

Mestrado Integrado em Engenharia Química

Implementação de um método de análise de éter pentabromodifenílico por SPME-GC/ECD

Tese de Mestrado

desenvolvida no âmbito da disciplina de

Projecto de Desenvolvimento em Ambiente Académico

Ana Raquel Pires Kritinas



Universidade do Porto

Faculdade de Engenharia

FEUP

Departamento de Engenharia Química

Orientador na FEUP: Prof. Doutora Maria Arminda Costa Alves

Fevereiro de 2008

Agradecimentos

À Prof. Doutora Arminda Alves, por me ter dado o prazer da sua orientação, acreditando sempre nas minhas capacidades; e pela atenção e força demonstrada durante a realização deste trabalho, estando sempre presente quando se revelaram as grandes dificuldades.

À Prof. Doutora Lúcia Santos, por ter sido uma presença constante e por me ter incentivado nos momentos difíceis.

A todos os que me ajudaram e proporcionaram um excelente ambiente de trabalho, de modo muito especial o Sr. Serafim, a Fátima, o Zé Luís, o Nuno, a Elisabete, a Ná e o Miguel.

À Vera, à Rita e à Joana, pelo inquestionável apoio e por terem conseguido proporcionar nestes meses de trabalho, momentos inesquecíveis.

A todos os meus amigos que me apoiaram e me “aturaram” quando a paciência não era muita. Para não correr o risco de me esquecer de alguém não cito nomes. A todos os Louva, a Cedofeita, aos Escuteiros e aos “meus meninos”, um muito obrigada por tudo.

Aos meus pais, por me terem proporcionado mais esta oportunidade, depois de tantos anos de estudo. Por estarem sempre presentes e por darem tudo sem esperarem nada em troca. E ao meu irmão, que apesar de não demonstrar muito também me apoia a 100%.

E por último, como não podia deixar de ser, a Deus, porque sei que sempre acreditou em mim e me deu forças quando estas me faltavam.

Resumo

Os éteres polibromodifenílicos são uma família de compostos denominados de retardadores de chama e são adicionados a uma variedade de produtos consumíveis de modo a retardar a sua combustão. Devido à sua toxicidade e por serem prejudiciais à saúde humana, a Convenção de Estocolmo das Nações Unidas, incluiu estas substâncias nos Poluentes Orgânicos Persistentes. Entre estes compostos, encontra-se o éter pentabromodifenílico, objecto deste estudo, por ser um dos mais presentes em águas e sedimentos.

O método de análise utilizado para a quantificação destes compostos baseou-se numa técnica de microextracção em fase sólida (SPME), seguido de cromatografia gasosa com detecção por captura de electrões (GC-ECD). O limite de detecção foi de 0,77 µg/L e a incerteza global associada variou de 10 a 30 % para concentrações acima dos 10 µg/L, enquanto que para a concentração de 1 µg/L subiu drasticamente para 127%. A recuperação média obtida para o padrão de 5 µg/L (5 ensaios consecutivos) foi de 36,30%.

No que se refere à optimização das condições de extracção e de injeção, foi escolhida a extracção com uma fibra de PDMS 100 µm, durante 30 minutos e a uma temperatura de 60°C. A injeção foi realizada em modo split/splitless, com tempo de splitless de 1 minuto. O programa de temperaturas utilizado foi 100°C inicialmente, 50°C/min. até aos 300°C, mantendo-se 15 minutos a esta temperatura, o que permitiu diminuir o tempo de análise. Embora o pico cromatográfico do BDE-100 (congénere estudado) apareça aos $17,5 \pm 1$ minuto, este tempo é compatível com o tempo de extracção.

Palavras-chave: PBDEs / Cromatografia Gasosa / Microextracção em Fase Sólida

Abstract

The polybrominated diphenyl ethers are a family of compounds denominated by flame retardants and are added to a variety of consumable products in way to delay its combustion. Due to its toxicity and for being harmful to the human health, the Stockholm Convention of the United Nations included these substances in the pollutant organic persistent substances. Among these compounds, we can find the pentabromodiphenyl ether, which will be the object of this study, as it is for one of the most present in water and sediments.

The analysis method used for the quantification of these compounds was based on a technique of Solid-Phase Microextraction (SPME), followed by Gaseous Chromatography with Electron Capture Detector (GC-ECD). The detection limit was 0,77 µg/L, and the global uncertainty associated floated between 10 a 30 % for concentrations above 10 µg/L whereas for the concentration of 0,1 µg/L it has increased drastically to 127 %. The medium recovery obtained for the pattern of 5 µg/L (5 consecutive rehearsals) was 36,30%.

In extraction and injection conditions optimization matters, it was chosen the extraction with a fibre of PDMS 100 µm, in a 30 minutes period and a 60°C temperature. The injection was made in split/splitless mode, with 1 minute of splitless time. The temperature programme used was initially 100°C, 50°C/min. till 300°C and was with this temperature for 15 minutes, what provoked a decrease in the analysis time. Eventhough the chromatographic peak of the BDE-100 (the homologous studied) appears at $17,5 \pm 1$ minute, this time is compatible with the extraction time.

Key Words: PBDEs/ Gaseous Chromatography/ Solid-Phase Microextraction

Índice

Índice	i
Notação e Glossário	iii
1. Introdução	1
1.1. Enquadramento e apresentação do projecto	1
1.2. Contributos	1
1.3. Organização da tese	2
2. Estado da Arte	3
2.1. Caracterização do composto a analisar	3
2.1.1. O que são PBDEs?	3
2.2.2. Características Físico-Químicas	6
2.2.3. O BDE-100	6
2.2.4. Fontes de contaminação ambiental por PBDEs	7
2.2. Métodos analíticos	9
2.3. Conceitos associados à metodologia usada	13
2.3.1. Microextracção em fase sólida (SPME)	13
2.3.2. Cromatografia Gasosa (GC)	16
3. Materiais e Métodos	18
3.1. Materiais	18
3.1.1. Padrões e Reagentes	18
3.1.2. Equipamento para Microextracção em Fase Sólida	18
3.1.3. Equipamento Cromatográfico	19
3.2. Métodos	19
3.2.1. Preparação dos padrões analíticos	19
3.2.2. Procedimento de extracção	20
3.2.3. Análise cromatográfica	20

4. Resultados e Discussão	22
4.1. Ensaio Preliminares.....	22
4.2. Validação do método analítico de determinação de BDE-100.....	25
4.3. Incerteza global do método.....	29
5. Conclusões	33
Referências Bibliográficas.....	35
Anexo A. Propriedades Físico-Químicas dos PBDEs.....	40
Anexo B. Frases de Risco (R) e de Segurança (S) e Símbolos de Risco para o BDE-100	41
Anexo C. Informações relativas ao SPME.....	43
Anexo D. Preparação dos padrões para análise.....	45
Anexo E. Resultados obtidos na quantificação dos padrões de BDE-100.....	46
Anexo F. Estudo da Linearidade.....	48
F.1. Estudo da Linearidade para a recta de calibração por injeção directa.....	48
F.2. Estudo da Linearidade para a recta de calibração por SPME.....	51
Anexo G. Estudo da Incerteza Global.....	53
G.1. Incerteza associada à preparação dos padrões, U_1	53
G.2. Incerteza associada à recta de calibração, U_2	54
G.3. Incerteza associada à precisão, U_3	55
G.4. Incerteza associada à exactidão, U_4	55
G.5. Incerteza global associada, U	56

Notação e Glossário

Siglas latinas

a	Ordenada na origem da recta de calibração
a_{\max}	Valor máximo da ordenada na origem da recta de calibração
a_{\min}	Valor mínimo da ordenada na origem da recta de calibração
ATSDR	Agency for toxic substances & disease registry
b	Declive da recta de calibração
b_{\max}	Valor máximo do declive da recta de calibração
b_{\min}	Valor mínimo do declive da recta de calibração
BDE100	Éter 2,2',4,4',6 - pentabromodifenílico
BSEF	Bromine Science and Environmental Fórum
BFRs	Substâncias Retardadoras de Chama
CV	Coeficiente de Variação
DecaBDE	Éter decabromodifenílico
E	Erro percentual de medição
ECD	Detector de Captura de Electrões
GC	Cromatografia Gasosa / Cromatógrafo Gasoso
GC-MS	Cromatografia Gasosa com Espectroscopia de Massa
GC-ECD	Cromatografia Gasosa com Detector de Captura de Electrões
HS	<i>Headspace</i>
HS-SPME	Microextração em fase sólida com <i>headspace</i>
IC_a	Intervalo de confiança para a ordenada na origem da recta de calibração
IC_b	Intervalo de confiança para o declive da recta de calibração
ID-SPME	Microextração em fase sólida com imersão directa
K_{fs}	Coeficiente de partição
K_{ow}	Coeficiente de partição octanol-água
LC/MS-MS	Cromatografia líquida com espectroscopia de massa em tandem
LD	Limite de detecção
MAE	Extração assistida por microondas
m_i	Valor medido do parâmetro
MSPD	Matriz de dispersão em fase sólida

N	Número de pontos experimentais
n	Número de injeções efectuadas para cada padrão
n.d.	Não detectado
OctaBDE	Éter octabromodifenílico
PBDEs	Éteres polibromodifenílicos
PCBs	Policloro-bifenilos
PCB52	2,2',5,5' - tetraclorobifenilo
PDMS	Polidimetilsiloxano
PentaBDE	Éter pentabromodifenílico
PVT	Injecção por vaporização a temperatura programável
R _{máx.}	Recuperação máxima
R _{média}	Recuperação média
R _{mín.}	Recuperação mínima
RSD	Desvio padrão relativo
s _a	Desvio padrão associado à ordenada na origem da recta de calibração
s _b	Desvio padrão associado ao declive da recta de calibração
S _{x0}	Desvio padrão da concentração calculado através da recta de calibração
S _{y/x}	Desvio padrão residual
SBSE	Stir bar sorptive extraction
SPMDs	Membranas de polietileno de baixa densidade
SPME	Microextração em fase sólida
U	Incerteza Global Associada
U ₁	Incerteza associada à preparação dos padrões
U ₂	Incerteza associada à recta de calibração
U ₃	Incerteza associada à precisão
U ₄	Incerteza associada à exactidão
UAE	Extracção assistida por ultra sons
UNEP	United Nations Environmental Programme
V _s	Volume máximo de amostra para o máximo de sensibilidade
V _f	Volume do revestimento da fibra
\bar{x}	Média dos valores de concentração dos padrões
x _i	Concentração do padrão <i>i</i> ($i \in [1,5]$)
x ₀	Valor da concentração dos padrões de BDE100 preparados

\bar{y}	Média dos valores das áreas obtidas experimentalmente
$y_{cal.}$	Valores das áreas de BDE100 calculadas, para cada valor de x_i , com base na recta de calibração
y_i	Valores das áreas de BDE100 obtidos experimentalmente
$y_{i\ max.}$	Valor máximo dos valores das áreas de BDE100 obtidas experimentalmente
$y_{i\ mín.}$	Valor mínimo dos valores das áreas de BDE100 obtidas experimentalmente
WHO	World Health Organization

Siglas gregas

Δm_i	Erro associado à medição de um determinado parâmetro
--------------	--

1. Introdução

1.1. Enquadramento e apresentação do projecto

Os éteres polibromodifenílicos (PBDEs) são um grupo de substâncias químicas denominadas de retardadoras de chama, uma vez que são adicionados a uma grande variedade de produtos consumíveis de modo a dificultar a sua combustão. O éter pentabromodifenílico (BDE-100) é um dos congéneres mais tóxicos e também um dos mais detectados em águas e sedimentos e como tal, foi o seleccionado para o trabalho.

Em Agosto de 2006, o Programa de Ambiente das Nações Unidas, mais concretamente, a Convenção de Estocolmo, classificou estas substâncias de poluentes orgânicos persistentes (POPs), sendo a concentração média anual máxima fixada em 0,5 ng/L para a água de superfície, não estando fixado limites máximos (Directiva 2006/0129 (COD)).

Não é objectivo prioritário desta tese a detecção de limites tão baixos quanto a lei exige, mas sim estudar a fase preliminar, no que concerne às condições de extracção por microextracção em fase sólida (SPME) e análise por cromatografia gasosa com sistema de detecção de captura de electrões (GC-ECD), aplicados à detecção de BDE-100.

1.2. Contributos

A contribuição deste trabalho prende-se com a validação de alguns resultados existentes na literatura, uma vez que os estudos científicos referentes à análise de PBDEs em águas são escassos. A utilização de SPME é cada vez mais uma técnica procurada, devido à rapidez de preparação das amostras para posterior identificação e da eliminação de solventes orgânicos das extracções analíticas. Até à data não são referidos estudos que envolvem SPME-GC/ECD para a identificação de PBDEs e apenas um estudo é referido na bibliografia, usando GC-ECD para esta identificação. O ECD tem como grande vantagem a sua sensibilidade a compostos halogenados, que é o caso em estudo. Porém, a sua quantificação torna-se difícil devido à oscilação do tempo de retenção, sendo necessário comprovar a presença do analito por GC-MS. A validação do método é auxiliada pelo cálculo da sua incerteza global, tornando-se no principal contributo desta tese.

1.3. Organização da tese

Esta tese está dividida em 4 grandes capítulos cujo um breve resumo é apresentado de seguida:

2. Estado da Arte

Neste tópico é apresentado o composto a analisar, as suas propriedades físico-químicas e as fontes de libertação do mesmo para o ambiente. De um modo mais específico são abordados os estudos recentes realizados, bem como a evolução nas metodologias de análise. A teoria adjacente à microextração em fase sólida (SPME) e ao detector de captura de electrões (ECD) é apresentada neste capítulo de modo sucinto e claro.

Eliminado: ,

3. Materiais e Métodos

Neste capítulo são referidos os materiais e reagentes utilizados, descrito o equipamento utilizado e os métodos (condições operatórias) adoptados.

4. Resultados e Discussão

São referidos todos os estudos preliminares adjcentes à execução deste trabalho experimental, tais como a escolha da fibra de extração para SPME, a temperatura de extração e o programa de temperaturas utilizado. São apresentados os resultados da validação do método e a sua respectiva discussão. De modo mais promenorizado é abordado o cálculo da incerta global do método e o respectivo resultado.

5. Conclusões

São apresentados, resumidamente, os resultados deste trabalho experimental e uma crítica geral ao trabalho efectuado.

2. Estado da Arte

2.1. Caracterização do composto a analisar

2.1.1. O que são PBDEs?

Os PBDEs pertencem a um grupo de substâncias químicas denominadas de retardadoras de chama (BFRs). Estas substâncias inibem a ignição e/ou reduzem a taxa de combustão de um produto. São normalmente usados por produtores para manter os padrões de segurança contra incêndios estabelecidos na lei para produtos como equipamento eléctrico, mobiliário e veículos (Environment Agency, 2005).

As primeiras produções comerciais de PBDEs tiveram início na Alemanha nos anos 70 e continuam até ao presente, embora de forma decrescente, uma vez que o objectivo seria banir a produção e comercialização destas substâncias até 2004. Em 2001 a procura de PBDEs no mundo foi de 67390 toneladas (Tabela 1), sendo 83% de éter decabromodifenílico (decaBDE), 6% de éter octabromodifenílico (octaBDE) e 11% de éter pentabromodifenílico (pentaBDE) (ATSDR, 2004).

Tabela 1. Procura de PBDEs no ano de 2001, em toneladas (BSEF, 2003, extraído de ATSDR, 2004)

	Américas	Europa	Ásia	Resto do Mundo	Total
PentaBDE	7100	150	150	100	7500
OctaBDE	1500	610	1500	180	3790
DecaBDE	24500	7600	23000	1050	56100

Quimicamente, são compostos aromáticos, nos quais 2 a 10 átomos de bromo estão ligados a uma molécula de éter difenílico (Figura 1).

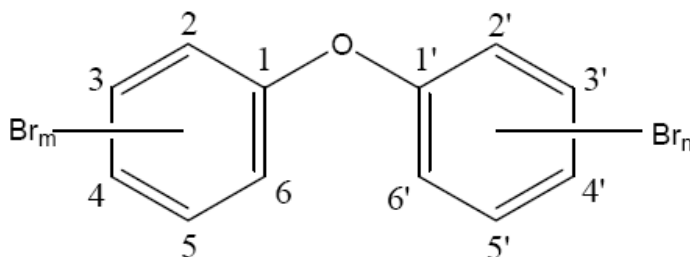


Figura 1. Estrutura química dos PBDEs, onde $m + n = de 2 a 10$ (Fonte: ATSDR, 2004)

Os PBDEs podem ser agrupados pelo grau de bromação e, desta forma, o termo “homólogo” é usado para referir todos os PBDEs com o mesmo número de átomos de bromo. Como tal, existem 10 grupos homólogos diferentes, cada um contendo um ou mais congêneres (isómeros), sendo o número teórico destes 209. Estes isómeros individuais são identificados por números de código (ATSDR, 2004). No estudo em questão, o BDE-100, ou seja, éter 2,2',4,4',6 – pentabromodifenílico foi o congênere utilizado, uma vez que este é dos mais detectados em águas e sedimentos.

Estas substâncias não eram primordialmente associadas a efeitos na saúde pública. Contudo, as preocupações têm aumentado, devido a alguns destes químicos terem sido encontrados no ambiente em variadas concentrações (ATSDR, 2004). Porém, a Environment Agency em 2005, refere que o pentaBDE apresenta riscos para os predadores de topo da cadeia alimentar e a possível contaminação de recém nascidos, caso o seu uso continuasse a ser permitido. A mesma agência refere que o éter decabromodifenílico não apresenta riscos para o ambiente e, conseqüentemente para a saúde pública.

Embora estes riscos não tenham sido estudados extensivamente em humanos, em estudos animais a exposição destes, antes e depois de nascerem, aos PBDEs causa problemas no desenvolvimento cerebral (ATSDR, 2004). Estes estudos observaram problemas na aprendizagem, na memória e no comportamento. Também foi demonstrado que a exposição durante o desenvolvimento diminui os níveis de hormonas na tiróide, afectam a reprodução e reduzem a eficiência do sistema imunitário (ATSDR, 2004). Foram encontrados PBDEs no sangue, na gordura e no leite materno em pessoas de todo o mundo, uma vez que estes se armazenam no corpo humano por longos períodos de tempo (anónimo, 2008).

Com base nestes riscos, a União Europeia estabeleceu uma “estratégia contra a poluição da água” (Directiva 2000/60/EC), que inclui o éter pentabromodifenílico, como substância tóxica prioritária. Esta directiva visa alcançar o término ou o faseamento das descargas, emissões ou perdas destas substâncias para a água dentro de 20 anos.

Uma vez que a preocupação prioritária quanto aos riscos para a saúde pública são os éteres pentabromodifenílicos, foram esses os alvos desta tese, mais concretamente o BDE-100, como já tinha sido referido anteriormente, e é sobre estes que se vai explicar mais um pouco.

Nos últimos 40 anos, o pentaBDE (nome dado à mistura comercial) é usado ou foi usado nos seguintes sectores (UNEP, 2006):

- Aplicações eléctricas e electrónicas – computadores, electrodomésticos, equipamento de escritório e aplicações domésticas.
- Tráfego e transportes – carros, comboios, aviões e navios que contêm interiores têxteis e de plástico e componentes electrónicos.
- Materiais de construção – enchimentos de espuma, tábuas e espumas de isolamento, painéis de parede e de chão, folhas de plástico e resinas.
- Mobiliário – mobiliário estofado, colchões, componentes de espuma flexíveis.
- Têxteis – cortinas, carpetes, películas antiaderentes de espuma, tendas, encerados, roupas de trabalho e de protecção.
- Embalagens – Espuma de poliuretano para materiais de embalagem.

O uso mais comum do pentaBDE, atingindo cerca de 95 a 98% da sua utilização, desde 1999, é a espuma de poliuretano. Esta espuma contém entre 10 a 18% de pentaBDE comercial.

Dadas as variadas formas de uso do pentaBDE, denotou-se um aumento rápido das concentrações do mesmo no ambiente e em humanos, desde o início dos anos 70 até meados dos anos 90 (UNEP, 2006).

2.2.2. Características Físico-Químicas

As propriedades físico-químicas dos PBDEs são, na sua maioria, semelhantes a outros contaminantes ambientais conhecidos, tais como os PCBs.

As soluções de PBDEs disponíveis comercialmente não são substâncias puras, mas sim misturas de homólogos. Por exemplo, a mistura comercial de éter pentabromodifenílico, mostra que o componente principal contém o seu homólogo (50-62%). Para além deste também contém éter tetrabromodifenílico (24-38%), com pequenas quantidades de éter hexabromodifenílico (4-8%) e quantidades vestigiais de éter tribromodifenílico (0-1%) (ATSDR, 2004). Estas soluções são bastante resistentes à degradação física, química e biológica.

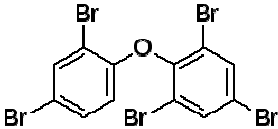
Os PBDEs são lipofílicos e a sua solubilidade em água é baixa, especialmente para os homólogos com peso molecular mais elevado. De facto, os PBDEs com peso molecular mais baixo são mais solúveis em água e têm uma grande propensão para a volatilização e para o seu transporte na atmosfera, onde estes homólogos tendem a partir-se em moléculas.

Devido às baixas pressões de vapor, à pouca solubilidade em água e grande valor de K_{ow} é esperado que, com a entrada destes compostos no ambiente, se liguem à parte orgânica da matéria. Com base nestas características, os PBDEs têm um comportamento persistente e bioacumulativo no ambiente, sendo o tempo de semi-vida destes no solo e na água de 150 dias e de 600 dias em sedimentos (propriedades físico-químicas dos PBDEs em Anexo A). Estudos demonstram que a degradação ambiental de PBDEs ocorre por meios fotolíticos e bacterianos (ATSDR, 2004).

2.2.3. O BDE-100

A tabela 2 apresenta as propriedades físico-químicas do BDE-100. Em Anexo B, são apresentadas as frases de risco e de segurança, bem como símbolos de segurança.

Tabela 2. Propriedades físico-químicas do BDE-100.

Propriedades	BDE-100	Fonte
Nome	Éter 2,2',4,4',6-pentabromodifenílico	
Fórmula Química	C ₁₂ H ₅ Br ₅ O	Sigma-Aldrich
Estrutura Química		Sigma-Aldrich
Peso Molecular	564,69 g/mol	Sigma-Aldrich
Solubilidade em Água	40 µg/L	Tittlemier et al, 2002
Pressão de Vapor	$2,15 \times 10^{-7}$ mm Hg	Tittlemier et al, 2002
Constante de Henry	$6,80977 \times 10^{-7} \frac{atm \cdot m^3}{mol}$	Tittlemier et al, 2002
log K _{ow}	7,24	Braekvelt et al, 2003

2.2.4. Fontes de contaminação ambiental por PBDEs

Não são conhecidas fontes naturais para estes compostos, excepto alguns organismos marinhos que produzem formas de PBDEs que contêm níveis elevados de oxigénio (ATSDR, 2004).

As emissões de PBDEs para o ambiente ocorrem três fases distintas do seu manuseamento: durante a produção, durante o uso e enquanto produto descartado.

- Durante a sua produção

O pentaBDE é sintetizado a partir do éter difenílico por bromação com bromo elementar na presença de um catalisador Friedel-Craft de ferro. Os produtores deram a conhecer que neste processo a libertação de pentaBDE para o ambiente é devida às filtragens e ao material rejeitado, ambos depositados em aterros (UNEP, 2006).

De acordo com o relatório de risco da União Europeia acerca do pentaBDE, as emissões durante a produção de poliuretano são devidas ao processo de fazer espuma,

no manuseamento de aditivos (descargas para a água) e durante o seu processo de cura (emissões para o ar). É assumido também que, algum do pentaBDE volatilizado neste processo, condensa na sala de produção e culmina nas águas residuais. Também para as águas residuais vão 0,01% (100g/tonelada) de matéria-prima manuseada durante a mistura de pentaBDEs na produção de espuma de polímeros.

Como o pentaBDE não é facilmente solúvel em água, como se mostra em Anexo A, não são encontrados níveis elevados destes compostos nas águas. As pequenas quantidades que nela se encontram permanecem em partículas e eventualmente assentam no fundo.

- Durante o uso do produto

O pentaBDE é somente usado como aditivo na mistura física com o polímero, e assim, pode migrar juntamente com a matriz sólida e volatilizar da superfície dos artigos durante o seu ciclo de vida. Aproximadamente 3,9% do pentaBDE presente nos artigos são estimados libertar-se cada ano durante, por volatilização (UNEP, 2006). Para além do uso em espuma de poliuretano, o pentaBDE também é libertado em itens domésticos, tais como mobiliário e carpetes, sendo possível verificar a sua presença no pó da casa (Varian, 2004).

- A partir de resíduos

Os resíduos podem ser gerados a partir da produção de pentaBDE, a partir de processos de fabrico de materiais que contenham pentaBDE e a partir do manuseamento de produtos em fim de vida útil que contenham pentaBDE.

Os desperdícios que contenham mais de 0,25% de pentaBDE são classificados como “lixos tóxicos” (UNEP, 2006).

Segundo a UNEP, as libertações de pentaBDE poderão ocorrer para o ar, para a água e para o solo, mas a maior parte acumula-se no solo. No meio ambiente este composto está vinculado em partículas, apenas uma pequena parte é transportada na fase gasosa ou diluída na água. Este transporte durante longos períodos de tempo é decisivo na distribuição alargada de pentaBDE no meio ambiente.

2.2. Métodos analíticos

A análise de PBDEs pode ser dividida em duas etapas distintas: a preparação das amostras e respectiva extracção e a análise cromatográfica. Quanto ao método de preparação das amostras, segundo Covaci et al (2007) este tem sido baseado em protocolos pré-estabelecidos para detectar poluentes orgânicos persistentes. Devido à complexidade das amostras ambientais e aos baixos níveis aos quais estes compostos estão presentes, os tratamentos de amostras incluem extracções exaustivas, com um grande número de passos e pré-concentração dos compostos alvo, seguido de purificação, antes da separação cromatográfica e da detecção.

- Métodos de Extracção

Para analisar PBDEs em água são vários os métodos de extracção existentes na literatura. Llorca-Porcel et al (2006) propõem a extracção líquido-líquido (LLE) como uma aproximação simples para a determinação de BFRs, tendo como desvantagem a necessidade de grandes volumes de amostras para assegurar a sua detecção. Para superar estas limitações, poderão ser usadas técnicas baseadas em membranas.

Uma técnica que tem demonstrado ser uma alternativa interessante para a recuperação quantitativa de éteres tri- a hexapentabromodifenílicos é a extracção assistida por microondas (MAE). Segundo Yusa et al (2006), os éteres têm que ser pré-concentrados numa membrana semipermeável de polietileno de baixa densidade (SPMDs). Este método de extracção reduz o consumo de solvente em 1/3 e encurta o tempo de extracção de 24h a 5 minutos.

A microextracção em fase sólida (SPME), uma técnica rápida, livre de solvente e de baixo custo analítico, tem sido crescentemente avaliada para inúmeras determinações ambientais, incluindo a análise de PBDEs. Uma vez que estes têm elevados pesos moleculares e pressões de vapor baixas, pode-se obter recuperações mais altas por imersão directa da fibra na amostra do que por *headspace* (HS), quando usamos este método para pré-concentrar a amostra. (Covaci et al, 2007).

Polo et al (2004) observaram uma tendência oposta quando analisaram éteres tetra- e pentabromodifenílicos em águas correntes e águas residuais de uma estação de tratamento por SPME-GC/MS. Foi realizada microextracção em fase sólida com *headspace* (HS-SPME) de 10 mL de água num vial de 22 mL, a uma temperatura de

100°C e com tempo de extracção de 30 minutos. Foram observadas respostas lineares numa gama de 0,2 – 500 ng/L, com recuperações acima dos 87% e desvio padrão relativo (RSDs) abaixo dos 19%. Verificou-se que não seria necessário mais nenhum pré-tratamento antes de se realizar HS-SPME e que este método estaria limitado a congéneres de pentaBDE sendo estes completamente absorvidos, eliminados lentamente e altamente bioacumulados. Nesta técnica, o facto de usar GC/MS apresenta a vantagem de identificação inequívoca dos analitos mas tem a desvantagem de ser uma técnica cara que necessita de operadores especializados, ao contrário da técnica de GC-ECD. De facto a análise cromatográfica por GC-ECD pode ser utilizada facilmente em métodos de *screening*, isto é, de triagem de um grande número de amostras, sendo que as amostras positivas (em que se detecta BDE-100) devem ser confirmadas por GC/MS.

As soluções de trabalho foram obtidas por diluição em ciclohexano, isoctano e acetona e armazenadas a -20°C. Quanto à fibra utilizada verificou-se que a melhor fibra para a extracção de PBDEs é a fibra de polidimetilsiloxano (PDMS) e como tal, a temperatura de dessorção da mesma foi indicada pelo seu fornecedor, 280°C durante 2 minutos. Observou-se também que trabalhar em HS-SPME traz as suas vantagens, não só melhora a extracção da maioria dos analitos como também previne a contaminação da fibra com substâncias não voláteis e prolonga o seu tempo de vida útil.

Polo et al (2004) concluíram assim que as melhores condições para SPME de pentaBDEs seriam a extracção com fibra de PDMS, em *headspace*, com um volume de amostra de 10 mL, a uma temperatura de 100°C com agitação e com um tempo de extracção de 30 minutos.

Salgado-Petinal et al (2006) analisaram PBDEs em amostras de lamas de esgoto. O método combinou a extracção assistida por ultra sons (UAE) e microextracção em fase sólida em *headspace* (HS-SPME-GC/MS-MS). O método proposto exhibe um bom desempenho em termos de linearidade e precisão com recuperações excedendo os 92% e limites de detecção na ordem das ng/g. Esta combinação permite reduzir o tempo de análise, providenciando boa linearidade, precisão e recuperações altas.

Llorca-Porcel et al (2006) referem também a extracção sortiva por barras (*stir bar sorptive extraction* - SBSE), numa barra magnética de PDMS, que tem sido usada para uma pré-concentração de éteres tri- a hexabromodifenílicos, a partir de 100 mL de água contaminada. Os analitos foram dessorvidos termicamente a partir da barra magnética no injector do cromatógrafo gasoso (GC) e detectados por MS. O único pré-tratamento

requerido é a adição de 20% de metanol (v/v) à amostra de água. O longo tempo necessário, cerca de 25 horas, resulta em baixos limites de detecção, de 0,4 – 10 ng/L.

- Avanços na Análise

O método cromatográfico mais usado para os PBDEs é a cromatografia gasosa (GC), devido às pressões de vapor e à polaridade dos compostos, mais concretamente a cromatografia gasosa com espectroscopia de massa (GC-MS). Contudo, devido a alguns problemas de degradação de alguns congéneres, muita pesquisa tem sido realizada e a metodologia tem sido optimizada (Covaci et al, 2007).

Björklund et al (2004) descrevem como as características do GC influenciam significativamente a determinação de PBDEs por GC-MS. Segundo Björklund, se não se seleccionar apropriadamente o tipo de coluna e o detector, assim como o comprimento da coluna e a técnica de injeção, a análise de PBDEs poderá sofrer grande influência e a precisão na determinação de congéneres com mais de 5 átomos de bromo poderá diminuir significativamente.

Martinez et al (2005) estudaram a análise de PBDEs em amostras de gordura de carne de boi, gordura de galinha, músculo de peixe e fígado de pequenos tubarões, usando um cromatógrafo gasoso com detector de captura de electrões (GC-ECD), usando como processo de extracção uma matriz de dispersão em fase sólida (MSPD). Considera, deste modo, o ECD como alternativa sensível e de baixo custo para a separação de poluentes halogenados. No entanto, tem selectividade limitada, uma vez que, a detecção e identificação dos analitos é somente baseada no tempo de retenção e as interferências dos halogéneos poderão afectar o resultado (Alaee et al, 2001).

No estudo de Martinez et al (2005) as soluções padrão dos congéneres e da solução standard foram preparadas em isoctano e n-hexano. Para análise usou-se um GC com injector split/splitless e um ECD de ^{63}Ni e como método de extracção, MSPD (matriz de dispersão em fase sólida). Para as separações foi usada uma coluna capilar HP-5 de dimensões 30m x 0,25mm x 0,25 μm , tendo como gás de arraste o azoto a uma pressão de 45 kPa e como gás auxiliar também o azoto a um caudal de 50 mL/min. As soluções foram injectadas no modo spitless, com tempo de purga de 1 minuto. O programa de temperaturas escolhido foi: 90°C durante 1 min., primeira rampa a 15°C/min até aos 220°C, segunda rampa a 8°C/min até aos 300°C e tempo de espera final 10 minutos (tempo de corrida total de aproximadamente de 30 minutos). A temperatura do injector

foi de 260°C e do detector de 300°C. Com este método foi verificada linearidade entre 0,2 – 200 ng/mL, com coeficientes de correlação acima dos 0,998, desvio padrão relativo para 5 injeções consecutivas de 2 a 4% e recuperações acima dos 97%.

Para o mesmo método de análise, Korytár et al (2005) propõem a combinação de duas colunas capilares: DB-1 de dimensões 30m x 0,25mm x 0,25µm e 007-65HT de dimensões 1,0m x 0,1mm x 0,10µm, também com injeção no modo *splitless*.

Segundo Stapleton, Heather (2006), a injeção de amostras no GC é um passo muito importante e crucial para a precisão e determinação óptima de compostos com pontos de ebulição relativamente elevados tais como os PBDEs. As três técnicas mais comuns de injeção na análise destes compostos são injeção *split/splitless*, injeção directa na coluna e injeção por vaporização a temperatura programável (PTV).

A injeção *split/splitless* é a mais usada e é a mais adequada para analisar amostras ambientais, contudo este método é limitado a pequenos volumes (normalmente 1 – 3 µL) e a temperaturas elevadas de injeção (250 – 300°C). A elevada temperatura de entrada pode levar à degradação térmica de PBDEs com elevado peso molecular, como é o caso do congénere BDE-209. Outra das desvantagens deste tipo de injeção é que para analitos com elevado peso molecular, pode haver uma transferência deficiente da amostra para a coluna. Um estudo detalhado de Björklund et al (2004) mostra que a temperatura óptima do injector e o tempo de *splitless* deverá se manter o mais alto possível, naquele caso, 325°C e 4 minutos.

A injeção directa na coluna tem-se tornado um método comum de introduzir amostras no GC para a análise de PBDEs. É muito mais simples do que o injector *split/splitless* e envolve a injeção directa da amostra, dissolvida num solvente de arrasto, sobre o topo da coluna. Desta forma, reduz-se o potencial para a degradação térmica verificada no injector anterior (Huwe et al (2002), Stapleton et al (2005), Sjödin et al (2001)).

Contudo, os injectores PVT (injeção por vaporização a temperatura programável) têm-se tornado, cada vez mais, uma opção comum para a injeção nos últimos 5 anos. A principal vantagem é um aumento no volume de injeção (acima dos 125 µL), que pode melhorar drasticamente os limites de detecção (Voorspoels et al (2003), Voorspoels et al (2004), Covaci et al (2005)). Inúmeros estudos demonstram que os injectores PVT devem ser otimizados antes de serem usados, uma vez que eles são mais complicados do que o injector *split/splitless*.

No entanto, têm sido referenciadas outras técnicas de injeção, tais como o injetor *loop-type* (Björklund et al (2003a)) e as válvulas rotativas automáticas (Björklund et al (2003b)) que permitem grandes volumes de injeção.

Dado este ser um assunto em expansão, também têm sido estudadas novas técnicas para a análise, não se restringindo somente à cromatografia gasosa. Debrauwer et al (2005) estudou a aplicação do método de análise por cromatografia líquida com espectroscopia de massa em tandem (LC/MS-MS). Com este método os PBDEs são ionizados, tanto do modo positivo como do modo negativo, dependendo do grau de bromação.

2.3. Conceitos associados à metodologia usada

2.3.1. Microextração em fase sólida (SPME)

Este método foi desenvolvido para responder à necessidade de uma rápida preparação das amostras, de modo a poderem ser submetidas posteriormente aos métodos de identificação e de eliminar completamente solventes orgânicos das extracções analíticas.

A microextração em fase sólida (SPME) é um método simples de extração de compostos a partir de líquidos, ar ou mesmo lamas, sem a necessidade de usar solvente e foi desenvolvido no início dos anos 90 por Pawliszyn (Pawliszyn, 1997). Funciona de modo similar à extração líquido-líquido (LLE) excepto pela fase líquida orgânica ser substituída por uma fase estacionária – fibra revestida de sílica fundida. Esta fibra está contida dentro de uma seringa que providencia tanto a protecção como o fácil transporte da fase da fibra (Grob, Robert, 2004).

Quando este método de extração é usado em análises, em primeiro lugar a agulha da seringa é colocada dentro da solução de analito ou em *headspace* e em seguida a fibra revestida é exposta. Quando o sistema estiver em equilíbrio, a fibra é retraída de novo à seringa e esta é retirada do vial, onde está contida a amostra. A agulha é então transferida para o injetor e os analitos são dessorvidos termicamente para o interior do cromatógrafo gasoso (Figura 2).

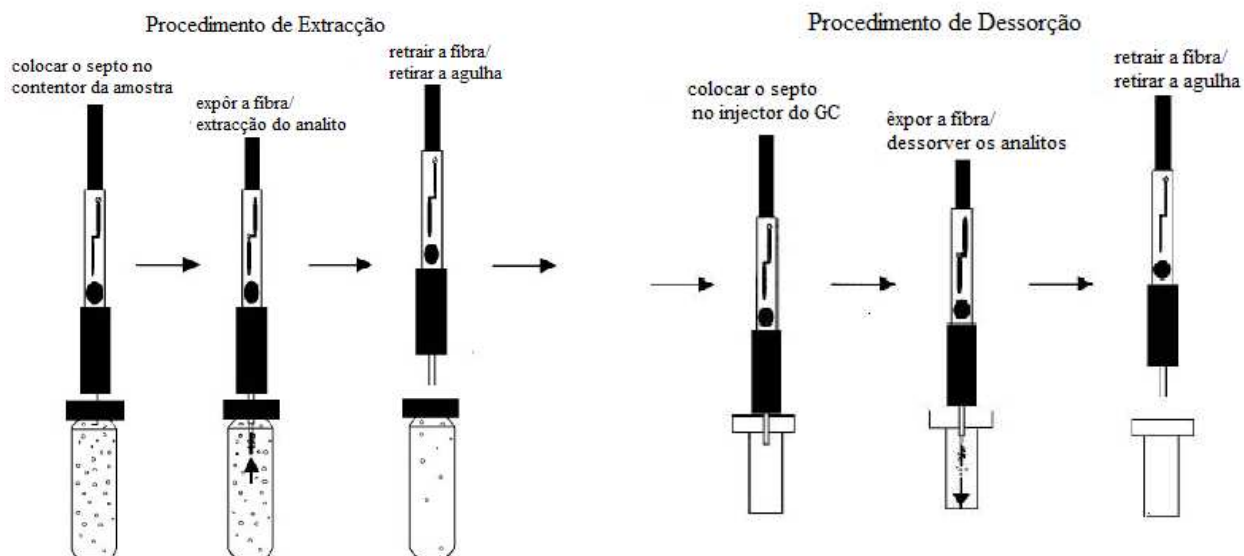


Figura 2. Esquema da microextração em fase sólida (SPME) em interface com a cromatografia gasosa (GC) (Supelco, 2008)

O sucesso deste método consiste na escolha das condições, de modo que o soluto favoreça o mais possível a camada de absorção do SPME na presença da amostra e consequentemente seja rápido e completamente libertado para análise cromatográfica. Deste modo vamos aprofundar a escolha destas condições.

- Escolha do revestimento da fibra

A escolha da fibra para extração envolve a escolha do revestimento da fibra e da espessura do mesmo revestimento. Em Anexo C, apresentam-se as fibras disponíveis comercialmente para SPME.

Na literatura existente sobre SPME pode-se verificar que em 80% dos casos se escolheu uma fibra de PDMS, este tipo de fibra é bastante útil porque o comportamento de extração em fibras de PDMS pode ser previsto a partir do comportamento de retenção nas colunas revestidas a PDMS (Grob, Robert, 2004).

As fibras requerem um condicionamento inicial, a uma temperatura e durante um período de tempo, especificados pelo seu fabricante (normalmente entre 210 e 320°C e entre 30 minutos a 4 horas), e que pode ser efectuado por dessorção no injetor do GC. Este procedimento não deve ser dispensado ao iniciar-se cada dia de trabalho,

para controlar o *carryover* (arrastamento de compostos ainda retidos na fibra, após a última amostra utilizada).

- Optimização do Volume a extrair

O volume da amostra é escolhido com base no coeficiente de partição do analito entre a matriz da amostra e o revestimento da fibra. Este detalhe foi descrito por Pawliszyn, J. (1997). O volume de amostra pode ser estimado com base no erro de medição pela equação (1),

$$V_s = \frac{100 K_{fs} V_f}{E} \quad (1)$$

onde V_s é o volume máximo de amostra para o máximo de sensibilidade, K_{fs} é o coeficiente de partição, V_f é o volume do revestimento da fibra e E é o erro percentual de medição. Quando se trabalha em *headspace* a forma do vial e o volume do *headspace* também têm um papel importante na determinação da quantidade e da taxa de extracção. Em SPME com *headspace*, uma vez que a quantidade do analito extraído para a fibra é muito menor que a quantidade existente no *headspace*, a capacidade do *headspace* deverá ser optimizada e será muito maior do que a capacidade da fibra.

- Optimização nas condições de dessorção

Na maioria dos casos a dessorção ocorre num injector *split/splitless*. Sob condições de *splitless*, com velocidades lineares baixas através do *glass liner*, a dessorção e o processo de transferência no injector é lenta, o que requer minutos e necessita de focagem da banda seguindo o processo de injeção. A temperatura de dessorção da fibra é escolhida segundo a temperatura máxima recomendada para o material de revestimento e experimentalmente optimiza-se o tempo de dessorção, tendo sempre em consideração a possibilidade de degradação térmica do analito (Grob, Robert, 2004).

- Escolha do modo de extracção e do método de agitação

Os principais problemas na escolha do modo de extracção e do método de agitação prendem-se com a natureza da amostra e da matriz. Do ponto de vista do tempo de vida da fibra, é preferível usar extracção em *headspace* (HS-SPME), mas as amostras deverão ser minimamente voláteis e não terem estabelecido ligações fortes com a matriz. Para amostras com volatilidade baixa, a imersão directa (ID-SPME) é o modo de extracção eleito, contudo, tem a desvantagem da diminuição do tempo de vida útil da fibra, se a matriz não for limpa.

O segundo ponto a ter em consideração ao escolher um modo de extracção é o equilíbrio *versus* extracção exaustiva. Em SPME, o equilíbrio de extracção é muito simples de executar, logo é comumente usado. A extracção exaustiva é utilizada quando o volume ou a concentração da amostra é muito baixo e em estudos físico-químicos.

Quanto ao método de agitação, a agitação magnética é o mais usado. Esta escolha é, em parte, determinada pela escolha do modo de extracção. Em extracções com *headspace*, a amostra geralmente não é agitada, enquanto que em extracções com imersão directa, o controlo do método de agitação tem um papel importante na determinação do tempo de equilíbrio e na reprodutibilidade das extracções. Os métodos de agitação para SPME, bem como as suas vantagens e desvantagens, estão sumarizados em Anexo C.

2.3.2. Cromatografia Gasosa (GC)

A cromatografia é sobejamente o método mais usado na análise de PBDEs. Uma vez que a principal diferença neste estudo é o detector usado, é sobre ele que se fará uma breve explicação.

O detector usado neste estudo, o detector de captura de electrões (ECD) é um detector de concentração, isto é, mede a concentração do soluto no gás de arraste.

O ECD é particularmente sensível a moléculas halogenadas, carbonilos conjugados, nitrilos, compostos nitrosos e compostos organometálicos, mas relativamente insensível a hidrocarbonetos, álcoois e cetonas (Harris, Daniel, 2004). Neste detector, o gás efluente é ionizado por uma corrente de partículas originada numa fonte radioactiva, tipicamente ^3H ou ^{63}Ni . Dessa forma, o gás de arraste produz uma

alimentação fixa de iões positivos e electrões livres, que pode ser medida como uma corrente estacionária entre dois eléctrodos carregados. Quando os componentes da amostra passam através do detector, a corrente estacionária poderá ser perturbada e estes são detectados pelo decréscimo de corrente estacionária. Os compostos que contêm átomos bastante electronegativos capturam electrões livres muito facilmente, o que ocorre devido ao aumento da taxa de recombinação de iões positivos e negativos, comparado com os iões positivos e os electrões (Peckson et al, 1986)

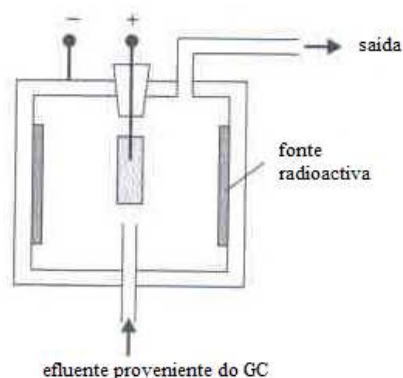


Figura 3. Esquema de um detector de captura de electrões (Extraída de Harris,D., 2004)

Apesar de existirem trabalhos em que se utiliza SPME para análise de PBDEs em águas, da bibliografia referenciada apenas um (Polo et al, 2004), estes não contemplam o estudo de incertezas analíticas, que constitui a principal inovação do presente trabalho.

3. Materiais e Métodos

3.1. Materiais

3.1.1. Padrões e Reagentes

O BDE-100 com 99,9% de pureza foi adquirido à Sigma-Aldrich (33681-1mL).

Os solventes utilizados para a preparação dos padrões foram n-hexano (para cromatografia gasosa), da Merck e etanol (*gradient grade* para HPLC), da Panreac. Usou-se também água destilada e desionizada do laboratório.

3.1.2. Equipamento para Microextração em Fase Sólida

Para o método de SPME foi utilizada uma fibra de 100 μm de polidimetilsiloxano (PDMS) e respectivo suporte (Figuras 4 e 5), ambos adquiridos à Supelco. Para agitação e controlo da temperatura de extração foi utilizada uma placa de aquecimento/agitação Corning, à qual foi acoplada um termómetro e um banho de óleo de silicone. Para efectuar as extracções, as amostras estavam contidas em vials de 15 mL com tampa roscada com septo, também da Supelco.



Figura 4. Fibra de PDMS



Figura 5. Suporte da Fibra

3.1.3. Equipamento Cromatográfico

Para análise das amostras utilizou-se um cromatógrafo gasoso (GC) Finnigan 9001 (Figura 6) equipado com uma coluna capilar J&W Scientific DB-5MS (30 m de comprimento x 0,53 mm de diâmetro interno x 1,5 µm de espessura do filme) e um detector de captura de electrões (ECD) de ^{63}Ni em conexão com um sistema de aquisição de dados informáticos, com software BORWIN 2.1.



Figura 6. Cromatógrafo Gasoso Finnigan 9001 com detector de captura de electrões (GC-ECD), usado no trabalho.

3.2. Métodos

3.2.1. Preparação dos padrões analíticos

A preparação dos padrões analíticos para injeção directa e para SPME tiveram procedimentos diferentes. Para injeção directa os padrões foram preparados numa gama entre 50 e 500 µg/L e para SPME os padrões foram preparados para uma gama entre 0,001 e 250 µg/L. O modo de preparação dos mesmos, bem como o volume necessário para cada um estão em Anexo D.

3.2.2. Procedimento de extracção

Para a extracção por SPME, a fibra de PDMS de 100 μm foi condicionada no injector do GC a 250°C durante uma hora, como especificado pelo fabricante. Sempre que necessário, procedeu-se a uma limpeza da fibra, avaliada por uma injeção em branco no cromatógrafo. O volume de amostra escolhido para extracção foi de 5 mL e os vials foram colocados na placa de aquecimento/agitação (Figura 7). As condições definidas para a extracção foram as seguintes: colocação da fibra em *headspace* durante 30 minutos, a uma temperatura controlada de 60°C e velocidade de agitação constante.

Após a extracção, o suporte da fibra foi colocado no injector do GC através do septo e a fibra foi mantida em dessorção por 3 minutos após o início de cada corrida.



Figura 7 – Fotografia do sistema de SPME.

3.2.3. Análise cromatográfica

Tanto para injeção directa de amostras como para a dessorção da fibra de SPME, a separação cromatográfica teve procedimento idêntico, apenas apresentando diferenças na forma de introdução da solução no cromatógrafo. Na introdução de amostras por injeção directa, estas foram inseridas recorrendo a uma micro-seringa, com um volume de injeção de 1 μL . Quanto à dessorção a fibra de SPME esta decorreu segundo o procedimento já referido anteriormente, no ponto 2.3.1.. Em ambos os casos a injeção decorreu em modo split/splitless com tempo de splitless de 1 minuto.

O gás de arraste era o azoto 99,999% de pureza, com pressão de entrada de 5 bar.

Tabela 3. Condições de operação do cromatógrafo

Temperaturas	Forno	100 °C
	Injector	280°C
	Detector ECD	300°C
Caudais	Gás de arraste	3 mL/min
	<i>Split Vent</i>	40 mL/min
	<i>ECD Make-Up</i>	15 mL/min
	ECD detector	45 mL/min

No que diz respeito ao programa de temperaturas, este foi alterado durante o decorrer do trabalho. Inicialmente, a temperatura do forno era de 130°C durante 1 minuto, seguido de um gradiente de temperatura de 12°C/min. até aos 235°C e atingida esta temperatura, o gradiente passou a ser de 2°C/min. até aos 280°C, sendo o tempo total de corrida de aproximadamente 33 minutos. Numa fase posterior do trabalho, o método de temperaturas foi alterado sendo a temperatura inicial do forno de 100°C, seguido de um gradiente de temperatura de 50°C/min. até aos 300°C, mantendo esta temperatura por 15 minutos. O tempo total de corrida foi de 20 minutos.

A metodologia seguida para os mecanismos de extracção e análise cromatográfica foi adaptada da descrita por Polo et al. (2004) e Martinez et al. (2005).

4. Resultados e Discussão

4.1. Ensaio Preliminares

A parte experimental deste trabalho iniciou-se com a aprendizagem da técnica de extracção de SPME, bem como da utilização do GC-ECD. Para o efeito começou-se por preparar padrões de compostos com comportamentos semelhantes ao BDE-100, no caso policloro-bifenilos (PCB-52). Realizaram-se ensaios com injeção directa e com injeção de padrões extraídos. Estes resultados não estão apresentados pois não fazem parte do âmbito da tese. Devido a alguns problemas na determinação do pico cromatográfico do PCB, associadas a algumas anomalias no funcionamento do equipamento, que tiveram de ser corrigidas, esta fase preliminar teve uma duração maior do que a prevista, tendo atrasado o restante trabalho.

A determinação do pico cromatográfico do BDE-100 foi efectuada por injeção directa no GC de um padrão de 1 mg/L em hexano e da própria solução comercial, após injeção de hexano puro para verificar o seu tempo de retenção. Durante esta determinação verificou-se que o programa de temperaturas usado inicialmente só atingia uma temperatura máxima de 280°C, motivo pelo qual não aparecia o pico do BDE-100, visto que este, provavelmente ficava retido na coluna (Figura 8). Ao elaborar um novo programa de temperaturas, este aspecto foi tido em conta, pelo qual se elevou a temperatura máxima do forno para 300°C (Figura 9). O brusco gradiente de temperaturas serve para diminuir o tempo de análise.

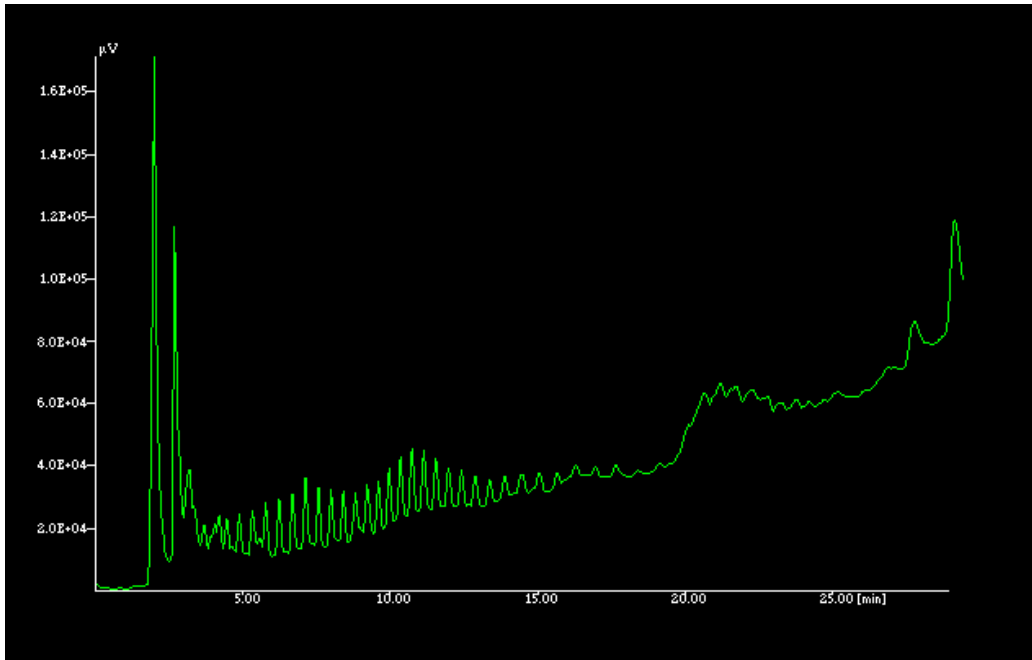


Figura 8. Cromatograma de um padrão de BDE-100 50 mg/L em isoctano; programa de temperaturas: 130°C durante 1 minuto, 12°C/min até aos 235°C e 2°C/min até aos 280°C.

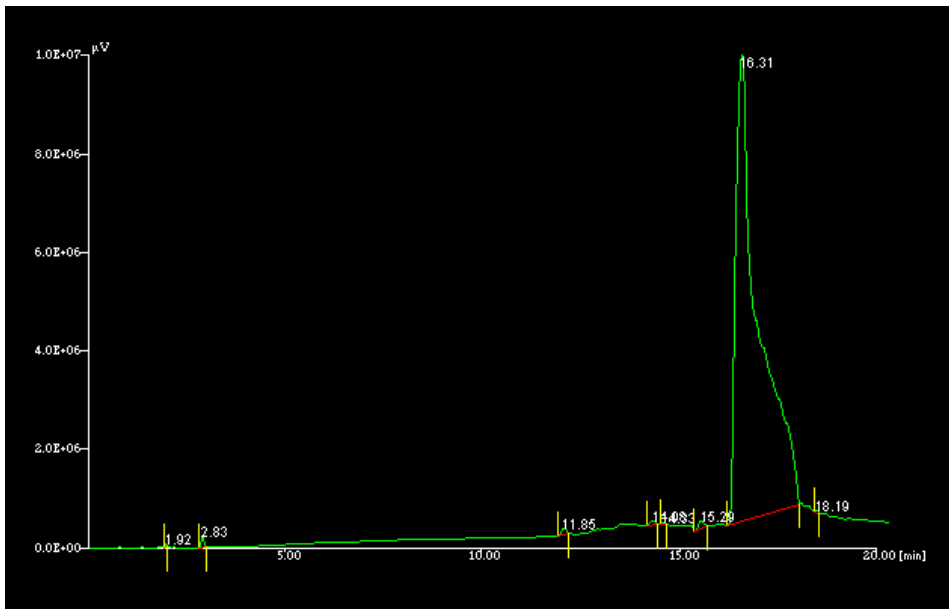


Figura 9. Cromatograma de um padrão de BDE-100 50 mg/L m isoctano; programa de temperaturas: 100°C, 50°C/min até aos 300°C, mantendo esta temperatura durante 15 minutos.

Após a determinação do pico cromatográfico procedeu-se à optimização do processo de extracção por SPME, tendo esta optimização incidido na escolha da fibra e na temperatura de extracção.

Na escolha da fibra para extracção foram testados dois tipos de fibras possíveis para a extracção de PBDEs, uma fibra de polidimetilsiloxano (PDMS) de 100 μm e a fibra de poliacrilato (PA) de 85 μm . Para efectuar este teste, realizou-se a extracção de um padrão de 50 $\mu\text{g/L}$, a 60°C durante 30 minutos. As áreas dos picos cromatográficos obtidas foram respectivamente 56706,30 e 32790,23 mV.min, como tal foi seleccionada a fibra de PDMS.

Na escolha da temperatura de extracção foram testadas três temperaturas diferentes, de modo a verificar qual das temperaturas permitia melhor quantidade de analito extraída. As temperaturas testadas foram 40°C, 60°C e 80°C e as extracções foram realizadas com uma fibra de PDMS durante 30 minutos, dentro de um banho de óleo de silicone. Segundo os resultados apresentados na Tabela 4, a temperatura que melhor permite a extracção é a temperatura mais elevada, tendo sido essa a escolhida na primeira fase deste trabalho. Porém, a escolha desta temperatura demonstrou não ser a mais adequada, pois sendo a matriz, a água, esta liberta vapor de água para a fibra. Numa segunda fase, seleccionou-se uma temperatura mais baixa, sendo as extracções realizadas a 60°C.

Esta não é de facto a temperatura utilizada por outros autores (Polo et al. (2004) e Sánchez-Prado et al (2005)) embora os meios disponíveis no laboratório não permitissem no momento a utilização de banhos termostáticos com controlo mais eficiente de temperatura.

Tabela 4. Valores médios das áreas dos picos cromatográficos para as temperaturas de 40, 60 e 80°C.

	Temperaturas (°C)		
	40	60	80
Valores médios das áreas dos picos cromatográficos (mV.min)	28 192, 53	56 706, 30	107 999, 04

As condições operatórias seleccionadas foram extracção com fibra de PDMS a uma temperatura de 60°C.

4.2. Validação do método analítico de determinação de BDE-100

O estudo de validação do método analítico para a quantificação de BDE-100 em amostras aquosas assentou na determinação da linearidade, do limite de detecção, da precisão e da exactidão. O objectivo da validação do método analítico é provar que este se adequa aos objectivos do trabalho. Este corresponde ao conceito actual de *fit-for-purpose*, em que não se pretende obter o melhor limite de detecção possível, a melhor precisão e melhor exactidão, mas antes verificar que estes parâmetros contribuem para uma incerteza global que se adequa aos fins em vista.

O facto de o BDE-100 estar em concentrações muito baixas nas amostras que têm de ser analisadas, obriga a proceder à concentração do analito até níveis detectáveis pelo instrumento de medição. Por esta razão acoplou-se a SPME com a cromatografia em fase gasosa com detector por captura de electrões.

Na figura 10 está representado um cromatograma de um padrão de BDE-100, nas condições operatórias optimizadas. O tempo de retenção médio do BDE-100 nas condições operatórias descritas foi 17,5 min \pm 1 min. Este tempo de análise apesar de poder parecer um tempo relativamente longo, em particular se se trata de analisar um só composto, é compatível com o tempo de extracção de 30 minutos de SPME, para estas condições de extracção por SPME e com o equipamento utilizado na análise cromatográfica.

Nesta fase procedeu-se à análise de 5 amostras de águas residuais provenientes de um plano de monitorização nacional de águas da zona Norte de Portugal. São águas superficiais de rios ou ribeiras que captam efluentes de indústrias com alta probabilidade de usarem PBDEs e por isso estão a ser vigiadas. É esperado que devido à sua rápida degradabilidade e decomposição fotolítica, estas substâncias não sejam detectadas em águas superficiais. Como podemos ver na Figura 11, não existem interferentes na proximidade do tempo de retenção.

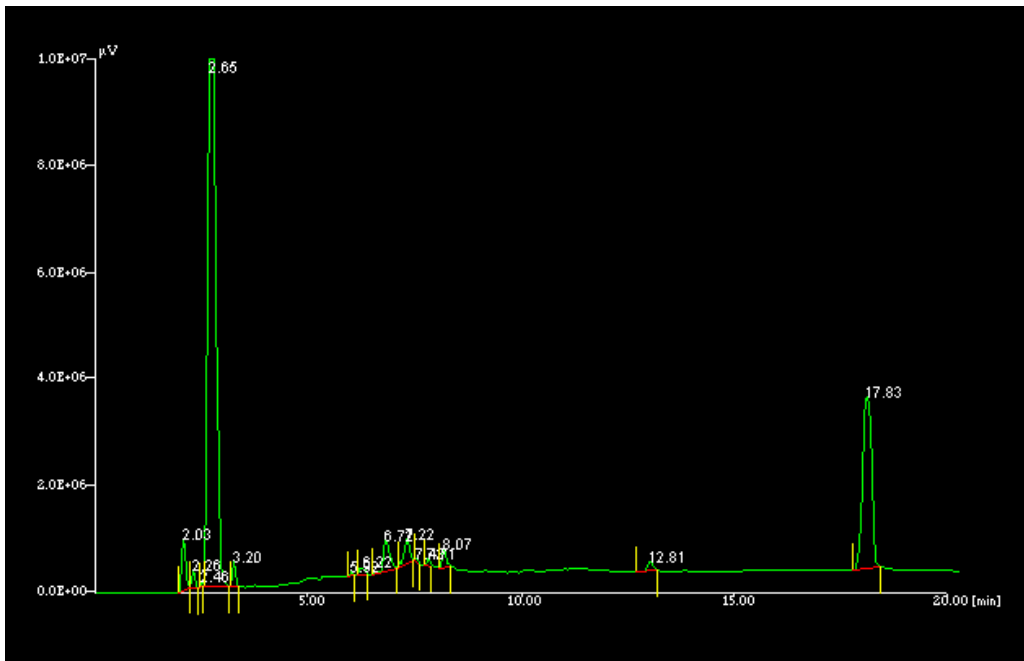


Figura 10. Identificação do BDE-100 através do cromatograma obtido por GC-ECD de um padrão extraído por SPME de 5 $\mu\text{g/L}$.

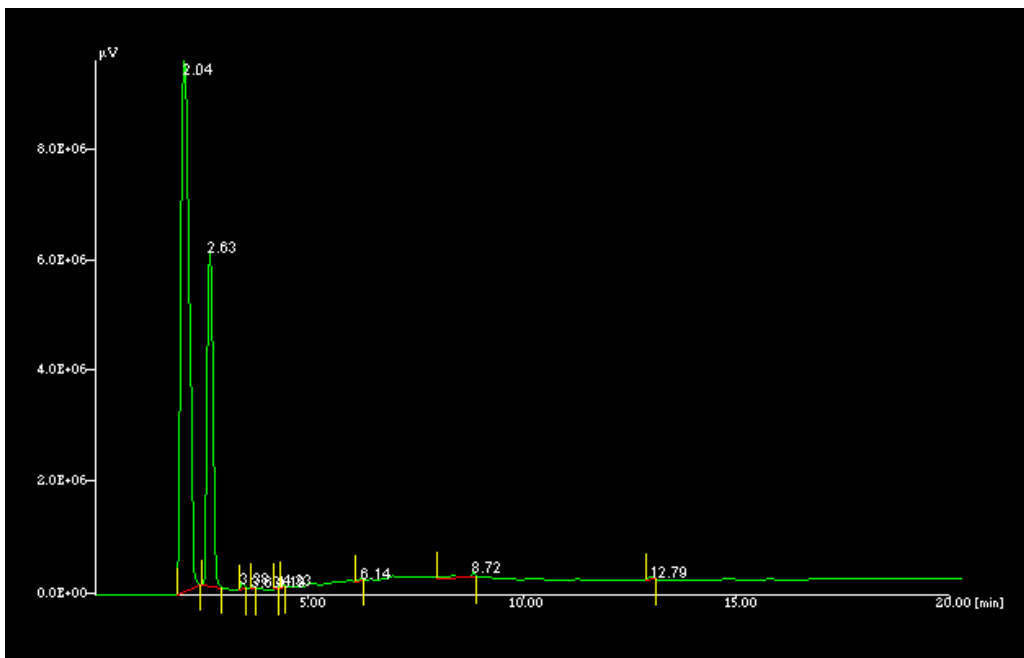


Figura 11. Identificação do BDE-100 através do cromatograma obtido por GC-ECD de uma água residual.

O passo seguinte da validação consistiu na avaliação da gama de linearidade de resposta do detector, obtida por injeção directa de padrões. A Figura 12 apresenta a recta de calibração obtida, a qual contudo não foi utilizada na quantificação de BDE-100. Os dados experimentais que conduziram á regressão linear da Figura 12 encontram-se no Anexo E e o cálculo dos parâmetros de linearidade estão apresentados em Anexo F.

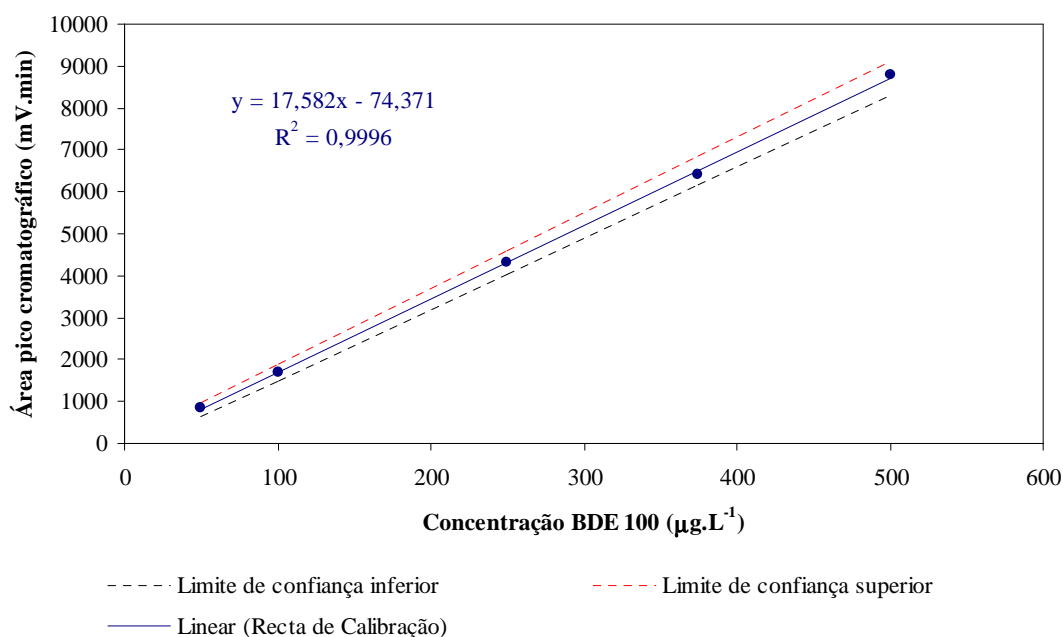


Figura 12. Curva de calibração de BDE-100 por SPME e respectivos limites de confiança e limite de detecção.

A quantificação de compostos vestigiais em amostras reais por SPME é normalmente conseguida pela aplicação do método do padrão externo, na qual a recta de calibração é construída pela preparação dos padrões de forma em tudo semelhante à preparação das amostras.

A utilização deste método, com a construção da recta de calibração apresentada na Figura 13, mostrou ser adequado para proceder à quantificação de BDE-100, uma vez que os parâmetros obtidos para a recta são aceitáveis, parâmetros esses apresentados no Anexo F. Entre eles destaca-se o coeficiente de correlação e as condições propostas por Miller e Miller (1998), que são:

1. A razão entre o desvio padrão do declive e o valor obtido, s_b/b , deve ser inferior ou igual a 5%; e
2. O intervalo de valores com limites da ordenada na origem subtraída do seu desvio padrão e a ordenada na origem somada do seu desvio padrão deve incluir o zero.

Estes parâmetros para a recta de calibração do BDE-100 apresentaram os seguintes valores: 3,76% para s_b/b , -1604,48 para $a-s_a$ e para -304,48 $a+s_a$, o que mostra que a recta obedece parcialmente aos critérios definidos. Dos 8 padrões extraídos, apenas 4 são apresentados na recta de calibração, uma vez que o padrão de 0,001 $\mu\text{g/l}$ não é detectado devido à sua concentração ser muito baixa e os padrões de 100 e 250 $\mu\text{g/l}$ também não são detectados devido à elevada quantidade de etanol presente, derivada do grande volume de solução mãe necessário (Anexo D) na preparação dos padrões. O padrão de 0,1 $\mu\text{g/L}$ foi desprezado numa fase posterior, uma vez que estando abaixo do limite de detecção não é correcto ele constar da recta de calibração. Deste modo a gama de linearidade do método foi entre 1 e 50 $\mu\text{g/L}$.

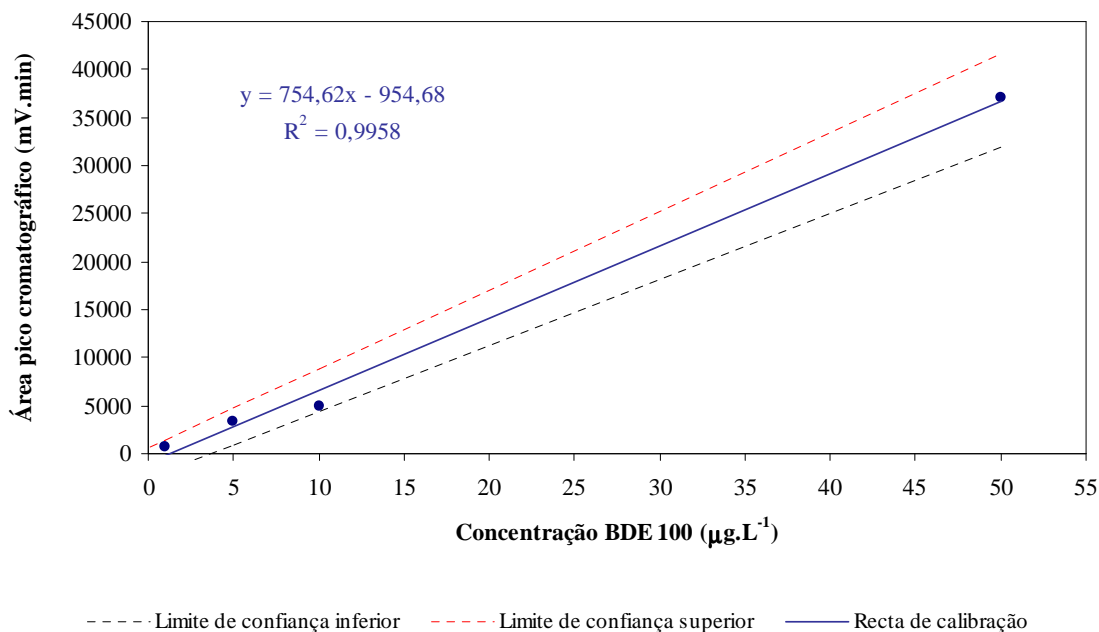


Figura 13. Curva de calibração de BDE-100 para injeção directa e respectivos limites de confiança e limite de detecção

Com base na recta de calibração determinou-se o limite de detecção do método (LD), baseado na razão sinal/ruído, sendo de 0,77 µg/L. Existem várias metodologias de determinação do LD entre as quais figuram a avaliação do LD através da razão sinal: ruído superior a 3. Neste caso o LD seria próximo do padrão de concentração mais baixa, pelo que se optou por manter este padrão dentro da gama de linearidade.

A precisão do método foi avaliada através da repetibilidade do padrão de 5 µg/L. O coeficiente de variação, calculado como a razão do desvio padrão pelo valor médio obtido em 5 amostras, foi, de 8 % (dados em Anexo E). Por falta de tempo não foi possível avaliar a precisão do método a níveis de concentração mais baixos (próximos do limite de detecção) e mais altos (no topo do intervalo de linearidade).

Para avaliar a exactidão, não tendo sido possível realizar ensaios de amostras reais adicionadas de padrão, optou-se por calcular a percentagem de recuperação através da razão entre a área do pico obtida experimentalmente e a área calculada pela recta de calibração, para o padrão de 5 µg/L. A recuperação média (5 ensaios) foi de 36,30% com o coeficiente de variação de 8%. Esta recuperação não apresenta valores muito aceitáveis uma vez que a própria recta de calibração é também obtida com padrões extraídos, ou seja, as condições de extracção são semelhantes. Tal facto significa que podem existir efeitos complementares no processo cromatográfico, como seja, a deficiente dessorção do analito na fibra durante a injeção. Este aspecto justifica a realização de mais ensaios, a concentrações diferentes, para comprovar esta teoria.

Comparando estes valores com os obtidos por outros autores (Polo et al, 2004) com a mesma metodologia pode considerar-se o método desenvolvido adequado, embora este ainda careça de futuras optimizações, quer na temperatura de extracção, como no volume de extracção e no tempo de extracção.

4.3. Incerteza global do método

A avaliação da incerteza global associada ao resultado da análise reveste-se de importância crucial, em particular se se tratam de compostos vestigiais, em que as incertezas analíticas assumem proporções significativas. Ao estimar a incerteza global associada a um resultado, avaliam-se as fontes de erro inerentes ao método e, conseqüentemente, a sua aptidão para a respectiva análise, tanto mais quanto mais

próxima for a concentração do limite de detecção, maior será a incerteza associada à sua determinação (Brás, I.P.L., 2005).

A incerteza é um parâmetro que está associado a um resultado de uma medição e que indica a gama de valores que pode ser razoavelmente atribuída a esse resultado, o que não corresponde ao respectivo erro. Este último representa a diferença entre o resultado e o valor real para o parâmetro medido. A incerteza de um método tem origem na amostragem, interferências ou efeitos de matriz na amostra, das condições ambientais, do equipamento de medição, dos valores de referência, das aproximações e suposições incorporadas no método e procedimentos de cálculo, assim como em variações aleatórias associadas aos procedimentos (EURACHEM, 2000).

Embora existam várias aproximações para o cálculo da incerteza (Ratola et al, 2006), o método seguido no presente trabalho assenta no cálculo da incerteza global, U , através do procedimento preconizado pela Eurachem.

Actualmente existem vários processos para estimativa da incerteza associada a um resultado analítico. A metodologia conhecida como *bottom-up* é aquela preconizada pelo Guia Eurachem (Eurachem, 2000) em que se recorre aos resultados da validação para estimar as contribuições mais significativas para a incerteza. É um processo de cálculo moroso, por vezes correspondendo a uma sobreavaliação da incerteza, mas que apresenta a vantagem de se poder reconhecer a variação da incerteza para as várias concentrações.

Um outro processo muito simples e prático para estimar a incerteza está descrito há mais de 20 anos por Horwitz, o qual juntou dados de mais de 1500 ensaios interlaboratoriais e obteve a seguinte curva (curva de Horwitz).

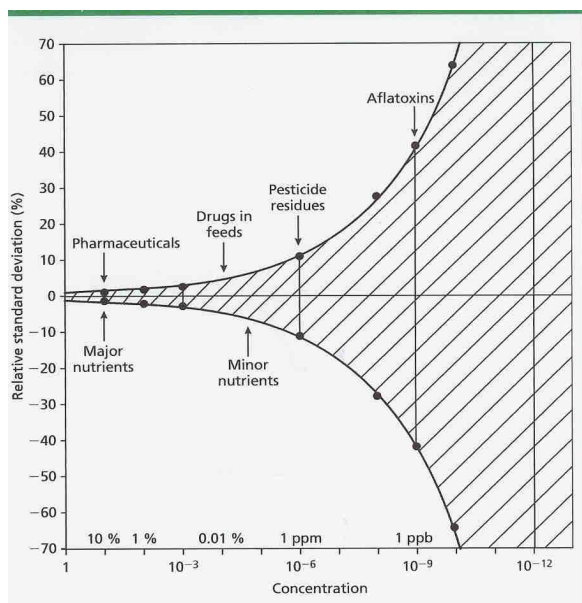


Figura 14. Curva de Horwitz (extraída de Meyer, V.R.)

Através desta curva, Horwitz derivou a seguinte equação $s_R = 0,02 \times C^{0,85}$, em que C é a concentração expressa em percentagem. Para a gama de concentrações estudada (entre 1 e 50 $\mu\text{g/L}$) a incerteza deverá ser da ordem de 8%.

Tabela 5. Valores da incerteza associada à recta de calibração por SPME, calculados através da equação de Horwitz.

Concentração ($\mu\text{g/L}$)	Concentração (%)	s_R	CV (%)
1	0,01	0,000399	3,99
50	0,5	0,011	2,21

O cálculo da incerteza global, U , foi efectuado para todos os padrões preparados, no que diz respeito à determinação da incerteza associada à preparação dos padrões, U_1 , e à incerteza associada à construção da curva de calibração, U_2 , e para o padrão de 5 $\mu\text{g/L}$ para a incerteza associada à precisão, U_3 , e à exactidão, U_4 .

Na tabela 6 estão apresentadas as incertezas relativas calculadas para cada padrão das quais pode constatar-se que a incerteza associada à curva de calibração é a que contribui maioritariamente para a incerteza global do método na gama de

concentrações mais baixa. Para concentrações superiores, acima de aproximadamente 10 $\mu\text{g/L}$, a incerteza associada à precisão e à exactidão passam a ser mais significativas.

Tabela 6. Resultados do cálculo das incertezas calculadas para os vários padrões.

C ($\mu\text{g/L}$)	U1	U2	U3	U4	U	U(%)
1	0,026	1,27	0,0357	0,091	1,27	127
5	0,026	0,26	0,0357	0,091	0,28	28
10	0,031	0,13	0,0357	0,091	0,17	17
50	0,031	0,03	0,0357	0,091	0,11	11

Da análise do gráfico apresentado na figura 15 atesta-se que na gama de concentrações estudadas, a incerteza global tem um valor aproximadamente constante entre 10 e 20%, aumentando drasticamente para concentrações inferiores a 5 $\mu\text{g/L}$, atingindo 127% para o padrão de 1 $\mu\text{g/L}$.

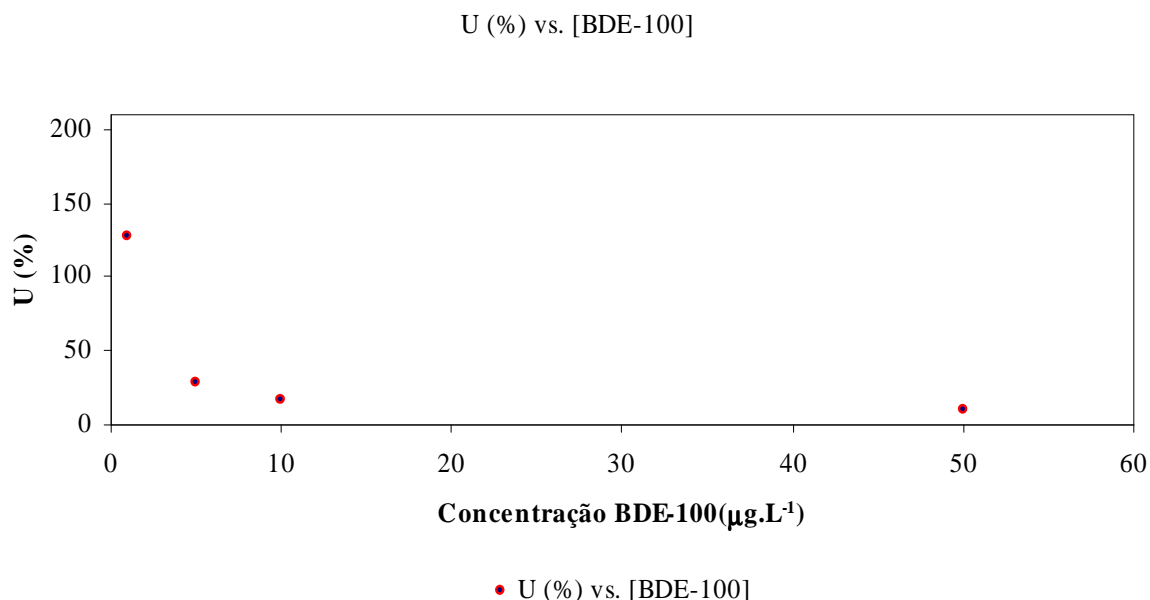


Figura 15. Variação da incerteza do resultado analítico com a concentração dos padrões

Na bibliografia não se encontram referências para valores de incerteza global associada a determinações por SPME/GC-ECD.

5. Conclusões

O objectivo principal deste trabalho era a implementação de um método de análise de éter pentabromodifenílico por SPME-GC/ECD. Não se pretendia contudo atingir os níveis de detecção permitidos por lei, validando apenas alguns estudos encontrados na literatura. Sendo este um assunto bastante recente não há um método de determinação aconselhado, embora a cromatografia gasosa com espectroscopia de massa seja, de longe, a mais utilizada. Esta técnica necessita de operadores especializados, tornando-se, deste modo, mais cara. Para a preparação das amostras foi utilizada a microextração em fase sólida, também uma técnica bastante recente e com a principal vantagem de eliminar solventes orgânicos da análise.

As condições de extração foram optimizadas e concluiu-se que a melhor fibra para a extração destes compostos é a fibra de PDMS e a uma temperatura de 60°C. O programa de temperaturas (temperatura do forno a 100°C, seguido de 50°C/min. até aos 300°C, permanecendo a esta temperatura durante 15 minutos) utilizado permitiu a diminuição do tempo de corrida e foi compatível com o tempo de extração.

Na validação do método de análise, as condições de linearidade obedecem parcialmente aos critérios propostos por Miller e Miller, 1998. Quanto à gama de linearidade, entre 1 e 50 µg/L, esta não seria a desejada, mas devido ao tempo reduzido do trabalho não foi possível trabalhar mais neste ponto. A precisão do método, avaliada na injeção de 5 amostras consecutivas, foi de 8% e uma vez mais só foi avaliada para o padrão de 5 µg/L, por não ter havido tempo de avaliar as concentrações próximas do limite de detecção e no topo do intervalo de linearidade. Quanto à exactidão, pelo mesmo motivo, só foi avaliada no padrão de 5 µg/L e a recuperação média, em 5 ensaios, foi de 36,30%, com coeficiente de variação de 8%. Não apresenta resultados muito aceitáveis, uma vez que a recta de calibração, por si, já resulta de padrões extraídos. Tal facto significa que podem existir efeitos complementares no processo cromatográfico, como seja, a deficiente dessorção do analito na fibra durante a injeção. Este aspecto justifica a realização de mais ensaios, a concentrações diferentes, para comprovar esta teoria.

Quanto à incerteza global do método pode-se constatar que a incerteza associada à recta de calibração é a que mais contribui para a incerteza global, nos padrões abaixo de 10 µg/L, enquanto que, nos padrões acima desta concentração, a influência da

incerteza associada à exactidão e a incerteza associada à precisão começam a ser mais significativas. Pode-se também dizer que na gama de concentrações estudadas, a incerteza global tem um valor aproximadamente constante entre 10 e 20%, aumentando drasticamente para concentrações inferiores a 5 µg/L, atingindo 127% para o padrão de 1 µg/L.

Em suma, este é um trabalho que pretendeu ser uma primeira abordagem ao método de análise por SPME-GC/ECD, havendo muito mais a trabalhar neste campo. Contudo, os resultados obtidos são considerados aceitáveis para o objectivo do trabalho proposto.

Referências Bibliográficas

1. Alae, M., Backus, S., Cannon, C., Potential interference of PBDEs in the determination of PCBS and other organochlorine contaminants using electron capture detection , Journal of Separation Science, 24, 465-469, 2001
2. Anónimo, 2008, www.oregon.com, acessado em Janeiro de 2008
3. ATSDR , 2004, www.atsdr.cdc.gov, acessado em Janeiro de 2008
4. Björklund, J., Tollbäck, P., Hiarne, C., Östman, C., Large volume injection GC-MS in electron capture negative ion mode utilizing isotopic dilution for the determination of polybrominated diphenyl ethers in air, Journal of Separation Science, 26, 1104-1110, 2003a
5. Björklund, J., Tollbäck, P., Hiarne, C., Dyremarck, E., Östman, C., Automated rotary valve injection for polybrominated diphenyl ethers in gas chromatography, Journal of Separation Science, 26, 594-600, 2003b
6. Björklund, J., Tollbäck, P., Hiarne, C., Dyremarck, E., Östman, C., Instrumental methods and challenges in quantifying polybrominated diphenyl ethers in environmental extracts: a review, Journal of Chromatography A, 1041, 201-210, 2004
7. Braekvelt, E., Tittlemier, S.A., Tomy, G.T., Direct measurement of octanol-water partition coefficients of some environmentally relevant brominated diphenyl ether congeners, Chemosphere, 51, 563 – 567, 2003
8. Brás, I.P.L., Utilização de Casca de Pinheiro como Adsorvente para a Remoção de Pentaclorofenol de Águas Contaminadas, Tese de Doutorado em Engenharia Química, FEUP, 2005

9. Covaci, A., Gheorghe, A., Voorspoels, S., Maervoet, J., Steen Redeker, E., Blust, R., Schepens, P., Polybrominated diphenyl ethers, polychlorinated biphenyls and organochlorine pesticides in sediment cores from the Western Scheldt river (Belgium), *Environmental Int*, 31, 367-375, 2005
10. Covaci, A., Voorspoels, S., Ramos, L., Neels, H., Blust, R., Recent developments in the analysis of brominated flame retardants and brominated natural compounds, *Journal of Chromatography A*, 1153, 145-171, 2007
11. Debrauwer, L., Riu, A., Jouahri, M., Rayhahao, E., Jouanin, I., Antignac, J.P., Cariou, R., Le Bizec, B., Zalko, D., Probing new approaches using atmospheric pressure photo ionization for the analysis of brominated flame retardants and their related degradation products by liquid chromatography–mass spectrometry, *Journal of Chromatography A*, 1082, 98-109, 2005
12. ENVIRON, 2003, www.vironcorp.com, acessido em Janeiro de 2008
13. Environment Agency, 2005, www.environment-agency.gov.uk, acessido em Janeiro de 2008
14. Eurachem/Citac Guide Quantifying Uncertainty in Analytical Measurement, Ellison, Rosslein and Williams Editors, 2ª edição, 2000
15. Grob, R., *Modern Practice of gás chromatography*, Wiley_Interscience, 4ª edição, 2004
16. Harris, D., *Quantitative chemical analysis*, Oxford, University Press, 2004
17. Horwitz, W., *Analytical Chemistry*, 57, 67A, 1982

18. Huwe, J.K., Lorentzen, M., Thuresson, K., Bergman, Å., Analysis of mono- to deca-brominated diphenyl ethers in chickens at the part per billion level, *Chemosphere*, 46, 635-640, 2002
19. Korytar, P., Covaci, A., Leonards, P.E.G., Bóer, J. de, Brinkman, U.A.Th., Accumulation, tissue-specific distribution and debromination of decabromodiphenyl ether (BDE209) in European starling (*Sturnus vulgaris*), *Environmental Pollution*, 148, 648-653, 2007
20. Llorca-Porcel, J., Martínez-Sánchez, G., Alvarez, B., Cobollo, M.A., Valor, I., Analysis of nine polybrominated diphenyl ethers in water samples by means of stir bar sorptive extraction-thermal desorption-gas chromatography-mass spectrometry, *Analytica Chimica Acta*, 569, 113-118, 2006
21. Martinez, A., Ramil, M., Montes, R., Hernanz, D., Rubí, E., Development of a matrix solid-phase dispersion method for the screening of polybrominated diphenyl ethers and polychlorinated biphenyls in biota samples using gas chromatography with ECD, *Journal of Chromatography A*, 1072, 83-91, 2005
22. Meyer, V. R., Minimizing the effect of sample preparation on measurement uncertainty, *LC-GC, Europa*, Julho, 2-5, 2002
23. Miller, J.C., Miller, J.N., *Statistics for Analytical Chemistry*, Prentice Hall, 3ª edição, ISBN-10: 0130309907, 1993
24. Pawliszyn, J., *Solid Phase Microextraction Theory and Practice*, Wiley, Nova Iorque, 1997
25. Peckson, R.L., Shields, L.D., Cairns, T., McWilliam, I.G., *Modern methods of chemical analysis*, John Wiley & Sons, 2ª edição, 1986

26. Polo, M., Gómez-Noya, G., Quintana, J.B., Llompart, M., Garcia-Jares, C., Cela, R., Development of a solid-phase microextraction gás chromatography/tandem mass spectrometry method for polybrominated diphenyl ethers and polybrominated biphenyls in water samples, *Analytical Chemistry*, 76, 1054-1062, 2004
27. Ratola N., Santos L., Herbert P. and Alves A., Uncertainty associated to the analysis of organochlorine pesticides in water by solid-phase microextraction/gas chromatography-electron capture detection - Evaluation using two different approaches, *Analytica Chimica Acta*, 573, 202-208, 2006
28. Salgado-Petinal, C., Llompart, M., Garcia-Jares, C., Garcia-Chao, M., Cela, R., Simple approach for the determination of brominated flame retardants in environmental solid-phase microextraction followed by gás chromatography-tandem mass spectrometry, *Journal of Chromatography A*, 1124, 139-147, 2006
29. Sánchez-Prado, L., González-Barreiro, C., Lores, M., Llompart, M., Garcia-Jones, C., Cela, R., Photochemical studies of a polybrominated diphenyl ethers (PBDEs) technical mixture by solid phase microextraction (SPME), *Chemosphere*, 60, 922-928, 2005
30. Sigma-Aldrich, www.sigmaaldrich.com, acessado em Janeiro de 2008
31. Stapleton, H., Dodder, N.G., Offenber, J.H., Schantz, N.M., Wise, S.A., Polybrominated Diphenyl Ethers in House Dust and Clothes Dryer Lint, *Environmental Science & Technology*, 39, 925-931, 2005
32. Stapleton, H., Instrumental methods and challenges in quantifying polybrominated diphenyl ethers in environmental extracts: a review, *Analytica Bioanalytical Chemistry*, 386, 807-817, 2006

33. Sjödin, A., Patterson, D.G., Bergman, Å, Brominated Flame Retardants in Serum from U.S. Blood Donors, *Environmental Science & Technology*, 35, 3830-3833, 2001
34. Tittlemier, S.A., Halldorsom, T., Stern, G.A., Vapor pressures, aqueous solubilities, and Henry's Law constants of some brominated flame retardants, *Environmental Toxicology and Chemistry*, 21, 1804 – 1810, 2002
35. UNEP, Draft Risk Profile Pentabromodiphenyl ether, Agosto de 2006
36. Varian, Application Note, Fast, Sensitive, and Selective Determination of Polybrominated Diphenylethers by Tandem Mass Spectrometry, Nº 75, Setembro de 2004
37. Voorspoels, S., Covaci, A., Schepens, P., Polybrominated Diphenyl Ethers in Marine Species from the Belgian North Sea and the Western Scheldt Estuary: Levels, Profiles, and Distribution, *Environmental Science & Technology*, 37, 4348-4357, 2003
38. Voorspoels, S., Covaci, A., Maervoet, J., Schepens, P., PBDEs in marine and freshwater sediments from Belgium: levels, profiles and relations with biota, *Journal of Environmental Monitoring*, 6, 914-918, 2004
39. Yusa, V., Pastor, A., Guardia, M. de la, Microwave-assisted extraction of polybrominated diphenyl ethers and polychlorinated naphthalenes concentrated on semipermeable membrane devices, *Analytica Chimica Acta*, 565, 103-111, 2006
40. WHO, www.who.int, acessado em Janeiro de 2008

Anexo A. Propriedades Físico-Químicas dos PBDEs

Tabela 7. Principais características físico-químicas do pentaBDE (mistura comercial)

Propriedade		PentaBDE	Fonte
Fórmula química		$C_{12}H_{10-y}Br_yO$ onde $y = 4 - 6$	WHO, 1994
Peso molecular		Mistura	ATSDR, 2004
Cor		Incolor	WHO, 1994
Estado Físico		Líquido viscoso	
Ponto de Fusão		-7 a -3°C	ENVIRON, 2003
Ponto de Ebulição		> 300°C , a decomposição começa acima dos 200°C	WHO, 1994 ENVIRON, 2003
Densidade		2,28 g/mL a 25°C	WHO, 1994
Solubilidade	Água	13,3 µg/L	ENVIRON, 2003 EU, 2001
	Solventes Orgânicos	10 g/kg em metanol Miscível em tolueno e diclorometano	EU, 2001
Log K_{ow}		6,57	ENVIRON, 2003
Log K_{oc}		4,89 – 5,10	
Pressão de Vapor		$3,5 \times 10^{-7}$ a 25°C	ENVIRON, 2003
Constante de Henry (H)		$1,2 \times 10^{-5}$; $1,2 \times 10^{-6}$; $3,5 \times 10^{-6}$	ATSDR, 2004
Temperatura de ignição		Decompõe-se acima dos 200°C	ENVIRON, 2003

Anexo B. Frases de Risco (R) e de Segurança (S) e Símbolos de Risco para o BDE-100

- Frases de Risco (R)

R11 – Facilmente inflamável

R38 – Irritante para a pele

R50/53 – Muito tóxico para os organismos aquáticos, podendo causar efeitos nefastos a longo prazo no ambiente aquático.

R65 – Nocivo: pode causar danos nos pulmões se ingerido

R67 – Pode provocar sonolência e vertigens, por inalação dos vapores

- Frases de Segurança (S)

S60 – Este produto e seu recipiente devem ser eliminados como resíduos perigosos

S61 – Evitar a libertação para o ambiente. Obter instruções específicas/ fichas de segurança

S62 – Em caso de ingestão, não provocar o vômito. Consultar imediatamente um médico e mostrar-lhe a embalagem ou o rótulo

- Símbolos de Risco

Tabela 8. Símbolos de Risco para o BDE-100

Símbolo de Risco e Nome	Significado (Definição e Precaução)
 <p>F (Facilmente inflamável)</p>	<p>Classificação: Substâncias e preparações: que podem aquecer e finalmente inflamar-se em contacto com o ar a uma temperatura normal sem fornecimento de energia, ou sólidas, que podem inflamar-se facilmente por uma breve acção de uma fonte de inflamação e que continuam a arder ou a consumir-se após o afastamento da fonte de inflamação, ou no estado líquido, cujo ponto de inflamação é inferior a 21 °C, ou gasosas, inflamáveis em contacto com o ar a pressão normal, ou que, em contacto com a água ou o ar húmido, desenvolvem gases facilmente inflamáveis em quantidades perigosas; Materiais altamente inflamáveis, gases inflamáveis, combustíveis líquidos.</p> <p>Precaução: evitar contato com materias ignitivos (ar, água).</p>
 <p>Xn (Nocivo)</p>	<p>Classificação: Substâncias e preparações que, por inalação, ingestão ou penetração cutânea, podem implicar riscos de gravidade limitada;</p> <p>Precaução: deve ser evitado o contato com o corpo humano, assim como a inalação dessa substância.</p>
 <p>N (Perigoso para o ambiente)</p>	<p>Definição: A libertação dessa substância no meio ambiente pode provocar danos ao ecossistema a curto ou longo prazo</p> <p>Manuseio: devido ao seu risco em potencial, não deve ser liberado em encanamentos, no solo ou no ambiente. Tratamentos especiais devem ser tomados!</p>

Anexo C. Informações relativas ao SPME

Tabela 9. Fibras disponíveis comercialmente para SPME (Adaptada da SUPELCO/Sigma-Aldich)

Fibra	Espessura do filme (μm)	Aplicação
Polidimetilsiloxano (PDMS)	100	Analitos voláteis semi-polares e apolares
PDMS	30	Analitos voláteis e semi-voláteis semi-polares e apolares
PDMS	7	Analitos menos voláteis semi-polares e apolares
PDMS/divinilbenzeno (PDMS/DVB)	65	Compostos voláteis, aminas
PDMS/DVB	60	HPLC
Poliacrilato (PA)	85	Analitos altamente e moderadamente polares
Carboxen/PDMS	75	Analitos muito voláteis
Carboxen/PDMS	95	Analitos muito voláteis
Carboxen/DVB	50/30	Compostos odoríferos
Carbowax/DVB	70	Compostos polares
Carboxen/resina modelo	50	HPLC
DVB/Carboxen	50/30	Compostos voláteis e perfumados

Tabela 10. Sumário dos métodos de agitação para SPME

Método	Vantagens	Desvantagens
Estático (sem agitação)	Simples, actua bem em fases gasosas	Limitada a analitos voláteis e a HS-SPME
Agitação magnética	Equipamento comum, bom desempenho	Requer uma barra magnética no interior do vial
<i>Intrusive stirring</i>	Muito bom desempenho	Dificuldade em selar a amostra
<i>Vortex/moving vial</i>	Bom desempenho, não necessita de uma barra magnética no interior do vial	Tensão na fibra e na agulha
Movimento da fibra	Bom desempenho, não necessita de uma barra magnética no interior do vial	Tensão na fibra e na agulha, limitado a pequenos volumes de amostra
<i>Flowthrough</i>	Boa agitação a fluxos elevados	Potencial para contaminação cruzada, requer caudais constantes
Ultra sons	Tempos muito baixos de extracção	Barulhento, aquece a amostra

Anexo D. Preparação dos padrões para análise

Para a análise cromatográfica por injeção directa preparou-se, inicialmente, uma solução-mãe de 1 mg/L em hexano, uma vez que este solvente é um dos referidos na literatura e disponível no laboratório. A partir da solução-mãe, prepararam-se as soluções de 500, 375, 250, 100 e 50 µg/L, também em hexano. Para um volume de 1 mL, os volumes de BDE100 necessários para cada diluição estão descritos na Tabela 11.

Tabela 11. Volume de BDE-100 para cada diluição para um volume final de 1 mL .

Concentração (µg/L)	Volume de BDE-100 (mL)
500	500
375	375
250	250
100	100
50	50

Para a preparação dos padrões para SPME, preparou-se uma solução-mãe de 500 µg/L em etanol. As soluções filhas foram diluídas em água destilada, em balões volumétricos. Os volumes dos balões e os volumes retirados para cada diluição estão referidos na Tabela 12.

Tabela 12. Volumes preparados e necessários para cada diluição, para SPME.

Concentração (µg/L)	Volume de BDE-100 (mL)	Volume do balão (mL)
250	12,5	25
100	5	25
50	5	50
10	0,5	25
5	0,250	25
1	0,05	25
0,1	0,01	50

O padrão de 0,001 µg/L foi preparado a partir do padrão de 0,1 µg/L, retirando 250 µL para um balão volumétrico de 25 mL, em hexano.

Anexo E. Resultados obtidos na quantificação dos padrões de BDE-100

Nas tabelas seguintes apresentam-se os resultados obtidos na análise dos padrões preparados para a realização das rectas de calibração, quer por injeção directa, quer por SPME, bem como os resultados da repetibilidade do padrão de 5 µg/L, considerando 5 extracções consecutivas deste padrão.

Tabela 13. Resultados obtidos na análise dos padrões preparados para a obtenção da recta de calibração por injeção directa.

[BDE-100] (µg/L)	Área média do pico cromatográfico (mV.min)	Desvio padrão	CV (%)
50	845,37	7,48	0,88
100	1680,63	139,92	8,33
250	4302,13	1,56	0,04
375	6420,45	902,20	14,05
500	8796,27	1311,31	14,91

Tabela 14. Resultados obtidos na análise dos padrões preparados para a obtenção da recta de calibração por SPME.

[BDE-100] (µg/L)	Área média do pico cromatográfico (mV.min)	Desvio padrão	CV (%)
0,001	n.d.	----	----
0,1	500,26	7,77	1,55
1	642,76	420,37	65,40
5	3347,89	*	*
10	4963,34	*	*
50	37031,95	31838,15	85,97
100	n.d.	--	--
250	n.d.	--	--

Tabela 15. Resultados obtidos para a repetibilidade para o padrão de 5 µg/L.

Extracção	Área do pico cromatográfico (mV.min)	Desvio Padrão	CV (%)
1	1407,44	110,28	7,99
2	1157,90		
3	1432,83		
4	1380,51		
5	1375,56		

Anexo F. Estudo da Linearidade

F.1. Estudo da Linearidade para a recta de calibração por injeção directa

A partir dos dados da Tabela 13 pode-se construir a recta de calibração, indicada abaixo, e calcular os parâmetros da Tabela 16.

$$\text{Área do pico cromatográfico (mV.min)} = 17,582 \times [\text{BDE-100}] - 74,371$$

Tabela 16. Parâmetros necessários para o estudo da linearidade da resposta do GC-ECD por injeção directa.

	x_i	y_i	$y_{cal.}$	x_i^2	$\left(x - \bar{x}\right)^2$	$\left(y - y_{cal.}\right)^2$
	50	845,37	804,7290	2500	42025,00	1651,43
	100	1680,63	1683,8290	10000,0000	24025,00	10,25
	250	4302,13	4321,1290	62500,0000	25,00	360,96
	375	6420,45	6518,8790	140625,0000	14400,00	9687,60
	500	8796,27	8716,6290	250000,0000	60025,00	6342,89
Média	250	--	--	--	--	--
Soma	--	--	--	465625,0000	140500,0000	18053,13

Com,

$$y_{cal.} = 17,582 \times x_i - 74,371$$

e,

$$s_{y/x} = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^N (y_i - \bar{y})^2}{N - 2}} = 77,574$$

sendo,

$y_{cal.}$ \equiv valores das áreas de OTA calculadas, para cada valor de x_i , com base na recta de calibração;

y_i \equiv valores das áreas de OTA obtidos experimentalmente;

x_i \equiv concentração do padrão i ($i \in [1;7]$);

$s_{y/x}$ \equiv desvio padrão residual;

N \equiv número de pontos experimentais ($N=7$);

\bar{x} \equiv média dos valores de concentração dos padrões;

\bar{y} \equiv média dos valores das área obtidas experimentalmente.

Os parâmetros do estudo da linearidade foram determinados para um nível de confiança de 95% e com base nas seguintes equações:

$$s_a = s_{y/x} \times \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^N x_i^2}{N \times \sum_{i=1}^N (x_i - \bar{x})^2}} = 63,155$$

$$a + s_a = -11,2156$$

$$a - s_a = -137,526$$

$$s_b = \frac{s_{y/x}}{\sqrt{\sum_{i=1}^N (x_i - \bar{x})^2}} = 0,207$$

$$\frac{s_b}{b} (\%) = \frac{0,207}{17,582} \times 100 = 1,12\%$$

$$t_{student} = 2.353$$

onde, s_a e s_b são, respectivamente, o desvio padrão associado à ordenada na origem e o desvio padrão associado ao declive da recta de calibração.

Com base nos valores anteriores, através das equações que se seguem, calculam-se os intervalos de confiança para o declive b , IC_b e para a ordenada na origem a , IC_a , que se apresentam na Tabela 17.

$$IC_b = t_{\text{student}} \times S_b$$

$$IC_a = t_{\text{student}} \times S_a$$

Tabela 17. Intervalos de Confiança correspondentes ao declive e à ordenada na origem, para um nível de confiança de 95%.

	Intervalo de Confiança	Valor determinado	Mínimo	Máximo
Declive (b)	0,487	17,582	17,095	18,069
Ordenada na Origem (a)	148,605	-74,371	-222,976	74,234

A partir dos resultados acima obtiveram-se as bandas de confiança para cada valor de concentração da recta de calibração, permitindo o traçado das rectas limite máximo e mínimo representadas na Figura 12.

$$y_{i\text{max}} = b_{\text{max}} \times x_i + a_{\text{max}}$$

$$y_{i\text{min}} = b_{\text{min}} \times x_i + a_{\text{min}}$$

O limite de detecção do método, foi determinado através da razão sinal: ruído superior a 3. Através da observação de um cromatograma podemos considerar o ruído como 10 mV.min. Desta forma, através da recta de calibração o limite de detecção do é de 5,94 $\mu\text{g/L}$.

F.2. Estudo da Linearidade para a recta de calibração por SPME

Da mesma forma, construiu-se a recta de calibração por SPME e calcularam-se os parâmetros das Tabelas 18, 19 e 20 tendo como base a recta de ajuste dada pela equação:

$$\text{Área do pico cromatográfico (mV.min)} = 754,52 \times [\text{BDE-100}] - 954,68$$

Tabela 18. Parâmetros necessários para o estudo da linearidade da resposta do GC-ECD por SPME.

	x_i	y_i	$y_{cal.}$	x_i^2	$\left(x - \bar{x}\right)^2$	$\left(y - y_{cal.}\right)^2$
	1	642,76	-200,16	1,00	240,25	710516,23
	5	3347,89	2817,92	25,00	132,25	280872,18
	10	4963,34	6590,52	100,00	42,25	2647726,96
	50	31031,95	36771,32	2500,00	1122,25	67929,95
Média	16,5	--	--	--	--	--
Soma	--	--	--	2626	1537	3707045,32

Tabela 19. Valores dos parâmetros do estudo da linearidade para um nível de confiança de 95%

S_{y/x}	1111,61
S_a	649,80
S_b	28,354
a + s_a	-304,88
a - s_a	-1604,48
S_b / b (%)	3,76
t_{student}	2,353

Tabela 20. Intervalos de Confiança correspondentes ao declive e à ordenada na origem, para um nível de confiança de 95%.

	Intervalo de Confiança	Valor determinado	Mínimo	Máximo
Declive (b)	66,72	754,52	687,80	821,24
Ordenada na Origem (a)	1528,98	-954,68	-2483,66	575,30

A partir dos resultados acima obtiveram-se as bandas de confiança para cada valor de concentração da recta de calibração, através das equações já referidas anteriormente, permitindo o traçado das rectas limite máximo e mínimo representadas na Figura 13.

O limite de detecção do método, foi determinado através da razão sinal: ruído superior a 3. Através da observação de um cromatograma podemos considerar o ruído como 10 mV.min. Desta forma, através da recta de calibração o limite de detecção do é de 0,77 µg/L.

Anexo G. Estudo da Incerteza Global

G.1. Incerteza associada à preparação dos padrões, U_1

As incertezas são calculadas recorrendo à expressão:

$$\text{Incerteza} = \sqrt{\sum_i \left(\frac{\Delta m_i}{m_i} \right)^2}$$

sendo, Δm_i o erro associado à medição de um determinado parâmetro, e m_i o valor medido do respectivo parâmetro.

A incerteza associada à preparação da solução-mãe de BDE-100 (1 mg.L^{-1}) é indicada a seguir.

$$\text{Incerteza relativa} = \sqrt{\left(\frac{0,0065}{0,25} \right)^2 + \left(\frac{0,04}{25} \right)^2} = 2,6 \times 10^{-2}$$

Os padrões utilizados para a obter a recta de calibração foram preparados a partir da solução-mãe.

Tabela 21. Erros associados aos instrumentos de medição.

Equipamento		Erro
Balão volumétrico 25 mL		0,04 mL
Balão volumétrico 50 mL		0,06 mL
Pipeta 10-100 μL	50 μL	0,009 μL
Pipeta 100-1000 μL	250 μL	0,065 μL
Pipeta 500-5000 μL	500 μL	0,0875 μL
	5000 μL	0,875 μL

Na tabela 22 apresentam-se os volumes medidos para cada padrão e a incerteza associada.

[BDE-100] ($\mu\text{g.L}^{-1}$)	V total (mL)	V pipetado (μL)	Erro do balão (mL)	Erro da pipeta (mL)	U_1
1	25	50	0,04	0,009	0,026
5	25	250	0,04	0,065	0,026
10	25	500	0,04	0,0875	0,031
50	50	5000	0,06	0,875	0,031

G.2. Incerteza associada à recta de calibração, U_2

Tabela 23 – Parâmetros para o cálculo de U_2 .

x	$(y - y_{cal})^2$	S_{x0}	x_0	U_2
1	710516,23	1,28	1	1,28
5	280872,18	1,28	5	0,26
10	2647726,96	1,28	10	0,13
50	67929,95	1,28	50	0,03

Com,

$$S_{x0} = \frac{S_{y/x}}{b} \times \sqrt{\frac{1}{N} + \frac{1}{n} + \frac{(y_i - \bar{y})^2}{b^2 \times \sum (x_i - \bar{x})^2}}$$

$$U_2 = \frac{S_{x0}}{x_0}$$

Sendo,

$n \equiv$ número de injecções efectuadas para cada padrão

$N \equiv$ número de valores experimentais de y obtidos

$Sx_0 \equiv$ desvio padrão da concentração calculado através da recta de calibração

$x_0 \equiv$ concentração calculada através da recta de calibração

G.3. Incerteza associada à precisão, U_3

Tabela 24 – Parâmetros para o cálculo de U_3 .

[BDE-100] µg/L	CV(%)	U_3
5	7,99	0,036

Sendo, $U_3 = \frac{CV}{\sqrt{n}}$

G.4. Incerteza associada à exactidão, U_4

Tabela 25 – Parâmetros para o cálculo de U_4 .

[BDE-100] µg/L	Recuperação (%)	Média (%)	Desvio Padrão	CV(%)	U_4
5	37,83	36,30	2,96	8,16	0,091
	31,12				
	38,51				
	37,10				
	36,97				

Sendo,

$$U_4 = \frac{\% R_{máx.} - \% R_{mín.}}{\sqrt{n} \% R_{média}}$$

Com,

$R_{máx}$ \equiv Recuperação máxima

$R_{mín}$ \equiv Recuperação mínima

$R_{média}$ \equiv Recuperação média

G.5. Incerteza global associada, U

Para o cálculo da incerteza global, utilizou-se o U3 e U4 como sendo o mesmo para todas as concentrações.

$$U_{total} = \sqrt{U_1^2 + U_2^2 + U_3^2 + U_4^2}$$

Tabela 26 – Resultados do cálculo das incertezas para os diferentes padrões

[BDE-100] µg/L	U ₁	U ₂	U ₃	U ₄	U	U (%)
1	0,026	1,28	0,036	0,091	1,27	127
5	0,026	0,26	0,036	0,091	0,28	28
10	0,031	0,13	0,036	0,091	0,17	17
50	0,031	0,03	0,036	0,091	0,11	11