificou-se que, através do *MIA ECH 20*, a epicloridrina e o interferente saíam menos coeluídos e mais tardiamente da coluna cromatográfica. Já através do *MIA ECH 21*, constatou-se que o analito e o interferente saíam ainda menos coeluídos e mais tardiamente da coluna cromatográfica. Por outro lado, com o *MIA ECH 22*, os compostos saíam completamente coeluídos, saindo no entanto mais cedo da coluna cromatográfica.

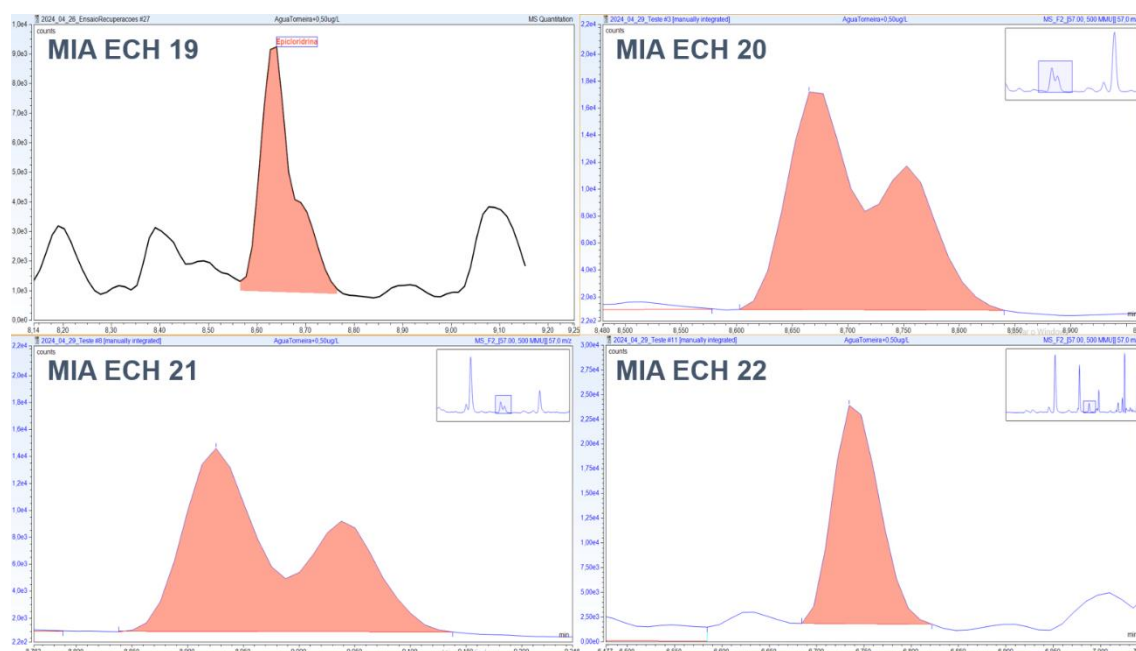


Figura 82: Cromatogramas da $m/z=57$ com modo de aquisição SIM gerados através da análise com diferentes MIAs de amostras de água da torneira com fortificação de padrão a $0,50 \mu\text{g/L}$, preparado através da S.I. 4 e extraído com fibra CAR-PDMS

Uma vez que a realização do Ensaio de Recuperações envolve a adição de tiosulfato de sódio à amostra de água da torneira a analisar, efetuou-se um teste para avaliar a possibilidade do interferente provir deste composto. Para tal, analisaram-se amostras de água desionizada com e sem adição de $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, bem como de água da torneira com e sem adição de $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, através do *MIA ECH 21*, uma vez que fora o que separara melhor a epicloridrina do interferente. Para além disso, prepararam-se soluções-padrão de calibração de epicloridrina na sua gama a validar em água desionizada e em água da torneira, com adição de $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, para serem analisados igualmente pelo *MIA ECH 21* (Figura 83).

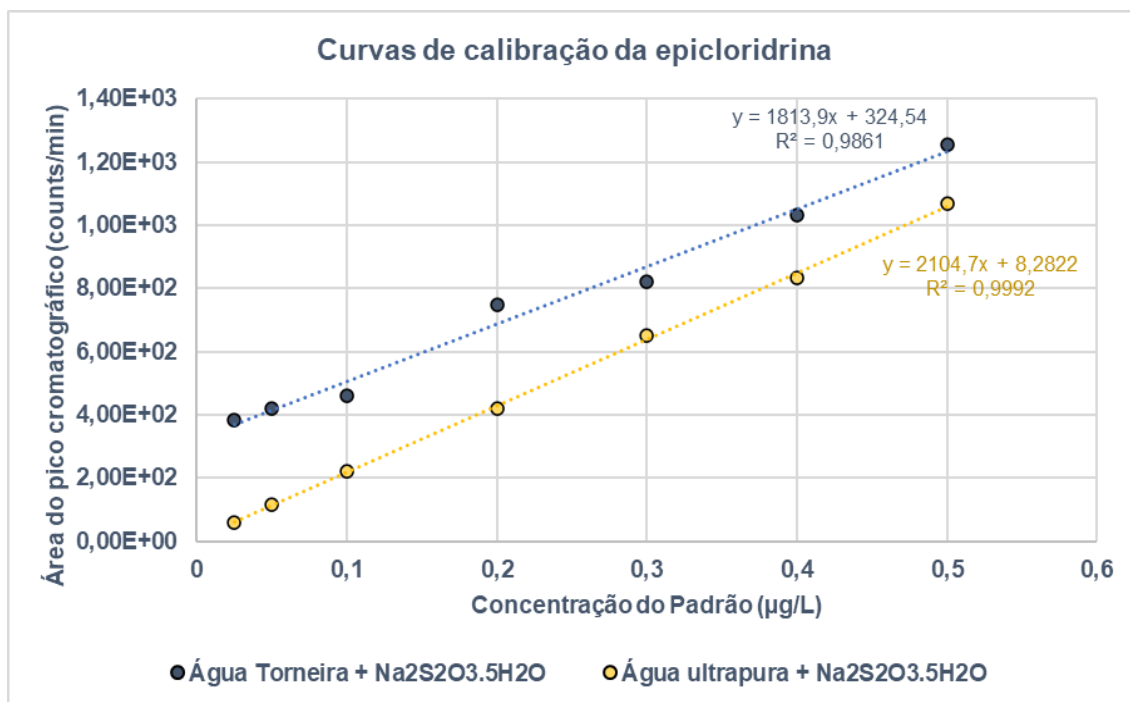


Figura 83: Curvas de calibração de soluções-padrão de epicloridrina preparados em água da torneira e em água desionizada com adição de Na₂S₂O₃·5H₂O

Verificou-se que a curva de calibração da epicloridrina apresentava uma boa dispersão quando as soluções-padrão tinham sido preparadas em água desionizada, não sucedendo o mesmo quando tinham sido preparadas em água da torneira. Para além disso, verificou-se que nos cromatogramas gerados pela análise das amostras de água desionizada não surgia o pico cromatográfico do interferente, independentemente da adição ou não de Na₂S₂O₃·5H₂O (Figura 84), enquanto nos cromatogramas gerados pela análise das amostras de água da torneira surgia o pico cromatográfico do interferente, independentemente da adição ou não de Na₂S₂O₃·5H₂O (Figura 85).

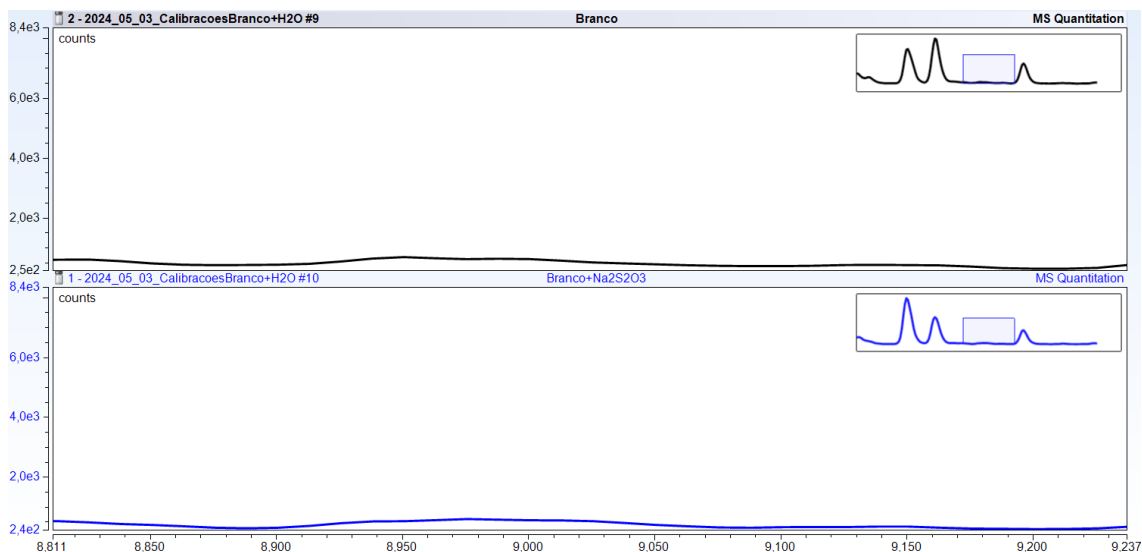


Figura 84: Cromatogramas da $m/z=57$ obtidos com modo de aquisição SIM através da análise com *MIA ECH 21* de amostra de água desionizada e água desionizada com adição de $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$

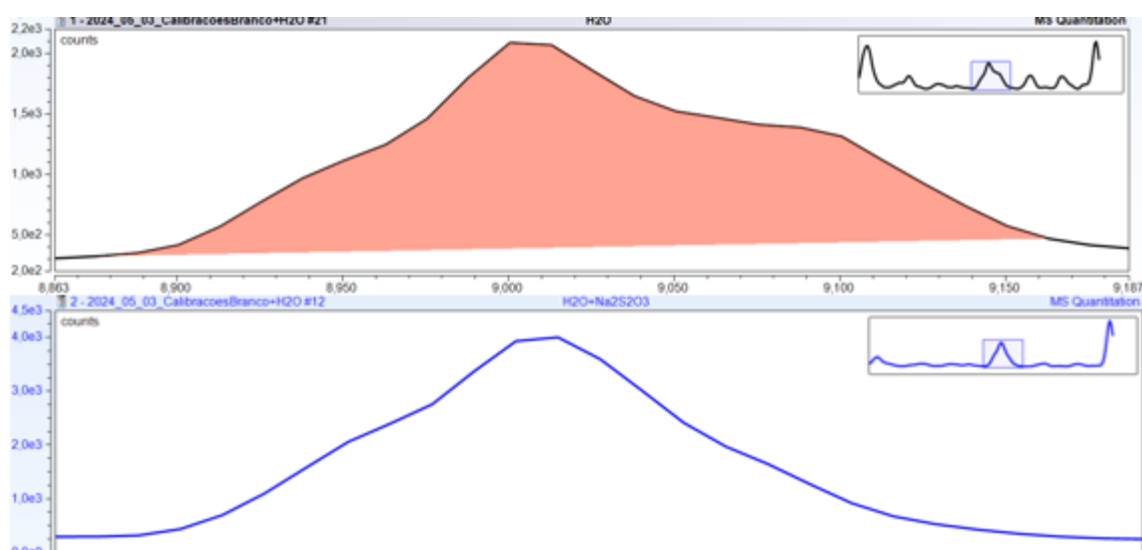


Figura 85: Cromatogramas da $m/z=57$ obtidos com modo de aquisição SIM através da análise com *MIA ECH 21* de amostra de água da torneira e água da torneira com adição de $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$

Relativamente ao *MIA ECH 1*, o *MIA ECH 19* diferiu apenas ao nível da técnica de HS-SPME, nomeadamente ao nível da temperatura de extração – que foi aumentada de 30 °C para 35 °C – no tempo de extração – que foi reduzido de 60 min para 35 min – e nas condições de agitação do *vial* – cujos ciclos de agitação foram alterados de 30 s a agitar e 10 s parado, para 59 s a agitar e 1 s parado.

5.4. VALIDAÇÃO DO MÉTODO PARA DETERMINAÇÃO DE EPICLORIDRINA

5.4.1. LINEARIDADE

A Linearidade do composto foi verificada através dos testes *Point-to-Point Slope*, Teste de Mandel e Análise de Resíduos, realizados com o software *Microsoft Excel*.

5.4.1.1. POINT-TO-POINT SLOPE

Através da aplicação do teste *Point-to-Point Slope* ao valor das áreas dos picos cromatográficos da epicloridrina, verificou-se que, para todos eles, os valores de Δb_{i-m} se situaram entre os valores mínimos (%) e máximos (%) admissíveis para cada um, correspondentes a $mediana_{\Delta b_{i-m}} - 0,25 \times mediana_{declive b_i}$ e $mediana_{\Delta b_{i-m}} + 0,25 \times mediana_{declive b_i}$, respetivamente (Tabela 16). Para além disso, este método de avaliação serviu igualmente para validar o parâmetro da Linearidade, pelo facto de não se terem verificado desvios da mediana dos declives b_m a aumentarem ou diminuírem sistematicamente, conforme ilustrado pela Figura AII.1 do Anexo II.

Tabela 16: Resultados do teste *Point-to-Point Slope* aplicado após análise de soluções-padrão de epicloridrina através do MIA ECH 19

Composto	Gama de Trabalho ($\mu\text{g/L}$)	Δb_{i-m} Mínimo	Δb_{i-m} Máximo	Mediana $_{b_i}$ - 25%	Mediana $_{b_i}$ + 25%
Epicloridrina	0,025 - 0,50	54,0	319,0	-460,0	460,0

5.4.1.2. TESTE DE MANDEL

Através da aplicação do Teste de Mandel ao valor das áreas dos picos cromatográficos da epicloridrina, verificou-se que o valor de VT foi inferior ao valor de $F_{(1,5)95\%}$ (Tabela 17). Como tal, confirmou-se que a função de calibração linear conduziu a um bom ajuste dos pontos experimentais.

Tabela 17: Resultados do teste de Mandel aplicado após análise de soluções-padrão de epicloridrina através do MIA ECH 19

Composto	Gama de Trabalho ($\mu\text{g/L}$)	VT	$F_{(1,5)95\%}$
Epicloridrina	0,025 - 0,50	0,67	7,71

5.4.1.3. ANÁLISE DE RESÍDUOS

Através da aplicação do Teste de Análise de Resíduos ao valor das áreas dos picos cromatográficos da epicloridrina, verificou-se que o desvio relativo da razão entre estes e o valor das áreas estimadas através da curva de calibração se situou entre -20% e 20%, conforme indicado pela Tabela 18 e indicado pela Figura AIII.1 do Anexo III. Como tal, este método de avaliação serviu igualmente para validar o parâmetro da Linearidade da epicloridrina.

Tabela 18: Resultados do teste de Análise de Resíduos aplicado após análise de soluções-padrão de epicloridrina através do MIA ECH 19

Composto	Gama de Trabalho (µg/L)	Desvio Mínimo (%)	Desvio Máximo (%)
Epicloridrina	0,025 - 0,50	0,7	10,0

5.4.2. REPETIBILIDADE

Após terem sido analisados 5 soluções-padrão correspondentes aos extremos da Gama de Trabalho a validar, procedeu-se ao cálculo da média das concentrações de cada nível analisado, tendo de seguida sido calculado o erro relativo médio e o CV de cada conjunto de dados. Verificou-se que os valores calculados relativos ao erro relativo médio e ao CV se situaram entre $\pm 25\%$, o que permitiu validar a Repetibilidade na Gama de Trabalho estudada (Tabela 19).

Tabela 19: Resultados do teste de Repetibilidade aplicado após análise de soluções-padrão de epicloridrina através do MIA ECH 19

Composto	Padrões Analisados (µg/L)	Valor Médio Obtido (µg/L)	Erro Relativo Médio (%)	Coefficiente de Variação (%)
Epicloridrina	0,025	0,025	-1,82	10,31
	0,50	0,50	0,56	3,1

5.4.3. LIMITE DE QUANTIFICAÇÃO

O parâmetro do LQ da epicloridrina foi validado simultaneamente com o parâmetro da Repetibilidade, na medida em que o valor do erro relativo médio e do CV relativos ao valor médio das soluções-padrão preparadas ao nível do LQ se situou entre $\pm 25\%$ (Tabela 19).

5.4.4. SELETIVIDADE

Para a verificação da Seletividade do método, prepararam-se soluções-padrão na Gama de Trabalho que se pretendia validar para a epicloridrina, tendo-se procedido ao cálculo da média do rácio das áreas dos picos cromatográficos entre o pico de quantificação e os picos de confirmação definidos, bem como os CVs destes valores, que foram inferiores a 25% (Tabela 20). No entanto, a incapacidade do método em identificar corretamente a epicloridrina em amostras reais, verificado através do ensaio de Recuperações, permitiu concluir que o método não se encontrava com a Seletividade adequada.

Tabela 20: Resultados do teste de Seletividade aplicado após análise de soluções-padrão de epicloridrina através do MIA ECH 19

Composto	Picos			Rácio					
	Quantificação	Confirmação 1	Confirmação 2	Quant / Confirm 1			Quant / Confirm 2		
				Média	Desv. Pad.	C.V. (%)	Média	Desv. Pad.	C.V. (%)
Epicloridrina	m/z = 57	m/z = 49	m/z = 62	4,12	0,838	20,34	6,57	1,168	17,78

5.4.5. ESPECIFICIDADE

Para a realização do Ensaio de Especificidade, foram verificadas, numa determinada sequência de análise, a área do pico cromatográfico da epicloridrina na solução-padrão correspondente ao seu LQ, bem como nos *brancos* usados nessa mesma sequência. Numa primeira instância, este Ensaio veio atestar uma boa Especificidade do método, uma vez que a média da área dos *brancos* foi inferior a 1/3 da área do pico cromatográfico do analito no Padrão preparado ao nível do seu LQ, ou seja, foi inferior ao LD do método (Tabela 21). No entanto, a incapacidade do método em quantificar a epicloridrina em amostras reais, verificado através do ensaio de Recuperações, permitiu concluir que o método não se encontrava com a Especificidade adequada.

Tabela 21: Resultados do teste de Especificidade aplicado após análise de soluções-padrão de epicloridrina através do MIA ECH 19

Composto	Área LQ (counts/min)	Área Branco (counts/min)					Área Média Branco/ Área LQ
		#1	#2	#3	#4	#5	
Epicloridrina	22,127	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000

5.4.6. GAMA DE TRABALHO

Através da preparação de diferentes soluções-padrão de calibração após o desenvolvimento do *MIA ECH 24*, e após aplicação dos Ensaio de validação anteriores, foi determinada a Gama de Trabalho da epicloridrina, por avaliação visual do ajuste de correlação entre os pontos das curvas de calibração, com auxílio da avaliação do R^2 , encontrando-se apresentado em Anexo uma curva representativa do composto (Figura AIV.11). Assim, foi validada a Gama de Trabalho adequada à epicloridrina, de acordo com o apresentado na Tabela 22.

Tabela 22: Gama de Trabalho validada para a epicloridrina

Composto	Gama de Trabalho ($\mu\text{g/L}$)	R^2
Epicloridrina	0,025 - 0,50	0,9993

6. CONCLUSÕES FINAIS

O principal objetivo do Estágio Curricular incidiu no desenvolvimento de métodos para a determinação de benzeno, 1,2-dicloroetano, cloreto de vinilo e epicloridrina em amostras de água, e posterior validação dos mesmos, através de Ensaio para avaliação de diferentes parâmetros. Uma vez que o Laboratório se encontrava acreditado para a análise de THMs, tricloroetano e tetracloroetano, procurou-se criar um método que permitisse a determinação destes compostos juntamente com os referidos anteriormente.

No decorrer do Estágio, foram desenvolvidos e otimizados dois métodos diferentes, um deles para a determinação conjunta de benzeno, 1,2-dicloroetano, cloreto de vinilo, THMs, tricloroetano e tetracloroetano (*MIA COVs 24*), e outro para a determinação de epicloridrina (*MIA ECH 19*). Uma vez desenvolvidos os referidos MIAs, foram efetuados diferentes Ensaio para definir e validar a Gama de Trabalho dos diferentes analitos, tendo-se usado como parâmetros para as suas validações a Linearidade, Repetibilidade, Limite de Quantificação, Recuperações, Seletividade e Especificidade. Para além disso, elaboraram-se Ensaio Interlaboratoriais para determinação de benzeno, 1,2-dicloroetano, THMs, tricloroetano e tetracloroetano através do método

desenvolvido, bem como para a determinação de THMs, tricloroeteno e tetracloroeteno através do método implementado pelo Laboratório, sendo que ambos se demonstraram como adequados ao uso.

Relativamente ao *MIA COVs 24*, este diferiu do *MIA* inicial relativamente ao tempo de incubação e temperatura de extração, modo de injeção dos compostos, gradientes de temperatura do forno do cromatógrafo gasoso, e às configurações analíticas do espetrómetro de massa. Para além disso, com o desenvolvimento do método foi necessário alterar a fibra utilizada para a microextração dos compostos, tendo-se alterado o uso de uma fibra de SPME com revestimento de PDMS para uma fibra de SPME com revestimento de CAR-PDMS, uma vez que com a fibra PDMS se verificara uma fraca capacidade de adsorção do cloreto de vinilo, não sucedendo o mesmo com a fibra CAR-PDMS.

O tempo de incubação foi reduzido de 10 min para 0,5 min, uma vez que não se verificaram diferenças significativas nas áreas dos picos cromatográficos dos compostos entre ambos os tempos testados, pelo que se optou por reduzir o tempo de incubação do *vial*. A temperatura de extração foi reduzida de 40 °C para 30 °C, uma vez que se verificou que, apesar de não ter influência significativa na área dos picos cromatográficos dos restantes COVs, aumentava a área do pico cromatográfico do cloreto de vinilo, que consistia no fator-limitante do desenvolvimento do *MIA*, por necessitar de atingir um LQ menor.

Quanto ao tempo de incubação, optou-se por manter o tempo definido inicialmente de 10 min, uma vez que, apesar de não permitir atingir o tempo de equilíbrio do benzeno, 1,2-dicloroetano, THMs, tricloroeteno e tetracloroeteno – evidenciado pelo facto das áreas dos seus picos cromatográficos terem aumentado com o aumento do tempo de extração – permitia que fossem quantificados de forma significativamente robusta, e consistiu no tempo ideal para a extração do cloreto de vinilo. Para além disso, a seleção de um tempo de extração mais curto relativamente a outros testados favorecia uma maior rapidez no processo de análise das amostras.

O modo de injeção nos 2 min iniciais foi alterado de *splitless* para *splitless with surge*, já que permitiu resolver o arraste dos picos cromatográficos dos compostos, tendo-se definido a duração de *surge* de 0,25 min como a ideal, pois conferia a melhor dualidade entre definição e área dos picos cromatográficos para a maior parte dos compostos.

Ao nível do gradiente de temperaturas do forno, apenas foi alterado o patamar inicial de 30 °C para 35 °C, uma vez que promoveu uma melhoria na definição do pico cromatográfico do 1,2-dicloroetano e, para além disso, permitia que a duração entre o fim de uma análise e o início da seguinte fosse mais curto, já que o forno necessitava de menos tempo para arrefecer de modo a atingir a temperatura inicial programada.

Por fim, as configurações analíticas do espectrómetro de massa foram alteradas de acordo com os novos RTs dos compostos, e os iões escolhidos para quantificação e confirmação dos mesmos.

Através do *MIA COVs 24*, foi possível validar para todos os analitos os parâmetros de Linearidade, através dos testes de *Point-to-Point Slope*, Mandel e Análise de Resíduos; Repetibilidade; Limite de Quantificação; Recuperações; Seletividade e Especificidade em amostras de água destinada ao consumo humano, tendo, no entanto, sido necessário excluir os valores das fortificações ao nível do LQ para o clorofórmio, bromodiclorometano e dibromoclorometano, por terem sido considerados *outliers*, para validação deste parâmetro. Estes parâmetros de validação, conjuntamente com a análise visual de diferentes curvas de calibração, com auxílio dos valores de R^2 obtidos, permitiram definir como Gamas de Trabalho 0,10 µg/L a 1,0 µg/L para o cloreto de vinilo, 0,25 a 5,0 µg/L para o benzeno e 1,2-dicloroetano, 0,50 µg/L a 5,0 µg/L para o tricloroetano e tetracloroetano, e 0,50 µg/L a 10,0 µg/L e 10 µg/L a 50,0 µg/L para as Gamas Baixa e Alta dos THMs, respetivamente. Com o Ensaio Interlaboratorial efetuado através do método desenvolvido, registaram-se resultados satisfatórios conjuntamente com o técnico analista A e o técnico analista B para a determinação do benzeno, 1,2-dicloroetano, tricloroetano, clorofórmio, bromodiclorometano e dibromoclorometano; já para a determinação do tetracloroetano e bromofórmio, foi obtido um resultado satisfatório conjuntamente com o técnico analista B, tendo o técnico analista A apresentado resultados questionáveis na determinação destes compostos.

Relativamente ao *MIA ECH 19*, este diferiu do *MIA* inicial relativamente à temperatura de extração, duração do ciclo de agitação/repouso do *vial* na incubadora, e tempo de extração. Para além disso, durante o desenvolvimento do *MIA* para determinação da epicloridrina, foi necessário recorrer à água desionizada dispensada através do sistema de purificação de água instalado na Área de Microbiologia, ao invés da água desionizada produzida pelos sistemas de purificação que se encontravam instalados nas Áreas de

Química Orgânica e Química Geral, uma vez que se constatou que apresentava menos interferentes.

Com o *MIA ECH 19*, estabeleceu-se a temperatura de extração de 35 °C, uma vez que conferiu a maior área do pico cromatográfico da epicloridrina, relativamente às outras temperaturas testadas.

A duração do ciclo de agitação (s) /repouso (s) implementada foi de 59/1, já que, em comparação com os outros ciclos testados foi a que conferiu a maior área do pico cromatográfico, pelo que se concluiu que o aumento da agitação promoveu uma maior partição da epicloridrina entre a água e o *headspace*, e entre o *headspace* e a fibra de SPME.

Por fim, no que concerne ao tempo de extração, constatou-se que a área do pico cromatográfico do analito aumentou gradualmente com o aumento da duração até aos 55 min; no entanto, considerou-se uma duração excessiva para implementar em análises de rotina, definindo-se, no fim, o tempo de extração para 35 min, uma vez que conferia uma área do pico cromatográfico suficientemente robusta e permitia quantificar a epicloridrina ao nível do seu LQ, tratando-se simultaneamente de uma duração considerada aceitável para estabelecer em análises de rotina.

Durante o desenvolvimento do método para determinação da epicloridrina, foram testadas as fibras de SPME com revestimento de PDMS e CAR-PDMS, tendo-se optado por implementar o uso da fibra CAR-PDMS na etapa de microextração do composto, uma vez que a fibra PDMS não conseguia extrair o analito da amostra nas condições testadas, impossibilitando a sua deteção e quantificação.

Através do *MIA ECH 19*, foi possível validar para a epicloridrina os parâmetros da Linearidade, através dos testes *Point-to-Point Slope*, Mandel e Análise de Resíduos; Repetibilidade e Limite de Quantificação. Estes parâmetros de validação, conjuntamente com a análise visual de diferentes curvas de calibração, com auxílio dos valores de R^2 obtidos, permitiram definir uma Gama de Trabalho de 0,025 µg/L a 0,50 µg/L. No entanto, não foi possível validar o parâmetro de Recuperações, uma vez que as amostras de água da torneira, necessárias para a condução do Ensaio de validação deste parâmetro em água destinada ao consumo humano, apresentavam um interferente com um RT aproximado ao da epicloridrina, e iões comuns aos usados para a quantificação e confirmação do analito, o que impedia a quantificação deste. Apesar

de terem sido desenvolvidos MIAs de modo a separar a epícloridrina do interferente, nenhum deles se mostrou eficaz. Para além disso, apesar de inicialmente o método ter demonstrado uma aparente Seletividade e Especificidade adequadas na análise de soluções-padrão preparadas em água desionizada, o facto de a epícloridrina não ser corretamente quantificada nem identificada em amostras de água destinadas ao consumo humano impossibilitou a validação destes parâmetros.

Futuramente, dever-se-á continuar a otimizar o MIA desenvolvido para a determinação da epícloridrina, de modo a separar o analito do interferente, o que poderá passar, nomeadamente, pelo desenvolvimento de gradientes de temperatura diferentes dos testados até então. Alternativamente, poder-se-á considerar alterar a metodologia a implementar para a determinação da epícloridrina, passando a usar-se o espectrómetro com triplo quadrupolo – igualmente instalado na Área de Química Orgânica – ao invés do espectrómetro com quadrupolo simples, utilizado até ao momento para este fim.

Como outra tarefa futura, poderia ser vantajoso testar a determinação do cloreto de vinilo e da epícloridrina através de um mesmo MIA, uma vez que constituem dois parâmetros de avaliação conjunta para determinadas análises de água, nomeadamente águas naturais doces superficiais que se encontrem em locais com maior probabilidade de contaminação, tais como imediações de indústrias afetas à produção de polímeros. De facto, ao abrigo do Decreto-Lei nº 69/2023 de 21 de agosto, os valores paramétricos do cloreto de vinilo e da epícloridrina referem-se à concentração residual destes monómeros na água, calculada em função das especificações, fornecidas pelo fabricante, da migração máxima do polímero correspondente em contacto com a água [5].

Para além disso, futuramente será necessário testar o *MIA COVs 24* para a determinação de benzeno, 1,2-dicloroetano, cloreto de vinilo, THMs, tricloroetano e tetracloroetano, bem como o *MIA ECH 19* para a determinação de epícloridrina, noutras matrizes de água, nomeadamente águas de piscina e águas naturais doces superficiais e subterrâneas; para tal, será necessário efetuar Ensaaios de Recuperação através de ambos os MIAs nestas matrizes.

Por fim, demonstra-se essencial a participação futura em Ensaaios Interlaboratoriais para a determinação do cloreto de vinilo e epícloridrina para reforçar a adequabilidade a uso dos *MIA COVs 24* e *MIA ECH 19*, respetivamente.

Para além do desenvolvimento dos MIAs para a determinação do benzeno, 1,2-dicloroetano, cloreto de vinilo e epicloridrina, foi também possível participar em tarefas de rotina do Laboratório, nomeadamente análise de THMs, tricloroeteno e tetracloroeteno em amostras de água de controlos de inspeção, através do método acreditado pelo IPAC para a determinação dos mesmos, bem como a participação num Ensaio Interlaboratorial para avaliar a adequabilidade a uso do referido método.

A participação diária no quotidiano do Laboratório da Águas e Energia do Porto permitiu-me o desenvolvimento de ferramentas de trabalho essenciais, nomeadamente espírito de cooperação e comunicação, responsabilidade e sentido crítico. Para além disso, considero que o facto de o Estágio ter sido desenvolvido na Área de Química Orgânica constituiu um complemento importante à minha formação-base na Área da Biologia, uma vez que permitiu o aprofundar dos meus conhecimentos no domínio da qualidade da água, bem como o desenvolvimento das minhas capacidades de flexibilidade e adaptabilidade.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. *Águas e Energia do Porto - Empresa Municipal*, disponível em: <https://www.aguasdoporto.pt/abastecimento-de-agua/contextualizacao-historica> (Acedido a 20 de dezembro de 2023).
2. *ERSAR - Entidade Reguladora dos Serviços de Águas e Resíduos*, disponível em: <https://www.ersar.pt/pt/setor/caracterizacao> (Acedido a 20 de dezembro de 2023).
3. *Águas e Energia do Porto - Empresa Municipal*, disponível em: <https://www.aguasdoporto.pt/qualidade-da-agua/qualidade> (Acedido a 20 de dezembro de 2023).
4. *Decreto-Lei n.º 306/2007 de 27 de agosto do Ministério do Ambiente, do Ordenamento do Território e do Desenvolvimento Regional. Diário da República: I Série, No 164 (2007)*. Acedido a 6 dez. 2023. Disponível em www.dre.pt.
5. *Decreto-Lei n.º 69/2023 de 21 de agosto do Ministério do Ambiente e Ação Climática. Diário da República: I Série, No 161 (2023)*. Acedido a 6 de dezembro de 2023. Disponível em www.dre.pt. p. 10 – 73.
6. *Águas e Energia do Porto - Empresa Municipal*, disponível em: <https://www.aguasdoporto.pt/aguas-de-consumo/apresentacao> (Acedido a 20 de dezembro de 2023).
7. *NP EN ISO/IEC 17025 - Requisitos gerais de competência para laboratórios de ensaio e calibração*.
8. *Decreto-Lei n.º 23/2011 de 11 de fevereiro do Ministério da Economia, da Inovação e do Desenvolvimento. Diário da República: I Série, No 30 (2011)*. Acedido a 11 de dezembro de 2023. Disponível em www.dre.pt.
9. *IPAC - Instituto Português de Acreditação*, disponível em: <http://www.ipac.pt/ipac/recint.asp> (Acedido a 11 de dezembro de 2023).
10. *IPAC - Instituto Português de Acreditação*, disponível em: <http://www.ipac.pt/ipac/funcao.asp> (Acedido a 11 de dezembro de 2023).
11. *IPAC, 2012. Procedimento para acreditação de Laboratórios - DRC005. : Instituto Português de Acreditação 2012*.

12. *Documentação Interna do Laboratório - Lista de Ensaios sob Acreditação Flexível Intermédia, edição nº4, revisão nº5.*
13. *Documentação Interna do Laboratório - Lista de Ensaios sob Acreditação Flexível Global, edição nº2, revisão nº4.*
14. *Documentação Interna do Laboratório - Procedimento Interno "Validação e Verificação de Métodos de Ensaio - Físico-Química" (PI 18B), edição nº3, revisão nº0.*
15. *Guia RELACRE 13 (2000). "Validação de Métodos Internos de Ensaio em Análise Química", Relacre, Lisboa.*
16. *ISO 8466-1:2021 - Water quality - Calibration and evaluation of analytical methods - Part 1: Linear calibration function.*
17. *Directive 2010/75. Directive (EU) 2010/75 of the European Parliament and of the Council of 24 November 2010 on industrial emissions (integrated pollution prevention and control) (Recast). Document 02010L0075-20110106. disponível em <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/?uri=CELEX%3A02010L0075-20110106> (Acedido a 21 de agosto de 2024).*
18. *Directive 2004/42. Directive (CE) 2004/42 of the European Parliament and of the Council of 21 April 2004 on the limitation of emissions of volatile organic compounds due to the use of organic solvents in certain paints and varnishes and vehicle refinishing products and amending Directive 1999/13/EC. Document 32004L0042. disponível em <https://eur-lex.europa.eu/eli/dir/2004/42/oj> (Acedido a 21 de agosto de 2024).*
19. Barnett, S.M., *ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY 40 CFR Part 52.* 2019.
20. Faroon, O., *Toxicological profile for carbon tetrachloride.* 2005: Agency for Toxic Substances and Disease Registry.
21. Chary, N.S. and A.R. Fernandez-Alba, *Determination of volatile organic compounds in drinking and environmental waters.* TrAC Trends in Analytical Chemistry, 2012. 32: p. 60-75.

22. Guenther, A., et al., *A global model of natural volatile organic compound emissions*. Journal of Geophysical Research: Atmospheres, 1995. 100(D5): p. 8873-8892.
23. Jin, X., et al., *Volatile organic compounds in water matrices: Recent progress, challenges, and perspective*. Chemosphere, 2022: p. 136182.
24. Pandey, P. and R. Yadav, *A review on volatile organic compounds (VOCs) as environmental pollutants: fate and distribution*. International Journal of Plant and Environment, 2018. 4(2).
25. Zhu, F., et al., *Applications of in vivo and in vitro solid-phase microextraction techniques in plant analysis: A review*. Analytica chimica acta, 2013. 794: p. 1-14.
26. Fischer, G. and W. Dott, *Relevance of airborne fungi and their secondary metabolites for environmental, occupational and indoor hygiene*. Archives of microbiology, 2003. 179: p. 75-82.
27. Environmental Protection Agency. *Agriculture and Aquaculture: Food for Thought*. (2020, October). Disponível em: <https://www.epa.gov/snep/agriculture-and-aquaculture-food-thought> (Acedido a 28 de fevereiro de 2024).
28. Caron-Beaudoin, É., et al., *Volatile organic compounds (VOCs) in indoor air and tap water samples in residences of pregnant women living in an area of unconventional natural gas operations: Findings from the EXPERIVA study*. Science of the Total Environment, 2022. 805: p. 150242.
29. Spengler, J.D. and Q. Chen, *Indoor air quality factors in designing a healthy building*. Annual Review of Energy and the Environment, 2000. 25(1): p. 567-600.
30. Moran, M.J., et al., *VOLATILE ORGANIC COMPOUNDS IN GROUND WATER FROM RURAL PRIVATE WELLS, 1986 TO 1999 1*. JAWRA Journal of the American Water Resources Association, 2004. 40(5): p. 1141-1157.
31. Li, P., et al., *Sources and consequences of groundwater contamination*. Archives of environmental contamination and toxicology, 2021. 80: p. 1-10.
32. International Association of Hydrogeologists. *Groundwater - more about the hidden resource*. (2020) Disponível em: <https://iah.org/education/general-public/groundwater-hidden-resource> (Acedido a 28 de fevereiro de 2024).

33. Li, P., et al., *Progress, opportunities, and key fields for groundwater quality research under the impacts of human activities in China with a special focus on western China*. Environmental Science and Pollution Research, 2017. 24: p. 13224-13234.
34. Baehr, A.L., P.E. Stackelberg, and R.J. Baker, *Evaluation of the atmosphere as a source of volatile organic compounds in shallow groundwater*. Water Resources Research, 1999. 35(1): p. 127-136.
35. Barbash, J. and P.V. Roberts, *Volatile organic chemical contamination of groundwater resources in the US*. Journal (Water Pollution Control Federation), 1986. 58(5): p. 343-348.
36. David, E. and V.-C. Niculescu, *Volatile organic compounds (VOCs) as environmental pollutants: Occurrence and mitigation using nanomaterials*. International Journal of Environmental Research and Public Health, 2021. 18(24): p. 13147.
37. Wang, S., H. Ang, and M.O. Tade, *Volatile organic compounds in indoor environment and photocatalytic oxidation: State of the art*. Environment international, 2007. 33(5): p. 694-705.
38. Belpomme, D., et al., *The multitude and diversity of environmental carcinogens*. Environmental research, 2007. 105(3): p. 414-429.
39. Claxton, L.D. and G.M. Woodall Jr, *A review of the mutagenicity and rodent carcinogenicity of ambient air*. Mutation Research/Reviews in Mutation Research, 2007. 636(1-3): p. 36-94.
40. Rook, J., *Formation of haloform during chlorination of natural water*. Water Treatment and Examination, 1972. 21: p. 259.
41. Shafiee, M., M. Reza, and L. Taghavi, *Health effects of trihalomethanes as chlorinated disinfection by products: A review article*. World Academy of Science, Engineering and Technology, 2012. 68: p. 2090-2096.
42. Azizi, E., et al., *Application of advanced oxidation process (H₂O₂/UV) for removal of organic materials from pharmaceutical industry effluent*. Environment Protection Engineering, 2017. 43(1): p. 183-191.

43. Chowdhury, S., *Exposure assessment for trihalomethanes in municipal drinking water and risk reduction strategy*. Science of the Total Environment, 2013. 463: p. 922-930.
44. Dehghani, M.H., et al., *Equilibrium and kinetic studies of trihalomethanes adsorption onto multi-walled carbon nanotubes*. Water, Air, & Soil Pollution, 2016. 227: p. 1-17.
45. Villanueva, C.M., et al., *Disinfection byproducts and bladder cancer: a pooled analysis*. Epidemiology, 2004: p. 357-367.
46. Thiriat, N., et al., *Exposure to inhaled THM: comparison of continuous and event-specific exposure assessment for epidemiologic purposes*. Environment international, 2009. 35(7): p. 1086-1089.
47. Thomas, R., *Evaluation of toxicity of volatile organic chemicals: General considerations*. Significance and treatment of volatile organic compounds in water supplies. Lewis, Chelsea, MI, 1990: p. 451-463.
48. Nieuwenhuijsen, M.J., et al., *Chlorination disinfection byproducts in water and their association with adverse reproductive outcomes: a review*. Occupational and environmental medicine, 2000. 57(2): p. 73-85.
49. Organization, W.H., *Guidelines for drinking-water quality: incorporating the first and second addenda*. 2022: World Health Organization.
50. Guha, N., et al., *Carcinogenicity of trichloroethylene, tetrachloroethylene, some other chlorinated solvents, and their metabolites*. The lancet oncology, 2012. 13(12): p. 1192-1193.
51. Aschengrau, A., et al., *Long-term health effects of early life exposure to tetrachloroethylene (PCE)-contaminated drinking water: a retrospective cohort study*. Environmental health, 2015. 14: p. 1-12.
52. U.S. Environmental Protection Agency. *Toxicological Review of Tetrachloroethylene (Perchloroethylene)*. In: *Support of Summary Information on the Integrated Risk Information System (IRIS)*. Washington DC: US EPA; 2012.
53. Guyton, K.Z., et al., *Human health effects of tetrachloroethylene: key findings and scientific issues*. Environmental health perspectives, 2014. 122(4): p. 325-334.

54. Lonsdale, K., *The structure of the benzene ring in C₆ (CH₃)* 6. Proceedings of the Royal Society of London. Series A, Containing Papers of a Mathematical and Physical Character, 1929. 123(792): p. 494-515.
55. Smith, M.T., *Advances in understanding benzene health effects and susceptibility*. Annual review of public health, 2010. 31: p. 133-148.
56. Wallace, L.A., *Major sources of benzene exposure*. Environmental Health Perspectives, 1989. 82: p. 165-169.
57. Weisel, C.P., *Benzene exposure: an overview of monitoring methods and their findings*. Chemico-biological interactions, 2010. 184(1-2): p. 58-66.
58. Gwinn, M.R., et al., *A review of the genotoxicity of 1, 2-dichloroethane (EDC)*. Mutation Research/Reviews in Mutation Research, 2011. 727(1-2): p. 42-53.
59. Hughes, K., M. Meek, and I. Caldwell, *1, 2-Dichloroethane: Evaluation of risks to health from environmental exposure in Canada*. Journal of Environmental Science & Health Part C, 1994. 12(2): p. 293-303.
60. Delaware Health and Social Services. Division of Public Health. (2013, September). *1,2-Dichloroethane*, disponível em: <https://dhss.delaware.gov/dhss/dph/files/dichlethane12faq.pdf> (Acedido a 3 de março de 2024).
61. Goldberg, M.S., et al., *Incidence of cancer among persons living near a municipal solid waste landfill site in Montreal, Quebec*. Archives of Environmental Health: An International Journal, 1995. 50(6): p. 416-424.
62. Isacson, P., et al., *Drinking water and cancer incidence in Iowa: III. Association of cancer with indices of contamination*. American journal of epidemiology, 1985. 121(6): p. 856-869.
63. Morris, J., *Small-time polluter, big-time problems. Did Keil Chemical cause childhood cancer?* US News & World Report, 2000. 128(8): p. 57-58.
64. Flid, M., *Vinyl chloride technology: Present and future*. Catalysis in Industry, 2009. 1(4): p. 285-293.
65. Keppler, F., et al., *Natural formation of vinyl chloride in the terrestrial environment*. Environmental science & technology, 2002. 36(11): p. 2479-2483.
66. Kielhorn, J., et al., *Vinyl chloride: still a cause for concern*. Environmental health perspectives, 2000. 108(7): p. 579-588.

67. Walter, R.K., et al., *Investigation of factors affecting the accumulation of vinyl chloride in polyvinyl chloride piping used in drinking water distribution systems*. Water research, 2011. 45(8): p. 2607-2615.
68. Creech Jr, J. and M. Johnson, *Angiosarcoma of liver in the manufacture of polyvinyl chloride*. Journal of Occupational and Environmental Medicine, 1974. 16(3): p. 150-152.
69. Cooper, W.C., *Epidemiologic study of vinyl chloride workers: mortality through December 31, 1972*. Environmental Health Perspectives, 1981. 41: p. 101-106.
70. Duck, B., J. Carter, and E. Coombes, *Mortality study of workers in a polyvinyl-chloride production plant*. The Lancet, 1975. 306(7946): p. 1197-1199.
71. Nicholson, W.J., et al., *Mortality experience of a cohort of vinyl chloride-polyvinyl chloride workers*. Annals of the New York Academy of Sciences, 1975. 246: p. 225-230.
72. Ott, M.G., R.R. Langner, and B.B. Holder, *Vinyl chloride exposure in a controlled industrial environment: a long-term mortality experience in 594 employees*. Archives of Environmental Health: An International Journal, 1975. 30(7): p. 333-339.
73. Hebeish, A., et al., *Novel precursors for green synthesis and application of silver nanoparticles in the realm of cotton finishing*. Carbohydrate Polymers, 2011. 84(1): p. 605-613.
74. Organization, W.H., *Guidelines for drinking-water quality*. Vol. 1. 2004: World Health Organization.
75. Currie, J. and J.F. Schmieder, *Fetal exposures to toxic releases and infant health*. American Economic Review, 2009. 99(2): p. 177-183.
76. Shin, I.-S., et al., *One-generation reproductive toxicity study of epichlorohydrin in Sprague-Dawley rats*. Drug and chemical toxicology, 2010. 33(3): p. 291-301.
77. Giri, A., *Genetic toxicology of epichlorohydrin: a review*. Mutation Research/Reviews in Mutation Research, 1997. 386(1): p. 25-38.
78. Lei, P., et al., *Improved solid-phase microextraction extraction procedure to detect trace-level epichlorohydrin in municipal water systems by HS-SPME-GC/MS*. Frontiers in Chemistry, 2022. 10: p. 1004269.

79. Waidyanatha, S., et al., *Formation of epichlorohydrin, a known rodent carcinogen, following oral administration of 1, 3-dichloro-2-propanol in rats*. Chemical Research In Toxicology, 2014. 27(10): p. 1787-1795.
80. San Juan, P.M., J.D. Carrillo, and M.T. Tena, *Fibre selection based on an overall analytical feature comparison for the solid-phase microextraction of trihalomethanes from drinking water*. Journal of Chromatography A, 2007. 1139(1): p. 27-35.
81. *ISO 17943:2016 , Water quality — Determination of volatile organic compounds in water — Method using headspace solid-phase micro-extraction (HS-SPME) followed by gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS)*.
82. Fromberg, A., et al., *Analysis of chloro-and nitroanilines and-benzenes in soils by headspace solid-phase microextraction*. Journal of Chromatography A, 1996. 746(1): p. 71-81.
83. Havenga, W.J. and E.R. Rohwer, *Chemical characterization and screening of hydrocarbon pollution in industrial soils by headspace solid-phase microextraction*. Journal of Chromatography A, 1999. 848(1-2): p. 279-295.
84. Arthur, C.L. and J. Pawliszyn, *Solid phase microextraction with thermal desorption using fused silica optical fibers*. Analytical chemistry, 1990. 62(19): p. 2145-2148.
85. Carasek, E., L. Morés, and J. Merib, *Basic principles, recent trends and future directions of microextraction techniques for the analysis of aqueous environmental samples*. Trends in environmental analytical chemistry, 2018. 19: p. e00060.
86. Nolvachai, Y., et al., *Solid phase microextraction for quantitative analysis—Expectations beyond design?* Green Analytical Chemistry, 2023. 4: p. 100048.
87. Martin, A.J. and R.L. Synge, *A new form of chromatogram employing two liquid phases: A theory of chromatography. 2. Application to the micro-determination of the higher monoamino-acids in proteins*. Biochemical Journal, 1941. 35(12): p. 1358.
88. James, A.T. and A.J. Martin, *Gas-liquid partition chromatography: the separation and micro-estimation of volatile fatty acids from formic acid to dodecanoic acid*. Biochemical Journal, 1952. 50(5): p. 679.

89. Zuo, H.-L., et al., *Preparative gas chromatography and its applications*. Journal of chromatographic science, 2013. 51(7): p. 704-715.
90. Santos, F. and M. Galceran, *The application of gas chromatography to environmental analysis*. TrAC Trends in Analytical Chemistry, 2002. 21(9-10): p. 672-685.
91. Awad, H., M.M. Khamis, and A. El-Aneed, *Mass spectrometry, review of the basics: ionization*. Applied Spectroscopy Reviews, 2015. 50(2): p. 158-175.
92. De Hoffmann, E. and V. Stroobant, *Mass spectrometry: principles and applications*. 2007: John Wiley & Sons.
93. Thomson, J.J., *Discovery of the electron*. Philosophical Magazine, 1897. 44: p. 93.
94. Dempster, A., *A new method of positive ray analysis*. Physical Review, 1918. 11(4): p. 316.
95. Bleakney, W., *A new method of positive ray analysis and its application to the measurement of ionization potentials in mercury vapor*. Physical Review, 1929. 34(1): p. 157.
96. Nier, A.O., *A mass spectrometer for isotope and gas analysis*. Review of Scientific Instruments, 1947. 18(6): p. 398-411.
97. Piacentini, L., et al., *Determination of BTEX and volatile organic compounds (VOCs) in drinking water by GC-MS/MS coupled to static headspace and solid-phase microextraction sampling*.
98. Pawliszyn, J., *Theory of solid-phase microextraction*, in *Handbook of solid phase microextraction*. 2012, Elsevier. p. 13-59.
99. Hook, G.L., et al., *Solid-phase microextraction (SPME) for rapid field sampling and analysis by gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS)*. TrAC Trends in Analytical Chemistry, 2002. 21(8): p. 534-543.
100. Barshick, C.M., et al., *Development of a technique for the analysis of inorganic mercury salts in soils by gas chromatography/mass spectrometry*. International journal of mass spectrometry, 1998. 178(1-2): p. 31-41.
101. Boyd-Boland, A.A., S. Magdic, and J.B. Pawliszyn, *Simultaneous determination of 60 pesticides in water using solid-phase microextraction and gas chromatography-mass spectrometry*. Analyst, 1996. 121(7): p. 929-937.

102. Llompart, M., K. Li, and M. Fingas, *Solid-phase microextraction and headspace solid-phase microextraction for the determination of polychlorinated biphenyls in water samples*. Analytical chemistry, 1998. 70(13): p. 2510-2515.
103. Moens, L., et al., *Sensitive, simultaneous determination of organomercury,-lead, and-tin compounds with headspace solid phase microextraction capillary gas chromatography combined with inductively coupled plasma mass spectrometry*. Analytical Chemistry, 1997. 69(8): p. 1604-1611.
104. Ng, W.F., M.J.K. Teo, and H.-Å. Lakso, *Determination of organophosphorus pesticides in soil by headspace solid-phase microextraction*. Fresenius' journal of analytical chemistry, 1999. 363: p. 673-679.
105. Piri-Moghadam, H., F. Ahmadi, and J. Pawliszyn, *A critical review of solid phase microextraction for analysis of water samples*. TrAC Trends in Analytical Chemistry, 2016. 85: p. 133-143.
106. Santos, F. and M. Galceran, *Modern developments in gas chromatography–mass spectrometry-based environmental analysis*. Journal of Chromatography A, 2003. 1000(1-2): p. 125-151.
107. Gan, H.-H., C. Soukoulis, and I. Fisk, *Atmospheric pressure chemical ionisation mass spectrometry analysis linked with chemometrics for food classification—A case study: Geographical provenance and cultivar classification of monovarietal clarified apple juices*. Food chemistry, 2014. 146: p. 149-156.
108. Hopfgartner, G., D. Tonoli, and E. Varesio, *High-resolution mass spectrometry for integrated qualitative and quantitative analysis of pharmaceuticals in biological matrices*. Analytical and bioanalytical chemistry, 2012. 402: p. 2587-2596.
109. Ojanperä, I., M. Kolmonen, and A. Pelander, *Current use of high-resolution mass spectrometry in drug screening relevant to clinical and forensic toxicology and doping control*. Analytical and bioanalytical chemistry, 2012. 403: p. 1203-1220.
110. Persike, M. and M. Karas, *Rapid simultaneous quantitative determination of different small pharmaceutical drugs using a conventional matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry system*. Rapid Communications in Mass Spectrometry: An International Journal Devoted to the Rapid Dissemination of Up-to-the-Minute Research in Mass Spectrometry, 2009. 23(22): p. 3555-3562.

111. Wood, M., et al., *Recent applications of liquid chromatography–mass spectrometry in forensic science*. Journal of Chromatography A, 2006. 1130(1): p. 3-15.
112. O'Reilly, J., et al., *Automation of solid-phase microextraction*. Journal of separation science, 2005. 28(15): p. 2010-2022.
113. Mustapha, S., et al., *A critical review on geosmin and 2-methylisoborneol in water: sources, effects, detection, and removal techniques*. Environmental Monitoring and Assessment, 2021. 193: p. 1-34.
114. Michel, F., Y. Chen, and R. Shirey, *Improved Determination of Volatile Organic Compounds in Water by SPME and GC/MS: ISO Standard 17943*. 2022.
115. Harris, D.C., *Quantitative chemical analysis*. 2010: Macmillan.
116. Koehler, W. and H. Geppert, *inventors; Varian Associates, Inc., assignee, Solid phase microextraction with vibration*. 1997, WO/1997/011763.
117. Faidi, F., H. Abderrazek, and C. Radhouane, *Glycol Ethers: méthodes d'analyse et applications*. 2018: Éditions universitaires européennes.
118. Schmidt, K. and I. Podmore, *Solid phase microextraction (SPME) method development in analysis of volatile organic compounds (VOCS) as potential biomarkers of cancer*. Journal of Molecular Biomarker & Diagnosis, 2015. 6(6).
119. Murphy, B.L. and R.D. Morrison, *Introduction to environmental forensics*. 2014.
120. Peng, J. and A. Wan, *Effect of ionic strength on Henry's constants of volatile organic compound*. Chemosphere, 1998. 36(13): p. 2731-2740.
121. Bruno, T.J., *A review of capillary and packed column gas chromatographs*. Separation and Purification Methods, 2000. 29(1): p. 27-61.
122. Hussain, S.Z. and K.M. Khushnuma Maqbool, *GC-MS: principle, technique and its application in food science*. 2014.
123. Bhardwaj, C. and L. Hanley, *Ion sources for mass spectrometric identification and imaging of molecular species*. Natural product reports, 2014. 31(6): p. 756-767.
124. Munson, M.S. and F.-H. Field, *Chemical ionization mass spectrometry. I. General introduction*. Journal of the American Chemical society, 1966. 88(12): p. 2621-2630.

125. Donato, P., et al., *Lipidomics*, in *Comprehensive analytical chemistry*. 2015, Elsevier. p. 395-439.
126. Paul, W. and H. Steinwedel, *A new mass spectrometer without a magnetic field*. Zeitschrift fuer Naturforschung (West Germany) Divided into Z. Naturforsch., A, and Z. Naturforsch., B: Anorg. Chem., Org. Chem., Biochem., Biophys., 1953. 8.
127. Gershman, D., et al., *Enabling the next generation of spaceborne quadrupole mass spectrometers*, in *Earth and Space 2012: Engineering, Science, Construction, and Operations in Challenging Environments*. 2012. p. 393-402.
128. Hermann, G., et al., *Analysis of (poly-) phenols in commercially available red wines by means of LC-MS*. 2012.
129. Sparkman, O.D., Z. Penton, and F.G. Kitson, *Gas chromatography and mass spectrometry: a practical guide*. 2011: Academic press.
130. *NIST 23 Mass Spectral Library, NIST 2023/2020/2017 Database, agilent Format available. (n.d.).* <https://www.sisweb.com/software/ms/nist.htm>.
131. McLafferty, F.W. and F. Turecek, *Interpretation of mass spectra*. 1993: University science books.
132. *National Center for Biotechnology Information (2024). PubChem Compound Summary for CID 280, Carbon Dioxide. disponível em* <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Carbon-Dioxide>. (Acedido a 10 de setembro de 2024).
133. *National Center for Biotechnology Information (2024). PubChem Compound Summary for CID 947, Nitrogen. disponível em* <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Nitrogen>. (Acedido a 10 de setembro de 2024).
134. *National Center for Biotechnology Information (2024). PubChem Compound Summary for CID 887, Methanol. disponível em* <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Methanol>. (Acedido a 10 de setembro de 2024).
135. Garcia-Esteban, M., et al., *Study of the effect of different fiber coatings and extraction conditions on dry cured ham volatile compounds extracted by solid-phase microextraction (SPME)*. Talanta, 2004. 64(2): p. 458-466.

136. Pinheiro, G.P., et al., *Comparison of four different solid-phase microextraction fibers for analysis of Plectranthus amboinicus (Lour.) Spreng. leaf volatiles*. Adv. Med. Plant. Res, 2019. 7: p. 38-43.
137. Kenessov, B., et al., *Modeling solid-phase microextraction of volatile organic compounds by porous coatings using finite element analysis*. Analytica Chimica Acta, 2019. 1076: p. 73-81.
138. *ISO/TS 13530:2009 - Water quality - Guidance on analytical quality control for chemical and physicochemical water analysis*.
139. Griesse, M.H., et al., *Using reducing agents to eliminate chlorine dioxide and chlorite ion residuals in drinking water*. Journal-American Water Works Association, 1991. 83(5): p. 56-61.
140. *ISO/IEC 17043:2023 - Conformity assessment — General requirements for the competence of proficiency testing providers*.
141. Thermo Fisher Scientific, *Thermo Xcalibur TRACE 1300 1310 Gas Chromatograph Setup User Guide*. Rev. D, Thermo Fisher Scientific, 2014. p. 81-82.

ANEXOS

ANEXO I

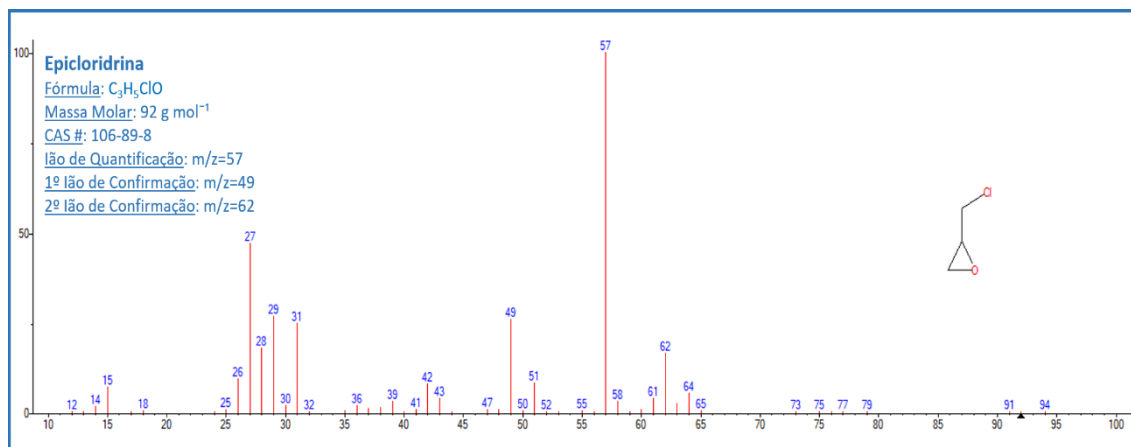


Figura AI.1: Espectro de massa da epícloridrina

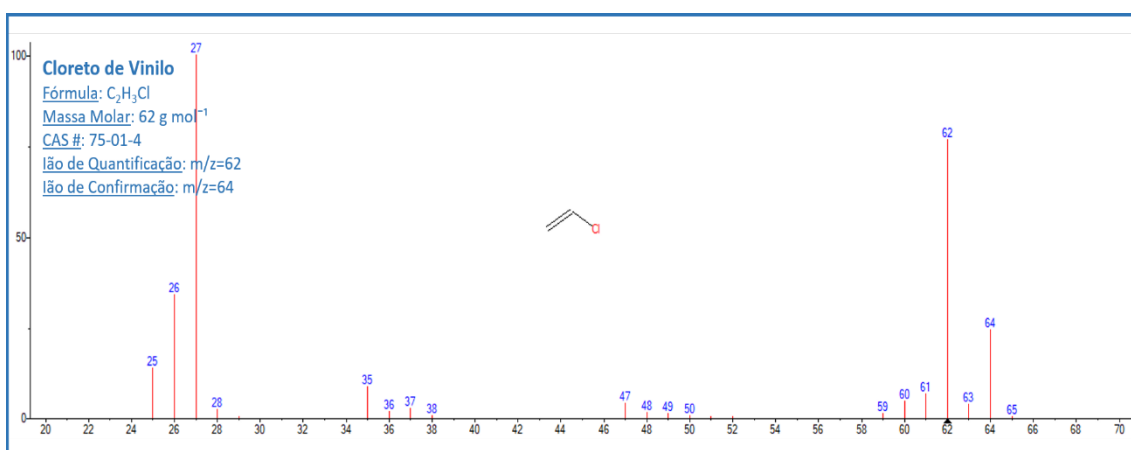


Figura AI.2: Espectro de massa do cloreto de vinilo

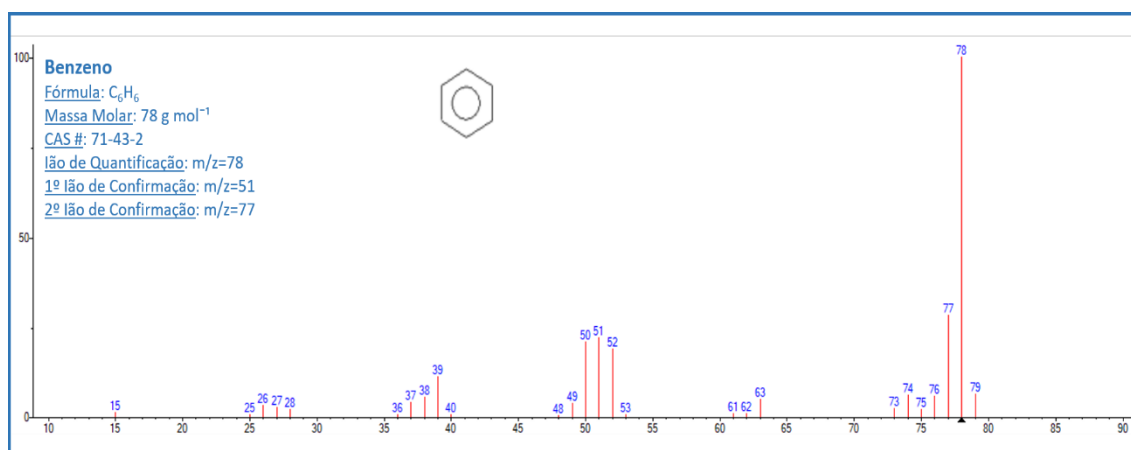


Figura AI.3: Espectro de massa do benzeno

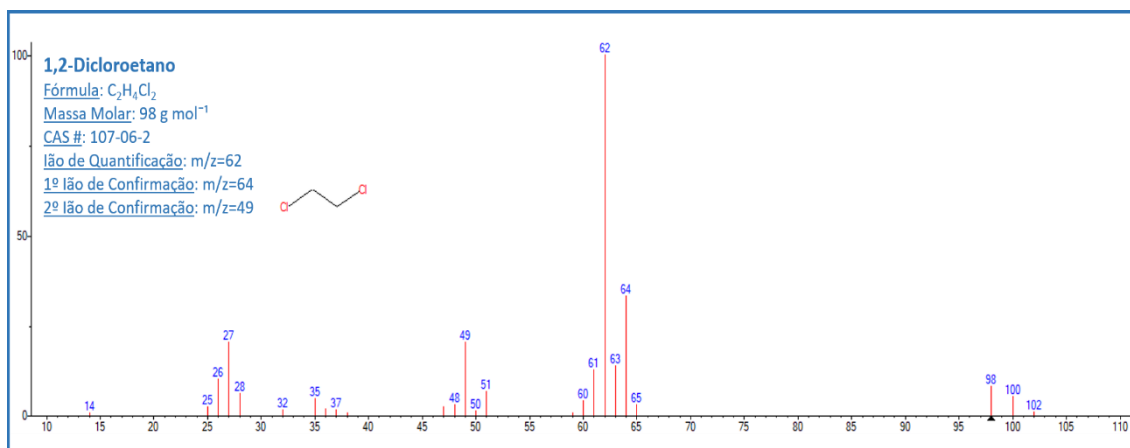


Figura Al.4: Espectro de massa do 1,2-dicloroetano

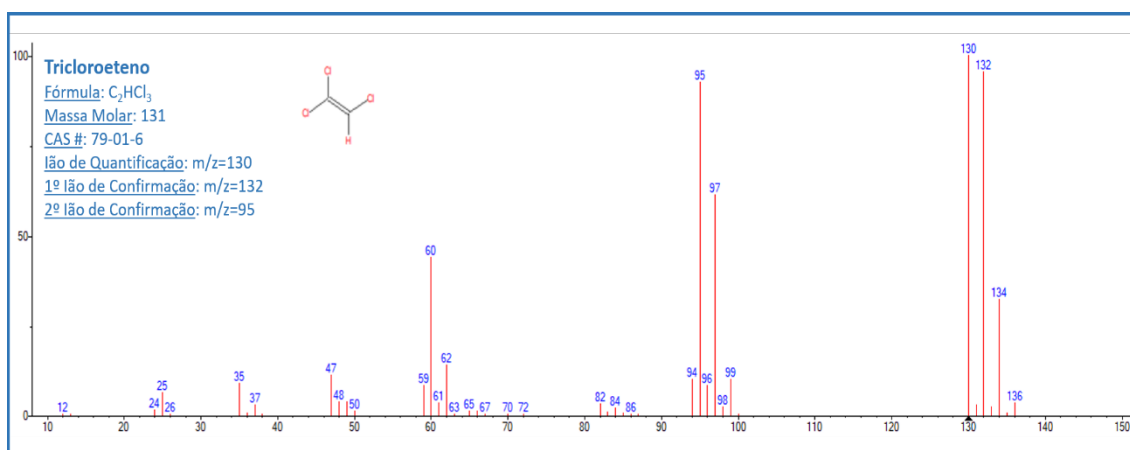


Figura Al.5: Espectro de massa do tricloroeteno

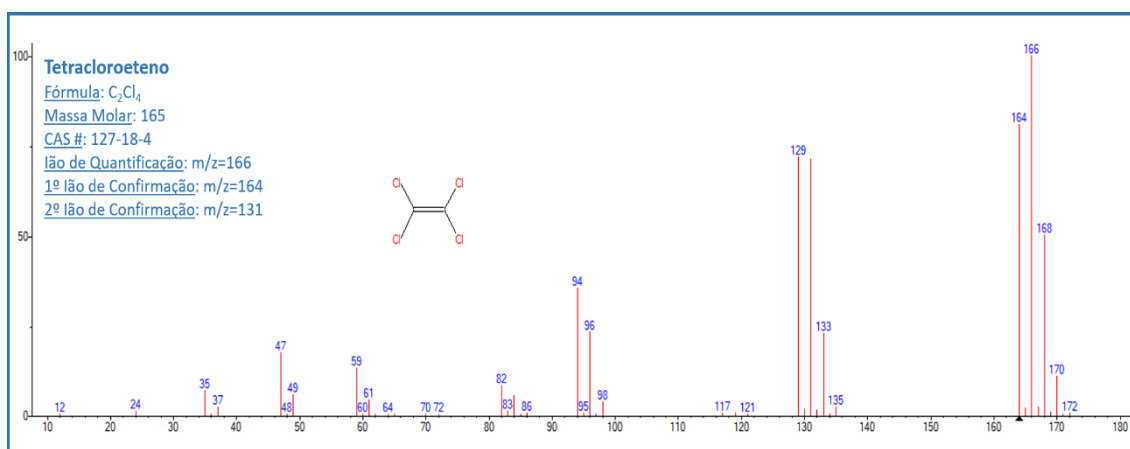


Figura Al.6: Espectro de massa do tetracloroeteno

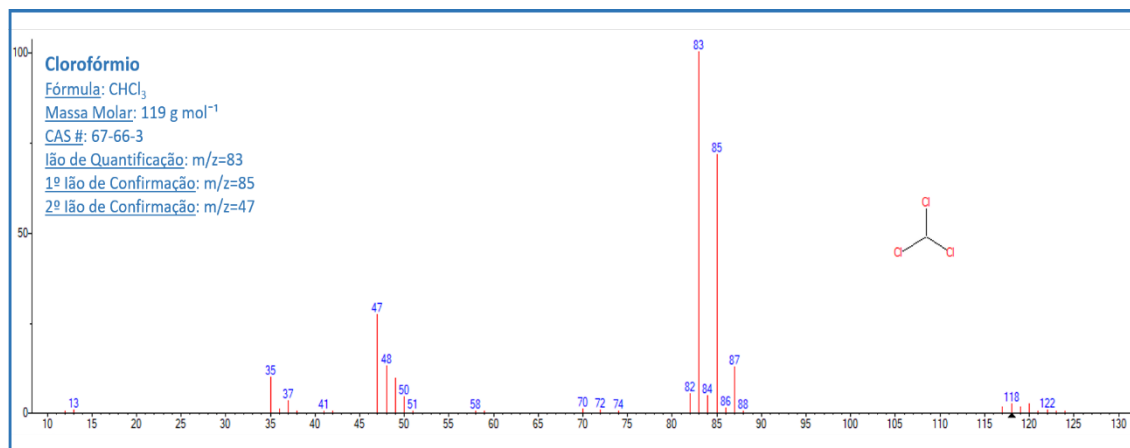


Figura A1.7: Espectro de massa do clorofórmio

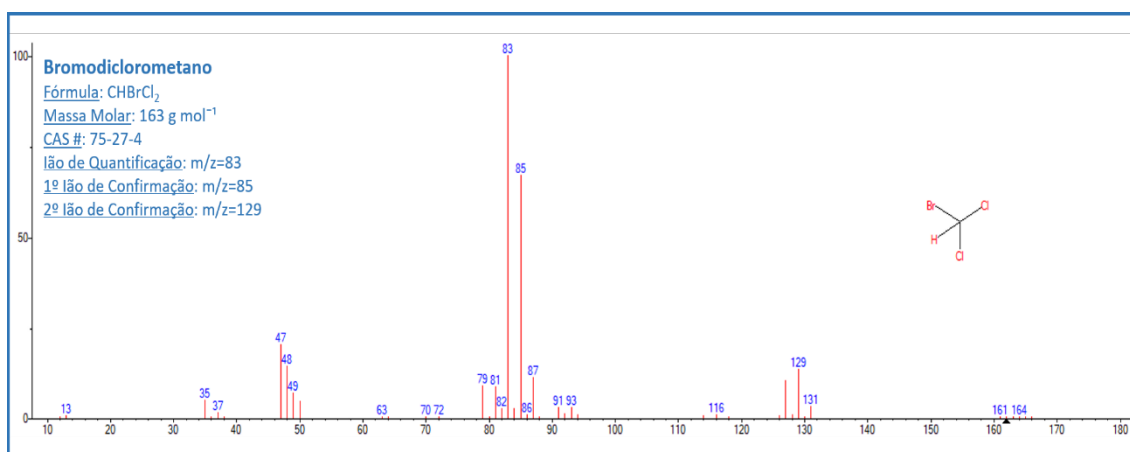


Figura A1.8: Espectro de massa do bromodichlorometano

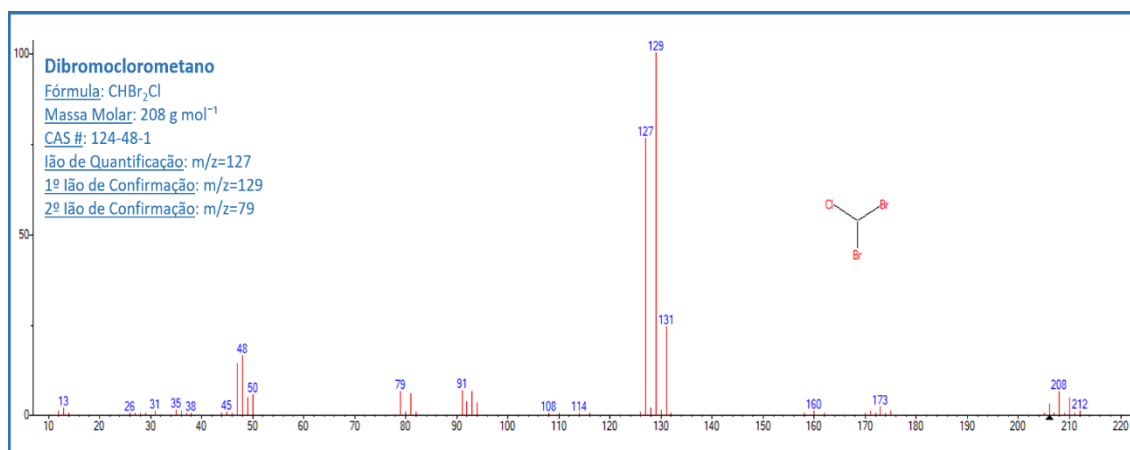


Figura A1.9: Espectro de massa do dibromochlorometano

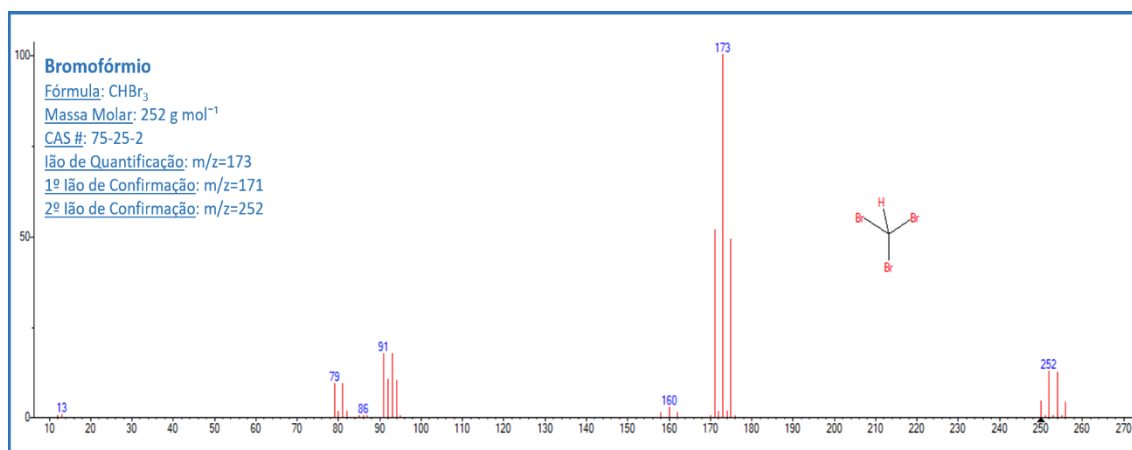
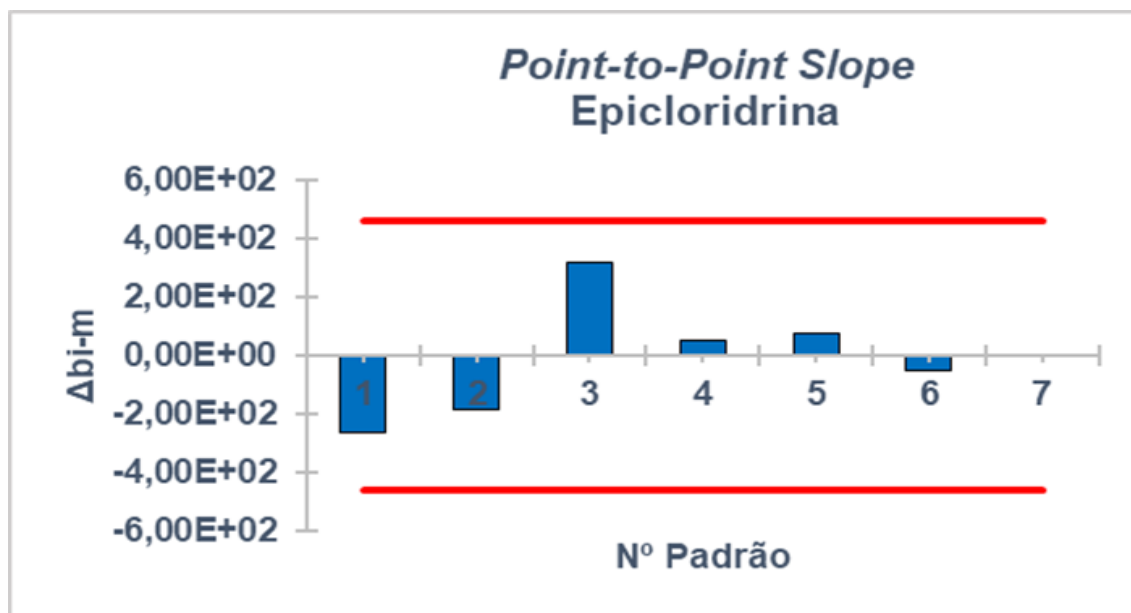
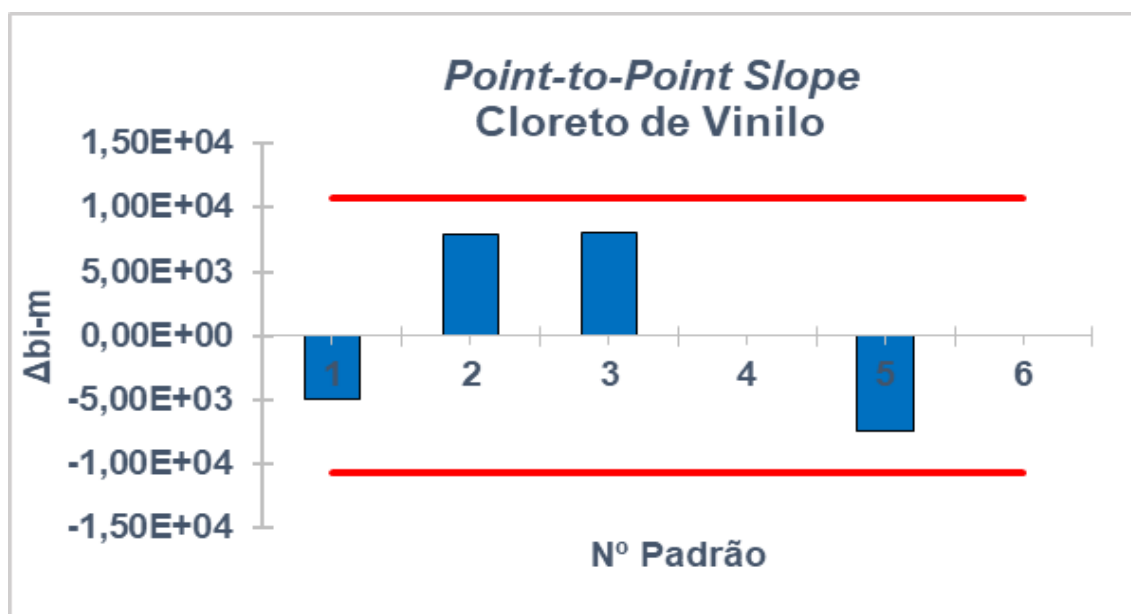
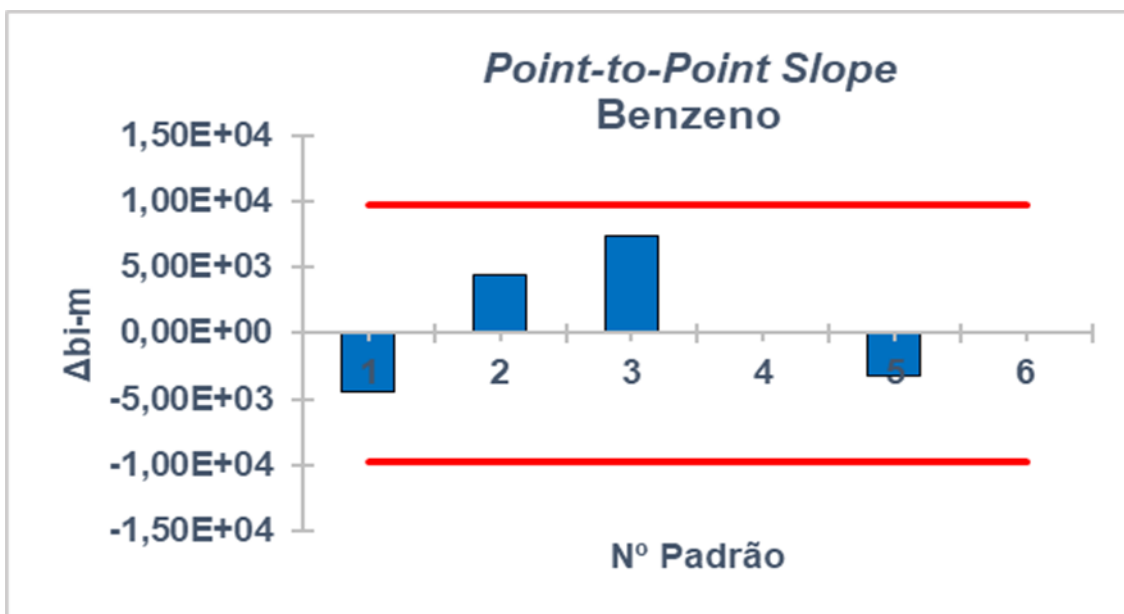
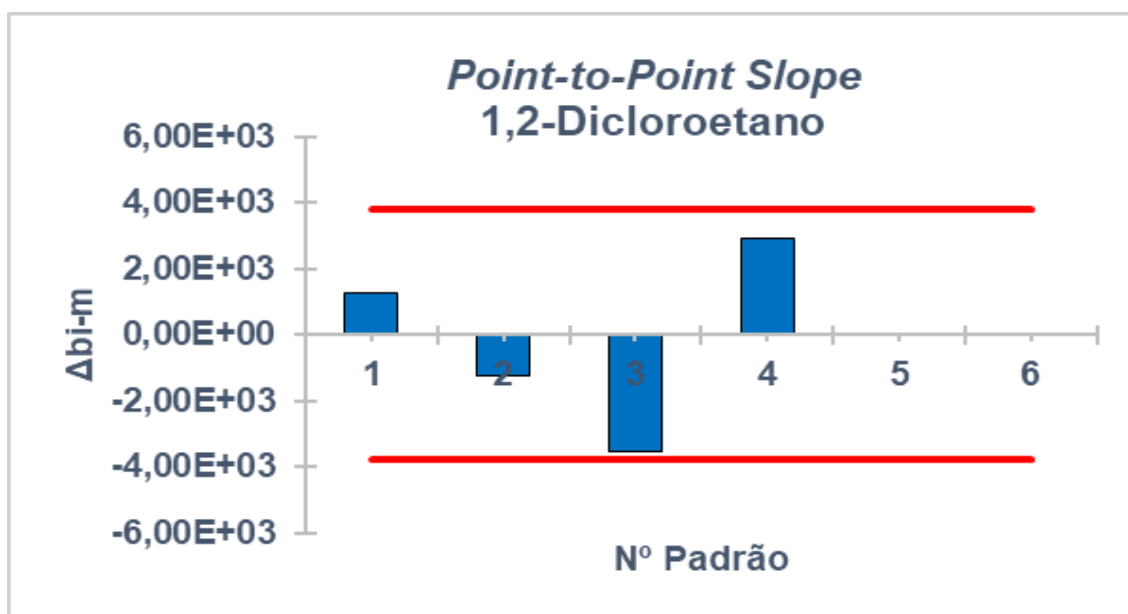
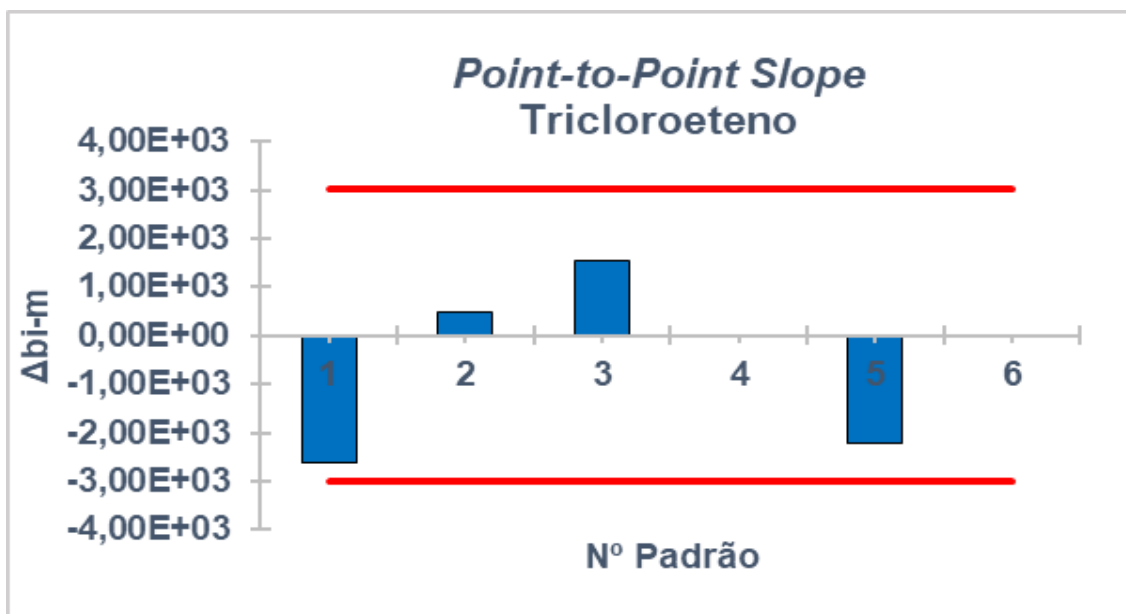
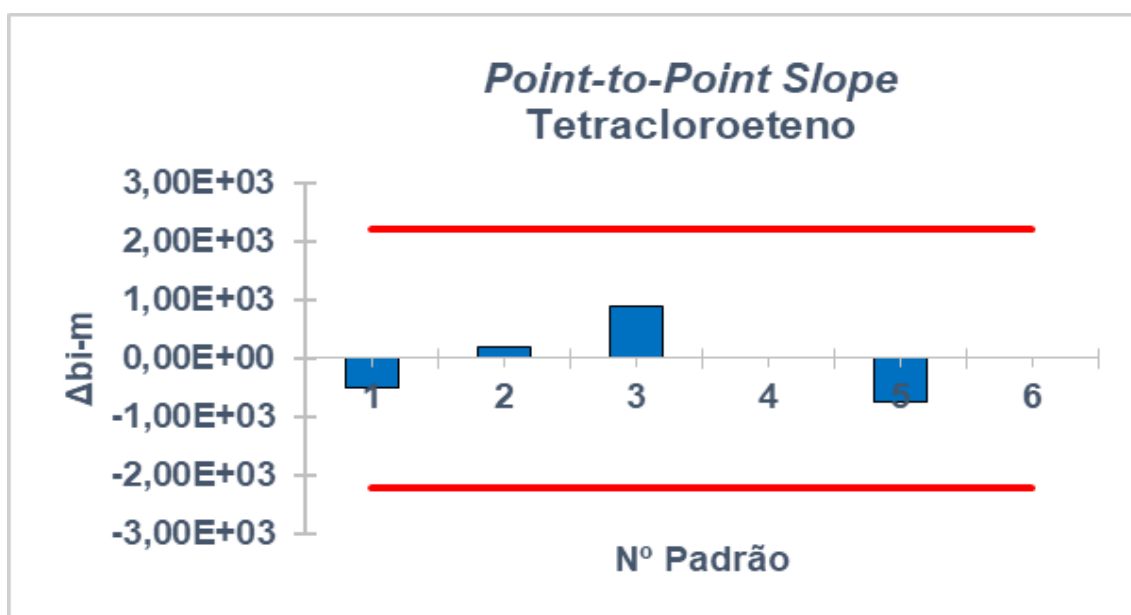


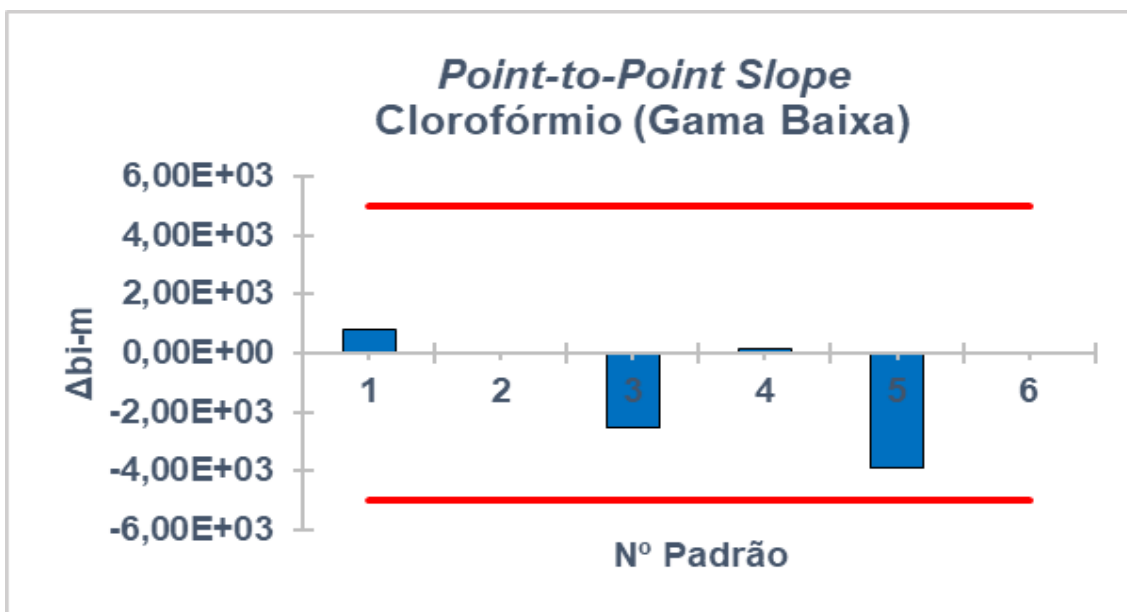
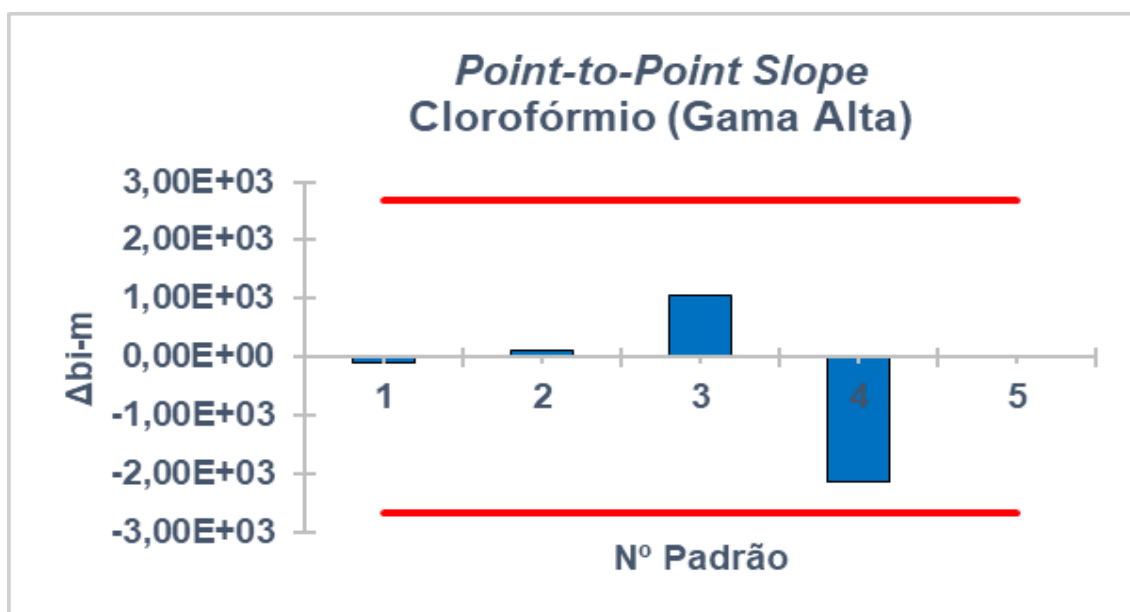
Figura A1.10: Espectro de massa do bromofórmio

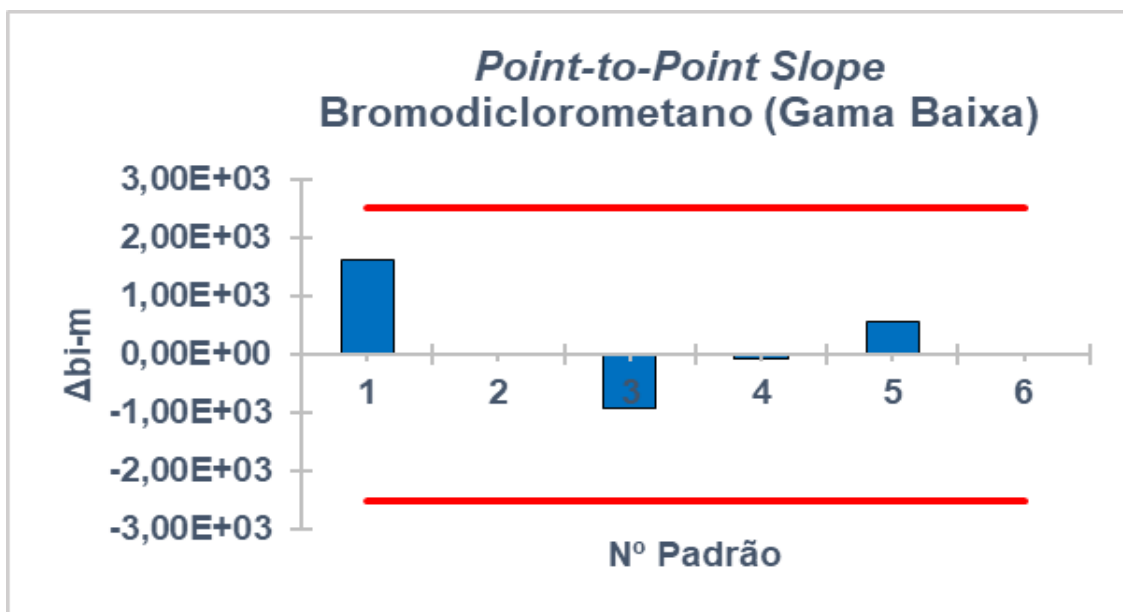
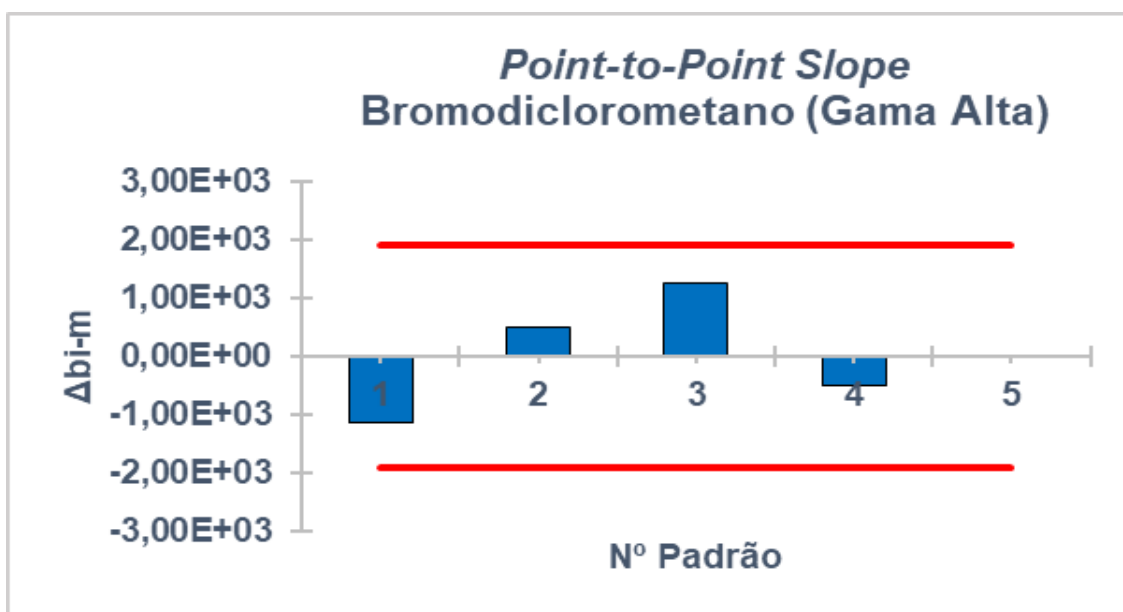
ANEXO II

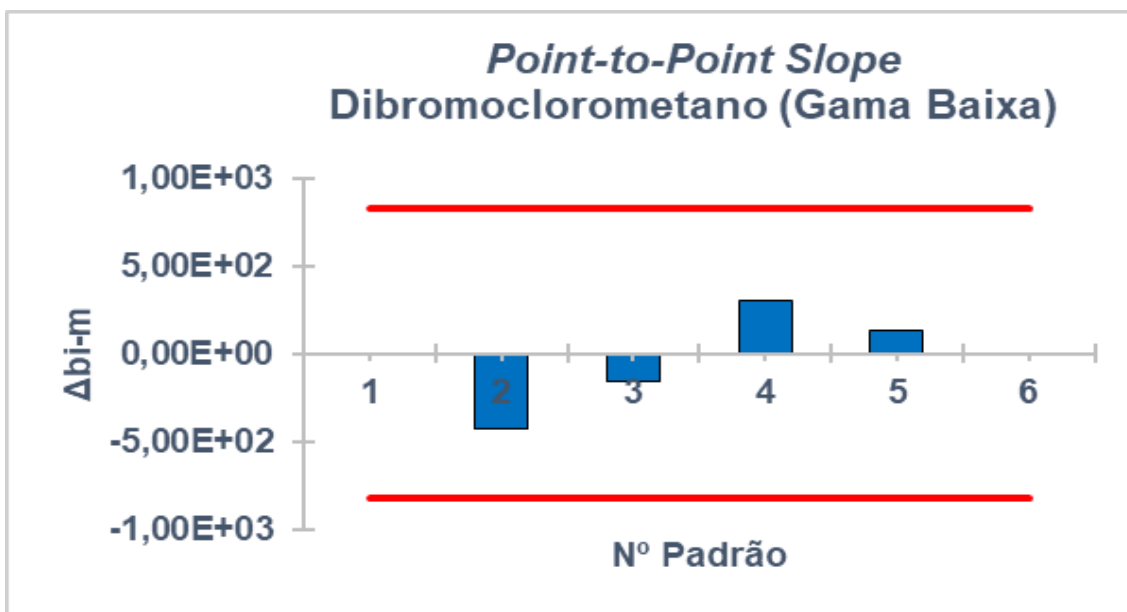
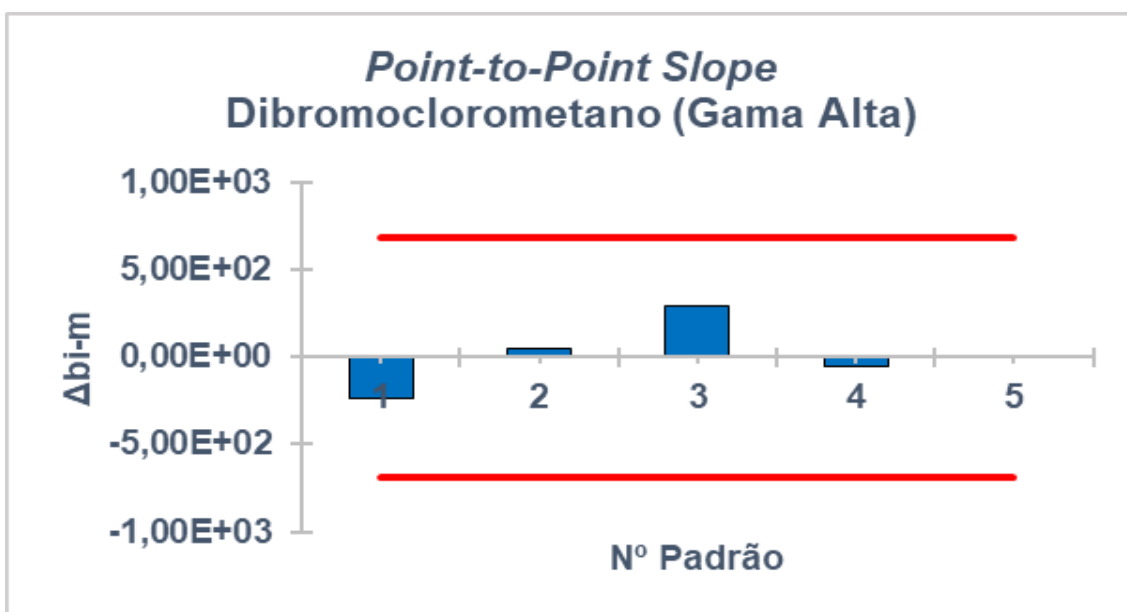
Figura AII.1: Gráfico *Point-to-Point Slope* da epicloridrinaFigura AII.2: Gráfico *Point-to-Point Slope* do cloreto de vinilo

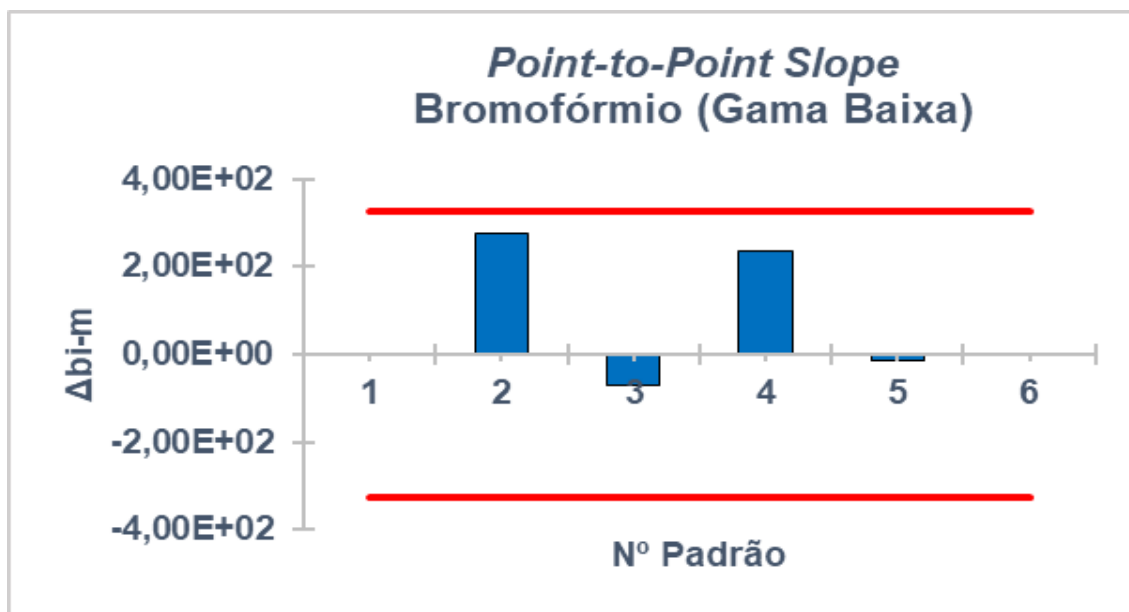
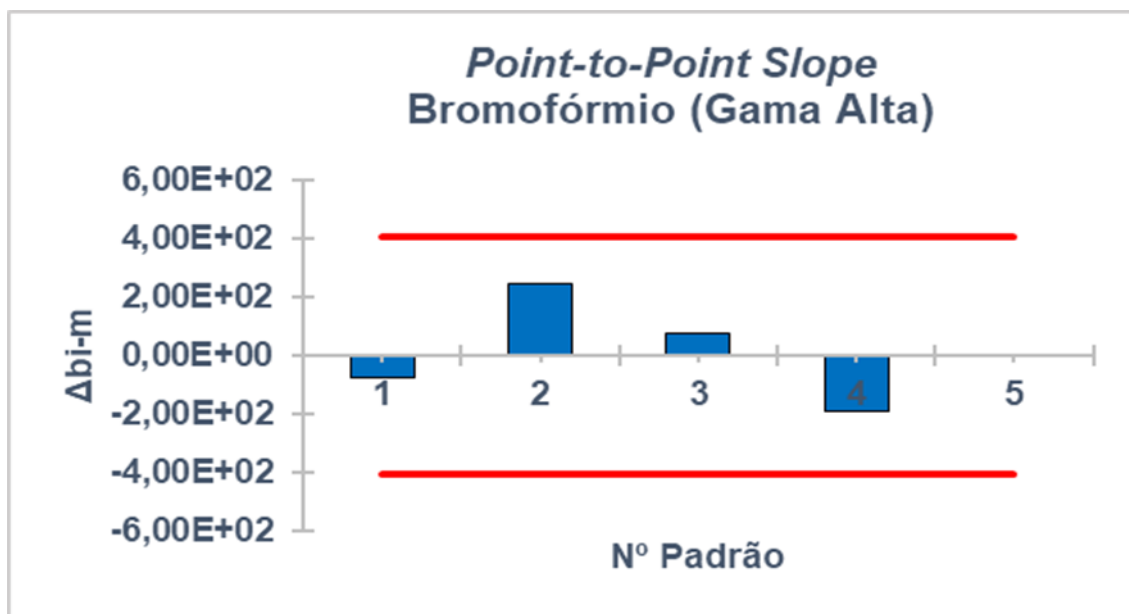
Figura All.3: Gráfico *Point-to-Point Slope* do benzenoFigura All.4: Gráfico *Point-to-Point Slope* do 1,2-dicloroetano

Figura AII.5: Gráfico *Point-to-Point Slope* do tricloroetenoFigura AII.6: Gráfico *Point-to-Point Slope* do tetracloroeteno

Figura AII.7: Gráfico *Point-to-Point Slope* do clorofórmio (Gama Baixa)Figura AII.8: Gráfico *Point-to-Point Slope* do clorofórmio (Gama Alta)

Figura AII.9: Gráfico *Point-to-Point Slope* do bromodiclorometano (Gama Baixa)Figura AII.10: Gráfico *Point-to-Point Slope* do bromodiclorometano (Gama Alta)

Figura AII.11: Gráfico *Point-to-Point Slope* do dibromoclorometano (Gama Baixa)Figura AII.12: Gráfico *Point-to-Point Slope* do dibromoclorometano (Gama Alta)

Figura AII.13: Gráfico *Point-to-Point Slope* do bromofórmio (Gama Baixa)Figura AII.14: Gráfico *Point-to-Point Slope* do bromofórmio (Gama Alta)

ANEXO III

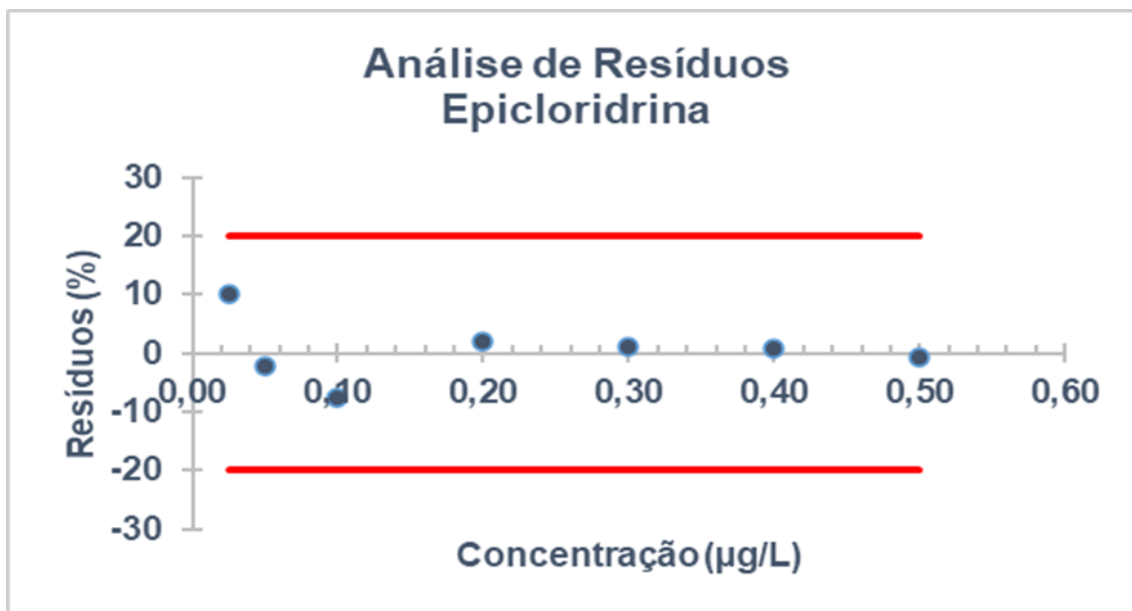


Figura AIII.1: Gráfico da Análise de Resíduos da epícloridrina

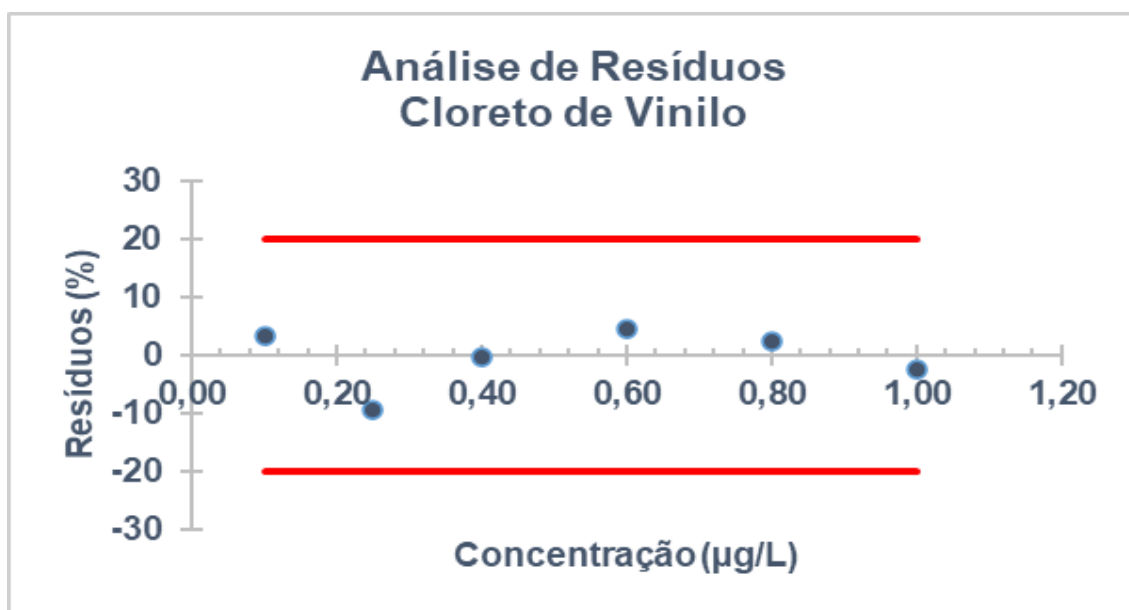


Figura AIII.2: Gráfico da Análise de Resíduos do cloreto de vinilo

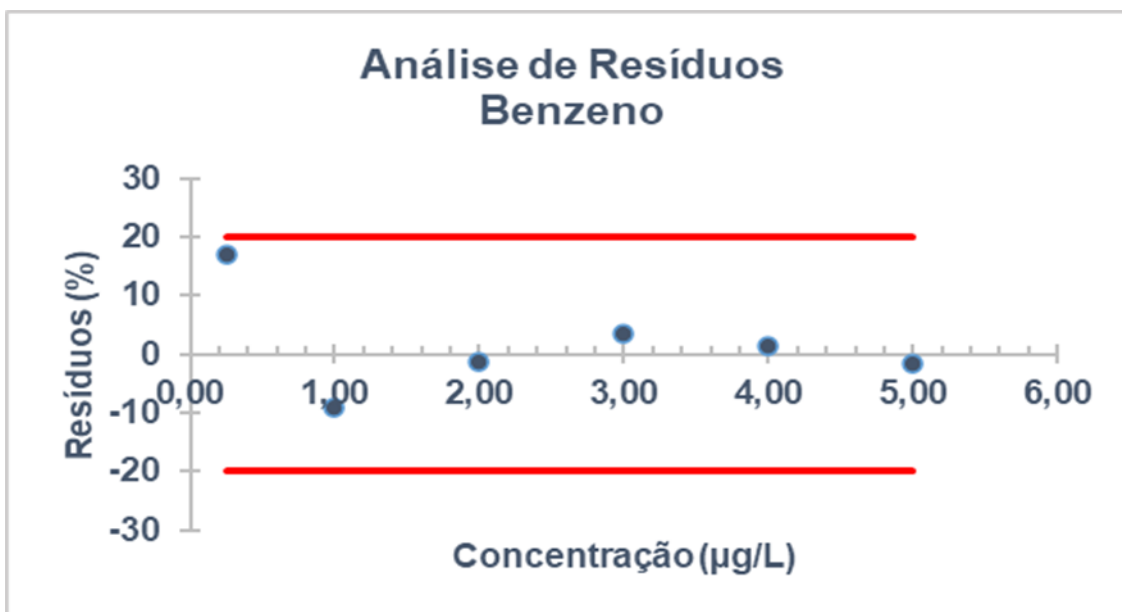


Figura AIII.3: Gráfico da Análise de Resíduos do benzeno

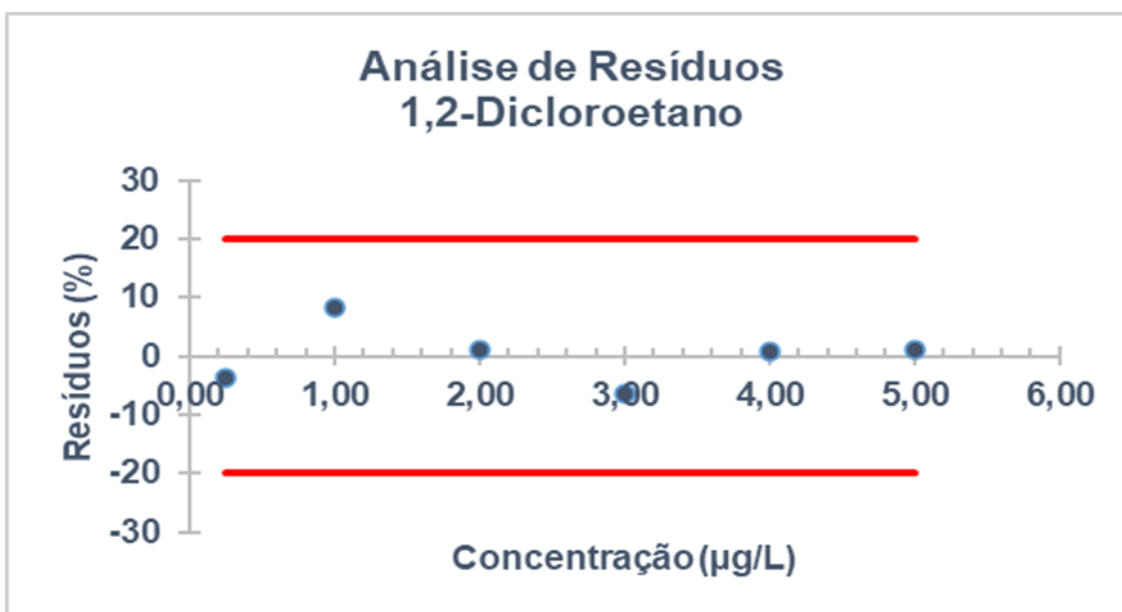


Figura AIII.4: Gráfico da Análise de Resíduos do 1,2-dicloroetano

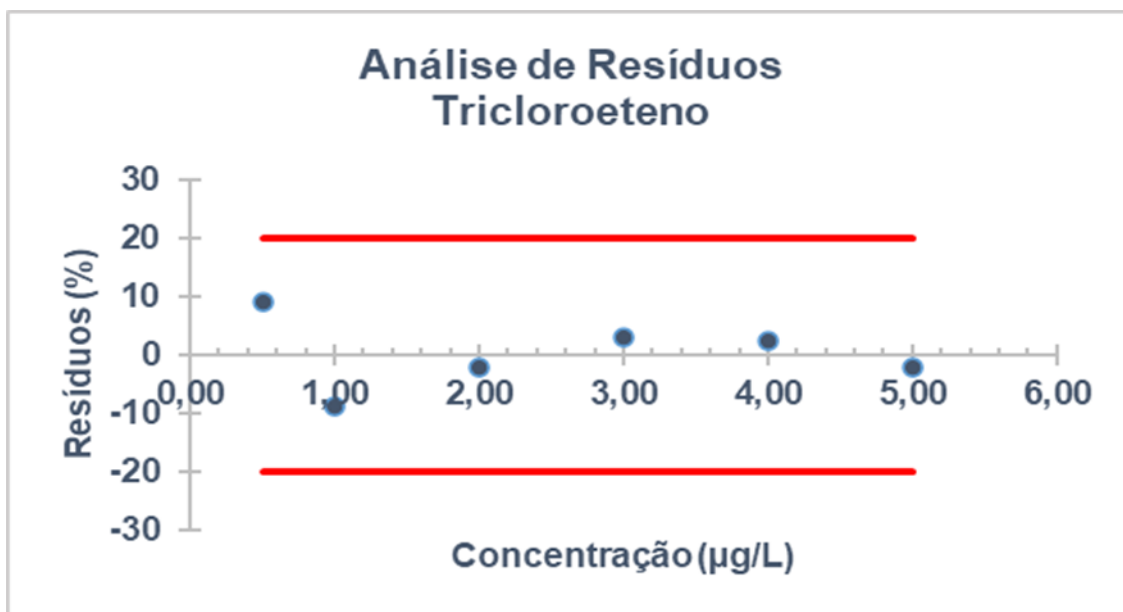


Figura AIII.5: Gráfico da Análise de Resíduos do tricloroeteno

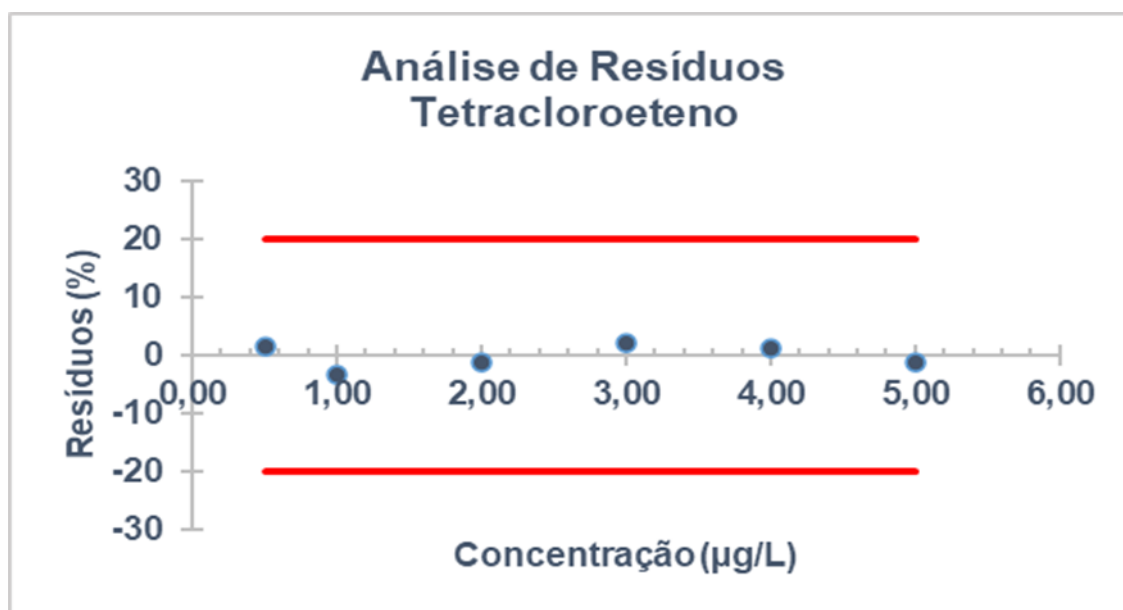


Figura AIII.6: Gráfico da Análise de Resíduos do tetracloroeteno

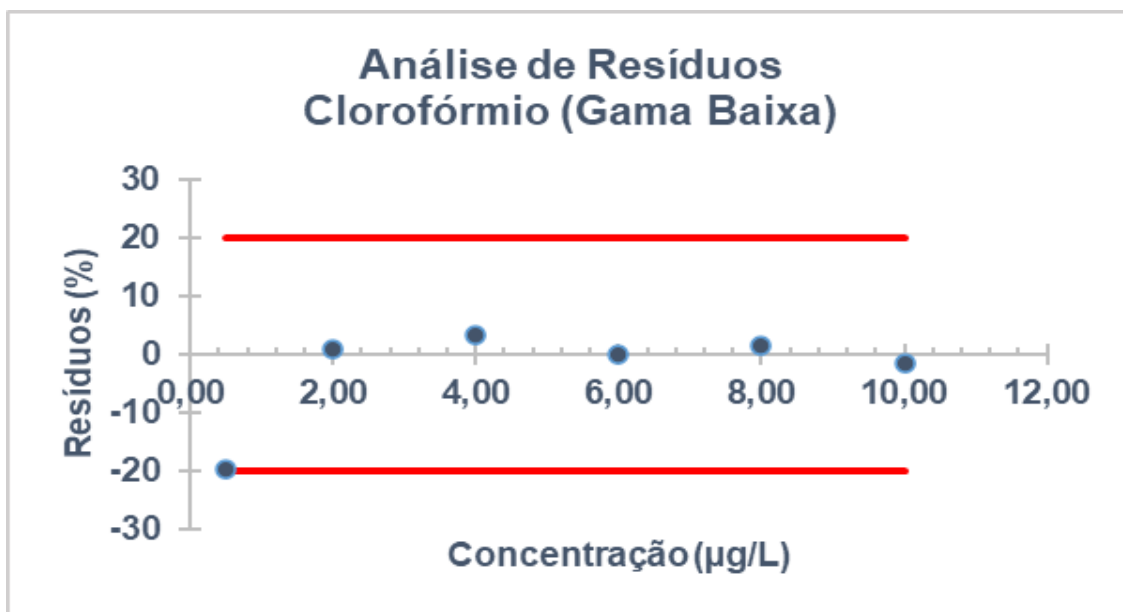


Figura AIII.7: Gráfico da Análise de Resíduos do clorofórmio (Gama Baixa)

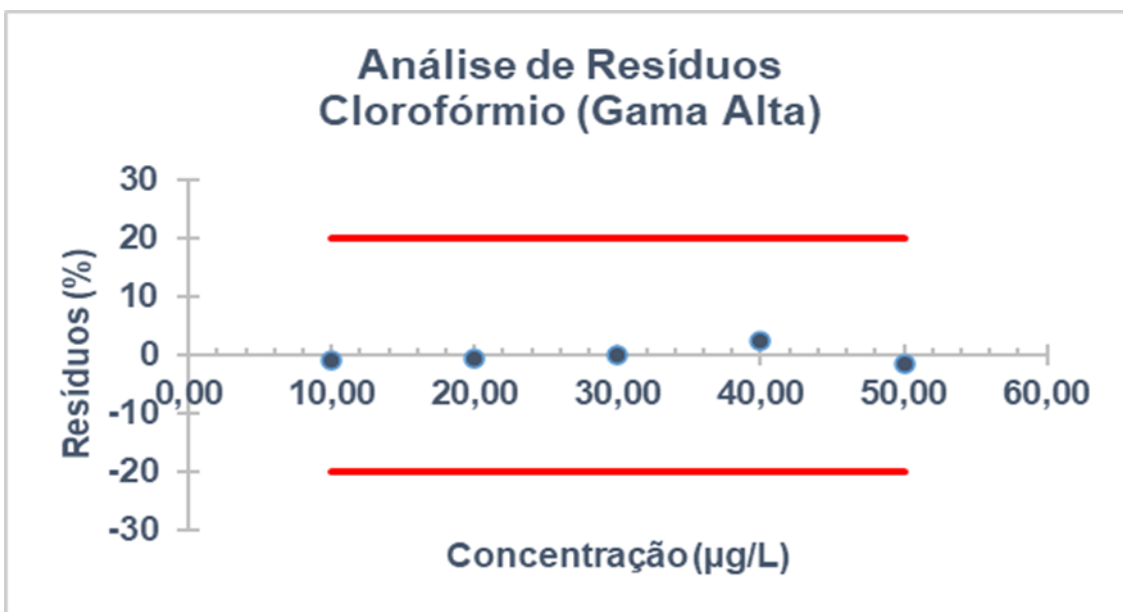


Figura AIII.8: Gráfico da Análise de Resíduos do clorofórmio (Gama Alta)

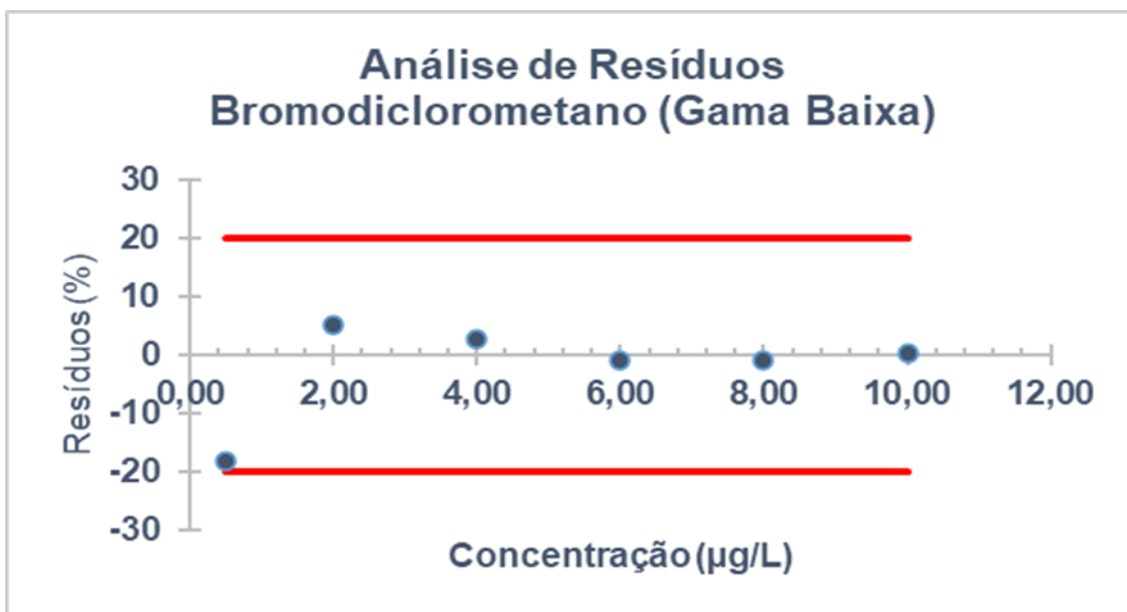


Figura AIII.9: Gráfico da Análise de Resíduos do bromodiclorometano (Gama Baixa)

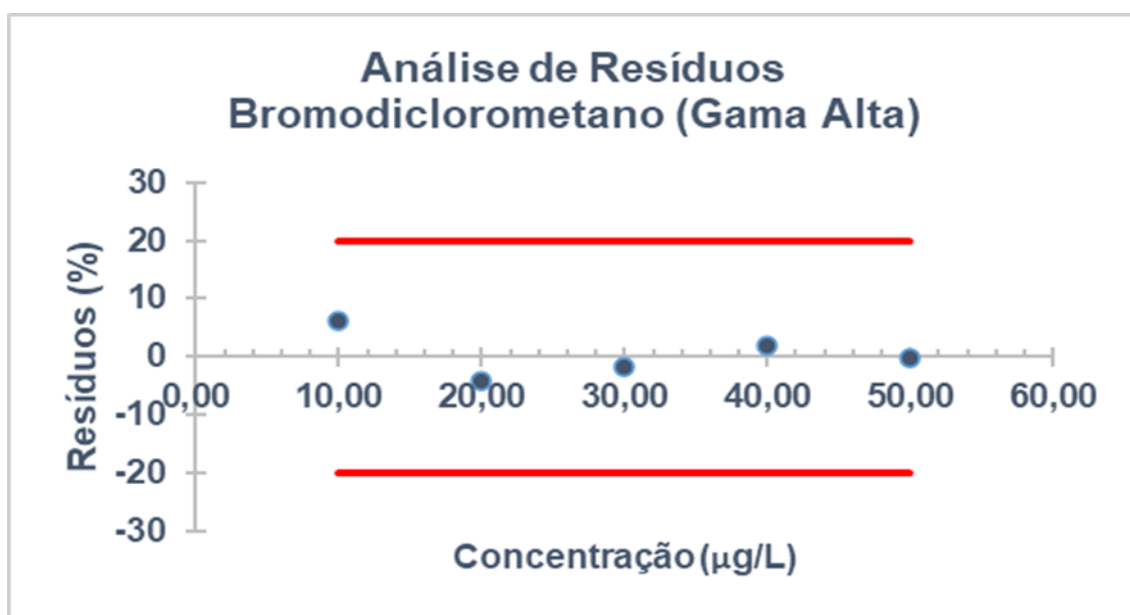


Figura AIII.10: Gráfico da Análise de Resíduos do bromodiclorometano (Gama Alta)

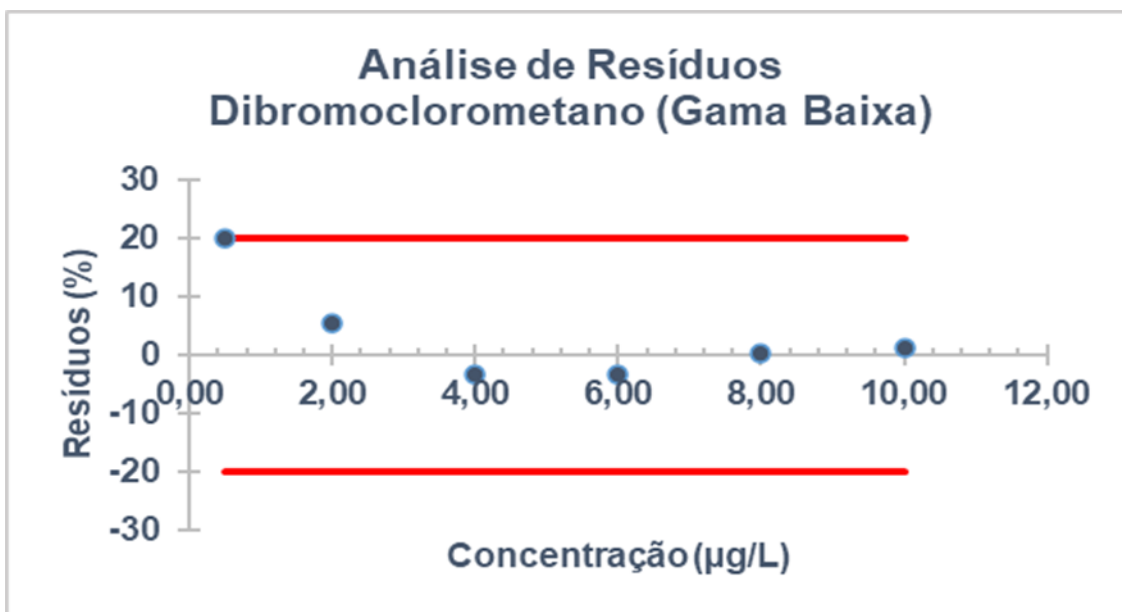


Figura AIII.11: Gráfico da Análise de Resíduos do dibromoclorometano (Gama Baixa)

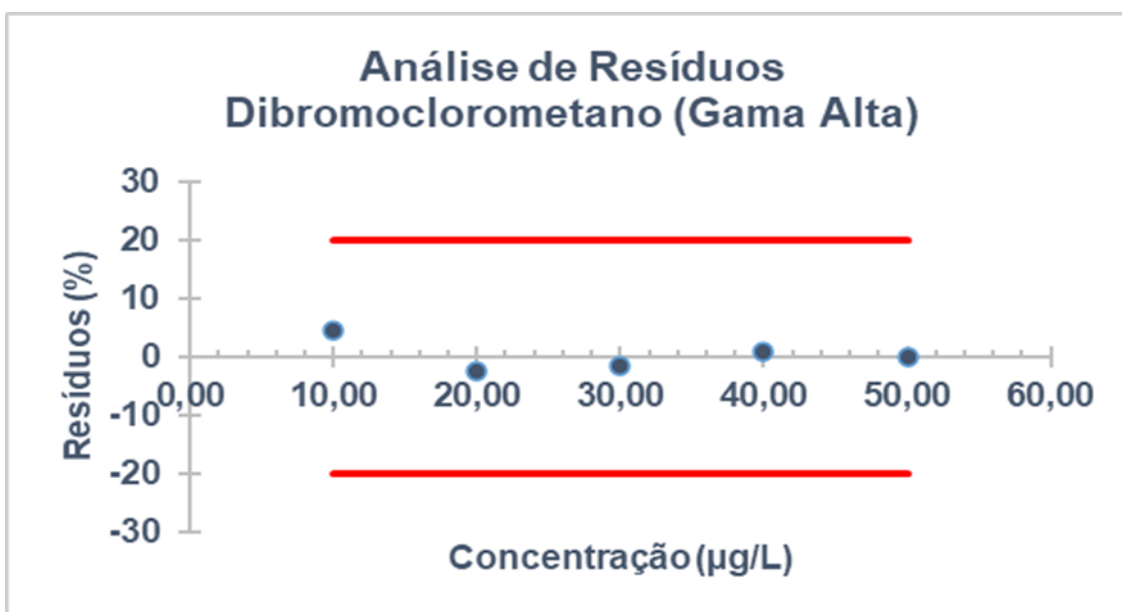


Figura AIII.12: Gráfico da Análise de Resíduos do dibromoclorometano (Gama Alta)

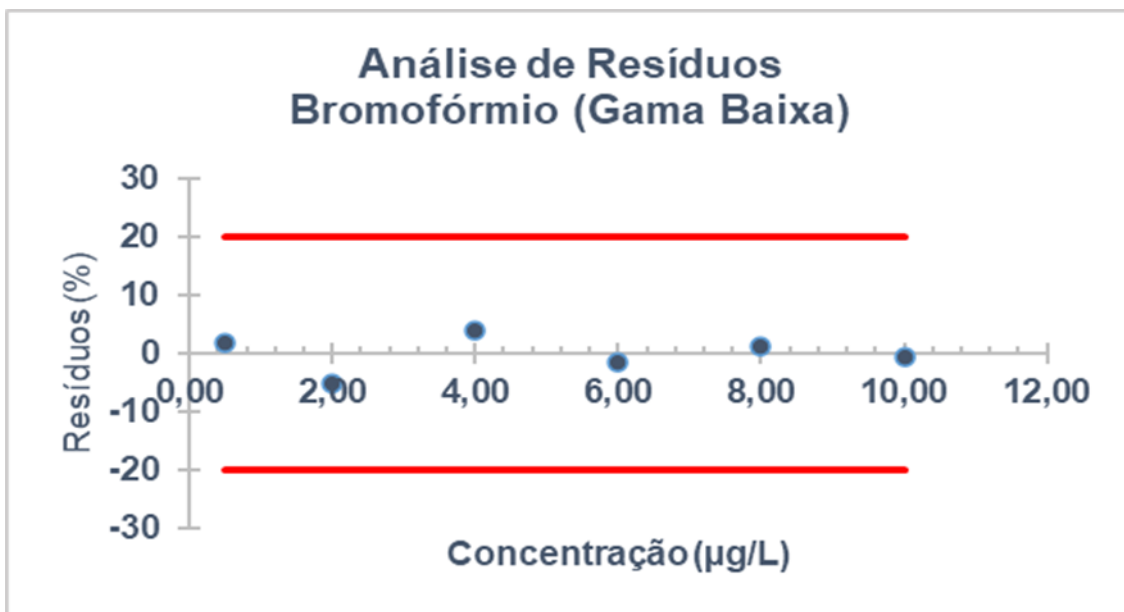


Figura AIII.13: Gráfico da Análise de Resíduos do bromofórmio (Gama Baixa)

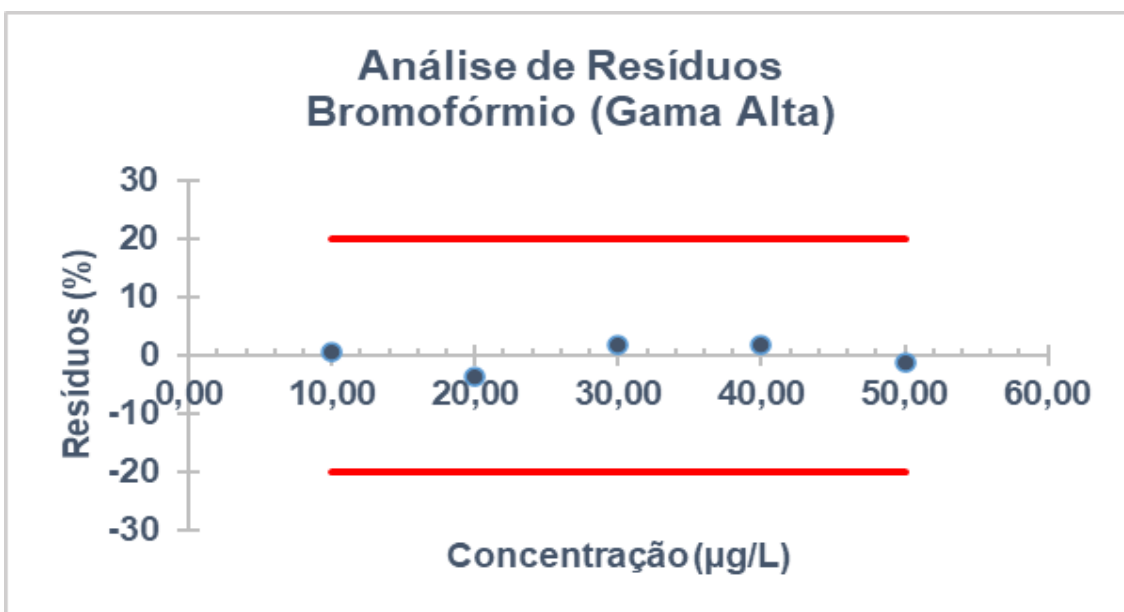


Figura AIII.14: Gráfico da Análise de Resíduos do bromofórmio (Gama Alta)

ANEXO IV

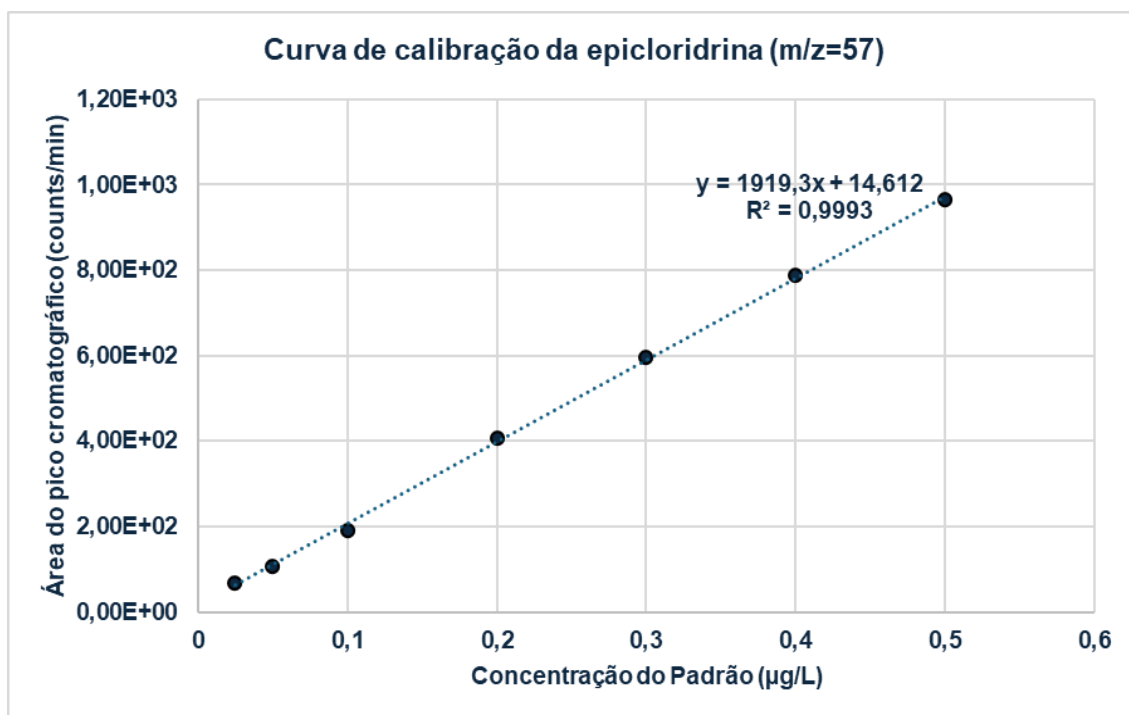


Figura AIV.1: Gráfico da curva de calibração da epicloridrina

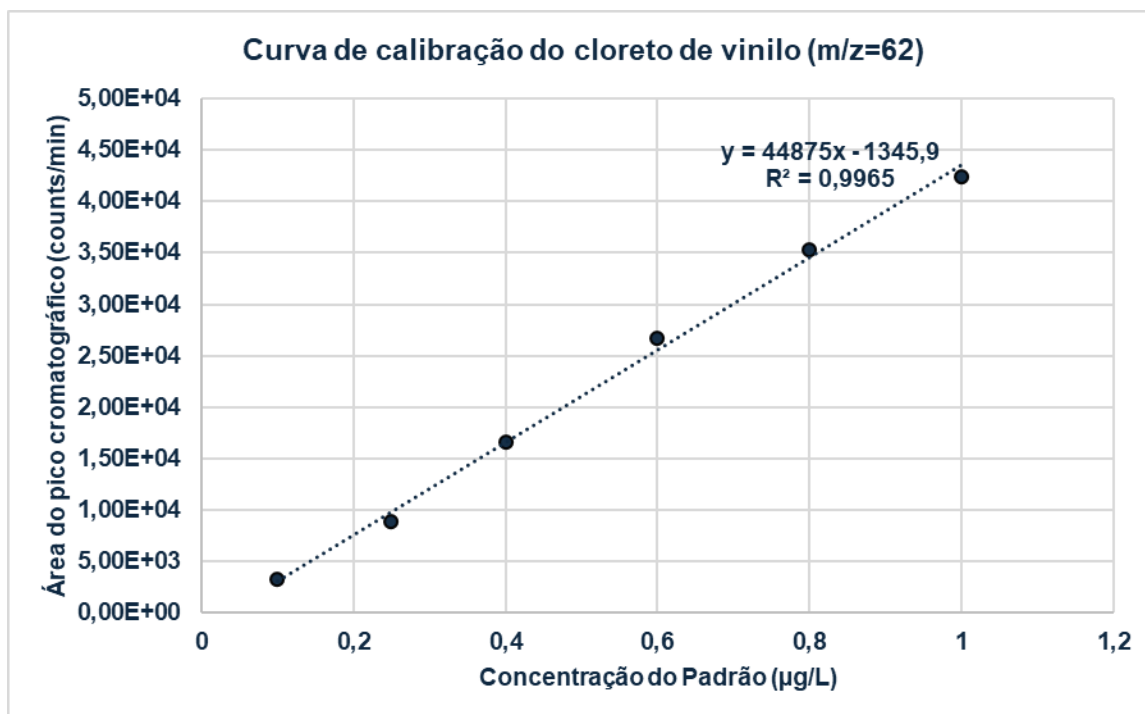


Figura AIV.2: Gráfico da curva de calibração do cloreto de vinilo

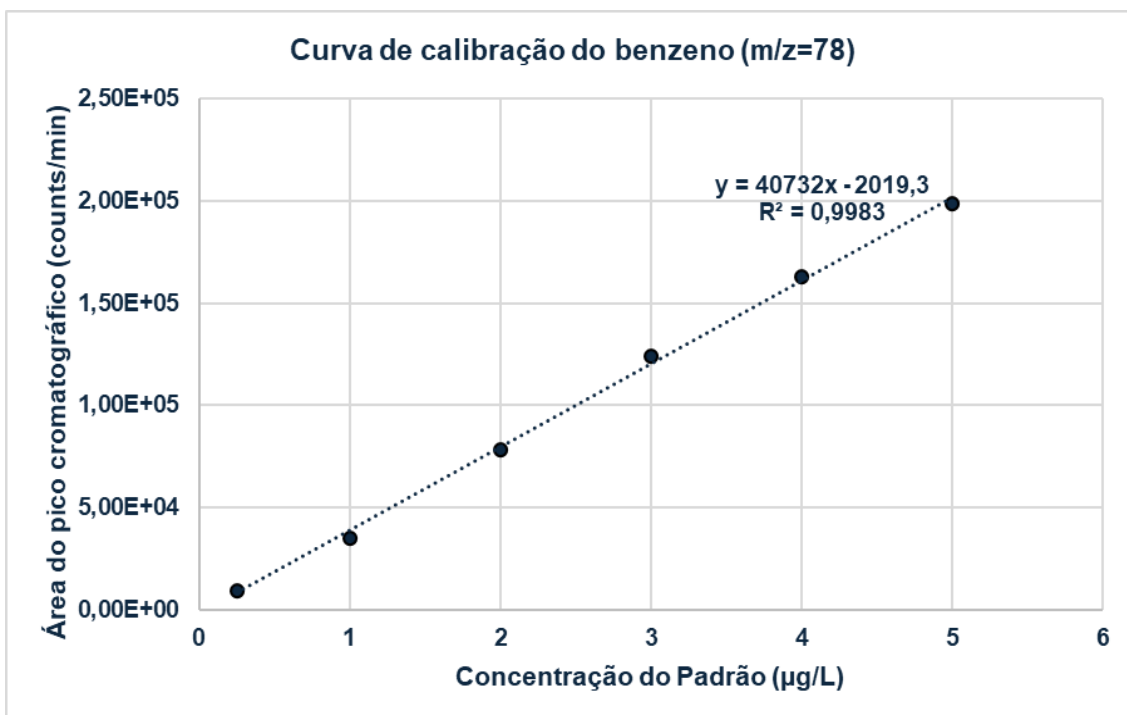


Figura AIV.3: Gráfico da curva de calibração do benzeno

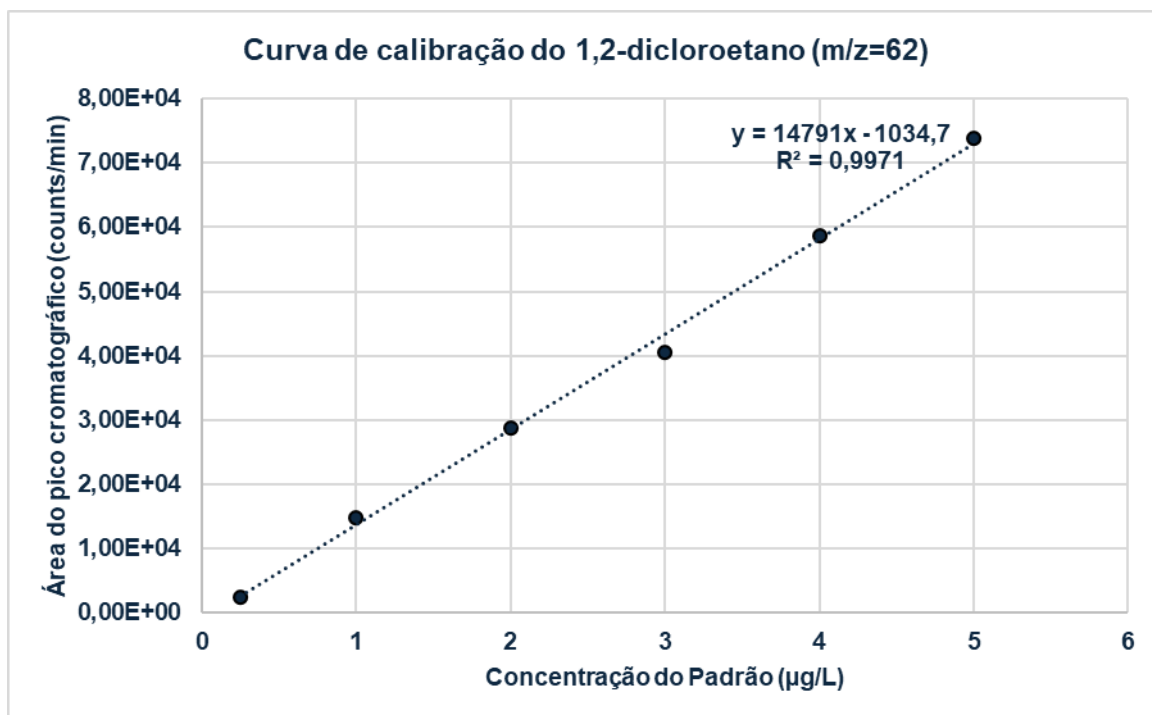


Figura AIV.4: Gráfico da curva de calibração do 1,2-dicloroetano

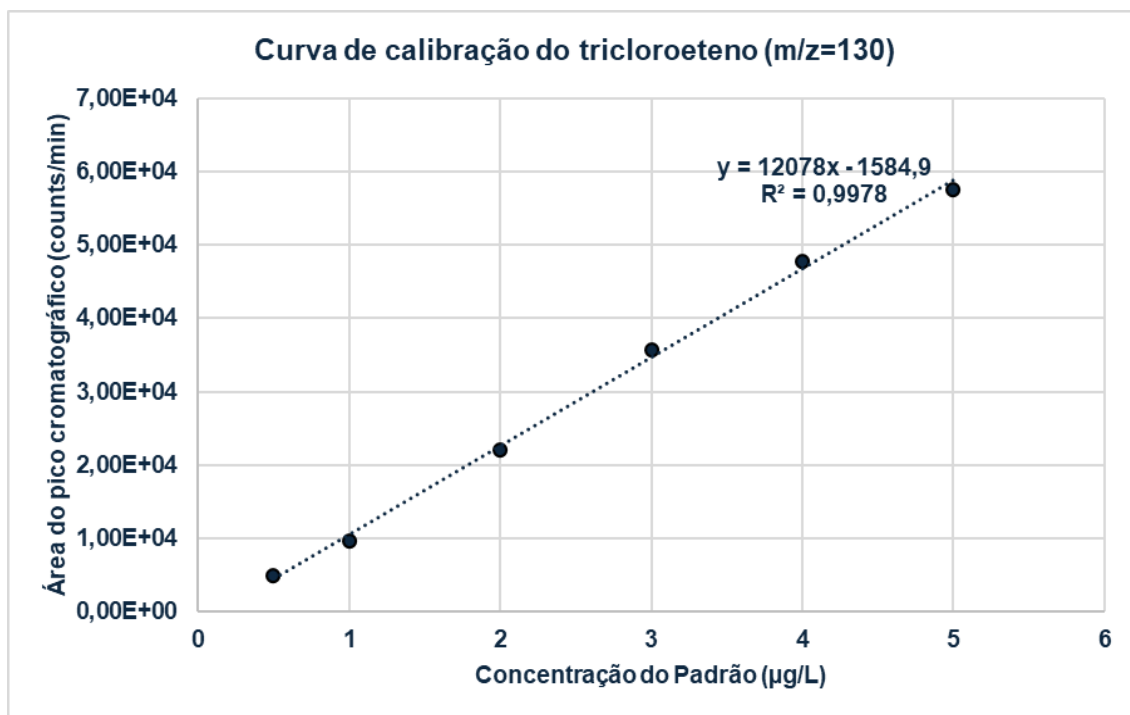


Figura AIV.5: Gráfico da curva de calibração do tricloroeteno

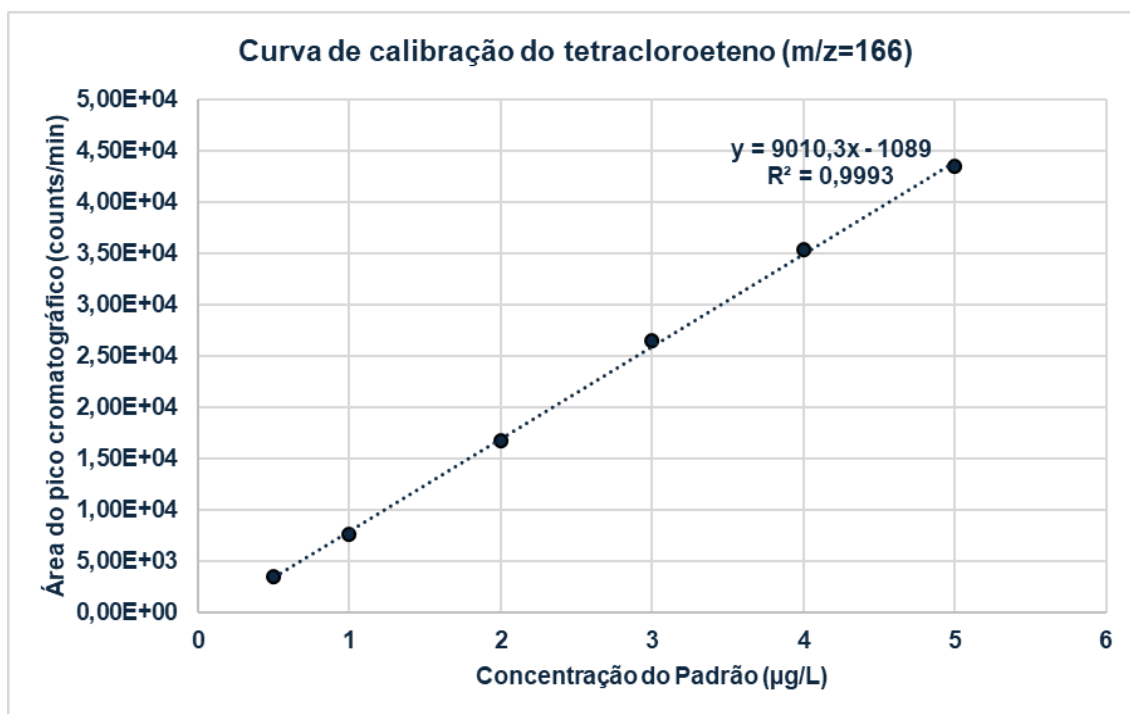


Figura AIV.6: Gráfico da curva de calibração do tetracloroeteno

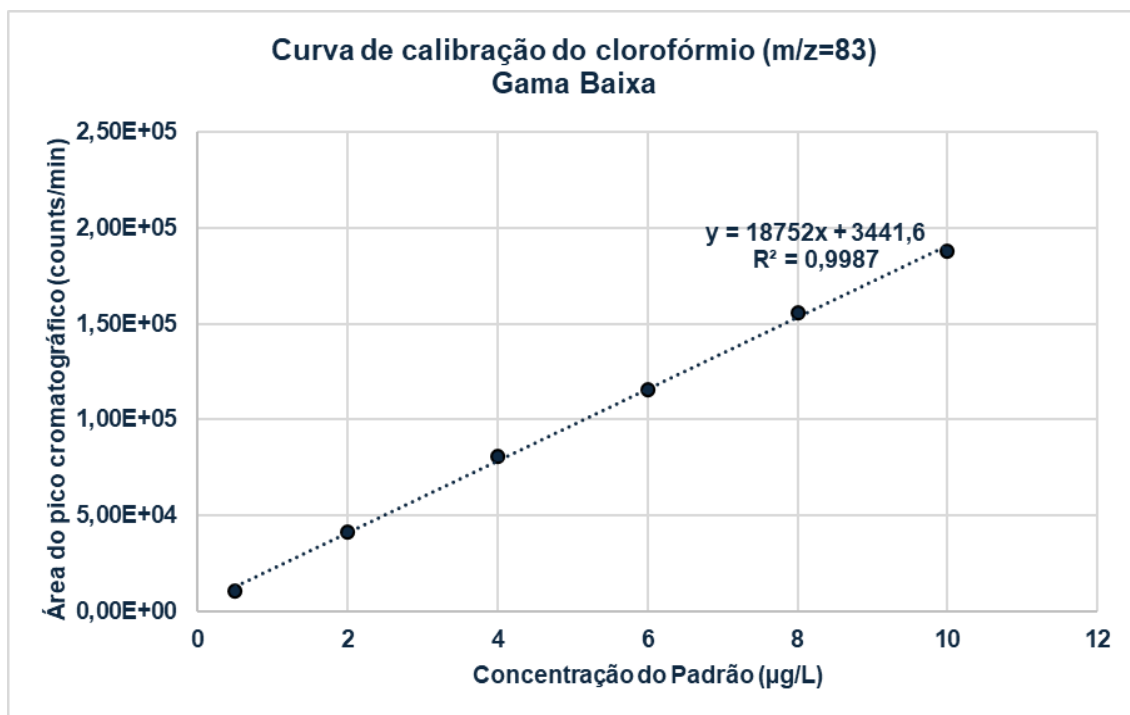


Figura AIV.7: Gráfico da curva de calibração do clorofórmio (Gama Baixa)

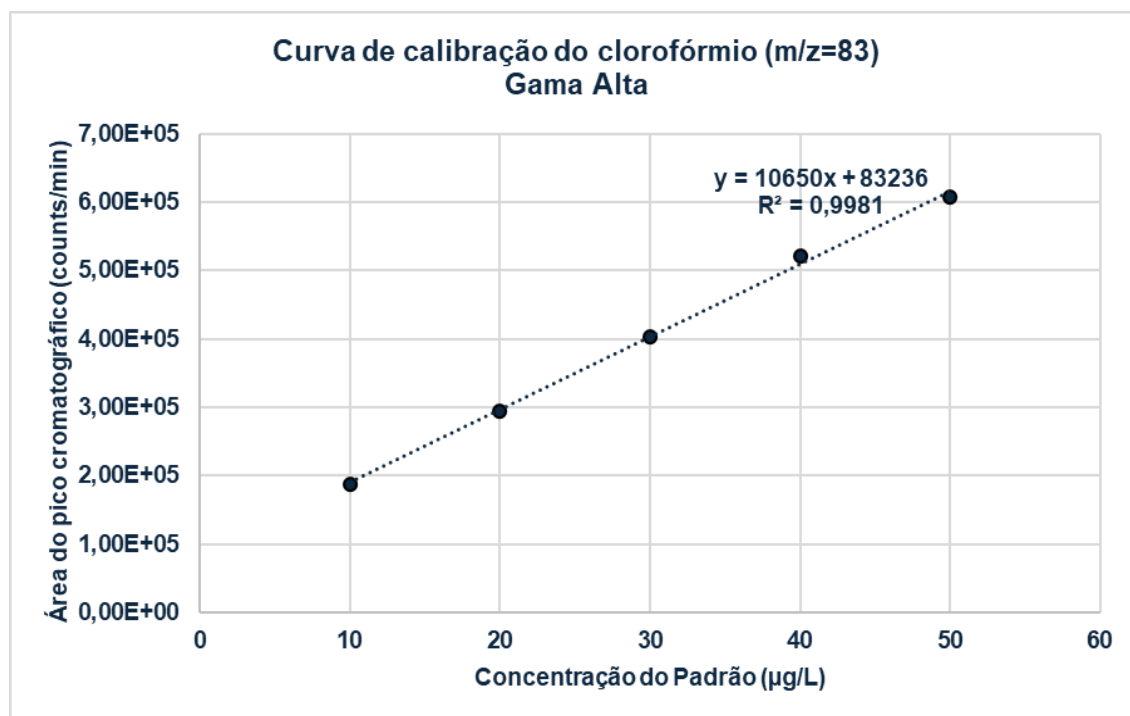


Figura AIV.8: Gráfico da curva de calibração do clorofórmio (Gama Alta)

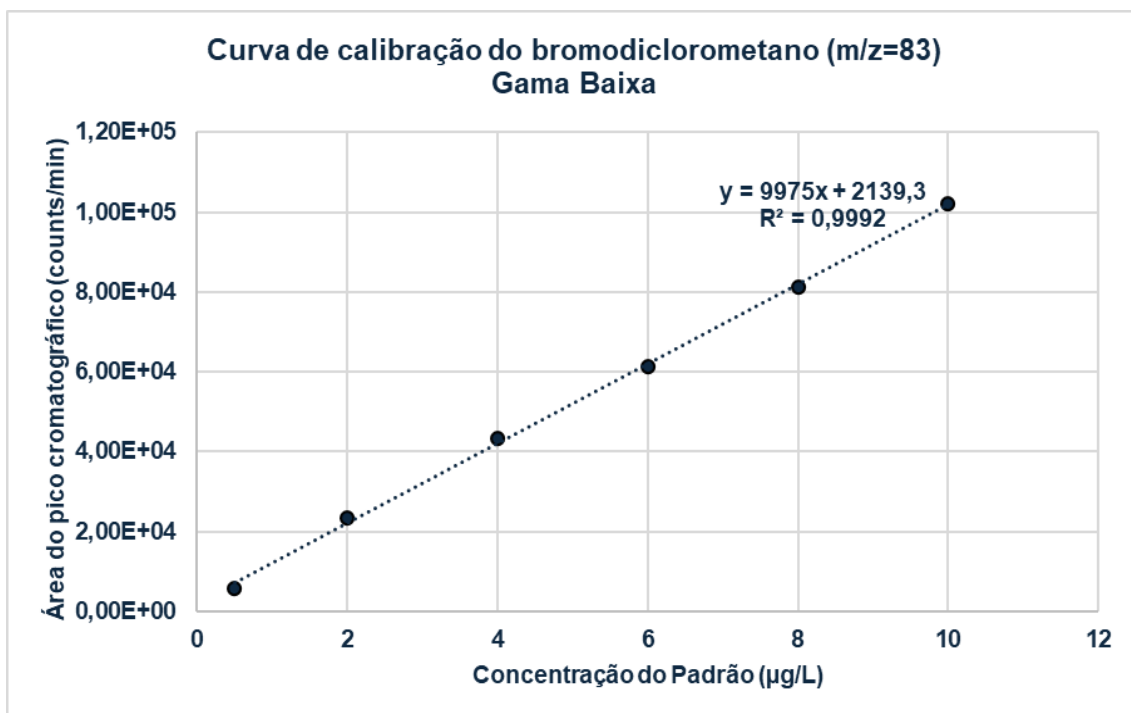


Figura AIV.9: Gráfico da curva de calibração do bromodiclorometano (Gama Baixa)

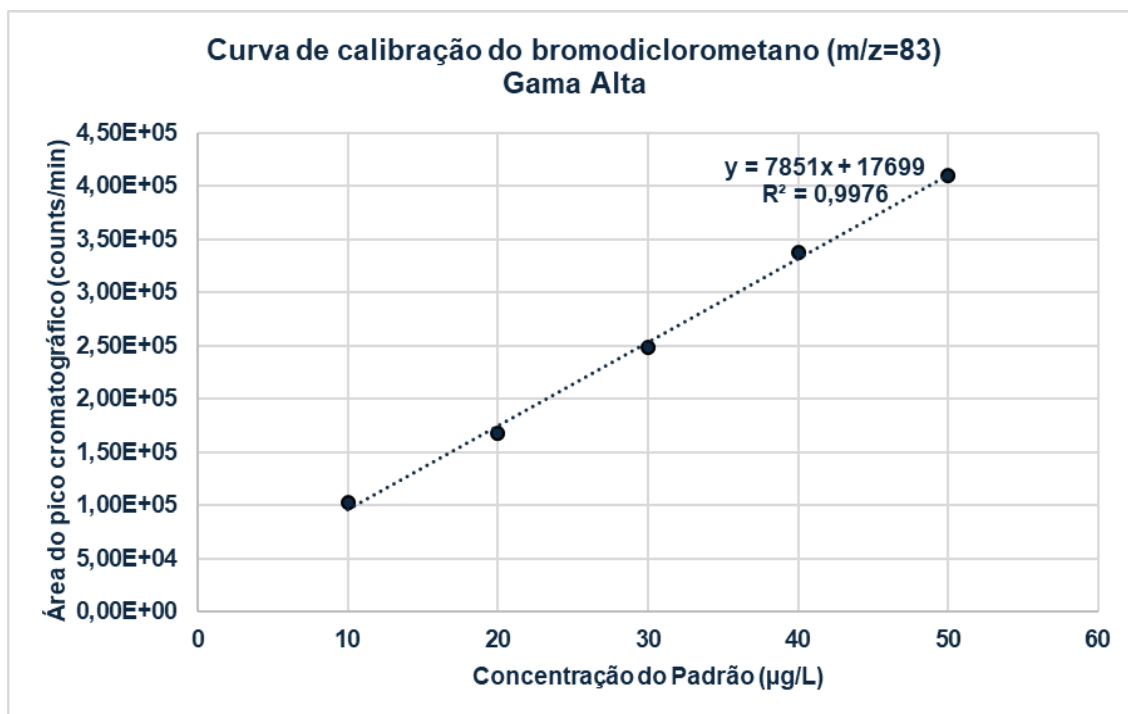


Figura AIV.10: Gráfico da curva de calibração do bromodiclorometano (Gama Alta)

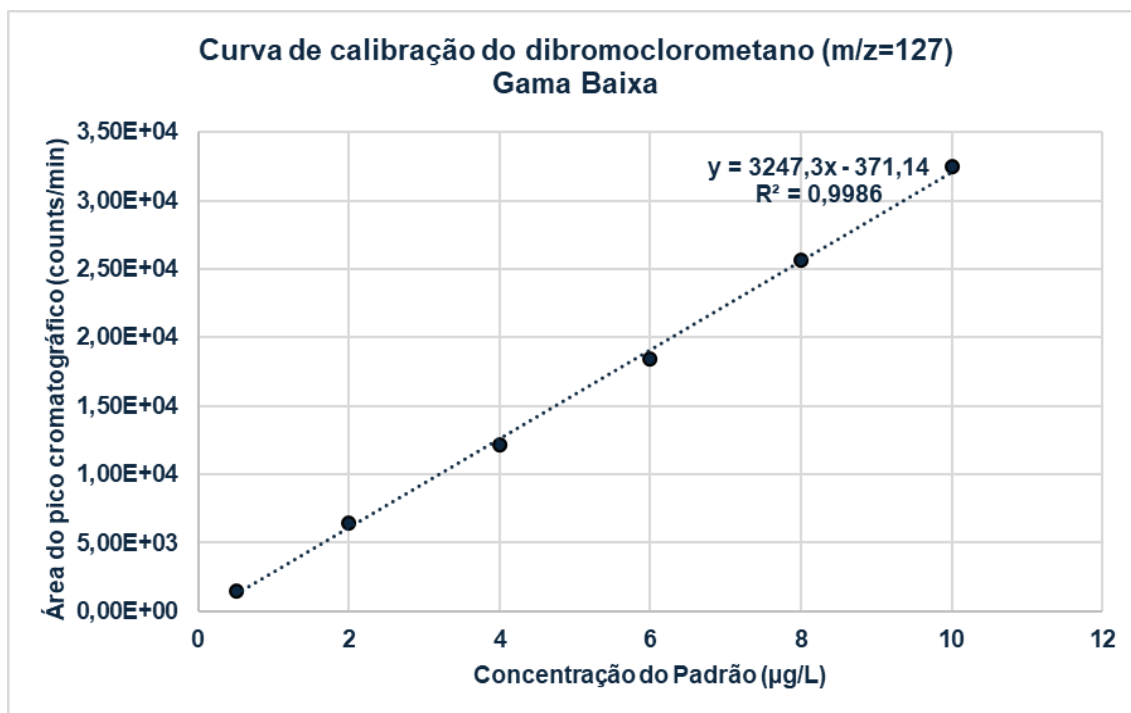


Figura AIV.11: Gráfico da curva de calibração do dibromoclorometano (Gama Baixa)

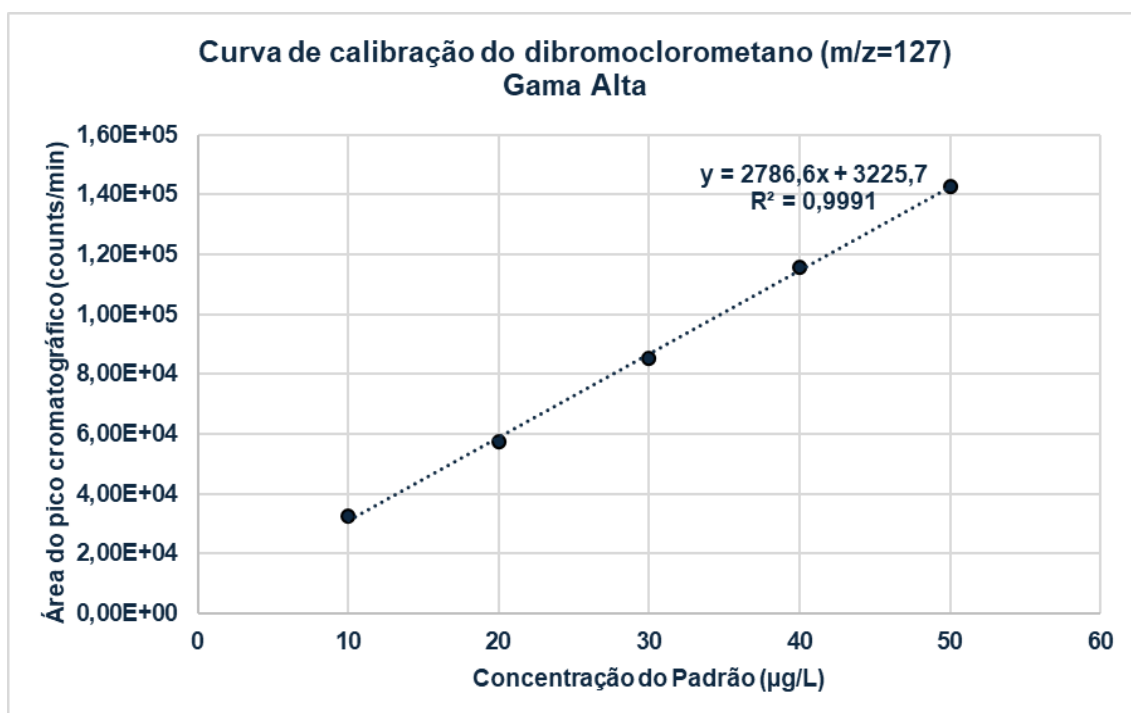


Figura AIV.12: Gráfico da curva de calibração do dibromoclorometano (Gama Alta)

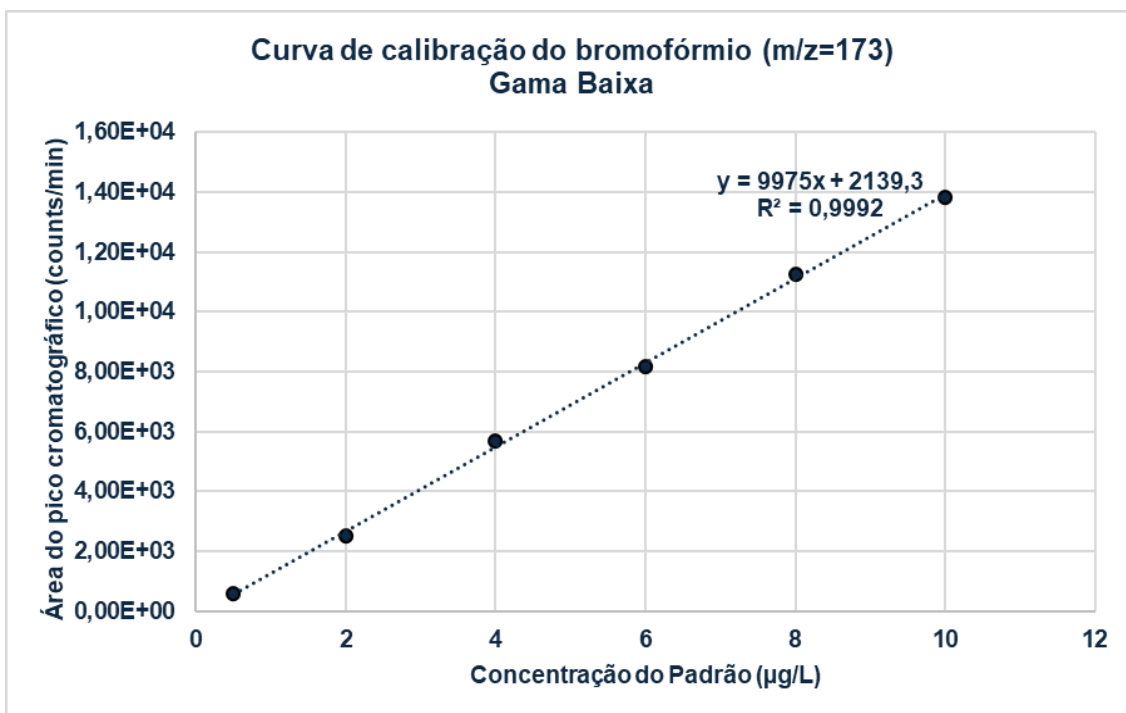


Figura AIV.13: Gráfico da curva de calibração do bromofórmio (Gama Baixa)

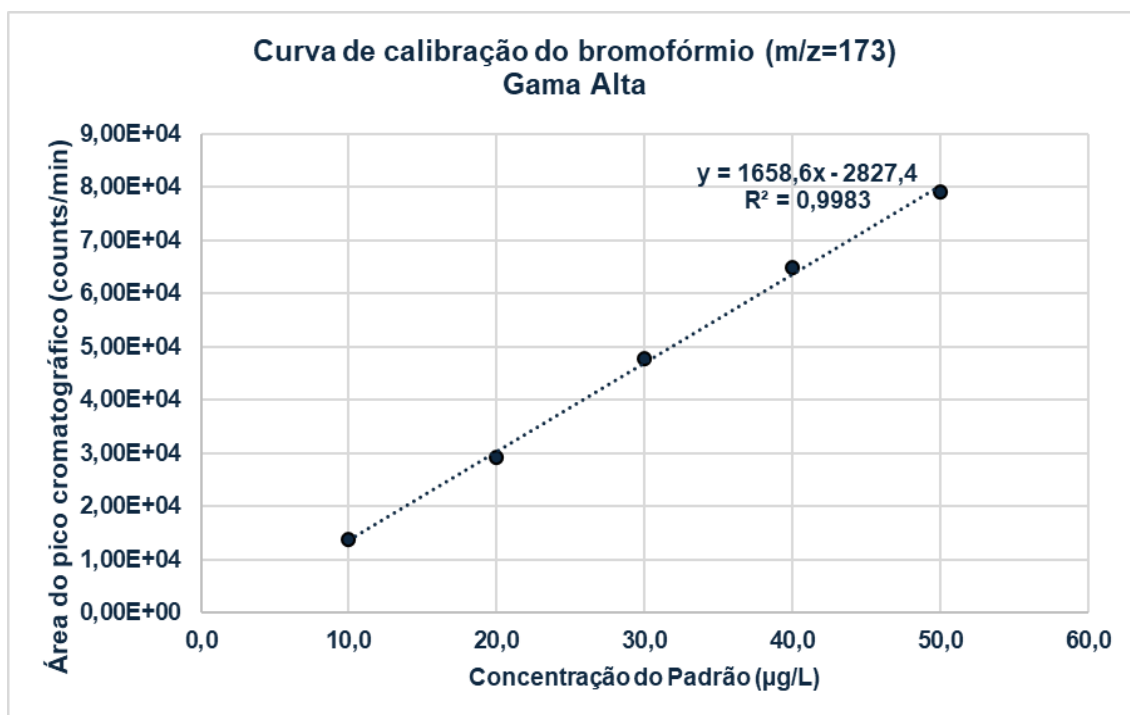


Figura AIV.14: Gráfico da curva de calibração do bromofórmio (Gama Alta)