

FILIPE AMADEU OLIVEIRA VIEIRA ALVES

Pesquisa de Pesticidas Organoclorados em Sedimentos e Rizo-sedimentos do Estuário do Rio Douro

DISSERTAÇÃO PARA MESTRADO EM QUÍMICA



FC

FACULDADE DE CIÊNCIAS
UNIVERSIDADE DO PORTO

DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
FACULDADE DE CIÊNCIAS
UNIVERSIDADE DO PORTO
2005

**Pesquisa de Pesticidas Organoclorados
em Sedimentos e Rizo-sedimentos do
Estuário do Rio Douro**

Agradecimentos

À Doutora Maria Clara Basto, minha orientadora, pela fantástica disponibilidade demonstrada e pelo inextinguível apoio dado durante todo o trabalho sem o qual seria impossível realizar este projecto.

Aos Dr. Hugo Silva, António Pereira, Joaquim Guedes e ao Eng. Rafael Evangelista, pela ajuda e troca de ideias nos diversos problemas surgidos ao longo do trabalho.

Ao Eng. Rui Soares e Doutor José Catita pela oportunidade dada em termos profissionais na Paralab SA, que me fez evoluir em termos pessoais e deu um novo alento para o desenvolvimento deste trabalho.

Ao LAQUIPAI – Laboratório de Química Inorgânica Pura e de Aplicação Interdisciplinar, pela cedência das instalações para a realização deste trabalho.

À Doutora Maria Teresa Vasconcelos, minha co-orientadora, pela ajuda na fase final da correcção da tese.

À minha namorada, Vera Santos, pelo apoio emocional nesta fase muito importante da minha vida.

Por último, um profundo e sincero agradecimento, ao que é a base de tudo na minha vida, os meus pais, pelo carinho, compreensão e apoio sem os quais nada teria sido possível.

Resumo

O trabalho desenvolvido insere-se no âmbito de um projecto de investigação mais amplo sobre o estudo das interacções biogeoquímicas na rizosfera de plantas de sapal.

Um dos objectivos do trabalho consistiu na implementação de um processo de pesquisa de pesticidas organoclorados em sedimentos estuarinos (cuja matriz é complexa). O processo implementado foi, seguidamente, aplicado à investigação da presença de pesticidas organoclorados em sedimentos do estuário do Rio Douro. Para tal, os analitos foram pré-extraídos para metanol, com auxílio de microondas. A detecção e quantificação dos pesticidas organoclorados foi realizada usando microextracção para fase sólida, aplicada a *headspace*, e cromatografia gasosa com detecção por espectrometria de massa. O processo implementado foi testado sobre um material de referência (sedimento padrão), onde foram quantificados de modo aceitável seis dos trezes pesticidas presentes no sedimento.

Amostras de sedimentos com características diferentes, um arenoso e outro vasoso, foram recolhidas em dois locais do estuário do Rio Douro, colonizados por *Juncus maritimus*, e nelas foi averiguada a existência de contaminação por pesticidas organoclorados, quer nos sedimentos junto das raízes quer em sedimentos nas imediações da planta.

Nos sedimentos estudados foi detectada a presença de cinco pesticidas (α -lindano, β -lindano, heptacloro epóxido, DDE e DDT) em concentrações da ordem dos nanogramas de pesticida por grama de sedimento seco.

As determinações realizadas, embora em número restrito, permitiram concluir que, em geral, a contaminação pelos pesticidas organoclorados detectados foi maior no local do sapal em que o sedimento é arenoso. Os pesticidas DDE e DDT acumularam-se junto das raízes enquanto que o α e β -lindano, menos hidrofóbicos, predominaram nas imediações da planta.

Os resultados obtidos indicaram uma possível existência de capacidade da planta para remediação de pesticidas em sedimentos.

Abstract

This work is in the ambit of a broad project, which aims the study of biogeochemical interactions at the rhizosphere of marsh plants.

One objective of the work was the development of a method to determine organochlorine pesticides in estuarine sediments (whose matrices are complex). The developed process was then applied to the investigation of the presence of organochlorine pesticides in Douro River estuary sediments. The pesticides were first extracted into a small portion of methanol, by microwave-assisted extraction. The detection and quantification of the organochlorine pesticides were performed using headspace solid phase microextraction and gas chromatography coupled to mass spectrometry. The optimized process was tested using a reference material (standard sediment), in which six pesticides, within thirteen present in the sediment, were acceptably quantified.

Sediment samples with different characteristics, sandy or muddy, were collected at two different sites of the Douro River estuary, colonized by *Juncus maritimus*. The existence of organochlorine pesticide contamination was investigated both in sediments near root and in sediments not colonized by the plant.

Five pesticides (α -lindane, β -lindane, heptachlor epoxide, DDE and DDT) were detected at ng/g levels in the studied sediments.

The obtained results indicated that, in general, the contamination by those pesticides was higher at the site where the sediment is sandy. The pesticides DDT and DDE accumulated near the plant roots while the less hydrophobic α - and β -lindanes predominated in not colonized sediments.

The results indicted the possible existence of plant ability for pesticide remediation in sediments.

Índice

Agradecimentos	V
Resumo	VII
Abstract	IX
Índice	XI
Índice de tabelas	XV
Índice de figuras	XVII
Enquadramento do Trabalho	XIX
CAPÍTULO 1- PESTICIDAS	1
1.1 – Introdução	3
1.2 – Pesticidas organoclorados	4
1.2.1 – Lindanos	5
1.2.2 – Heptacloro	6
1.2.3 – Aldrina	7
1.2.4 – Dieldrina	8
1.2.5 – Endrina	9
1.2.6 – Endossulfanos	10
1.2.7 – DDT	11
1.2.8 – DDE	12
1.2.9 – DDD	12
1.2.10 – Metoxicloro	13
1.3 – Bioremediação de pesticidas	14
1.4 – Sedimentos de sapal contaminados	16
CAPÍTULO 2 - DETECÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DOS PESTICIDAS	19
2.1 – Introdução	21
2.2 – Cromatografia	21
2.2.1 – Mecanismo e eficiência da separação cromatográfica	22
2.2.2 – Componentes cromatográficos	24
2.2.3 – Análise de cromatogramas	25
2.3 – Espectrometria de massa	26
2.3.1 – Introdução	26

2.3.2	– Aquisição de dados em espectrometria de massa	27
2.3.2.1	– Detecção por varrimento contínuo (<i>FullScan</i>)	27
2.3.2.2	– Monitorização por ião seleccionado (SIS)	28
2.4	– Microextração em fase sólida	28
2.4.1	– Introdução	28
2.4.2	– Optimização e calibração em SPME	32
2.4.2.1	– Aspectos práticos para optimização da SPME	34
2.4.3	– Selecção do método de calibração	39
2.5	– Extração auxiliada por microondas	42
CAPÍTULO 3 - PARTE EXPERIMENTAL		43
3.1	– Introdução	45
3.2	– Reagentes e soluções	45
3.3	– Material	45
3.4	– Instrumentação	46
3.5	– Procedimentos especiais	46
3.5.1	– Condicionamento da fibra	47
3.5.2	– Condicionamento dos septos	47
3.5.3	– Condicionamento das barras magnéticas, frascos e material de plástico	47
3.5.4	– Condicionamento da coluna cromatográfica	47
CAPÍTULO 4 - PROGRAMAS DE CROMATOGRAFIA GASOSA E ESPECTROMETRIA DE MASSA		49
4.1	- Introdução	51
4.2	- Aquisição de dados por GC-MS	51
4.2.1	– Programa de cromatografia gasosa	51
4.2.2	– Interface GC-MS	52
4.3	– Descrição dos programas de GC-MS	52
4.3.1	– Programa inicial	53
4.3.2	– Programa final	54
4.4	- Quantificação	58
CAPÍTULO 5 - IMPLEMENTAÇÃO DO MÉTODO ANALÍTICO		59
5.1	- Introdução	61
5.2	– Optimização dos parâmetros relativos a SPME	61
5.2.1	– Escolha do revestimento da fibra de SPME	61

5.2.2	– Temperatura e tempo de microextração	61
5.2.3	– Volume dos frascos	61
5.2.4	– Efeito da adição de sal (<i>salting out</i>).....	62
5.3	- Optimização dos parâmetros relativos à extração assistida por microondas	64
5.4	- Caracterização do método analítico	66
5.4.1	– Descrição geral do método.....	66
5.4.2	– Análise de sedimento de referência	67
5.4.3	– Precisão do método.....	68
5.4.4	– Limites de detecção e quantificação	69
CAPÍTULO 6 - PESQUISA DE PESTICIDAS ORGANOCLORADOS EM		
SEDIMENTOS ESTUARINOS		71
6.1	– Introdução.....	73
6.2	- Locais de recolha dos sedimentos.....	73
6.3	- Amostras de sedimentos estuarinos	75
6.3.1	– Amostras de Abril de 2003	76
6.3.2	– Amostras de Junho de 2003.....	77
6.3.3	– Amostras de Maio de 2004.....	78
6.4	– Discussão global dos resultados.....	79
CAPÍTULO 7 - CONCLUSÕES		85
7.1	– Conclusões	87
BIBLIOGRAFIA		89

Índice de tabelas

TABELA 1 – ESTADO DE REPARTIÇÃO DO INJECTOR DO CROMATÓGRAFO	51
TABELA 2 – RAMPA DE TEMPERATURAS DO CROMATÓGRAFO	52
TABELA 3 – PROGRAMA INICIAL EM VARRIMENTO TOTAL	53
TABELA 4 – TEMPO DE RETENÇÃO DOS PESTICIDAS EM ESTUDO.....	54
TABELA 5 – IÕES CARACTERÍSTICOS DOS PESTICIDAS EM ESTUDO.....	56
TABELA 6 – PROGRAMA DE AQUISIÇÃO EM MODO SIS	57
TABELA 7 – FRAGMENTOS USADOS NA QUANTIFICAÇÃO DE ÁREAS.....	58
TABELA 8 – ÁREAS DOS PICOS OBSERVADOS NOS CROMATOGRAMAS OBTIDOS SEM ADIÇÃO DE SAIS E USANDO DIFERENTES QUANTIDADES DE SAIS ADICIONADOS À AMOSTRA.....	62
TABELA 9 – ESTUDO DO EFEITO DA QUANTIDADE DE CLORETO DE SÓDIO ADICIONADO À AMOSTRA	63
TABELA 10 – COMPARAÇÃO DAS ÁREAS DOS PICOS OBSERVADOS NOS CROMATOGRAMAS DOS EXTRACTOS PREPARADOS EM ÁGUA E EM METANOL	65
TABELA 11 – RESULTADOS OBTIDOS PARA O SEDIMENTO DE REFERÊNCIA	67
TABELA 12 – VALORES DOS DESVIOS PADRÕES RELATIVOS.....	68
TABELA 13 – LIMITES DE DETECÇÃO E QUANTIFICAÇÃO	69
TABELA 14 – DESCRIÇÃO DOS SEDIMENTOS ESTUDADOS, EM TERMOS DE GRANULOMETRIA E TEOR DE MATÉRIA ORGÂNICA.....	74
TABELA 15 – CONCENTRAÇÕES DOS PESTICIDAS QUANTIFICADOS (NG DE PESTICIDA POR G DE SEDIMENTO SECO) E RESPECTIVOS DESVIOS PADRÕES OBTIDOS PARA AS AMOSTRAS DE ABRIL DE 2003.....	76
TABELA 16 – RESULTADOS DA APLICAÇÃO DO TESTE T A AMOSTRAS DE ABRIL DE 2003	77
TABELA 17 – RESULTADOS (NG DE PESTICIDA POR G DE SEDIMENTO SECO) OBTIDOS PARA AS AMOSTRAS DE JUNHO DE 2003.....	77
TABELA 18 - RESULTADOS DA APLICAÇÃO DO TESTE T A AMOSTRAS DE JUNHO DE 2003	78
TABELA 19 – RESULTADOS (NG DE PESTICIDA POR G DE SEDIMENTO SECO) OBTIDOS PARA AS AMOSTRAS DE MAIO DE 2004	78
TABELA 20 - RESULTADOS DA APLICAÇÃO DO TESTE T A AMOSTRAS DE MAIO 2004.....	79

Índice de figuras

FIGURA 1 - ESPECTRO DE MASSA E ESTRUTURA QUÍMICA DO LINDANO.....	6
FIGURA 2 - ESPECTRO DE MASSA E ESTRUTURA QUÍMICA DO HEPTACLORO	7
FIGURA 3 - ESPECTRO DE MASSA E ESTRUTURA QUÍMICA DA ALDRINA.....	8
FIGURA 4 - ESPECTRO DE MASSA E ESTRUTURA QUÍMICA DA DIELDRINA.....	9
FIGURA 5 - ESPECTRO DE MASSA E ESTRUTURA QUÍMICA DA ENDRINA.....	9
FIGURA 6 - ESPECTRO DE MASSA E ESTRUTURA QUÍMICA DO ENDOSSULFANO I.....	10
FIGURA 7 - ESPECTRO DE MASSA E ESTRUTURA QUÍMICA DO ENDOSSULFANO II.....	11
FIGURA 8 - ESPECTRO DE MASSA E ESTRUTURA QUÍMICA DO DDT	12
FIGURA 9 - ESPECTRO DE MASSA E ESTRUTURA QUÍMICA DO DDE	12
FIGURA 10 - ESPECTRO DE MASSA E ESTRUTURA QUÍMICA DO DDD.....	13
FIGURA 11 - ESPECTRO DE MASSA E ESTRUTURA QUÍMICA DO METOXICLORO	13
FIGURA 12 - PLANTA <i>JUNCUS MARITIMUS</i>	17
FIGURA 13 - FIBRA E SUPORTE PARA MICROEXTRACÇÃO EM FASE SÓLIDA	29
FIGURA 14 - PROCESSO DE EXTRACÇÃO E DESADSORÇÃO EM SPME.....	30
FIGURA 15 - DIFERENTES PROCESSOS DE EXTRACÇÃO POR SPME.....	31
FIGURA 16 - RELAÇÃO ENTRE O TEMPO DE EXTRACÇÃO E A MASSA EXTRAÍDA	38
FIGURA 17 - GRÁFICO EXEMPLIFICATIVO DO MÉTODO DE ADIÇÃO PADRÃO	40
FIGURA 18 - ESTUDO SOBRE O TEMPO DE EXTRACÇÃO DOS PESTICIDAS	66
FIGURA 19 - LOCALIZAÇÃO GEOGRÁFICA DA ÁREA EM ESTUDO	73
FIGURA 20 - REPRESENTAÇÃO GRÁFICA PARA A DETERMINAÇÃO DE A-LINDANO EM SEDIMENTO DO LOCAL 1 NUMA AMOSTRA SED DE JUNHO DE 2003	75
FIGURA 21 - COMPARAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO ($NG_{PESTICIDA}/G_{SEDIMENTO}$) DE DDT NAS DIFERENTES AMOSTRAS ANALISADAS	80
FIGURA 22 - COMPARAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO ($NG_{PESTICIDA}/G_{SEDIMENTO}$) DE DDE NAS AMOSTRAS ANALISADAS.....	80
FIGURA 23 - COMPARAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO ($NG_{PESTICIDA}/G_{SEDIMENTO}$) DE A-LINDANO NAS DIFERENTES AMOSTRAS ANALISADAS (ÁREA A PRETO: PESTICIDA DETECTADO, MAS NÃO QUANTIFICADO)	82
FIGURA 24 - COMPARAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO ($NG_{PESTICIDA}/G_{SEDIMENTO}$) DE B-LINDANO NAS DIFERENTES AMOSTRAS ANALISADAS (ÁREA A PRETO: PESTICIDA DETECTADO, MAS NÃO QUANTIFICADO)	82

Enquadramento do Trabalho

A ocorrência de pesticidas organoclorados no meio ambiente é objecto de preocupação devido à resistência a degradação e à toxicidade de muitos deles. Uma vez introduzidos no ecossistema aquático, por terem carácter hidrofóbico, são susceptíveis de associação com a matéria orgânica particulada e dissolvida, contaminando os sedimentos estuarinos.

Certos macrófitos exercem um papel importante na distribuição de contaminantes orgânicos (e inorgânicos) em sedimentos e na respectiva remediação. Porém, os processos de interacção entre as plantas e os sedimentos onde se inserem são muito complexos e ainda pouco compreendidos.

O trabalho teve como objectivo dar uma contribuição para a investigação do papel que a planta de sapal *Juncus maritimus* poderá eventualmente desempenhar na remediação de pesticidas organoclorados em sedimentos estuarinos.

A prossecução deste objectivo implicou a implementação de um processo de pesquisa de pesticidas organoclorados em sedimentos estuarinos (cuja matriz é complexa) envolvendo microextração para fase sólida e determinação por cromatografia gasosa com detecção por espectrometria de massa.

Capítulo 1

PESTICIDAS

1.1– Introdução

Pesticida é um agente químico, físico ou biológico que previne, destrói, repele ou mitiga organismos que são classificados como pragas, tais como insectos, roedores ou fungos. O termo pesticida é aplicado a fungicidas, insecticidas e agentes capazes de combater outras doenças provocadas por organismos, tais como as bactérias. Também os herbicidas são incluídos nesta designação.

Todos os anos, uma parte significativa da produção mundial de alimentos é destruída ou consumida por pragas. As maiores perdas ocorrem nas regiões tropicais e subtropicais, onde os agricultores muitas vezes produzem mais que uma colheita por ano no mesmo campo de cultivo, o que pode permitir um grande aumento populacional das pragas. Acresce ainda o facto de os Invernos nestas regiões não serem rigorosos, não sendo portanto um factor que limite o número de espécimes que sobrevive a essa estação. Mesmo nos países tecnologicamente mais avançados, quase metade da produção é perdida devido à acção das mais diversas pragas, apesar de serem dispendidas enormes quantias no seu controlo.

Na segunda metade do século XX ocorreu a grande explosão da utilização de pesticidas na agricultura. A descoberta dos pesticidas organoclorados, com custos de produção baixos, permitiu a sua utilização em massa, sem atender às consequências ambientais. Também a introdução de novas filosofias de cultivo trouxe novas políticas agrícolas (que visavam a produção intensiva de alimentos) e diferentes visões sobre a aplicação de pesticidas.

Os pesticidas são produtos que devem ser utilizados com cuidado e de uma forma lógica. A utilização intensiva leva a que os organismos ganhem resistências e afecta populações de seres vivos que não são consideradas pragas. Todos os insecticidas utilizados actualmente apresentam efeitos tóxicos sobre o sistema nervoso por um ou mais dos mecanismos seguintes: interferência com o transporte através de membranas celulares dos iões cloreto, sódio, potássio ou cálcio, inibição de enzimas e libertação de neurotransmissores. Hoje em dia, muitos produtos encontram-se proibidos devido à elevada toxicidade ou ao elevado tempo de semi-vida, conjugado com o fenómeno da bioacumulação nos tecidos gordos dos organismos, que os tornam bastante mais tóxicos. Porém, como efeito da sua utilização intensiva no passado, continuaram a

contaminar solos, águas e mesmo alimentos. A tendência de bioacumulação e a persistência ambiental dos pesticidas torna importante o investir em formas de agricultura que estejam isentas do uso desses compostos químicos, tais como a agricultura biológica ou orgânica que não provocam tanta poluição, pois tiram o máximo partido da actividade biológica em substituição dos pesticidas de síntese¹.

Os estuários são reservatórios de efluentes domésticos e industriais, escorrimentos urbanos e agrícolas que introduzem no meio aquático uma grande quantidade de produtos químicos tóxicos.

Um dos principais acumuladores e subsequentes fontes de pesticidas são os sedimentos. Os pesticidas hidrofóbicos, uma vez introduzidos no meio aquático, distribuem-se entre a água e partículas em suspensão, A sua grande afinidade para a matéria orgânica particulada tem consequências importantes no transporte e distribuição destes contaminantes nos estuários. Um dos factores importantes na adsorção de pesticidas é a matéria orgânica presente nos sedimentos. Os sedimentos estuarinos de características físicas distintas (constituídos por grãos de tamanhos diferentes) incluem quantidades de matéria orgânica diferentes e, assim, retêm quantidades de contaminantes diferentes. A libertação de um contaminante de um sedimento pode ser afectado pela presença ou descarga de outro composto, efeito designado por adsorção/absorção competitiva. Num estudo relativamente recente, este efeito foi atribuído a competição pelos sítios activos das matrizes nos sedimentos (esta competição depende do tamanho, estrutura e polaridade das moléculas, além de propriedades do adsorvente/absorvente em termos de estrutura e grupos funcionais)².

Os pesticidas retidos não ficam necessariamente fixados permanentemente aos sedimentos, podendo ser reciclados pela acção de agentes biológicos e químicos. A biodisponibilidade de um contaminante depende de múltiplos factores, entre os quais a cinética de adsorção e as características do sedimento.

1.2– Pesticidas organoclorados

Os pesticidas organoclorados são altamente hidrofóbicos e, devido à sua estrutura química, muito persistentes. A degradação destes insecticidas é muito lenta, possuem átomos de cloro difíceis de eliminar e as estruturas aromáticas dificultam a sua

decomposição. A tendência para bioamplificação e persistência ambiental fazem com que estejam sujeitos a amplos ciclos de transporte na biosfera. Os efeitos tóxicos dos insecticidas organoclorados continuam a manifestar-se a diversos níveis da cadeia trófica e no meio ambiente. Podem ser agrupados em classes distintas: derivados de diclorodifeniletano, ciclodienos, clorobenzenos e clorociclohexanos.

O estudo efectuado neste trabalho envolveu quinze pesticidas organoclorados: α -lindano, δ -lindano, β -lindano, γ -lindano (clorociclohexanos); heptacloro, heptacloroepóxido, aldrina, endossulfano I, endossulfano II, dieldrina, endrina (ciclodienos); DDE, DDD, DDT e metoxicloro (derivados do diclorodifeniletano). As respectivas propriedades físicas e químicas são diferentes e tal origina comportamentos distintos. Todos são liposolúveis, mas as respectivas diferenças de solubilidade, volatilidade ou polaridade, explicam a tendência relativa para se alojarem nos lípidos, se dispersarem pelo ar ou de serem adsorvidos/absorvidos em sedimentos. Assim, faz-se uma breve descrição das características consideradas mais importantes de cada um disponíveis na literatura, refere-se o tempo de semi-vida, ponto de fusão, temperatura de decomposição, solubilidade em água e outros solventes comuns, toxicidade geral e formas resultantes da decomposição.

1.2.1 – Lindanos

O γ -hexaclorociclohexano, também conhecido como lindano (figura 1), é um produto sintético usado como insecticida, matando apenas por contacto, uma vez que é directamente absorvido pelos insectos e pelos seus ovos. Relativamente ao seu comportamento na natureza, sabe-se que é bastante estável em águas salgadas e doces, sendo resistente à degradação fotoquímica. Os lindanos são persistente em solos, tendo tendência para ser adsorvidos nos sedimentos e a sua biodegradação é lenta.

Os clorociclohexanos, na atmosfera, reagem com radicais hidroxilo produzidos fotoquimicamente. Em meios anaeróbicos, degradam-se a diferentes velocidades dependendo do substrato e das bactérias presentes no solo³. Em meios aeróbicos biodegradam-se muito lentamente.

Fórmula molecular: $C_6H_6Cl_6$

Ponto de fusão: 112,5°C

Solubilidade: 7,30 mg/L (25°C) em água, 7,4 g/l (20°C) em metanol

Tempo de semi-vida: 191 dias a 22°C e pH=7, 11 horas a pH=9

Metabólitos: α -lindano, β -lindano e δ -lindano

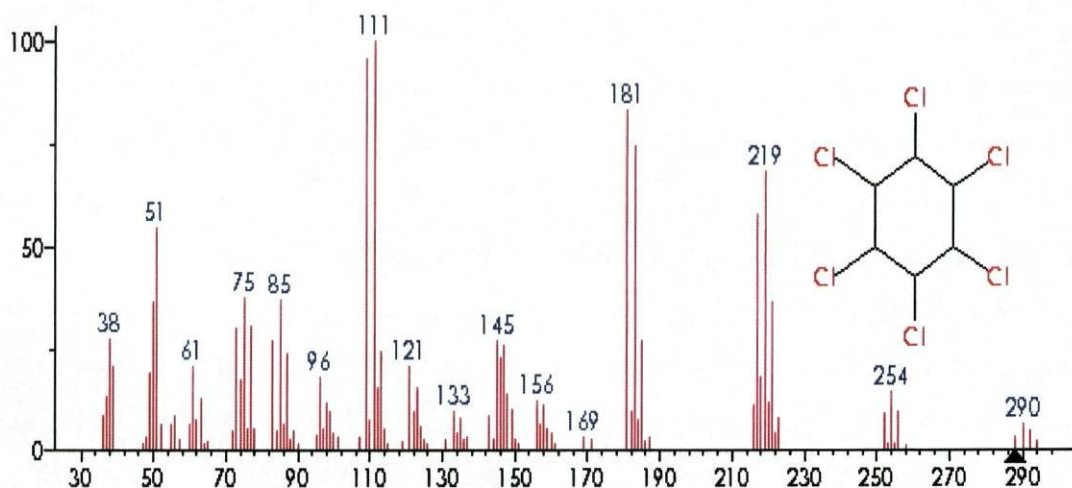


Figura 1 - Espectro de massa e estrutura química do lindano

1.2.2 – Heptacloro

O heptacloro (figura 2) é termicida e insecticida sendo, no entanto, extremamente tóxico para os seres humanos, causando hiper-excitação do sistema nervoso central e problemas de fígado. Foi proibido em grande parte dos países, incluindo Portugal, a partir dos anos 80.

É pouco estável em água, sendo a hidrólise a heptacloro epóxido bastante rápida. Além da hidrólise, a volatilização e a fotólise são outras formas de modificação estrutural do composto. Nos solos é transformado por fotólise em heptacloro epóxido. Este produto de degradação é persistente, bioacumulativo e tóxico.

Fórmula molecular: $C_{10}H_5Cl_7$

Ponto de fusão: 96°C

Solubilidade: 0,18 mg/L (25°C) em água, 0,45 g/l (27°C) em etanol

Produto de degradação: heptacloro epóxido

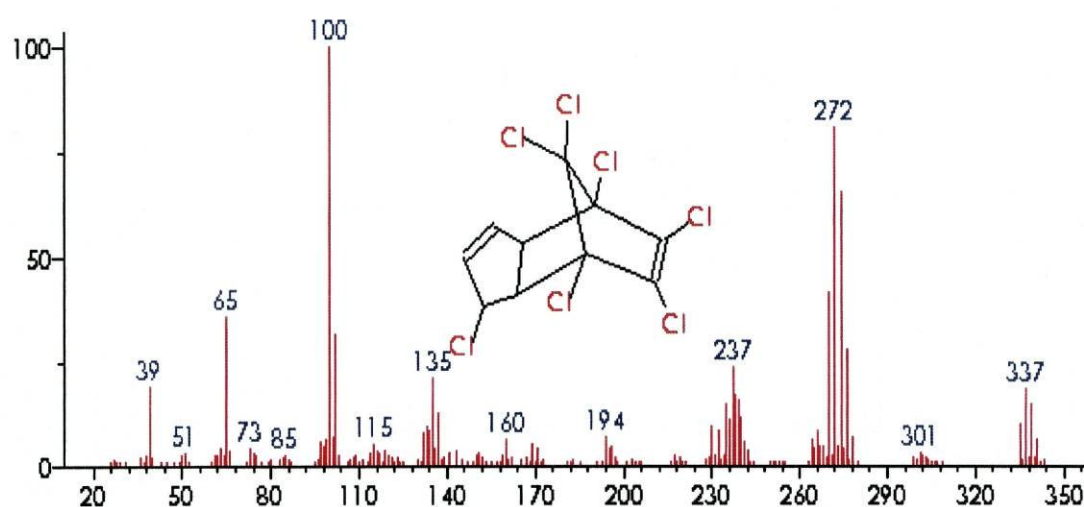


Figura 2 - Espectro de massa e estrutura química do heptacloro

1.2.3 – Aldrina

A aldrina (figura 3) é um inseticida adequado para controlar pragas em culturas de milho ou batata, sendo extremamente tóxico para os seres humanos, podendo provocar disfunções ao nível do sistema nervoso central, assim como modificações genéticas. Bioconcentra-se principalmente através dos seus produtos de conversão, dieldrina e endrina.

Devido à sua forma de utilização, este pesticida facilmente se acumula nos solos e raramente é transportado para as águas subterrâneas. É facilmente volatilizado dos sedimentos quando à sua superfície e redistribuído nas correntes de ar, contaminando áreas distantes do local inicial. Pode converter-se em dieldrina por degradação fotoquímica, sendo esta mais resistente à degradação do que a aldrina.

Fórmula molecular: $C_{12}H_8Cl_6$

Ponto de fusão: 104°C

Solubilidade: 0,027 mg/L (25°C) em água, 600g/L (27°C) em acetona e benzeno

Tempo de semi-vida: 20 – 100 dias em solos

Produtos de degradação: dieldrina e endrina

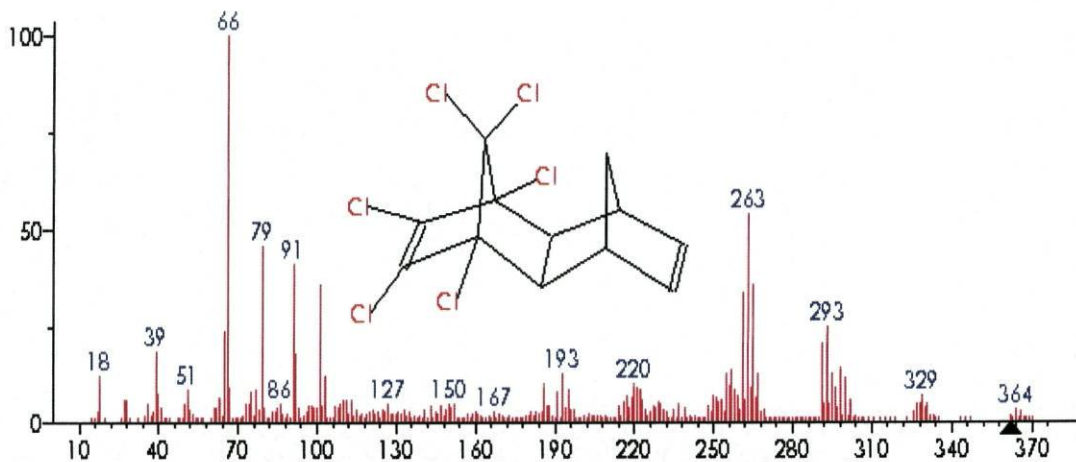


Figura 3 - Espectro de massa e estrutura química da aldrina

1.2.4 – Dieldrina

A dieldrina (figura 4) é usada como inseticida em citrinos e culturas de milho e algodão. A dieldrina é adsorvida nos sedimentos, não tendo tendência para passar para as águas subterrâneas.

Decorrente da sua estrutura química, é muito persistente em solos e tem um tempo de semi-vida de cerca de 5 anos em latitudes temperadas; em áreas tropicais, 90% desaparece em um mês.

Quando ocorre a volatilização dos sedimentos, é redistribuída pelas correntes de ar, contaminando locais distantes.

A dieldrina foi banida em grande parte dos países desenvolvidos, no entanto, foi identificada em organismos no ártico provando-se que ocorre transporte de regiões agrícolas.

Fórmula molecular: $C_{12}H_8Cl_6O$

Ponto de fusão: $175,5^{\circ}C$

Solubilidade: $0,195\text{ mg/L}$ ($25^{\circ}C$) em água e 10 g/L ($20^{\circ}C$) em metanol

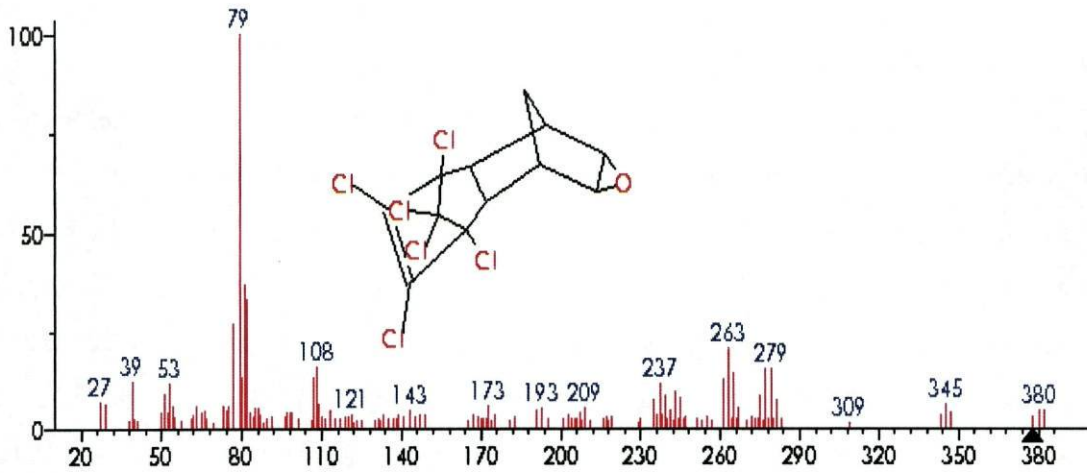


Figura 4 - Espectro de massa e estrutura química da dieldrina

1.2.5 – Endrina

A endrina (figura 5) é usada para controlar pragas de ratos e como inseticida em culturas de algodão e arroz. Tem uma estrutura química semelhante à aldrina e dieldrina, sendo a mais tóxica em meio aquático. No solo é extremamente persistente tendo um tempo de semi-vida de cerca de 12 anos, tornando-a, a par do DDT, um dos pesticidas mais persistentes conhecidos.

Formula molecular: $C_{12}H_8Cl_6O$

Ponto de fusão: $200^{\circ}C$

Solubilidade: 0,25 mg/L ($25^{\circ}C$) em água e 1,38 g/L em benzeno

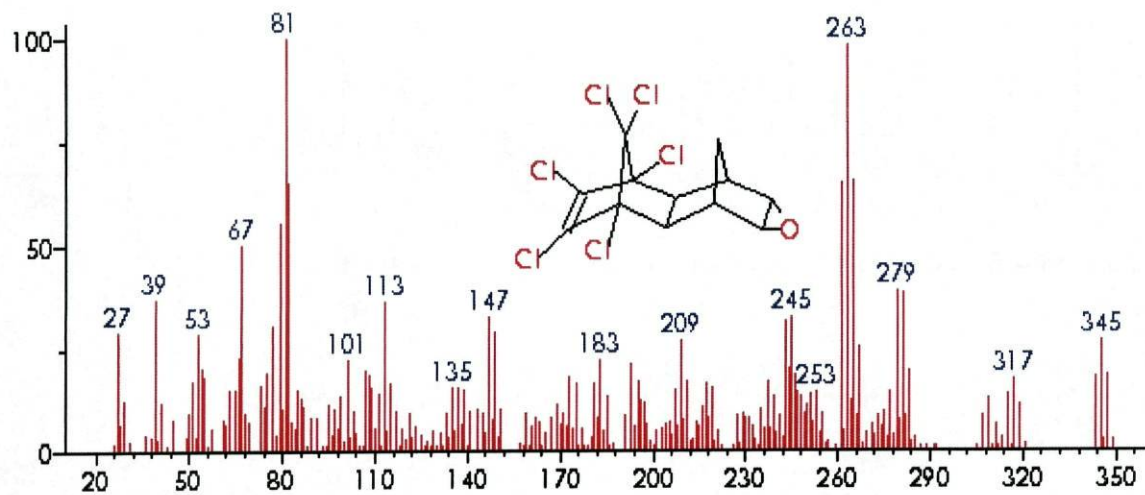


Figura 5 - Espectro de massa e estrutura química da endrina

1.2.6 – Endossulfanos

Os endossulfanos I (figura 6) e II (figura 7), isômeros, apresentam diferentes volatilidades, sendo o isômero I mais volátil do que o II. Esta propriedade é responsável pela maior persistência do isômero II nos solos⁴. É muito usado em plantações de tabaco.

Relativamente ao seu comportamento na natureza, é moderadamente persistente em solos, sendo adsorvido nas suas partículas o que o torna pouco móvel à superfície. É pouco solúvel em água sendo bastante rápida a sua degradação ao sulfato correspondente. Este é tóxico, persistente e fica adsorvido em sedimentos.

A sua biodegradação em água e solos depende das condições climáticas e dos microorganismos presentes.

Fórmula molecular: $C_9H_6Cl_6O_3S$

Ponto de fusão: 106°C

Solubilidade: 0,53 mg/L (25°C) em água, 65g/L (25°C) em metanol

Produtos de degradação: sulfato de endossulfano e endossulfano diol.

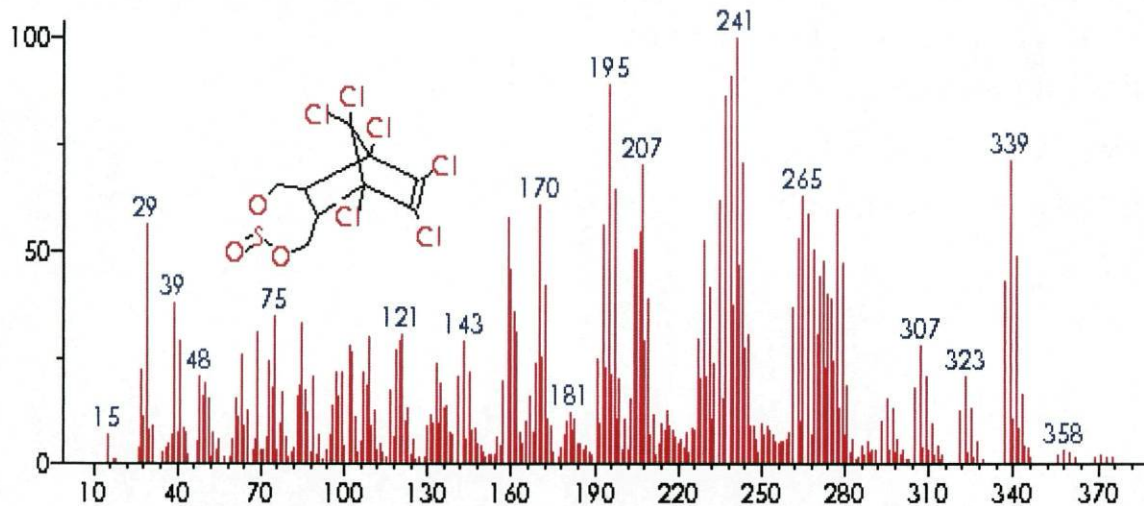


Figura 6 - Espectro de massa e estrutura química do endossulfano I

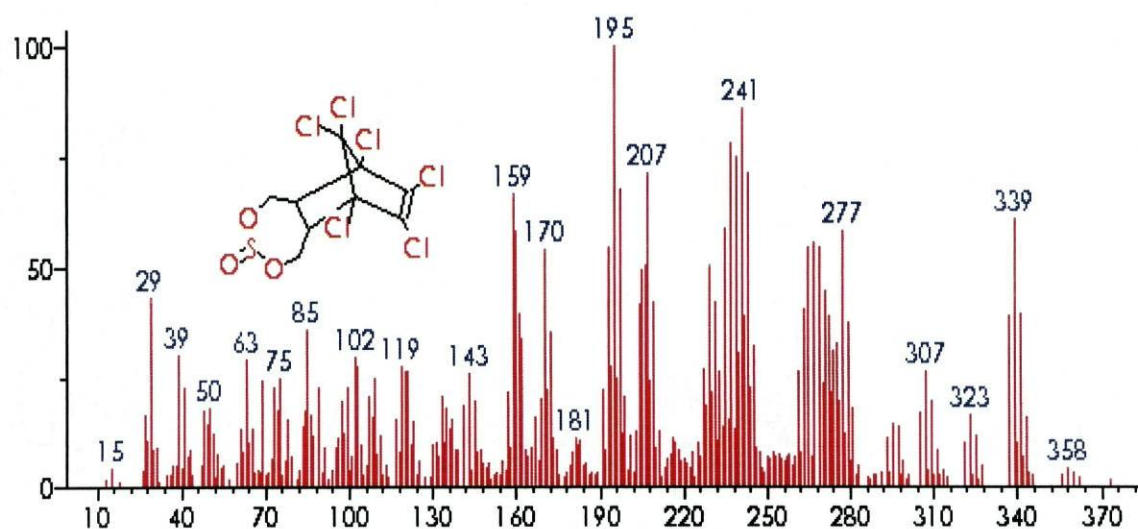


Figura 7 - Espectro de massa e estrutura química do endossulfano II

1.2.7 – DDT

O DDT (figura 8), é um insecticida que está banido na maioria dos países desenvolvidos. Ainda é aplicado em várias regiões do globo, fundamentalmente com o intuito de controlar o mosquito da malária. Relativamente à toxicidade e às formas de decomposição, o DDT é moderadamente tóxico, sendo muito persistente no meio ambiente. É relativamente imóvel nos solos. A biodegradação do DDT é lenta e, em meio alcalino, sofre hidrólise, convertendo-se em DDE. Em meio aquoso ácido, a hidrólise é muito lenta (tempo de semi-vida: 12 anos). Em condições anaeróbicas, forma-se o metabolito DDD, mas na presença de oxigénio é mais comum originar DDE.

Fórmula molecular: $C_{14}H_{10}Cl_4$

Ponto de fusão: 113 °C

Solubilidade: $5,5 \times 10^{-3}$ mg/L (25°C) em água, sendo solúvel na maioria dos solventes orgânicos

Tempo de semi-vida: aproximadamente 2 a 16 anos (biodegradação em solos aeróbicos)

Metabolitos: DDE e DDD

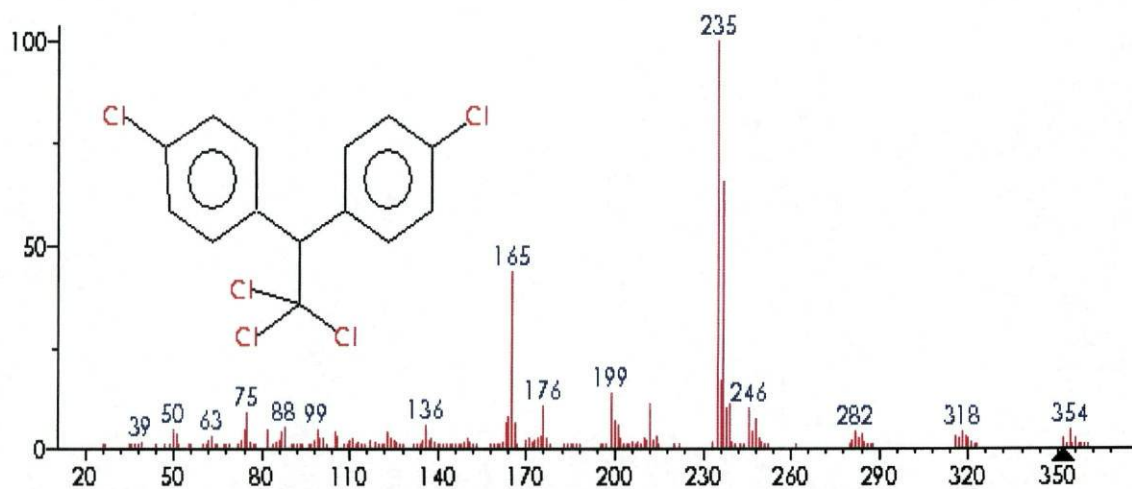


Figura 8 - Espectro de massa e estrutura química do DDT

1.2.8 - DDE

O DDE (figura 9) é um produto de degradação do DDT, mantendo grande parte das características deste. Na natureza é extremamente persistente e adsorve aos solos.

Fórmula molecular: $C_{14}H_8Cl_4$

Ponto de fusão: 89°C

Solubilidade: 0,065 mg/L (24°C) em água

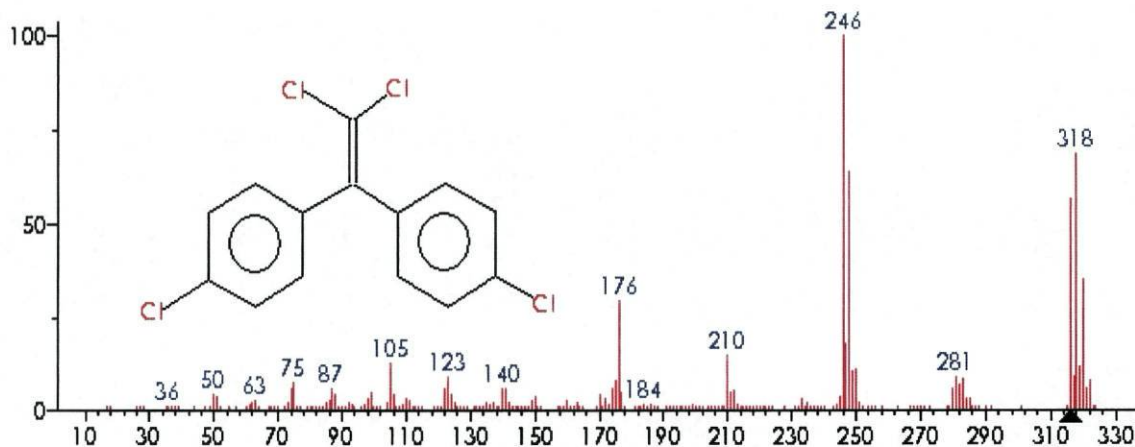


Figura 9 - Espectro de massa e estrutura química do DDE

1.2.9 - DDD

O DDD (figura 10) é um metabolito do DDT, com um comportamento físico-químico semelhante.

Fórmula molecular: $C_{14}H_{10}Cl_4$

Ponto de fusão: $109^{\circ}C$

Solubilidade: 0,16 mg/L ($24^{\circ}C$) em água e bastante solúvel em solventes orgânicos

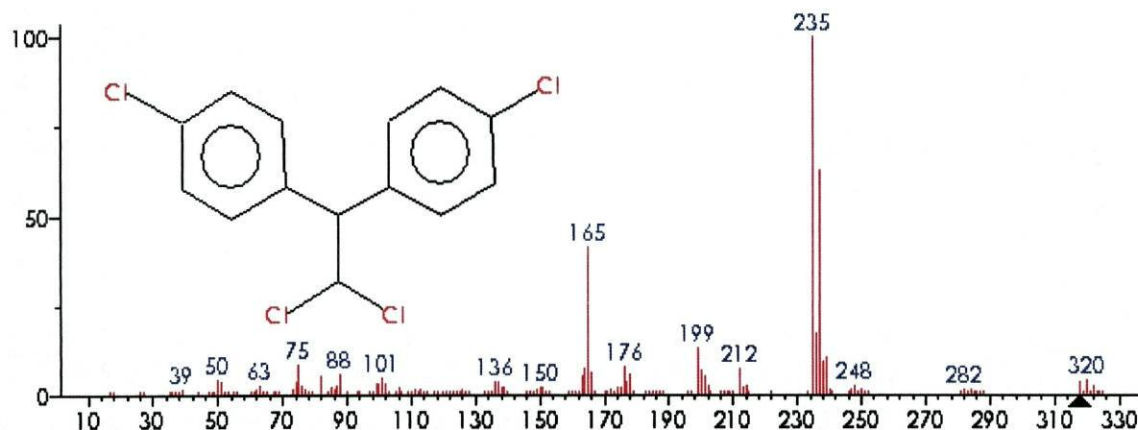


Figura 10 - Espectro de massa e estrutura química do DDD

1.2.10 – Metoxicloro

O metoxicloro (figura 11) é um inseticida, com um tempo de semi-vida de 120 dias nos solos. Relativamente à toxicidade e às formas de decomposição, é praticamente não-tóxico para o homem, não havendo indícios de se acumular nos organismos. É bastante estável nas águas e persistente em solos, não sendo provável a sua migração.

Fórmula molecular: $C_{16}H_{15}Cl_3O_2$

Ponto de fusão: $77^{\circ}C$

Solubilidade: 0,1 mg/L em água, a $25^{\circ}C$, sendo bastante solúvel na maioria dos solventes orgânicos.

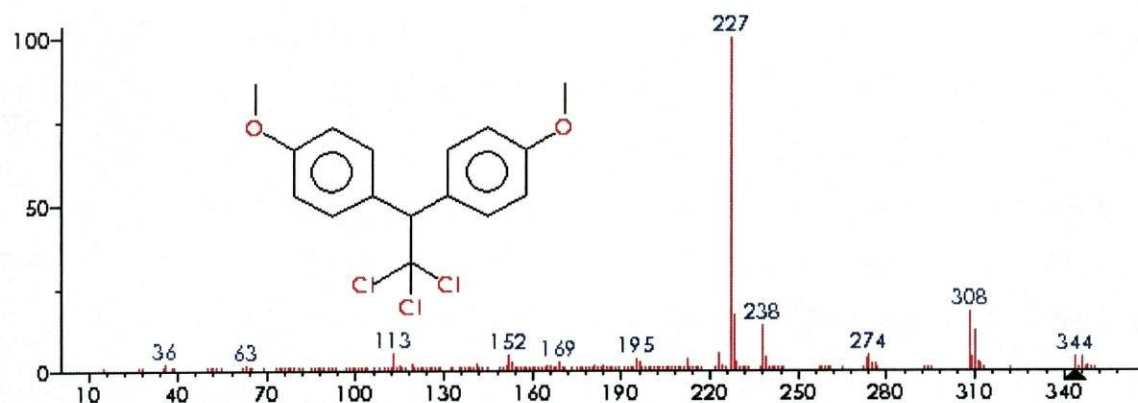


Figura 11 - Espectro de massa e estrutura química do metoxicloro

1.3– Bioremediação de pesticidas

A remediação de solos pode ser realizada através de remoção de grandes quantidades de solo e tratamentos mais ou menos complexos e dispendiosos. No entanto, verificou-se que o processo de devolver as características naturais a um local afectado, denominado remediação, pode ocorrer de forma natural, através da acção de seres vivos, tanto bactérias, como pequenas plantas ou até árvores. O processo de tratamento resultante da acção de seres vivos denomina-se bioremediação e é frequentemente muito lento.

Nos últimos anos, várias formas de bioremediação têm vindo a ser estudadas⁴, tentando-se acelerar o processo de remediação e utilizando diversas formas de vida.

A fitorremediação⁵ é uma tecnologia emergente que utiliza plantas e os organismos da rizosfera que lhes estão associados, para remover, transformar ou conter produtos químicos tóxicos que podem estar localizados no solo, sedimentos, água (tanto superficial como em lençóis freáticos) ou até na atmosfera. Os processos de interacção entre as plantas e o sedimento que a rodeia são complexos e ainda mal compreendidos, dependem da espécie de plantas e das características dos sedimentos havendo casos em que se reporta mesmo a ocorrência de processos de antagonismo ou sinergismo.

Actualmente, a fitorremediação é utilizada para eliminar vários tipos de contaminantes como, por exemplo, hidrocarbonetos derivados do petróleo, solventes clorados, pesticidas ou metais pesados.

A fitorremediação pode promover diversos processos de remediação de solos e águas contaminadas: (1) modificação das propriedades químicas e físicas dos solos contaminados, (2) libertação de exudados das raízes, aumentando o carbono orgânico disponível, (3) aumento do arejamento do solo, através da libertação de oxigénio na região das raízes e também aumentado a porosidade das regiões mais superiores do solo, (4) intercepção e retardamento do movimento dos produtos químicos, (5) transformações dos produtos químicos pela acção conjunta do metabolismo de micróbios e as enzimas da planta e (6) diminuição das migrações lateral e vertical dos poluentes através da remoção da água disponível e inversão do gradiente hidráulico.

Por causa da duração mais longa da fitorremediação, esta é tida normalmente como o último passo do processo de remediação de um caso de contaminação elevada. No entanto, é provavelmente, também, o passo menos dispendioso.

A fitorremediação, no entanto, tem aspectos, tanto positivos como negativos. A fitorremediação é aplicada directamente (*in situ*) no local contaminado, não envolvendo, por isso, transferência de material contaminado. Por outro lado, está limitada a águas superficiais ou perto da superfície, solos e sedimentos. A acção da fitorremediação é passiva porque não promove uma alteração do ambiente local mas as concentrações dos produtos perigosos podem ser demasiado elevadas e tornarem-se tóxicas para as plantas ou animais que as consomem.

A fonte de energia que as plantas necessitam é a solar, facilmente acessível; no entanto, existem muitas limitações em termos de transferência de massa. Apesar de ser bastante menos dispendiosa que outros processos de remediação, a fitorremediação é também bastante mais lenta. No entanto, é mais rápida que os processos de atenuação naturais, apesar de ser eficiente apenas em meios moderadamente hidrofóbicos. A fitorremediação tem grande aceitação mas ainda não existem muitos dados relativamente à toxicidade e biodisponibilidade dos produtos de degradação produzidos. Surgem emissões em pequena escala para a atmosfera ou para a água mas alguns produtos podem mesmo ser transportados para lençóis freáticos. Finalmente, a fitorremediação conserva os recursos naturais existentes, mas é muito influenciada pelas condições do clima e do solo.

Existem processos distintos de fitorremediação: *in situ*, *in vivo* e *in vitro*. No primeiro caso, as plantas são introduzidas directamente no local contaminado, estando em contacto directo com os produtos tóxicos. No caso da fitorremediação *in vivo*, é necessário retirar e deslocar as massas contaminadas para um outro local, onde então se colocam as plantas. Finalmente, na fitorremediação *in vitro*, são utilizados componentes de plantas para efectuar a remediação como por exemplo, enzimas.

Existem vários estudos sobre o uso de plantas para remoção de tóxicos em ecossistemas estuarinos⁶. Um trabalho realizado na Argentina evidenciou o papel importante de um macrófito *Schoenoplectus californicus*, na remoção de contaminantes de sedimentos em águas pouco profundas do lago Los Padres⁷.

No estudo de remediação de pesticidas organoclorados por esse macrófito⁸, verificou-se a capacidade da concentração de DDT e sulfato de endossulfano nas raízes.

Os pesticidas menos hidrofóbicos (lindanos e endossulfanos) acumulam-se nos caules expostos à água. Devido ao potencial de adsorção/absorção de substâncias orgânicas, os macrófitos possuem capacidade para funcionar como biomonitores *in situ* de contaminantes^{6,9,10,11,12}. Outro estudo relata ainda a degradação de certos pesticidas na rizosfera devido à grande população microbiana¹³.

1.4– Sedimentos de sapal contaminados

Os sapais, zonas húmidas estuarinas, constituem ecossistemas muito férteis que estão a ser rapidamente degradados por agentes tóxicos recebidos de fontes variadas tais como esgotos municipais e industriais.

Os sapais absorvem grandes quantidades de água tendo um papel muito importante na minimização dos impactos das inundações e na erosão. A poluição química associada aos sedimentos de sapal está dependente do tamanho das partículas dos sedimentos e da quantidade de matéria orgânica a eles associada.

A presença de plantas nos sapais tem um papel muito importante, visto poderem absorver toxinas e poluentes contribuindo para a purificação das águas.

Neste trabalho, pretende-se contribuir para um futuro estudo do potencial de um macrófito, *Juncus maritimus* (figura 12), na remediação de pesticidas de sedimentos contaminados.

A planta *J. maritimus* coloniza um sapal no estuário do rio Douro, pretendendo-se investigar se poderá ser útil para a monitorização e remediação de pesticidas organoclorados.



Figura 12 - Planta *Juncus maritimus*¹⁴

Capítulo 2

DETECÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DOS PESTICIDAS

2.1– Introdução

Diversas técnicas têm vindo a ser utilizadas para a determinação de pesticidas organoclorados, sendo a mais comum a cromatografia gasosa com detecção por captura electrónica (GC-ECD)^{7,15,16}. A cromatografia gasosa com detecção por espectrometria de massa (GC-MS) é outra técnica analítica usada para pesticidas devido à sua grande capacidade de identificação, sensibilidade e versatilidade, o que permite o seu uso para uma grande variedade de amostras. A literatura refere, por exemplo, a sua aplicação na determinação de herbicidas em solos e águas com recurso a microextração em fase sólida (SPME)^{17,18} e na quantificação de pesticidas em água¹⁹.

Os estudos com recurso a GC-MS para amostras de solos e sedimentos são escassos²⁰. Neste trabalho, para análise de amostras sólidas (sedimentos estuarinos) com uma matriz complexa, recorreu-se a SPME em *headspace* e a GC-MS. Refere-se de seguida, alguns aspectos gerais das técnicas utilizadas.

2.2– Cromatografia

A cromatografia^{21,22,23,24} pode envolver a partição de compostos entre duas fases, transportadas por intermédio de um veículo fluido (fase móvel) através de um meio, não miscível com o anterior (fase estacionária), movendo-se a velocidades diferentes, consoantes as suas características, o que tem como última consequência a sua separação física.

Consoante a natureza física do meio transportador, podem considerar-se diferentes tipos de cromatografia: cromatografia gasosa, cromatografia líquida ou cromatografia de fluido super-crítico.

Em cromatografia gasosa, a fase móvel é um gás inerte, normalmente azoto ou hélio a altas pressões e a fase estacionária pode ser um polímero de peso molecular elevado. A coluna ligada ao injector, que introduz a amostra no interior do sistema, encontra-se geralmente dentro de um forno, de forma a ser possível controlar a rampa de temperaturas, que permite controlar a separação. O detector cromatográfico deve ter um

comportamento linear ao gás arrastador mas responder de forma variável aos componentes separados pela coluna.

Este detector é controlado por um sistema de registo de resposta, normalmente computadorizado, que faz a aquisição dos resultados em função do tempo de retenção, originando o cromatograma.

O tempo que as moléculas passam exclusivamente na fase móvel é equivalente ao tempo de retenção de uma substância que não sofra qualquer tipo de interacção com a fase estacionária, pois corresponde ao deslocamento no interior da coluna segundo o fluxo do gás arrastador. Este período corresponde ao tempo morto, T_m . Para além do tempo absoluto, necessário ao percurso livre, devido às interacções com a fase estacionária as moléculas são retardadas, o que vai exigir um tempo adicional T'_r . Assim, o tempo decorrido entre a entrada na coluna e a detecção à saída desta (que é o tempo de retenção total, T_r) é o resultante dos dois componentes.

$$T_r = T_m + T'_r \quad (1)$$

A razão entre o tempo de retenção ajustado e o tempo morto representa uma grandeza relativa que traduz o quanto mais tempo um dado soluto passa na fase estacionária do que um outro soluto. Esta grandeza tem o nome de razão de capacidade ou coeficiente de capacidade.

$$k = \frac{T'_r}{T_m} \quad (2)$$

2.2.1 – Mecanismo e eficiência da separação cromatográfica

No momento da introdução da amostra no sistema cromatográfico, se ela não for gasosa, é vaporizada e depois arrastada através da coluna com a ajuda do gás arrastador. Quando atinge a fase estacionária estabelece-se um equilíbrio entre a parte que fica nesta fase e a parte que fica na fase gasosa. Esta quantidade na fase de vapor vai-se deslocar e estabelecer um novo equilíbrio com a fase estacionária. Ao mesmo tempo que isto acontece, o gás arrastador puro atinge a fase estacionária e o componente que se encontrava na fase estacionária estabelece novo equilíbrio, reentrando, parte dele, na

fase gasosa. Assim, o componente está progressivamente a deixar a fase gasosa e a passar para a fase estacionária, na região frontal do componente no interior da coluna, enquanto está a deixar a fase estacionária e a passar para a fase de vapor na região da retaguarda. Este movimento do vapor é o mecanismo fundamental da cromatografia gasosa e resulta num movimento compacto da amostra através da fase estacionária.

A distribuição de vapor entre a fase estacionária e a fase gasosa é descrita pela lei de Henry. O valor da razão de partição é uma medida da distribuição de vapor entre as duas fases (inverso do coeficiente de partição) e determina a velocidade com que a zona de vapor passa através da fase estacionária. Assim, compostos que são preferencialmente absorvidos pela fase estacionária e que, por consequência se movem lentamente através da coluna, têm uma razão de partição maior do que os compostos que não são prontamente absorvidos.

Se se introduzir numa coluna uma mistura de dois ou mais componentes, com coeficientes de partição bastante diferentes, eles atravessarão a coluna a velocidades diferentes e serão separados. Embora a separação dos componentes esteja relacionada, em primeiro lugar, com a razão dos seus coeficientes de partição, também depende da largura das bandas eluídas. A eficiência da separação pode definir-se, portanto, em termos da facilidade da coluna em separar uma dada amostra nos seus componentes de modo que sejam eluídos como bandas que não se sobreponham. A concentração de moléculas de soluto no efluente que emerge da coluna em função do tempo é, em condições ideais, uma curva do tipo gaussiano. A largura do pico é a consequência de vários factores relativos à coluna e não só. Os factores extra-coluna que contribuem mais para a dispersão do soluto são a largura da banda inicial e a existência de volumes mortos. A largura do pico reflecte a qualidade da coluna utilizada para a separação cromatográfica.

A resolução e o tempo necessário para a análise cromatográfica são parâmetros de grande importância. Estes estão relacionados com a natureza da coluna cromatográfica. A separação dos picos depende do comprimento e diâmetro interno, da fase estacionária e espessura do filme na coluna, da velocidade linear média do gás arrastador e da temperatura.

Deve-se notar, no entanto, que a selectividade da fase estacionária pode variar com a temperatura e ocorrer inversão da ordem de eluição. O tempo de análise pode ser diminuído encurtando o comprimento da coluna. Porém, é importante otimizar as

condições operacionais para conseguir minimizar o tempo de análise mantendo uma resolução adequada.

2.2.2 – Componentes cromatográficos

A introdução de amostra na coluna cromatográfica pode ser feita com o uso de uma micro-seringa, em que a agulha penetra uma membrana plástica que veda o interior do sistema cromatográfico. A membrana deve selar o sistema cromatográfico tornando-o impermeável a gases, tornando assim possível a deposição da amostra no início da coluna cromatográfica, que deve ser uma zona aquecida.

Outras formas de introdução de amostras no sistema cromatográfico são a partir de pirólise da amostra (que é especialmente útil para o caso de amostras sólidas), armadilhas que possibilitam a captura de compostos orgânicos voláteis (VOC's) e injectores adaptados a fibras de microextração em fase sólida, SPME. Este tipo de injector é de forma tubular, aberta e com temperatura regulável. Possui repartição regulável do fluxo de gás arrastador que passa pelo sistema de introdução da amostra para o interior da coluna. Não existe um septo mas sim um sistema que sela o interior do injector e se adapta à penetração da agulha de SPME para o seu interior. No interior do sistema de injeção passa um fluxo de gás arrastador que depois segue para o interior da coluna. Esse fluxo, em conjunto com a temperatura a que se encontra o sistema de injeção, permite a desadsorção dos compostos extraídos da amostra que se encontram à superfície da fibra, e a sua introdução no interior da coluna. O sistema de repartição da amostra permite que apenas parte do fluxo gasoso que passa pelo injector seja introduzido na coluna, permitindo uma diluição da amostra mas, também, minimizando a introdução de impurezas no sistema.

As colunas cromatográficas capilares, frequentemente usadas em cromatografia gasosa possuem diâmetros internos de 0,25 a 0,5 milímetros e comprimentos de 20 a 100 metros. A superfície interna é normalmente desactivada (inerte) sendo, posteriormente, recoberta com uma fase estacionária apropriada. A coluna possui duas funções principais em qualquer processo cromatográfico: separar os componentes individuais da mistura e minimizar a dispersão das bandas dos solutos, que se querem tão estreitas quanto possível. A separação dos componentes da mistura é o resultado da selectividade das fases estacionária e móvel, dadas as diferentes interacções dos

componentes com as duas fases. Quanto menor for a dispersão das bandas, maior será a resolução e, portanto, maior será a eficiência da coluna, expressa através do número de pratos teóricos.

A separação que ocorre na coluna é, na grande maioria dos casos, feita a temperatura controlada ou de acordo com um programa de temperaturas estabelecido. Normalmente, o intervalo de temperaturas utilizadas em cromatografia gasosa situa-se entre os 40 e os 350° C. Os fornos devem ser capazes de variar tão rapidamente quanto possível a sua temperatura e fazer com que não existam gradientes de temperaturas no seu interior.

O sistema de detecção é fundamental no sistema cromatográfico. O detector converte uma propriedade física num sinal mensurável. O sinal é, posteriormente, ampliado e tratado pelo registador ou integrador que existe acoplado ao detector. O detector deve ter uma capacidade de resposta rápida, manter sinal constante com o gás arrastador, ter capacidade de detecção dos compostos a concentrações muito baixas, deve proporcionar uma razão sinal/ruído apreciável, resposta linear ao longo de um intervalo de concentrações razoável e capacidade de detecção de diferentes tipos de compostos distintos. Os detectores mais usados em cromatografia gasosa são o detector de condutividade térmica (mede a condutividade térmica do gás arrastador, que vai sendo alterada consoante as substâncias que são eluídas), detector de ionização de chama (mede as variações da corrente de ionização de uma chama), detector de captura electrónica (baseia-se na electronegatividade das substâncias eluídas e a sua capacidade de formar iões negativos devido à captura de electrões) e o detector de espectrometria de massa (que se baseia na determinação do espectro de massa dos compostos que aparecem eluídos no gás arrastador).

2.2.3 – Análise de cromatogramas

Ao analisar um cromatograma deve examinar-se a linha de base e os picos cromatográficos (os tempos de retenção de cada pico, as áreas e alturas dos picos e a largura destes).

A análise do cromatograma pode ser feita do ponto de vista qualitativo e/ou quantitativo. A identificação cromatográfica é feita a partir dos dados obtidos sobre a retenção dos compostos, utilizando se possível amostras padrão ou, então, amostras com concentração elevada de cada analito a estudar. A análise quantitativa pode ser feita a

partir das áreas dos picos obtidos resultantes da utilização de padrões internos ou externos e por adição de padrão.

O uso de uma curva de calibração externa não é um procedimento aconselhável para amostras de matrizes complexas porque, desta forma, são desprezados todos os efeitos de matriz, o que no caso de uma amostra de sedimento com características muito complexas, decorrentes da presença de matéria orgânica, partículas que adsorvem os pesticidas e/ou outros contaminantes acaba por invalidar os resultados obtidos.

A quantificação recorrendo ao uso de padrão interno é um procedimento aconselhado para matrizes complexas e vestigiais, no entanto, obriga ao uso de um padrão com características semelhantes ao analito. Este facto, por vezes, dificulta ou mesmo impossibilita o uso deste método, visto frequentemente não estarem disponíveis comercialmente padrões idênticos às espécies em estudo.

Um outro procedimento para quantificação de uma amostra é a adição simples ou sucessiva de solução padrão. Neste método, uma quantidade rigorosamente conhecida do analito é adicionada à amostra. Esta adição pode ser efectuada apenas uma vez (adição simples) ou várias vezes (adição sucessiva), sendo que quanto maior o número de adições mais fiável será a recta de calibração. Este procedimento é fácil de implementar, não é excessivamente dispendioso, embora seja bastante moroso.

No trabalho realizado utilizou-se este último processo, visto ser o que produz resultados mais fiáveis. Desta forma, é possível utilizar uma solução padrão que contém todos os analitos em estudo.

2.3– Espectrometria de massa

2.3.1 – Introdução

Quando substâncias puras são introduzidas num sistema de alto vácuo, onde as moléculas podem ser excitadas pelo fornecimento de energia, algumas das suas ligações quebram-se. Geram-se, deste modo, fragmentos iónicos que podem ser separados de acordo com a relação massa/carga (m/z) dando origem a um padrão bem definido de iões presentes por cada valor daquela relação. Este padrão de distribuição de iões (abundância relativa) designado por espectro de massa contém informação única e característica da substância.

Um espectrómetro de massa é capaz de gerar uma enorme quantidade de dados que devem ser recolhidos, armazenados e tratados. Esta riqueza de informação exige o uso de computadores poderosos, dedicados a tarefas específicas, através do *software* adequado.

Quando uma substância orgânica é bombardeada por um feixe de electrões algumas moléculas excitadas procuram estabilidade através do rompimento de ligações, formando iões mais pequenos como fragmentos da molécula original. Algumas moléculas que não absorvem energia suficiente para fragmentar, perdem apenas um electrão, formando iões radicais positivos com a mesma massa nominal da molécula neutra. Estes iões são os chamados iões moleculares $[M]^+$ e contêm informação sobre o peso molecular.

O padrão de fragmentação obtido num espectro de massa pode ser interpretado de acordo com um conjunto de regras de modo a permitir a reconstrução da molécula com base na sua estrutura. Os espectros produzidos através do impacto electrónico são reprodutíveis e únicos para a maioria dos compostos orgânicos.

Este facto permite o estabelecimento de bases de dados digitalizados para comparação espectral e identificação tentativa computadorizada de compostos desconhecidos.

2.3.2 – Aquisição de dados em espectrometria de massa

Existem várias formas de aquisição de dados sendo das mais importantes a detecção do espectro completo (*FullScan*) e a monitorização de iões seleccionados (SIS).

O controlo da função de aquisição de dados é extremamente importante, pois dela resultam os dados necessários á obtenção dos resultados analíticos.

2.3.2.1 - Detecção por varrimento contínuo (*FullScan*)

A aquisição contínua do espectro total de massa e simultânea determinação do tempo de retenção de uma espécie permite a identificação de analitos por comparação com a biblioteca de espectros de massa.

Obtém-se um registo completo da análise da amostra e, como consequência, um elevado número de espectros é gerado.

Este tipo de método é, essencialmente, indicado para uma rápida análise de misturas complexas a fim de determinar a presença e tempos de retenção de compostos cujo espectro de massa é conhecido. Uma outra importante aplicação é a determinação da pureza de um pico porque através de uma escolha criteriosa dos iões, a presença de picos coalescentes pode ser detectada. Os componentes não separados de um pico complexo podem mesmo ser identificados sem que a sua separação constitua, para tal, uma condição necessária.

2.3.2.2 - Monitorização por ião seleccionado (SIS)

Neste tipo de técnica não são obtidos espectros de massa. O espectrómetro é sintonizado para medir a corrente iónica correspondente a apenas um único ou vários iões predeterminados.

A sensibilidade obtida por SIS é de 100 a 1000 vezes superior à alcançada com o método de varrimento, com limites de detecção da ordem dos subpicogramas. Este limite depende da eficiência de ionização do composto, da fracção de corrente iónica correspondente ao ião sintonizado, da intensidade do ruído de fundo interferente, da resolução do espectrómetro de massa e da sensibilidade do detector.

A maior vantagem prática deste tipo de método é a eliminação de compostos interferentes e consequente inferior limite de detecção.

2.4– Microextracção em fase sólida

2.4.1 – Introdução

A determinação de pesticidas em amostras aquosas inclui, normalmente, métodos de extracção líquido-líquido ou extracção para fase sólida. Existem métodos que utilizam extracção para fluídos super-críticos, dispersão de matriz em fase sólida e extracção com solvente orgânico assistida por microondas.

A microextracção para fase sólida^{25,26} (SPME) é uma técnica de amostragem em que não é necessário o recurso a solventes e foi desenvolvida para facilitar a amostragem tanto em laboratório como em local, *in-situ*, diminuindo as etapas de preparação da amostra para análise. O seu princípio de funcionamento baseia-se numa pequena

quantidade de fase extractora que pode ser constituída por um líquido polimérico de alta massa molecular ou um sólido sorbente de alta porosidade.

O sistema de SPME mais comum (figura 13) utiliza uma pequena fibra de sílica revestida por uma fase polimérica. A fibra é colocada para sua protecção num instrumento com a forma de uma seringa.

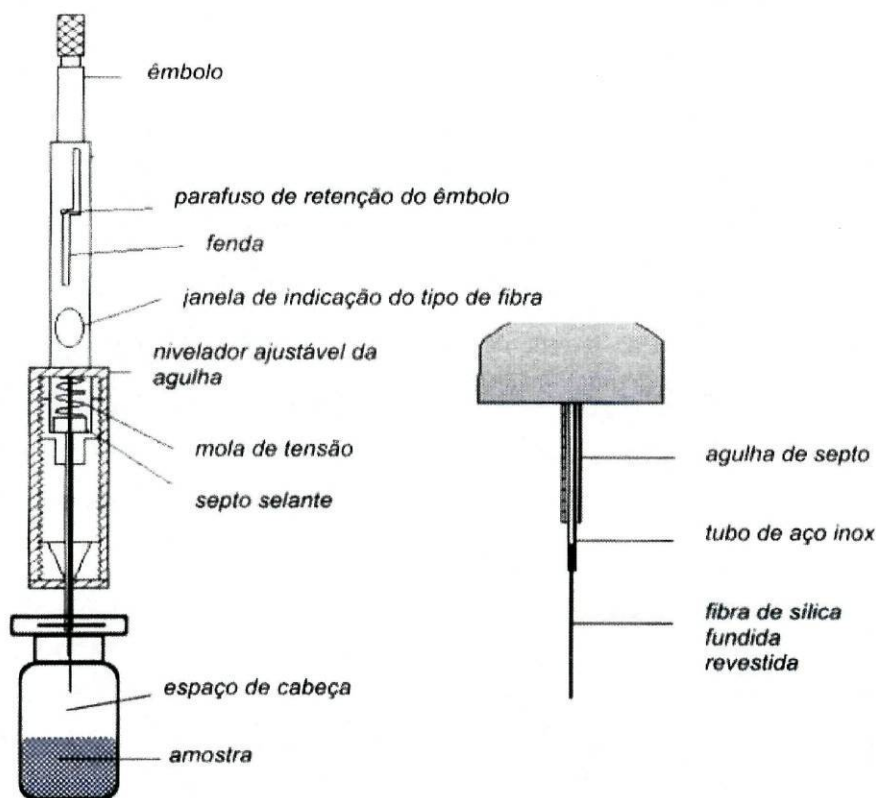


Figura 13 – Fibra e suporte para microextração em fase sólida²⁷

A fibra encontra-se montada num suporte próprio denominado *holder*, que é equipado com um sistema de profundidade de fibra ajustável, o que permite o controlo da profundidade a que a fibra se encontra no frasco da amostra e no injector do sistema de cromatografia.

Os analitos permanecem em contacto com a fase polimérica durante um tempo predefinido, após o qual a fibra é recolhida para a agulha. No caso de se usar um sistema de cromatografia gasosa para separação e quantificação analítica, a fibra é inserida num injector a uma temperatura elevada, onde ocorre desadsorção térmica dos analitos adsorvidos/absorvidos na fibra. O processo pode ser automatizado usando amostragem automática com uma seringa modificada para o efeito.

Os analitos são adsorvidos/absorvidos na fase polimérica da fibra até que o equilíbrio se estabeleça no sistema. A quantidade de analito extraída é determinada pela grandeza do coeficiente de partição do analito entre a matriz da amostra e o material polimérico.

Em SPME, os analitos normalmente não são extraídos de forma quantitativa da matriz, no entanto, os métodos de equilíbrio são mais selectivos porque aproveitam as vantagens das diferenças nas constantes de distribuição entre a fase extractora/matriz para separar os analitos das interferências. Uma das principais vantagens da técnica é que, em princípio, muitas das espécies sem interesse não são transferidas para a fase extractora.

A quantificação de analitos pode ser feita utilizando técnicas de adição de padrão, que compensam as variações matriciais e o seu efeito nas constantes de distribuição.

Os analitos extraídos são introduzidos no sistema analítico de uma forma simples, por colocação da fibra num sistema de desadsorção (figura 14). Este processo facilita a rápida separação entre espécies e o aparecimento de picos com boa resolução no sistema cromatográfico. Desta forma, a SPME resulta numa integração dos primeiros passos num procedimento analítico: extracção, concentração da amostra e introdução da mistura extraída num instrumento analítico.

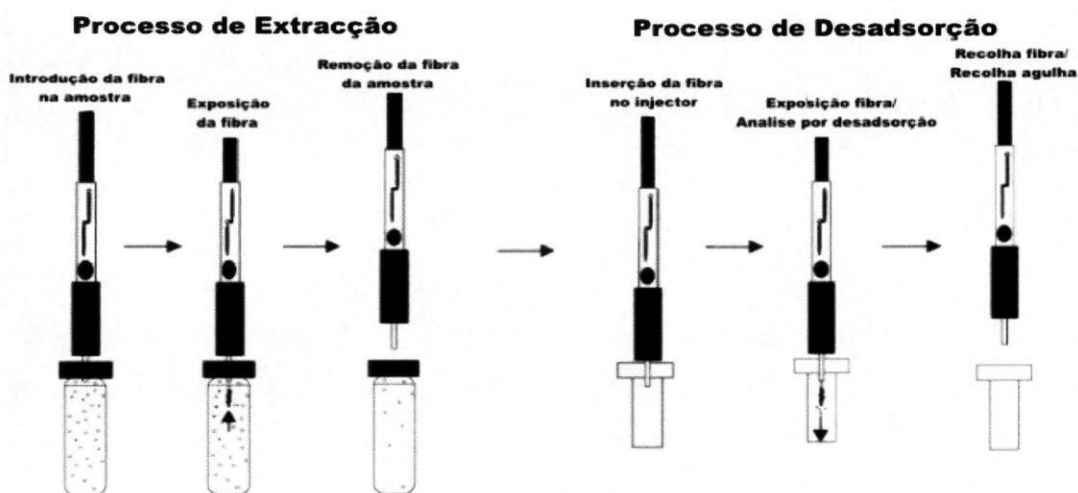


Figura 14 – Processo de extracção e desadsorção em SPME²⁵

A amostragem por SPME pode ser realizada por extracção directa, extracção em *headspace* e extracção com membrana protectora.

A figura 15 ilustra as diferenças entre cada um dos casos.

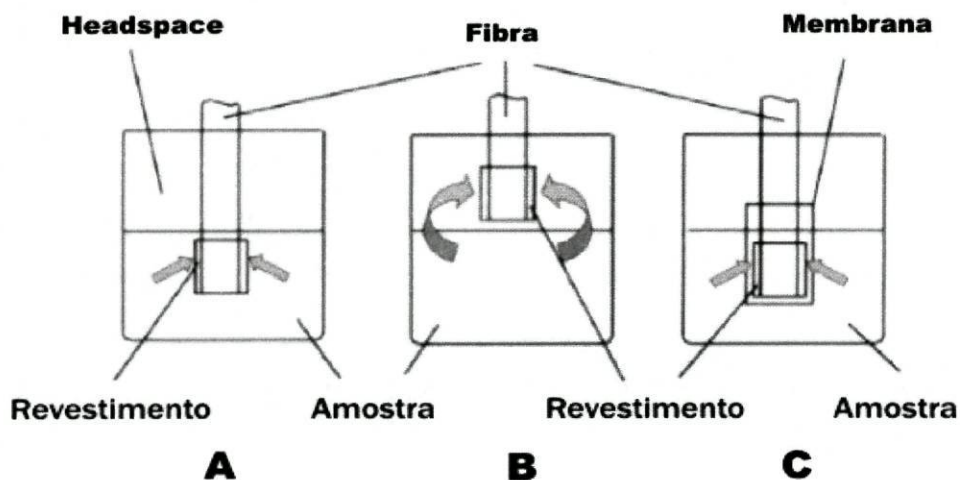


Figura 15 – Diferentes processos de extração por SPME²⁵

Na extração directa (figura 15A), a fibra é inserida na amostra e os analitos passam da matriz para a fase extractora. De forma a facilitar a rápida extração, é necessária agitação enérgica e uniforme. Para amostras gasosas, a convecção natural é, normalmente, suficiente para facilitar o estabelecimento rápido do equilíbrio, no entanto, para matrizes aquosas, técnicas de agitação mais eficiente (fluxo rápido da amostra, movimento rápido da fibra, do frasco ou agitação ultra sónica) são necessárias para reduzir o efeito da “zona de deflexão” produzida nas proximidades da fibra como resultante do transporte difusional lento do analito através da camada estacionária da matriz líquida que rodeia a fibra.

No caso da extração no *headspace* (figura 15B), os analitos são extraídos da fase gasosa em equilíbrio com a amostra. A principal razão desta modificação de processo é proteger a fibra de efeitos adversos causados por substâncias não voláteis presentes na matriz da amostra. A extração no *headspace* permite modificações da matriz, incluindo ajuste de pH sem afectar a fibra. Num sistema constituído por uma amostra líquida e o seu *headspace*, a quantidade de analito extraído pela fibra não depende da localização da fibra, logo a sensibilidade da amostragem em *headspace* é a mesma da sensibilidade na amostragem directa, desde que o volume das duas fases seja igual nos dois modos de amostragem. No entanto, o modo de amostragem tem um impacto muito importante na cinética da extração. Quando a fibra está no *headspace*, os analitos são removidos primeiro do *headspace*, seguido de extração indirecta da matriz. Desta forma os analitos voláteis são extraídos mais rapidamente que os semi-voláteis. A temperatura

tem um importante efeito na cinética do processo, uma vez que determina a pressão de vapor dos analitos.

Geralmente, o tempo de equilíbrio para compostos voláteis é menor em extracção por *headspace* do que em extracção directa, devido a que uma porção substancial do analito está presente no *headspace* antes do início do processo de extracção, existe uma interface grande entre a matriz da amostra e o *headspace*, e o coeficiente de difusão na fase gasosa é normalmente muito superior ao da fase líquida. Como a concentração dos compostos semi-voláteis na fase líquida à temperatura ambiente é baixa, a extracção no *headspace* desses mesmos compostos pode ser melhorada usando uma agitação mais eficiente ou aumentando a temperatura do sistema.

No terceiro modo de extracção (extracção com membrana protectora, figura 15C) a fibra é separada da amostra por uma membrana selectiva, que permite a passagem do analito e impede a passagem das espécies interferentes. O principal objectivo do uso desta membrana é proteger a fibra de efeitos adversos causados por esses compostos quando amostras muito “suja” são analisadas.

A SPME tem sido aplicada na análise de pesticidas organoclorados, organofosforados e organoazotados usando-se fibras revestidas com poliacrilato, relativamente polar e com polidimetilsiloxano, não polar.

A extracção no *headspace* é a mais usada neste tipo de estudos de pesticidas^{28,30,31} porque permite uma maior selectividade das espécies extraídas, consequente minimização do efeito de matriz e um aumento de vida da fibra de SPME.

2.4.2 – Optimização e calibração em SPME

A eficiência da extracção por SPME depende de diversos parâmetros²⁵ de acordo com a analito a extrair e o tipo de amostra.

Frequentemente, o sistema é complexo, tal como uma amostra constituída por uma fase aquosa com partículas sólidas em suspensão, existindo, portanto, interacções de adsorção com os analitos, e uma fase gasosa no *headspace*. Em alguns casos, têm ainda de ser considerados factores específicos, tais como perdas de analitos por biodegradação ou adsorção nas paredes do frasco que contém a amostra. Na discussão que se segue considera-se um sistema trifásico: o revestimento da fibra, a fase gasosa ou *headspace* e uma matriz homogénea tal como uma solução aquosa.

Nestas condições, a quantidade de um analito extraído por uma fase polimérica está relacionada com o equilíbrio total do analito nas três fases do sistema. Uma vez que a massa total do analito deve manter-se constante durante o processo de extracção, tem-se que

$$C_0 V_s = C_f^\infty V_f + C_h^\infty V_h + C_s^\infty V_s \quad (3)$$

em que C_0 é a concentração inicial do analito na matriz; C_f^∞ , C_h^∞ e C_s^∞ representam as concentrações em equilíbrio do analito na fibra (C_f^∞), no *headspace* (C_h^∞) e na matriz da amostra (C_s^∞); V_f , V_h , V_s são os volumes do revestimento da fibra, do *headspace* e da matriz, respectivamente.

Se definirmos a constante de distribuição fibra/*headspace* como $K_{fh} = C_f^\infty / C_h^\infty$ e a constante de distribuição *headspace*/matriz da amostra como $K_{hs} = C_h^\infty / C_s^\infty$, a quantidade do analito adsorvido/absorvido pelo revestimento da fibra, $n = C_f^\infty V_f$, pode ser expressa como

$$n = \frac{K_{fh} K_{hs} V_f C_0 V_s}{K_{fh} K_{hs} V_f + K_{hs} V_h + V_s} \quad (4)$$

se

$$K_{fs} = K_{fh} K_{hs}$$

rearranjando a equação anterior, obtém-se

$$n = \frac{K_{fs} V_f C_0 V_s}{K_{fs} V_f + K_{hs} V_h + V_s} \quad (5)$$

Esta equação mostra que, em condições de equilíbrio, a quantidade de analito extraído é independente da localização da fibra no sistema. Ela pode ser colocada no *headspace*, ou directamente na amostra, desde que os volumes do revestimento da fibra, *headspace* e amostra se mantenham constantes.

A possibilidade de quantificar analitos usando SPME reside na proporcionalidade entre as quantidades de analito adsorvido na fibra e a concentração do mesmo na amostra.

A área superficial disponível para adsorção/absorção é proporcional ao volume do revestimento da fibra se se assumir porosidade constante da espécie sorbente. Para concentrações muito elevadas a saturação da superfície pode resultar em perda de linearidade. Similarmente, grandes concentrações de espécies competitivas interferentes podem desalojar o analito da superfície da fibra.

A equação 5, porém, descreve apenas o aspecto termodinâmico da SPME, e não engloba o aspecto cinético. O intervalo de tempo necessário para que se atinja o equilíbrio depende das transferências de massa no sistema (coeficientes de difusão).

2.4.2.1 – Aspectos práticos para otimização da SPME

Um método otimizado assegura uma boa resposta do sistema estudado. Vários aspectos importantes devem ser considerados durante o desenvolvimento de um processo de SPME. Parâmetros operacionais básicos tais como a escolha do revestimento da fibra, o tempo e temperatura de extracção, o volume e a agitação da amostra são fundamentais em SPME.

Seleção do revestimento da fibra

A natureza química do(s) analito(s) alvo determina o tipo de revestimento da fibra a usar.

A seleção do revestimento é baseada primariamente nas características de volatilidade e polaridade do analito. Polidimetilsiloxano (PDMS) é um revestimento muito utilizado e deve ser considerado como opção no caso de analitos não polares. É muito robusto e suporta temperaturas de injector até cerca de 300 °C. PDMS é uma fase líquida não polar e extrai analitos não polares num intervalo de massas bastante largo. Pode também ser aplicado a compostos ligeiramente polares, após optimização das condições de extracção.

As constantes de distribuição e o volume do revestimento influenciam a sensibilidade do método e o tempo de extracção. No caso da microextracção em *headspace* com

agitação, revestimentos finos normalmente proporcionam extracções mais rápidas mas podem limitar a sensibilidade do método. De uma forma geral, para acelerar o processo de amostragem deve ser usado o revestimento mais fino que origine a sensibilidade desejada.

No caso da extracção de pesticidas organoclorados associada a cromatografia gasosa, estudos efectuados^{29,30,31,32} evidenciam que a melhor fibra para a extracção dos analitos é a de PDMS.

Seleccção do reagente derivatizante

A derivatização efectuada antes ou durante a extracção pode melhorar a sensibilidade e selectividade tanto do passo de extracção como de detecção, assim como activar a determinação de analitos normalmente não susceptíveis de análise por este processo.

Métodos de pós-extracção apenas melhoram o comportamento cromatográfico e/ou detecção. A incorporação de um passo derivatizante complica o procedimento de SPME, pelo que apenas deve ser usado quando absolutamente necessário. Na determinação de analitos em matrizes complexas pode-se produzir reacções selectivas que resultem em menos interferências no processo de quantificação.

Seleccção do modo de microextracção

O modo de microextracção a usar depende da composição da matriz da amostra, da volatilidade do analito e da sua afinidade para a matriz. A extracção no *headspace* é a adequada no caso de matrizes complexas com analitos de média ou alta volatilidade, uma vez que os tempos de equilíbrio são menores quando comparados com a extracção directa, além de que permite fazer uma selecção dos analitos alvo pelo controlo da temperatura de extracção. No caso de matrizes complexas, a não exposição directa permite evitar a adsorção de espécies presentes não em estudo que, assim, competiriam para a adsorção na fibra e se poderiam comportar como interferentes.

Seleção do processo de agitação

Os tempos de equilíbrio em amostras gasosas são curtos e, frequentemente, limitados pelo coeficiente de difusão dos analitos no revestimento da fibra. No entanto, para amostras líquidas, a agitação é necessária, em grande parte dos casos, para facilitar e acelerar o transporte de massas entre a amostra e a fibra.

O uso de agitação magnética é muito comum nas experiências que envolvem SMPE. No caso de microextração no *headspace* grandes velocidades rotacionais de agitação maximizam a passagem do analito da solução para o *headspace*. Na microextração de analitos de amostras sólidas em suspensão, este tipo de agitação é dificultado.

A utilização de outras técnicas de agitação como, por exemplo, os ultra-sons, pode acelerar ainda mais o processo. É importante salientar que a homogeneidade da agitação em todos os ensaios é fundamental, uma vez que dela depende em grande parte a reprodutibilidade dos ensaios e conseqüente quantificação eficaz.

Optimização das condições de desadsorção dos analitos na fibra

A temperatura e tempo de desadsorção dos analitos da fibra são factores importantes a ter em consideração.

A temperatura do injector do cromatógrafo desempenha um papel essencial no processo de desadsorção dos analitos da fibra. Deve ser suficientemente elevada para uma desadsorção completa num curto intervalo de tempo, mas não provocar decomposição dos analitos.

O tempo de desadsorção deve ser optimizado e, periodicamente, deve ser verificada a inexistência de “carry-over”.

Optimização do volume da amostra

O volume da amostra deve ser escolhido com base nos valores das constantes de distribuição envolvidas no sistema.

A quantidade de analito adsorvida pela fibra depende de vários factores: concentração inicial da amostra, volume da fase estacionária (fibra), volume da amostra, volume do *headspace*, constante de distribuição entre a matriz da amostra e a fibra e a constante de distribuição entre o *headspace* e a amostra (equação 5).

Desta forma, os volumes relativos da amostra e do *headspace* podem influenciar a quantidade de analito adsorvido na fibra. Devem ser escolhidas condições experimentais que levem a uma maior quantidade de analito adsorvido e, conseqüentemente, a um aumento de sensibilidade do método de microextração.

Estudos efectuados indicam que a eficiência da extração aumenta à medida que o volume do *headspace* diminui²⁹, como esperado teoricamente pela equação 5, porém, em alguns casos, isso apenas se verifica até um determinado valor de volume, abaixo do qual a eficiência se mantém constante.

O aumento do volume da amostra e diminuição do volume de *headspace* provoca um aumento da sensibilidade até que $V_s \gg K_{hs}V_h$.

Optimização da temperatura de extração

A temperatura tem um efeito significativo na cinética do processo de extração.

Temperaturas elevadas aumentam a velocidade de difusão através das fases, diminuindo o tempo para se atingir o equilíbrio, mas provocando um abaixamento dos valores das constantes de distribuição.

Quando a extração é feita em *headspace*, a temperatura determina a pressão de vapor das substâncias; desta forma o aumento da temperatura de extração favorece a passagem dos analitos para a fase de vapor, o que facilita a extração. No entanto, se a temperatura for demasiado elevada, pode favorecer o processo de desadsorção dos analitos (o que seria o contrário do propósito da extração) ou até alterar propriedades da amostra ou do analito.

De uma forma geral, se a percentagem extraída é a preocupação principal deve-se usar temperaturas mais elevadas, desde que acutelados os factores paralelos.

Determinação do tempo de microextração

O tempo necessário para que se atinja o equilíbrio do analito entre a amostra e o revestimento da fibra (tempo de equilíbrio) é definido como sendo o intervalo de tempo após o qual a quantidade de analito extraído se mantém constante e corresponde (dentro dos limites de erro experimental) à quantidade extraída após tempo infinito.

Nas determinações do tempo de equilíbrio, uma redução substancial do declive da curva pode ser tomada erradamente como o ponto no qual o equilíbrio é atingido, como se exemplifica na figura 16.

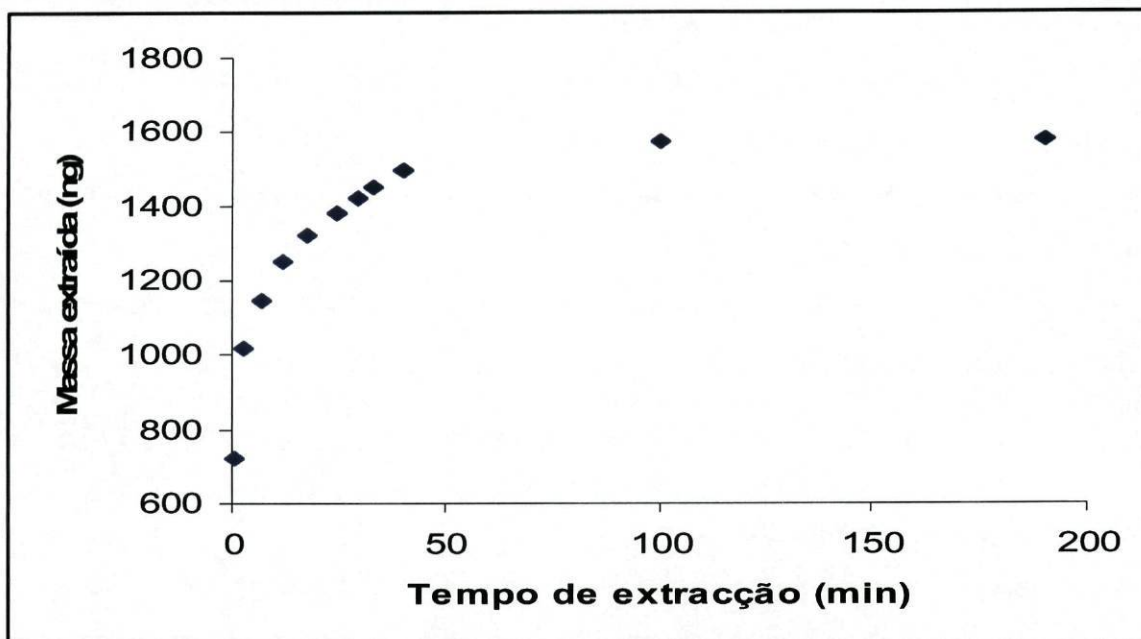


Figura 16 – Relação entre o tempo de extração e a massa extraída²⁵

No equilíbrio, pequenas variações no tempo de extração não afectam a quantidade de analito extraída pela fibra. Quando o tempo de equilíbrio é excessivamente longo, pode-se usar tempos de extração mais curtos. No entanto, nestes casos, o tempo de extração e as condições de transferência de massa devem ser controladas cuidadosamente de forma a assegurar uma boa precisão entre ensaios. As condições de transferência de massa e a temperatura devem-se manter constantes ao longo de todas as experiências.

Efeito da adição de sal

A adição de sal, num sistema de adsorção pode influenciar o equilíbrio entre fases num processo de SPME.

Pode conduzir á diminuição da eficiência de extração quando a solubilidade dos compostos não se altera. Este facto advém dos coeficientes de partição dependerem mais dos valores das actividades e não tanto das concentrações. Teores de sais elevados, correspondentes a valores elevados de força iónica, podem diminuir significativamente

os coeficientes de actividade de alguns analitos. Desta forma, o efeito de adição de sal depende do composto e da matriz, ocorrendo situações em que a eficiência da extracção pode diminuir, aumentar ou apresentar um máximo para valores intermédios de percentagem de saturação do soluto³³.

Por outro lado, o tipo de sal utilizado é importante, uma vez que pode introduzir alterações noutros parâmetros, tal como o pH.

Este efeito da adição de sal é conhecido como *salting out*, e pode fazer diminuir a solubilidade de determinados analitos, o que favorece a extracção.

Efeito do pH

O efeito provocado pela variação de pH não é o mesmo para todos os analitos. O aumento do pH, pode favorecer a extracção de alguns compostos, não apresentar efeitos sobre outros, ou mesmo ter um efeito negativo. A utilização de valores de pH mais extremos pode aumentar a velocidade de hidrólise de certos analitos, mas pode melhorar a extracção de outros.

Uma vez que os pesticidas organoclorados em estudo não sofrem hidrólise, a influência do pH na extracção por SPME é desprezável. Deve-se considerar, no entanto, que pode haver influência da variação do pH sobre a população bacteriana e consequente composição dos sedimentos.

2.4.3 – Selecção do método de calibração

Diversos procedimentos de calibração podem ser usados em determinações por SPME acoplada a cromatografia gasosa. Inicialmente, deve ser verificado que a fibra não causa interferências na determinação. A fibra deve ser previamente condicionada, num injector de GC. Este processo assegura que o revestimento da fibra não introduz interferências no sistema. O condicionamento da fibra pode ser repetido após a amostragem de quantidades significativas de compostos de elevada massa molecular, uma vez que este tipo de compostos requer um maior tempo de desadsorção.

Em casos de matrizes simples, a calibração pode não ser necessária se a constante de distribuição apropriada que define a curva de calibração está disponível na literatura, ou se pode ser calculada por parâmetros cromatográficos. A calibração externa pode ser

usada quando a matriz é bem definida. Nesse caso, os padrões devem ser preparados de tal forma que tenham a mesma composição da amostra. No caso de amostras com matrizes complexas, tal como sedimentos, os efeitos de matriz não podem ser desprezados.

Um procedimento especial de calibração, tal como o método da adição padrão, deve ser usado no caso de amostras mais complexas. Nestes métodos, assume-se que o(s) analito(s) alvo tem um comportamento semelhante ao padrão durante a extracção. Este procedimento é válido quando se analisa amostras homogéneas. No entanto, pode não o ser totalmente no caso de amostras heterogéneas, a não ser no caso dos analitos serem completamente libertados da matriz nas condições usadas. A adição simples de padrão do analito à amostra conduz a uma resposta instrumental que contém os efeitos de matriz. De forma a obter uma recta de calibração mais fiável deve-se usar o método de adição padrão multiponto.

Nesse caso, deve-se analisar o problema e tentar realizar determinações, em que as adições de padrão efectuadas dêem origem a um sinal analítico entre 1,5 e 3 vezes o valor do sinal da amostra³⁴, como é ilustrado na figura 17.

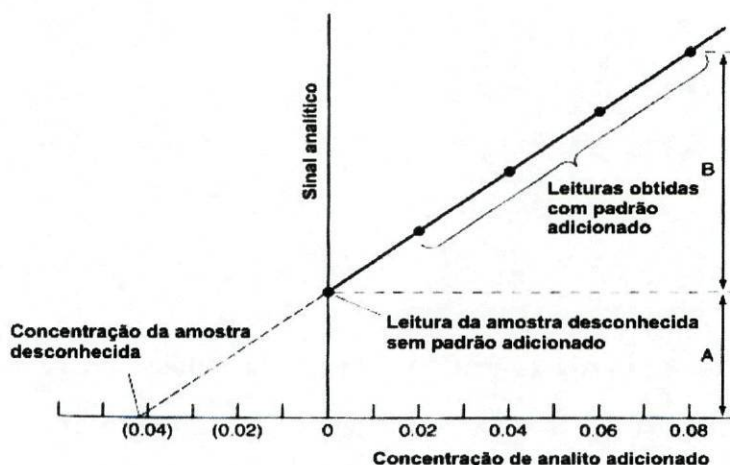


Figura 17 – Gráfico exemplificativo do método de adição padrão³⁵

O cálculo do desvio padrão do resultado no método de adição padrão deve ser determinado matematicamente através da equação 6.

$$\sigma = \frac{S_y}{m} \sqrt{\frac{1}{n} + \frac{\bar{y}^2}{m^2 \sum_i (x_i - \bar{x})^2}} \quad (6)$$

em que S_y é o desvio padrão de y e calcula-se através da equação 7,

$$S_y = \sqrt{\frac{\sum_i (y_i - \bar{y})^2}{n-2}} \quad (7)$$

m é o declive da recta obtido pelo método dos mínimos quadrados, n o número de pontos, \bar{y} é o valor médio de y para os n pontos, \bar{x} o valor médio de x para os n pontos obtidos e \hat{y} representa os valores de y obtidos por ajuste á linha obtida por regressão linear. O somatório no interior da raiz quadrada estende-se a todos os pontos.

O processo de quantificação através do padrão interno, com características semelhantes às do analito, é também aconselhado para matrizes complexas. A quantificação é feita por comparação da resposta do padrão adicionado à amostra com a resposta do analito.

Qualquer que seja o método usado, exige que exista linearidade na gama de concentrações entre a concentração da amostra e a concentração dos padrões mais amostra.

Muitas vezes é importante avaliar estatisticamente diferenças entre médias obtidas para duas amostras diferentes. Para este efeito pode ser utilizado o teste t de Student expresso pela equação 8. Em todo o processo a distribuição dos resultados deve ser normal, condição necessária para a aplicação deste teste.

$$t = \frac{\bar{x}_1 - \bar{x}_2}{\sqrt{s^2 \left(\frac{1}{n_1} + \frac{1}{n_2} \right)}} \quad (8)$$

Na equação 8, s representa o desvio padrão ponderado, \bar{x}_1 e \bar{x}_2 a médias das concentrações obtidas para as amostras a comparar e n_1 e n_2 o número de repetições efectuadas.

O valor de t é depois comparado com um valor de t crítico³⁶, para n_1+n_2-2 graus de liberdade.

2.5– Extracção auxiliada por microondas

O enriquecimento de compostos orgânicos semi-voláteis provenientes de matrizes sólidas pode ser efectuado por métodos clássicos²⁷, concretamente por lixiviação com solventes orgânicos ou Soxhlet e, mais recentemente, por extracção ultra-sónica, extracção super-crítica, extracção com solventes acelerada e extracção assistida por micro-ondas.

Quando a extracção directa por SPME não é possível ou não é eficaz, quando pode-se recorrer a processos que permitem melhorar a eficiência da extracção. Uma das hipóteses é auxiliar a extracção com o recurso a microondas^{28,37,38}. A extracção auxiliada por microondas é uma técnica de extracção que usa solventes polares, tais como a água, para extrair os compostos, por exemplo, das matrizes sólidas. Quando o solvente absorve a energia da radiação de microondas, a temperatura e a pressão aumentam, provocando uma desadsorção mais eficaz dos compostos da matriz. A água é, normalmente, escolhida devido à sua elevada constante dieléctrica e elevada capacidade de absorção da radiação do comprimento das microondas. A temperatura aumenta rapidamente até à temperatura de ebulição da água, ou até acima desta. Eventualmente, os compostos a analisar difundem-se para o solvente, libertando-se da matriz. Para certos compostos orgânicos muito pouco solúveis em água, pode ser usado, por exemplo, o metanol, que tem características próximas da água, sendo menos polar que esta, o que facilita a extracção desses compostos.

Além das propriedades do solvente, outros dois aspectos são fundamentais para a utilização de microondas: o tempo de aquecimento e a potência de aquecimento. Estes parâmetros devem ser estudados e optimizados, para que a extracção decorra da melhor forma possível. Teoricamente, o aumento da temperatura e potência de extracção devem tornar a extracção mais eficiente, até ao ponto em que ocorra interferência com os fenómenos de desadsorção, reduzindo a quantidade de composto extraído, podendo até provocar a decomposição deste.

O uso da extracção auxiliada por microondas alarga o leque de espécies que podem ser extraídas da matriz, assim como a extensão em que esses compostos são extraídos. Desta forma, pode ser possível, usando posteriormente SPME, detectar concentrações muito menores do que sem essa técnica auxiliar.

Capítulo 3

PARTE EXPERIMENTAL

3.1– Introdução

Neste capítulo apresentam-se aspectos gerais da parte experimental. Indicam-se os reagentes e as soluções utilizadas, inclui-se uma secção sobre o material e instrumentação utilizado e faz-se uma descrição de alguns procedimentos efectuados para o acondicionamento do material assim como outros aspectos considerados importantes na execução experimental.

3.2– Reagentes e soluções

Na preparação das amostras foram utilizados os reagentes sem qualquer purificação adicional:

- Sulfito de sódio, Riedel – de Haën, pureza 98%, para análise;
- Cloreto de sódio, Merck, pureza 99.5%, para análise;
- Metanol, Sigma-Aldrich Chromasolv, para cromatografia em fase líquida;

A partir de uma solução padrão comercial certificada de uma mistura de 18 pesticidas organoclorados com concentração 2000 µg/mL em tolueno/hexano (50/50), Sigma, prepararam-se soluções diluídas 1:770 em metanol, obtendo-se soluções stock padrão, de concentração 2,60 ppm.

Estas soluções foram preparadas semanalmente e mantidas num frigorífico sempre que não estavam a ser usadas.

Utilizou-se também um sedimento de referência – IAEA408 da International Atomic Energy Agency, Analytical Quality control Service.

3.3– Material

Além de material de uso corrente no laboratório, foram utilizados:

- Balões volumétricos de vidro de classe A;
- Micropipetas GILSON (20 µL, 100 µL, 1000 µL e 5000 µL);

- Frascos de 7 mL, 20 mL e 22 mL SUPELCO, com tampa perfurada;
- Barras magnéticas 15mm x 6mm;
- Microseringa HAMILTOM para GC de 100 μ L
- Septos de PTFE/Silicone para *headspace* vial, SUPELCO;
- Tampas metálicas com septos para amostrador automático;
- Fibras SPME SUPELCO 100 μ m PDMS, para amostragem manual e para amostrador automático com Merlin Microseal;
- *Holder* para fibra SPME, para uso manual, SUPELCO;
- *Holder* para fibra SPME, para amostrador automático, SUPELCO;
- Coluna cromatográfica CP-SIL8CB LowBleed/MS 60 m x 0,250 mm, (0,25 μ m film thickness) VARIAN;

3.4– Instrumentação

- Cromatógrafo VARIAN 3800 Gas Chromatograph, com um injetor programável com repartição/sem repartição (split/splitless) equipado com um detector por espectrometria de massa VARIAN Saturn GC-MS 2000
- Amostrador automático CTC Analytics, modelo Combipal
- Balança METTLER TOLEDO AG 245;
- Banho termostaticado com sistema de circulação e cabeça de aquecimento SELECTA Tectron Bio;
- Agitador magnético FRAMO GERÄTETECHNIK;
- Microondas Milestone MLS1200 Mega
- Centrifugador JASC Universal 16R
- Sistema de purificação de água SIMPLICITY Millipore;

3.5– Procedimentos especiais

O material utilizado requer cuidados adequados para garantir a ausência de contaminantes.

3.5.1 – Condicionamento da fibra

A fibra foi condicionada segundo as instruções do fabricante, tendo sido colocada no injector do cromatógrafo a uma temperatura de 250 °C durante 60 minutos. Este procedimento serve para limpar a fibra de espécies contaminantes.

No início de cada dia de trabalho condicionou-se a fibra durante 30 minutos no injector do cromatógrafo e procedeu-se ao traçado de um cromatograma de forma a verificar o seu estado de limpeza. Em alguns casos, a fibra foi colocada num banho de água milipore com agitação constante durante algum tempo, para lavagem.

3.5.2 – Condicionamento dos septos

Antes da utilização dos septos, para amostragem manual, estes foram condicionados num forno a uma temperatura constante de 250 °C, durante 60 minutos. Todos os septos foram utilizados apenas uma vez.

3.5.3 – Condicionamento das barras magnéticas, frascos e material de plástico

Todas as barras magnéticas e frascos foram lavados, passados por metanol e deixados em ácido nítrico a 20% durante um tempo nunca inferior a 3 dias. Após este período de tempo, foram retirados, lavados abundantemente com água e guardados numa estufa, a uma temperatura de cerca de 60°C, até nova utilização.

O material de plástico utilizado na amostragem foi descontaminado por imersão numa solução de ácido nítrico a 20 %, durante 24 horas, lavado várias vezes com água bi-desionizada e seco numa câmara de fluxo laminar.

3.5.4 – Condicionamento da coluna cromatográfica

No início de cada utilização, a coluna do cromatógrafo foi deixada a 300 °C durante 30 minutos, com o injector com a válvula de repartição aberta.

Após a exposição da fibra limpa e a selecção do programa a usar, era traçado um cromatograma, de forma a verificar-se a boa operacionalidade do sistema.

Capítulo 4

PROGRAMAS DE CROMATOLOGRAFIA
GASOSA E ESPECTROMETRIA DE
MASSA

4.1 - Introdução

Nesta secção descrevem-se e avaliam-se programas utilizados em cromatografia acoplada a espectrometria de massa que foram usados na fase inicial e final do trabalho. Mostra-se a implementação do processo de aquisição de dados e a importância deste procedimento para o trabalho desenvolvido.

4.2 - Aquisição de dados por GC-MS

Para a implementação do processo de análise cromatográfica começou-se por determinar os tempos de retenção das espécies em estudo.

Usou-se para tal fim uma solução padrão com uma mistura de 18 pesticidas organoclorados.

4.2.1 – Programa de cromatografia gasosa

A temperatura do injetor do cromatógrafo foi mantida a 250°C, dado que estudos relatados^{39,40} e verificados neste trabalho, indicavam a utilização desta temperatura de desadsorção para pesticidas organoclorados.

O estado de repartição do fluxo durante o programa é o apresentado na tabela 1.

Tabela 1 – Estado de repartição do injetor do cromatógrafo

Tempo (minutos)	Estado repartição no injetor	Razão de repartição
0	LIGADO	10
0,01	DESLIGADO	
7	LIGADO	10

A repartição divide o fluxo de gás que passa pelo injetor e permite que apenas parte desse fluxo entre para a coluna. Antes do programa se iniciar, a repartição apenas deixa entrar 10% do gás para o sistema. Após a fracção mínima de tempo possível depois da corrida se iniciar, todo o gás arrastador entra na coluna. Esta situação manteve-se

durante 7 minutos, tempo após o qual, a repartição volta à situação inicial. Este tempo de 7 minutos foi escolhido após, experimentalmente, se ter verificado que a desadsorção dos analitos da fibra era completa.

O fluxo de hélio foi mantido constante e igual a 1,0 ml/min.

O programa de temperaturas utilizado é descrito na tabela 2.

Tabela 2 – Rampa de temperaturas do cromatógrafo

Temperatura (°C)	Velocidade de aquecimento (°C/min)	Pausa (min)	Tempo Total (min)
40		5	5
160	30	0	9
275	5	0	32
300	30	3	35,83

Este programa de temperaturas otimizado teve em conta a duração do ensaio e a separação efectiva dos analitos em estudo.

4.2.2 – Interface GC-MS

A interface entre o GC e o MS é importante porque devido às diferenças de funcionamento entre as duas partes no que diz respeito à dinâmica de fluidos deve-se conciliar com muito cuidado as diferentes pressões dos dois sistemas.

Devem-se definir com cuidado os parâmetros fundamentais. As temperaturas da armadilha de iões, do distribuidor (*manifold*) e da linha de transferência foram mantidas constantes em todas as análises a 220, 60 e 230°C, respectivamente.

4.3– Descrição dos programas de GC-MS

O traçado dos cromatogramas para a determinação dos tempos de retenção dos pesticidas alvo de estudo, foi feito com varrimento total (*fullscan*), porém, ao longo do trabalho foram criados vários programas, tendo como objectivo a eliminação de alguns

problemas originados por interferências e obtenção de uma melhor resolução dos picos cromatográficos.

Apenas se descrevem pormenorizadamente o primeiro e último programas criados, de forma a evidenciar a resolução dos problemas surgidos.

4.3.1 – Programa inicial

O programa foi construído em varrimento total, tendo como principal objectivo a determinação dos tempos de retenção das espécies a analisar e a posterior separação em segmentos para optimização pelo método de monitorização dos iões seleccionados (SIS).

Tabela 3 – Programa inicial em varrimento total

Programa: VARRIMENTO TOTAL					
Segmentos do programa	Início (min.)	Fim (min.)	m/z mínimo	m/z maximo	Modo de ionização
Espera	0,00	4,00	40	650	Nenhum
Pesticidas	4,00	35,83	50	400	EI Auto

Utilizando este programa com amostras de um sedimento de referência dopado foi possível detectar e identificar quinze pesticidas em estudo, cujos tempos de retenção se indicam na tabela 4.

Tabela 4 – Tempo de retenção dos pesticidas em estudo

Pesticida organoclorado	Tempo de retenção / min
α -Lindano	21,48
β -Lindano	22,34
γ -Lindano	22,70
δ -Lindano	23,69
Heptacoloro	25,40
Aldrina	26,81
Heptacoloro epóxido	28,23
Endossulfano I	29,64
DDE	30,22
Dieldrina	30,68
Endrina	31,54
DDD	31,82
Endossulfano II	31,91
DDT	33,02
Metoxicloro	34,45

O uso deste programa de aquisição implicava fortes limitações na detecção dos analitos em estudo em amostras de sedimentos estuarinos. Tendo em conta a baixa concentração dos analitos na matriz em estudo, seria necessário minimizar o efeito de interferentes e o ruído na linha de base de forma a conseguir-se baixar o limite de detecção para valores adequados aos níveis das amostras em estudo.

Desta forma foram construídos vários programas de aquisição em modo de monitorização de iões seleccionados (SIS).

4.3.2 – Programa final

A aquisição correcta de dados é um aspecto fundamental num sistema analítico, para a obtenção de dados fiáveis. No caso das amostras usadas neste trabalho é importante, como atrás referido, minimizar os efeitos de matriz, coluna e fibra de microextracção de

forma a conseguir-se atingir a ordem de grandeza das concentrações dos analitos em estudo.

Os espectros de massa dos analitos resultam da contabilização de um conjunto de fragmentos identificados pelas razões m/z . Como cada composto tem o seu espectro de massa característico, é importante determinar qual a parte do espectro de massa que se pretende utilizar para a obtenção dos resultados da experiência efectuada.

Convém salientar que, se se optar por utilizar todo o espectro de massa correspondente a determinado pico, pode-se estar a incluir alguns interferentes que tenham o mesmo tempo de retenção que a espécie em questão. A alternativa mais comum é utilizar apenas alguns fragmentos m/z . Se forem escolhidos os fragmentos estatisticamente mais prováveis do espectro de massa da espécie a determinar, minimiza-se a probabilidade de interferências.

Como se pode verificar, a escolha da forma de aquisição dos dados em espectrometria de massa é uma área particularmente sensível e de extrema importância para a qualidade dos resultados analíticos. Por esse motivo, as deduções aparentemente lógicas devem ser substituídas por comprovações através de resultados.

Sendo assim, o desenvolvimento de um método de aquisição de dados por monitorização de iões seleccionados (SIS) é um processo que obriga a uma conjugação perfeita entre vários factores de forma a poder-se maximizar as capacidades do sistema analítico. No desenvolvimento do programa final, usando o método SIS, definiram-se alguns critérios, tais como a ejeção de iões interferentes e a selecção dos iões mais característicos para cada pesticida.

O critério usado para a escolha dos iões a armazenar foi a abundância relativa superior a 500 e massa do fragmento superior a 53 (limitação inerente ao método SIS)

Desta forma, os iões característicos escolhidos para cada pesticida foram os descritos na tabela 5.

Tabela 5 – Iões característicos dos pesticidas em estudo

Pesticida organoclorado	Iões Característicos
α -Lindano	109,111,181,183,217,219
β -Lindano	73,75,85,109,111,181,183,217,219
γ -Lindano	109,111,181,183,217,219,221
δ -Lindano	109,111,181,183,217,219,221
Heptacloro	100,270,272,274
Aldrina	66,79,91,263
Heptacloro epóxido	81,351,353,355
Endossulfano I	63,69,75,85,89,102,103,120,121,159,160,170,193, 195,197,205,206,207,209,229,235,237,239,241,242, 243,261,263,265,267,269,272,274,275,277,279
DDE	246,248,316,318
Dieldrina	79
Endrina	67,79,81,82,261,263,265,281
DDD	165,235,237
Endossulfano II	159,160,170,193,195,197,204,205,206,207,209, 229,232,235,237,239,241,243,263,265,267,269, 271,277,339
DDT	165,235,237
Metoxicloro	227

Outro aspecto tido em conta foram os iões interferentes a serem ejetados que têm como origem, entre outras, a coluna cromatográfica e o revestimento da fibra de SPME.

Após experiências realizadas conclui-se que os iões a ejectar seriam os iões 74,149,247, 355 e 381.

Depois da escolha dos iões característicos de cada pesticida, da ejeção dos iões interferentes e da optimização dos intervalos dos segmentos para a construção do programa final, chegou-se ao programa de aquisição de dados, descrito na tabela 6.

Tabela 6 – Programa de aquisição em modo SIS

Programa: RIZOSFERA SIS FINAL					
Segmentos do programa	Início (min.)	Fim (min.)	m/z mínimo	m/z máximo	Modo de ionização
	0,00	20,00	360	400	
Lindano(s)	20,00	24,50	67	227	El Auto
Heptacloro	24,50	26,00	94	280	El Auto
Aldrina	26,00	27,50	60	269	El Auto
Heptacloro epóxido	27,50	28,80	75	361	El Auto
Endossulfano I	28,80	29,90	57	395	El Auto
DDE/Dieldrina	29,90	31,10	73	324	El Auto
Endrina/ DDD/ Endossulfano II	31,10	32,50	57	395	El Auto
DDT	32,50	33,50	57	395	El Auto
Metoxicloro	33,50	35,83	222	233	El Auto
Preparação de iões - SIS					
Segmentos do programa	Intervalos de massas adquiridas				
	360-400				
Lindano(s)	72-76,84-86,108-112,180-184,216-222				
Heptacloro	99-101,269-275				
Aldrina	65-67,78-80,90-92,262-264				
Heptacloro epóxido	80-82,350-356				
Endossulfano I	62-122,158-209,226-280,338-340,384-390				
DDE/Dieldrina	78-80,245-249,315-319				
Endrina/ DDD/ Endossulfano II	62-122,158-209,226-282,338-340,384-390				
DDT	164-166,234-238				
Metoxicloro	226-228				

4.4- Quantificação

Para as experiências realizadas sem amostrador automático, no programa de cálculo para a quantificação de cada pesticida apenas foram usados os íons característicos com maior abundância relativa.

Na tabela 7 apresenta-se os fragmentos m/z usados nos cálculos de quantificação de áreas.

Tabela 7 – Fragmentos usados na quantificação de áreas

Pesticida organoclorado	Fragmentos m/z
α -Lindano	181+183+217+219+111+109+51
β -Lindano	181+183+217+219+111+109+51
γ -Lindano	181+183+217+219+111+109+51
δ -Lindano	181+183+217+219+111+109+51
Heptacloro	100+272+274
Aldrina	66+263
Heptacloro epóxido	81+353+355
Endossulfano I	195+241+197+239+207+237+243
DDE	246+248+316+318
Dieldrina	79
Endrina	81+263+82+79+265
DDD	165+235+237
Endossulfano II	195+241+197+239+207+237+243
DDT	235+237
Metoxicloro	227

Nos casos em que as experiências foram realizadas com recurso ao amostrador automático, o software instalado diferia do anterior, pelo que a quantificação foi obtida pela integração das áreas dos picos.

Capítulo 5

IMPLEMENTAÇÃO DO MÉTODO ANALÍTICO

5.1- Introdução

Neste capítulo referem-se os vários passos na implementação do método analítico utilizado. São descritos procedimentos adoptados para o desenvolvimento e optimização do método analítico. Foi feito um estudo de parâmetros de uma forma individual, visto a complexidade e variedade das matrizes dificultar o uso de métodos de optimização multivariada.

5.2– Optimização dos parâmetros relativos a SPME

5.2.1 – Escolha do revestimento da fibra de SPME

Dos estudos relatados ^{19,20,24,40,41} concluiu-se que para a determinação de pesticidas organoclorados o revestimento ideal da fibra para a microextracção em fase sólida seria o polidimetilsiloxano (PDMS).

Desta forma, todos os ensaios foram realizados recorrendo a este tipo de fibra.

5.2.2 – Temperatura e tempo de microextracção

Estes dois parâmetros foram anteriormente optimizados em trabalhos preliminares ^{42,43}, tendo-se chegado à conclusão que a temperatura a que a extracção de analitos era mais efectiva era 80°C.

Relativamente ao tempo de microextracção, este é um parâmetro importante visto que como se esperaria, tem relação com a quantidade de analito extraído. Desta forma chegou-se à conclusão que o tempo ideal de microextracção seria de 60 minutos ⁴².

5.2.3 – Volume dos frascos

Os volumes relativos da amostra e do *headspace* podem influenciar a quantidade de analito adsorvida na fibra usada para microextracção ⁴⁴. Desta forma no sentido de determinar qual a capacidade dos frascos mais adequada para as determinações a realizar, foram efectuados ensaios utilizando 10 mL de amostra em frascos de 22 mL e 3

mL de amostra em frascos de 7 mL (sendo a concentração dos analitos nas soluções, tempo de extracção e temperatura iguais em ambos os casos). Os resultados obtidos revelaram que a utilização de frascos de 22mL era favorecida.

5.2.4 – Efeito da adição de sal (*salting out*)

Foram efectuadas experiências para estudar o efeito da presença de cloreto de sódio e de sulfito de sódio nos extractos de sedimentos estuarinos.

O efeito, designado por *salting out*, pode facilitar a extracção dos pesticidas em consequência da alteração da força iónica da solução, o que desloca o equilíbrio dos pesticidas entre a solução e o *headspace*, no sentido do *headspace*.

O sulfito de sódio tem uma vantagem adicional que é eliminar as espécies de enxofre que possam existir na amostra e que provocam a observação de interferências no cromatograma.

Na tabela 8 resumem-se os resultados do estudo do efeito da adição de cloreto de sódio e sulfito de sódio á amostra.

Tabela 8 – Áreas dos picos observados nos cromatogramas obtidos sem adição de sais e usando diferentes quantidades de sais adicionados á amostra.

Pesticida	NaCl 1g	NaCl 1g + Na ₂ SO ₃ 1g	Na ₂ SO ₃ 1g	Sem adição
α-Lindano	528038	55637	34698	182289
β-Lindano	177485	123661	104693	108946
γ-Lindano	357699	70888	53824	143419
δ-Lindano	116860	32163	29618	26675
Heptacloro	36242	28272	5115	5411
Aldrina	128161	63914	58441	121209
Heptacloro epóxido	1803415	956826	1184527	863363
Endossulfano I	647014	27078	112442	384820
DDE	658756	440870	674537	545554
Dieldrina	300510	198561	245727	218853
Endrina	204727	275195	336749	223400
DDD	1119991	837935	1295090	779034
Endossulfano II	261840	-	-	138402
DDT	362204	212580	376628	310655
Metoxicloro	54373	45651	65649	22498

Como se pode verificar pelos resultados obtidos, a adição de cloreto de sódio provocou, geralmente, um aumento das áreas dos picos. As exceções verificam-se para os pesticidas DDE, DDD, DDT e metoxicloro (todos da mesma família, derivados do diclorodifeniletano). Tendo em conta que na maioria dos casos a adição de cloreto de sódio favoreceu a passagem de pesticidas para o *headspace* e nos outros casos se observaram picos com área razoável decidiu-se pelo uso de NaCl apenas.

Outro aspecto importante no *salting out* é a concentração de sal.

Teoricamente, o aumento da força iónica poderia favorecer o processo de libertação dos compostos para o *headspace*. Realizaram-se novas experiências em que se variou a concentração de NaCl nas amostras usando tomas do mesmo extracto.

Na tabela 9 apresentam-se os resultados obtidos.

Tabela 9 – Estudo do efeito da quantidade de cloreto de sódio adicionado à amostra

Pesticida	NaCl 0.5g	NaCl 1g	NaCl 2g	NaCl 4g
α -Lindano	447945	654284	682625	1064272
β -Lindano	76431	84624	95712	1830434
γ -Lindano	212047	490883	499053	761140
δ -Lindano	83018	135.065	153487	301459
Heptacloro	72835	152792	187453	224456
Aldrina	320918	220462	204538	97910
Heptacloro epóxido	1175483	886780	1390375	1417334
Endossulfano I	520392	543952	699142	627863
DDE	850527	696451	531546	239902
Dieldrina	299847	136680	261276	349345
Endrina	506383	332129	327021	265055
DDD	503781	962697	986130	1236103
Endossulfano II	234815	187229	267068	228499
DDT	315490	262478	256514	114046
Metoxicloro	39.009	25.185	40.556	26.624

Nestas experiências pôde-se verificar que, de uma forma geral, tal como se esperava, o aumento da concentração de NaCl, aumentou a quantidade extraída de muitos analitos pela fibra. No entanto, talvez devido a factores competitivos alguns pesticidas são desfavorecidos no processo. Desta forma optou-se por usar uma concentração

relativamente elevada, mas não a concentração máxima. Nas experiências seguintes foram usados 2 gramas de NaCl no processo de extracção por SPME, visto que embora não seja a concentração que mais favorece a microextracção de muitos dos pesticidas, concilia uma extracção aceitável para todos os analitos em estudo.

5.3- Optimização dos parâmetros relativos à extracção assistida por microondas

A extracção directa dos analitos dos sedimentos por SPME pode não ser eficaz, porque normalmente os pesticidas estão adsorvidos na matéria orgânica, o que dificulta, e por vezes, impossibilita a sua passagem para o *headspace*.

Desta forma recorreu-se a extracção auxiliada por microondas. O uso de um solvente polar, que absorve a radiação de microondas, fazendo com que a temperatura e pressão aumentem, favorece a desadsorção dos compostos da matriz.

Foram encontrados alguns artigos^{28,38} que descrevem procedimentos de extracção em que foi estudada a potência usada, o tempo e o procedimento de extracção para os pesticidas em estudo.

Assim, foram efectuadas experiências com sedimento dopado, de forma a optimizar a extracção dos pesticidas organoclorados. Tendo em conta que para este trabalho experimental não se dispunha de um microondas com características semelhantes às dos aparelhos usados nos trabalhos mencionados anteriormente, efectuaram-se pequenas modificações no método de extracção. Usou-se uma potência fixa (190W) e optimizou-se o tempo de extracção. Além disso, foi necessário incluir tempos de repouso entre extracções de forma a não danificar os frascos de amostras que eram sujeitos à acção das microondas.

Foram realizadas extracções com metanol e água, mas conclui-se que os pesticidas organoclorados apresentam uma maior taxa de extracção com auxílio de microondas, com este solvente orgânico, como se depreende dos resultados da Tabela 10.

Tabela 10 – Comparação das áreas dos picos observados nos cromatogramas dos extractos preparados em água e em metanol

Pesticida	Extracção com água	Extracção com metanol
α -Lindano	125149	3187823
β -Lindano	182019	1983163
γ -Lindano	112538	887064
δ -Lindano	201522	860367
Heptacloro	64185	125212
Aldrina	102569	316387
Heptacloro epóxido	336610	2464776
Endossulfano I	31250	125987
DDE	88241	89654
Dieldrina	62548	195620
Endrina	63258	259874
DDD	32158	128561
Endossulfano II	65487	258768
DDT	21633	31272
Metoxicloro	2410	10254

Este facto pode-se explicar pela maior solubilidade dos pesticidas organoclorados em metanol, o que facilita a sua extracção.

Relativamente à optimização do tempo de extracção, em experiências preliminares verificou-se que o tempo de extracção era importante porque o respectivo aumento provoca um aumento da quantidade de analito extraído.

Assim foram realizadas experiências em que se faziam extracções de 4 minutos a 190W intercaladas com 6 minutos de repouso de forma a não exceder os limites de pressão no interior do frasco.

Na figura 17 representam-se as áreas dos picos observadas em função do tempo total de extracção.

um volume total de 10,00 mL. O frasco era então introduzido na câmara térmica do amostrador automático à temperatura de 80°C e a solução agitada durante 30 minutos. Após esse intervalo de tempo (equilíbrio térmico largamente atingido), a fibra era introduzida no frasco, ficando exposta no *headspace* durante 60 minutos. Após este tempo de microextração, a fibra era introduzida no injetor de GC-MS, que se encontrava a 250°C, ocorrendo uma fase de desadsorção, durante 7 minutos. O programa cromatográfico usado encontra-se descrito no capítulo 4 (designado por Rizosfera SIS final).

Importa referir que a utilização de apenas 200 µL de extracto, em cada ensaio, se deve a que o uso de uma percentagem elevada de metanol é desaconselhado (valores superiores a 20% em metanol causam uma grande diminuição da resposta e originam degradação excessiva da fibra, como relatado em estudos efectuados^{45,46}).

5.4.2 – Análise de sedimento de referência

Uma das melhores formas de testar um método analítico é comparar os seus resultados com os obtidos em amostras com concentrações certificadas.

Realizaram-se determinações sobre amostras de sedimento de referência, nas condições previamente optimizadas e utilizadas para posterior quantificação dos pesticidas presentes nos sedimentos estuarinos, para verificar a eficiência do processo desenvolvido.

A quantificação dos pesticidas organoclorados no sedimento de referência, usando o método implementado, conduziu aos resultados apresentados na tabela 11.

Tabela 11 – Resultados obtidos para o sedimento de referência

Pesticida	Concentração (ng/g)	Intervalo de confiança 95% (ng/g) *	Coefficiente de correlação linear R ²
α-Lindano	2,16	0,8-1,7	0,9814
β-Lindano	0,49	0,21-1,5	0,9991
δ-Lindano	0,21	0,11-0,2	0,9995
Heptacloro epóxido	1,0	0,43-1,5	0,9978
DDE	1,8	0,88-2,0	0,9940
DDT	2,4	0,09-3,8	0,9969

* Segundo os dados constantes da folha de referência do sedimento⁴⁷

Outro ponto a salientar foi o facto de apenas se terem quantificado seis dos treze pesticidas presentes no sedimento em estudo (o sedimento de referência não inclui o metoxicloro e o endossulfano II). Este facto pode dever-se a que os outros pesticidas no sedimento de referência se encontram abaixo do respectivo limite de detecção no método desenvolvido.

5.4.3 – Precisão da análise

A avaliação da precisão da análise foi feita através da repetição de ensaios nas mesmas condições. Foram efectuados 5 ensaios com adição de 50 ng/L da mistura de pesticidas a 200 µL de extracto do sedimento de referência, para um volume final de 10 mL, ajustado com água milipore. Cada injeção continha todos os pesticidas pelo que a extracção deles foi simultânea e hipoteticamente concorrente. O uso desta quantidade de padrão adicionado justifica-se por ser o valor médio das adições efectuadas no método de adição padrão.

Na tabela 12 apresenta-se o desvio padrão das áreas (em %) para as injeções.

Tabela 12 – Valores dos desvios padrões relativos

Pesticida	Desvio padrão relativo (%)
α-Lindano	17,9
β-Lindano	14,2
γ-Lindano	17,5
δ-Lindano	10,8
Heptacloro	16,0
Aldrina	30,2
Heptacloro epóxido	31,4
Endossulfano I	8,9
DDE	15,9
Dieldrina	12,6
Endrina	31,3
DDD	10,6
Endossulfano II	30,4
DDT	19,1
Metoxicloro	n.d.

n.d. – não disponível por insuficiência de resultados

Os desvios mais elevados obtidos nos casos da aldrina, endrina e endosulfano II devem-se ao facto das áreas dos picos observados serem muito pequenas.

5.4.4 – Limites de detecção e quantificação

O limite de detecção é a quantidade mínima de analito que deve estar presente para que o sinal obtido possa ser considerado significativamente diferente do ruído de fundo do sistema.

Uma forma de avaliar o limite de determinação de um método envolve a repetibilidade do sinal do ruído de um ensaio branco³⁵.

No caso do método de adição de padrão, uma vez que não se dispõe de branco, torna-se necessário o recurso ao cálculo através dos limites instrumentais.

Usou-se a capacidade do software de fornecer a razão sinal/ruído em cada ponto do cromatograma. A partir deste valor, estimou-se o limite de detecção (LD) e o limite de quantificação (LQ). Ou seja a concentração do pesticida que correspondia a uma razão sinal/ruído igual a 3 para o LD e uma razão igual a 10 para o LQ.

Estes limites foram determinados nas amostras do sedimento de referência analisado anteriormente.

Tabela 13 – Limites de detecção e quantificação

Pesticida	LD (ng/g)	LQ (ng/g)
α -Lindano	0,30	0,99
β -Lindano	0,14	0,45
δ -Lindano	0,05	0,17
Heptacloro epóxido	0,15	0,50
DDE	0,03	0,10
DDT	0,04	0,12

Como se pode observar, os limites determinados para o DDE e DDT são os menores. Este facto pode ser explicado pela melhor optimização do programa de aquisição de iões nos intervalos em questão e pela maior afinidade destes dois pesticidas pela fibra.

Capítulo 6

PESQUISA DE PESTICIDAS
ORGANOCLORADOS EM
SEDIMENTOS ESTUARINOS

As amostras fornecidas foram recolhidas com pás de plástico, previamente descontaminadas, a uma profundidade de cerca de 15 cm e transportadas em sacos de plástico descontaminados, que foram imediatamente fechados e rotulados.

Os sedimentos foram secos à temperatura ambiente, durante seis dias, após o que foram peneirados por uma rede descontaminada de orifício quadrangular com comprimento médio de lado de 2 mm.

A tabela seguinte descreve a distribuição do tamanho das partículas e a percentagem de matéria orgânica do sedimento estudado⁴⁸ (amostra de Abril 2003). As amostras recolhidas noutras datas tinham características semelhantes.

Tabela 14 – Descrição dos sedimentos estudados, em termos de granulometria e teor de matéria orgânica

	LOCAL 1		LOCAL 2	
	RIZO	SED	RIZO	SED
Distribuição do tamanho de partículas (%)				
Lama ou argila (<0,063 mm)	2,4	2,1	76	30
Areia muito fina (0,063-0,125 mm)	8,0	6,1	7,7	4,1
Areia fina (0,125-0,25mm)	6,1	4,6	6,4	7,8
Areia média (0,25-0,5mm)	9,3	5,7	3,6	17,0
Areia grosseira (0,5-1mm)	29	34	3,8	29,0
Areia muito grosseira (1-2mm)	36	39	2,1	12,0
Gravilha (>2mm)	9,0	9,0	0,1	0,9
Matéria orgânica (%)				
	1,2	0,9	12	5,3

Foram recolhidas amostras em três datas diferentes, Abril 2003, Junho 2003 e Maio 2004, com o objectivo de investigar eventuais variações temporais da concentração de pesticidas em estudo.

6.3- Amostras de sedimentos estuarinos

O método utilizado para a determinação das concentrações dos pesticidas foi a adição de padrão. Desta forma, é possível reduzir os efeitos de matriz que surgem na análise de amostras complexas, como é o caso de sedimentos, principalmente porque as amostras dos locais 1 e 2 têm matrizes distintas entre si e de uma matriz aquosa simples.

Realizaram-se determinações em triplicado sobre cada amostra. Os resultados foram obtidos com base em quatro adições de mistura de padrões (10, 25, 50 e 100 ng/L) à amostra. Não foi usado um número superior de adições de padrão dada a morosidade do processo analítico (120 minutos por ponto experimental).

Na parte final do trabalho o processo de análise foi automatizado, por ter sido possível dispor de um amostrador automático, o que facilitou a obtenção de resultados.

Na figura 20, ilustra-se o procedimento, com uma representação gráfica para determinação de α -lindano.

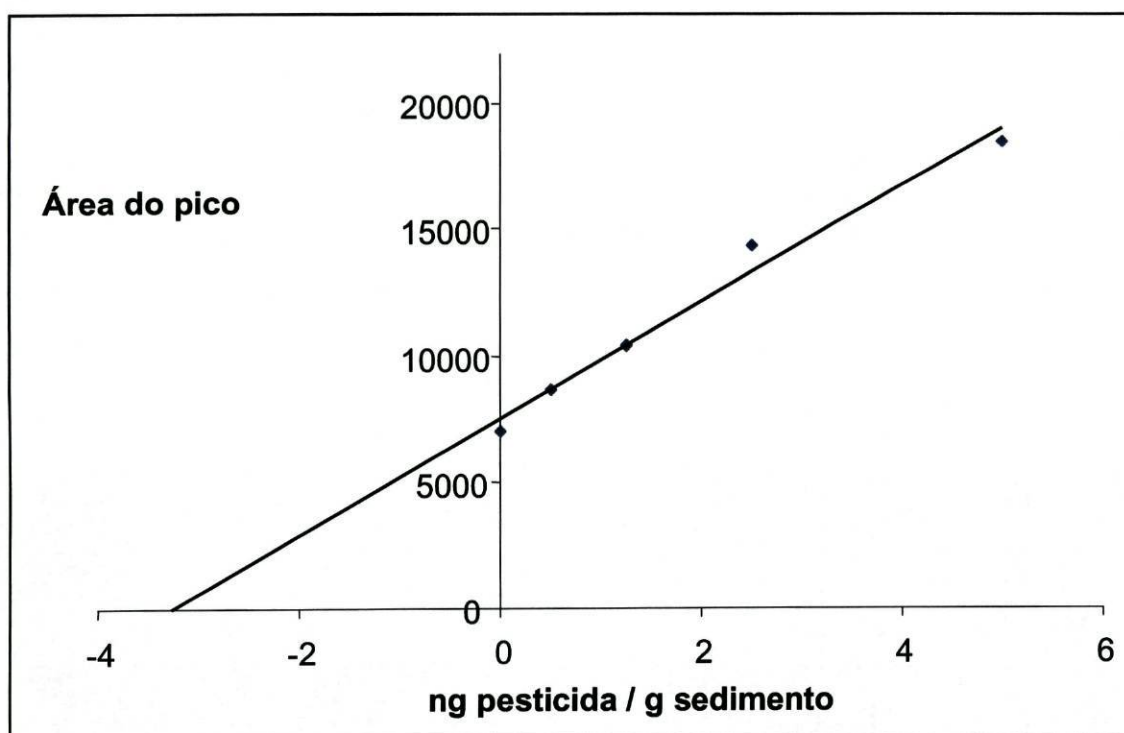


Figura 20 - Representação gráfica para a determinação de α -lindano em sedimento do local 1 numa amostra SED de Junho de 2003

Nas determinações efectuadas usou-se o ajuste linear pelo método dos mínimos quadrados obtendo-se coeficientes de correlação com valores entre 0,9554 e 0,9995.

O desvio padrão associado ao resultado foi calculado a partir da equação 6.

6.3.1 – Amostras de Abril de 2003

O procedimento para detecção e quantificação dos pesticidas nos sedimentos conjugou a detecção qualitativa através da comparação do espectro de massa obtido para um dado tempo de retenção no cromatograma com o espectro de massa do pesticida em estudo (em modo de aquisição por SIS, não é possível usar para identificação a base de dados do NIST incluída no software, devendo ser previamente conhecidos os tempos de retenção dos analitos).

Após a identificação positiva dos analitos foi realizada a respectiva quantificação. Na tabela 15 resumem-se os resultados obtidos nas amostras colhidas em Abril. Na tabela 16 apresentam-se os resultados do estudo estatístico comparativo, através do teste *t*, quando aplicável, para averiguar se existem diferenças de concentração do mesmo pesticida em diferentes amostras. Para tal, foram considerados três ensaios para cada média calculada, pelo que o número de graus de liberdade é 4. O valor do *t* crítico nestas condições, para um grau de confiança de 95 %, é 2,776.

Tabela 15 – Concentrações dos pesticidas quantificados (ng de pesticida por g de sedimento seco) e respectivos desvios padrões obtidos para as amostras de Abril de 2003

Pesticida	Local 1		Local 2	
	RIZO	SED	RIZO	SED
α -Lindano	NQ	5,6 \pm 1,4	NQ	NQ
β -Lindano	NQ	NQ	0,91 \pm 0,19	2,5 \pm 1,6
Heptacloro epóxido		1,99 \pm 0,50		
DDE	4,19 \pm 0,22		0,57 \pm 0,34	
DDT	0,78 \pm 0,34			

NQ – Pesticida detectado mas abaixo do limite de quantificação

Tabela 16 – Resultados da aplicação do teste t a amostras de Abril de 2003

Pesticida	Comparativo	t_{obtido}	t_{critico}	Conclusão estatística
β -Lindano	Local 2 RIZO / Local 2 SED	2,2	2,776	Idêntico
DDE	Local 1 RIZO / Local 2 RIZO	15,8	2,776	Diferente

Uma análise conjunta dos resultados apresentados nas tabelas 15 e 16 indica que, exceptuando o β -lindano, as concentrações dos pesticidas detectados foram superiores no local 1, apesar deste conter uma percentagem inferior de matéria orgânica.

Além disso, os resultados obtidos mostram a presença de α -lindano e β -lindano em todas as amostras e indicam, nos casos em que foram quantificáveis, a existência de maiores quantidades nas imediações das raízes da planta. O heptacloro epóxido apenas foi encontrado no sedimento do local 1 (SED)

O DDE e DDT ao contrário dos lindanos, apenas foram encontrados em amostras recolhidas nas zonas das raízes (RIZO).

6.3.2 - Amostras de Junho de 2003

Os resultados obtidos para as amostras de Junho de 2003 e o respectivo estudo comparativo, quando possível, estão apresentados nas tabelas 17 e 18.

Tabela 17 – Resultados (ng de pesticida por g de sedimento seco) obtidos para as amostras de Junho de 2003

Pesticida	Local 1		Local 2	
	RIZO	SED	RIZO	SED
α -Lindano	3,27±0,44	4,48±0,26	NQ	NQ
β -Lindano	NQ	NQ	NQ	NQ
Heptacloro epóxido		1,38±0,50		
DDE	1,29±0,26			
DDT	10,3±1,5			

NQ – Pesticida detectado mas abaixo do limite de quantificação

Tabela 18 - Resultados da aplicação do teste t a amostras de Junho de 2003

Pesticida	Comparativo	t obtido	t crítico	Conclusão estatística
α -Lindano	Local 1 RIZO / Local 1 SED	4,2	2,776	Diferente

Nos sedimentos do local 2, apenas foram detectados α -lindano e β -lindano, mas em quantidades não quantificáveis. No local 1, nos sedimentos das imediações das raízes (SED) encontrou-se α -lindano e heptacloro epóxido em maior quantidade do que no rizo-sedimento. O DDE e o DDT acumulam-se no rizo-sedimento, tal como foi anteriormente observado para as amostras de Abril de 2003.

Enquanto que o DDE existia em menor quantidade, o DDT foi encontrado no rizo-sedimento com uma concentração relativamente mais elevada, o que parece indicar ter ocorrido uma contaminação específica do local 1 (embora seja de estranhar não ter sido detectada a sua presença no sedimento das imediações das raízes (SED)).

O heptacloro epóxido foi detectado apenas no sedimento do local 1, tal como havia sido nas amostras de Abril 2003, embora com uma concentração mais baixa.

6.3.3 - Amostras de Maio de 2004

As concentrações de pesticidas organoclorados, e os resultados do estudo estatístico comparativo para as amostras de Maio de 2004 estão apresentados nas tabelas 19 e 20, respectivamente.

Tabela 19 – Resultados (ng de pesticida por g de sedimento seco) obtidos para as amostras de Maio de 2004

Pesticida	Local 1		Local 2	
	RIZO	SED	RIZO	SED
α -Lindano	NQ	0,64±0,24	NQ	
β -Lindano	2,07±0,22	NQ	0,53±0,05	NQ
Heptacloro epóxido		0,51±0,17		
DDE	0,33±0,06		0,13±0,08	
DDT	0,18±0,17		0,25±0,18	

NQ – Pesticida detectado mas abaixo do limite de quantificação

Tabela 20 - Resultados da aplicação do teste t a amostras de Maio 2004

Pesticida	Comparativo	t_{obtido}	$t_{\text{crítico}}$	Conclusão estatística
β -Lindano	Local 1 RIZO / Local 2 RIZO	14	2,776	Diferente
DDE	Local 1 RIZO / Local 2 RIZO	3,5	2,776	Diferente
DDT	Local 1 RIZO / Local 2 RIZO	0,49	2,776	Idêntico

Globalmente, a comparação dos resultados para os sedimentos nas imediações das raízes (SED), nos dois locais, permite concluir que a contaminação era maior no local 1 do que no 2, tal como observado para as amostras recolhidas em meses anteriores. O α -lindano e o heptacloro epóxido continuaram a predominar nas imediações das raízes (SED), porém, o β -lindano foi agora quantificado nos dois locais e predominou no rizo-sedimento.

O DDE e DDT foram encontrados, uma vez mais, apenas em amostras recolhidas nas zonas das raízes (RIZO).

6.4– Discussão global dos resultados

Importa nesta secção conjugar as observações e fazer considerações em relação ao conjunto de resultados obtidos neste trabalho.

De forma a visualizar facilmente os resultados e simplificar a respectiva análise e comparação representa-se graficamente (figuras 21 e 22) as concentrações obtidas para DDT e DDE nas amostras analisadas.

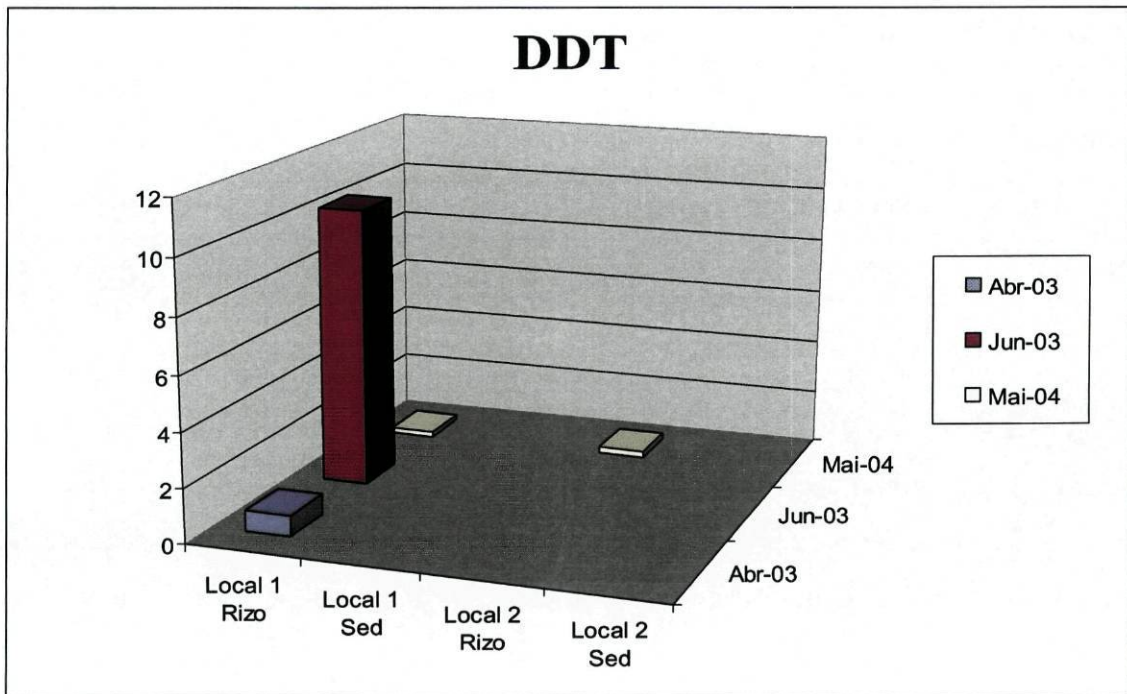


Figura 21 – Comparação da concentração (ng pesticida/g sedimento) de DDT nas diferentes amostras analisadas

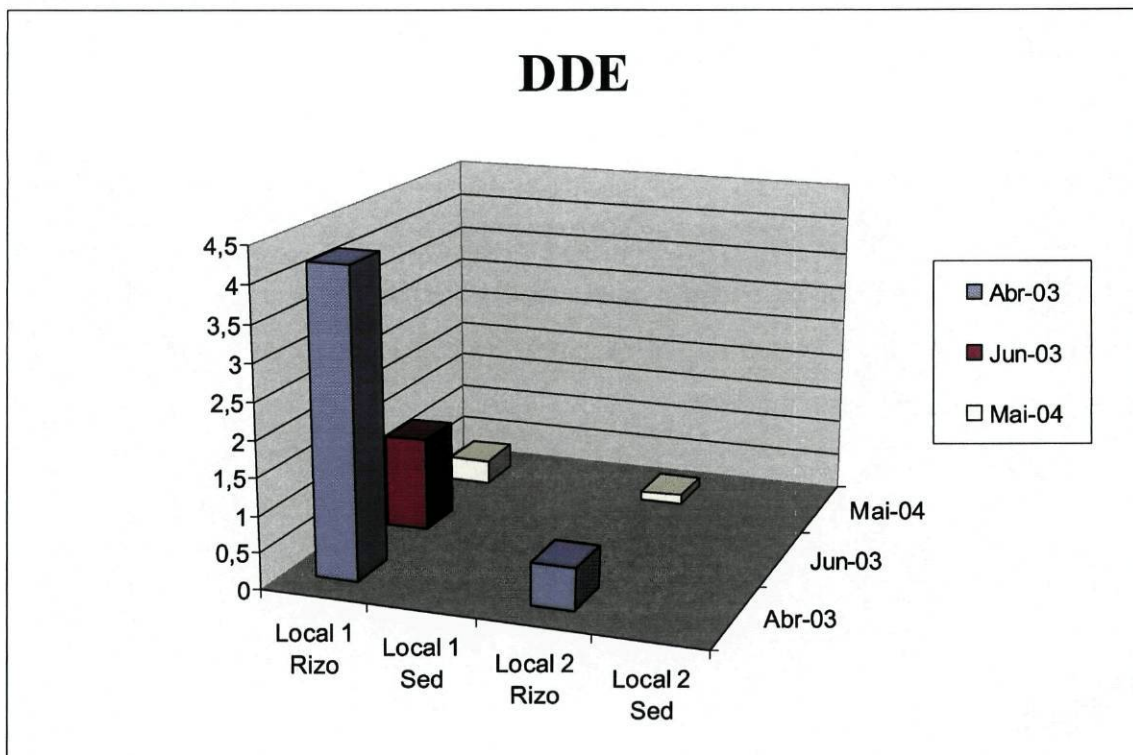


Figura 22 - Comparação da concentração (ng pesticida / g sedimento) de DDE nas amostras analisadas

Observou-se acumulação dos pesticidas derivados do diclorodifeniletano, DDT e DDE, mais hidrofóbicos do que os restantes pesticidas detectados, junto das raízes da planta *J. maritimus* (figuras 21 e 22). A presença de DDT nos sedimentos estuarinos do rio Douro poderá ser devida ao seu uso anterior na agricultura, oficialmente banido em 1990. No entanto, o insecticida comercial Dicofol e outros pesticidas organoclorados, ainda em uso, podem conter, como uma impureza de fabrico, DDT e os seus metabolitos ou podem converter-se (embora em baixas quantidades) em DDT, o que pode representar uma fonte desse pesticida na área.

O rácio entre o DDT e os seus metabolitos DDE e DDD, pode fornecer uma indicação sobre se houve uma introdução recente de pesticida no meio. Na presença de oxigénio, o DDE é o principal metabolito do DDT. Uma vez que o rácio DDT/DDE é bastante superior á unidade nos rizo-sedimentos do local 1, no mês de Junho de 2003, (tabela 16) pode-se admitir que houve uma introdução de DDT na área (porém, é de estranhar não ter sido detectada a sua presença no sedimento das imediações das raízes (SED) no mesmo local). A respectiva concentração foi bastante inferior nas amostras de Maio de 2004 do que nas amostras de 2003 o que poderia levantar a hipótese de o DDT ser degradado nas raízes da planta *J. maritimus*, porém, não se conhece o eventual fluxo de entrada do pesticida. Alguns estudos recentes^{7,8} de fitoremediação documentam o potencial de plantas aquáticas para bioacumular e metabolizar compostos organoclorados.

No local 1, o heptacloro epóxido foi observado apenas no sedimento das imediações das raízes da planta (SED), mas não no rizo-sedimento (e a concentração nos sedimentos, embora baixa, indicia uma tendência de diminuição ao longo do tempo). O aumento do arejamento do solo através da libertação de oxigénio na região das raízes aumenta a porosidade do solo, o que favoreceria o deslocamento do pesticida na direcção das raízes. O resultado observado seria explicado se se admitisse a ocorrência de degradação do pesticida junto das raízes ou absorção por parte da planta.

Os pesticidas comerciais que contêm lindano normalmente são constituídos por 60-70 % do isómero α , 5-12% do β , 10-12 % do γ e 6-10% do isómero δ . Entre eles, o isómero γ é o mais activo e em sedimentos pode-se converter, com bastante facilidade, nos isómeros α e β por biodegradação⁴⁹. Desta forma, no meio ambiente, os isómeros α e β serão os predominantes.

Nas amostras analisadas, α -lindano e β -lindano, apresentaram uma tendência de acumulação nas zonas fora das raízes (figuras 23 e 24).

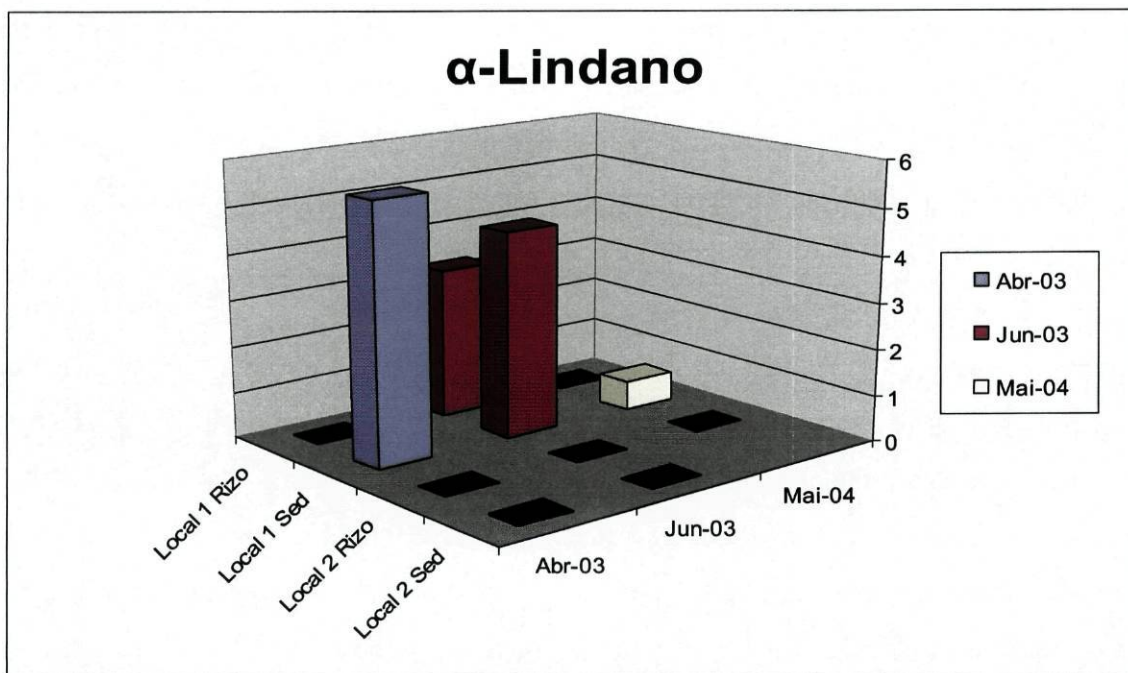


Figura 23 - Comparação da concentração (ng_{pesticida}/g_{sedimento}) de α -lindano nas diferentes amostras analisadas (área a preto: pesticida detectado, mas não quantificado)

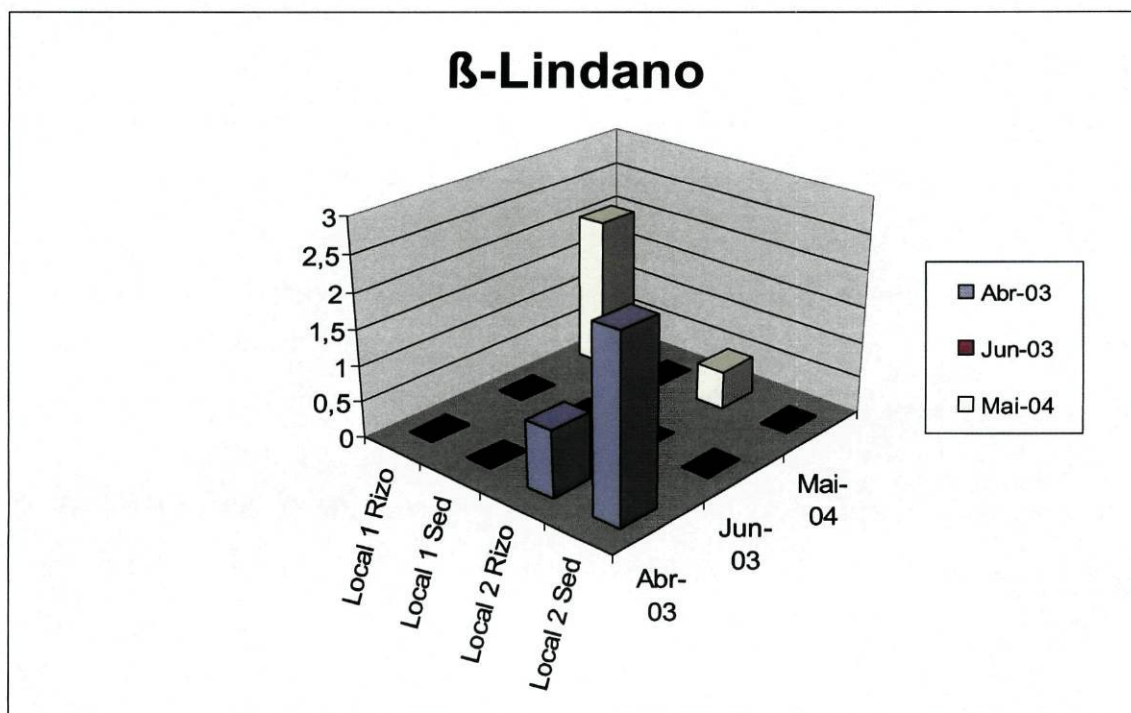


Figura 24 - Comparação da concentração (ng_{pesticida}/g_{sedimento}) de β -lindano nas diferentes amostras analisadas (área a preto: pesticida detectado, mas não quantificado)

A menor quantidade de lindanos existente nos sedimentos junto às raízes, pode ser explicada pelo facto de uma elevada actividade bacteriana proporcionar uma degradação mais rápida dos pesticidas em causa e/ou por absorção pela planta destes pesticidas menos hidrofóbicos do que o DDT e derivados.

Deve-se, no entanto, salientar que as explicações avançadas são especulativas, dado ser necessário para uma fundamentação, dispor de um número muito mais elevado de determinações, bem como de dados obtidos sobre os teores de pesticidas nos tecidos da planta.

Capítulo 7

CONCLUSÕES

7.1 – Conclusões

O método de análise desenvolvido permitiu detectar e quantificar os pesticidas organoclorados α -lindano, β -lindano, heptacloro epóxido, DDE e DDT em sedimentos do estuário do Rio Douro, colonizados e não colonizados pela planta *Juncus maritimus*. O método otimizado foi testado através da análise de um sedimento de referência, onde foram quantificados de modo aceitável seis dos trezes pesticidas presentes no sedimento. O método implementado apresenta limites de detecção baixos (na ordem de 10^{-10} gramas de pesticida por gramas de sedimento seco) com uma repetibilidade da ordem dos 20%.

O grau de contaminação, por pesticidas organoclorados, encontrado nos sedimentos dos dois locais estudados (1 e 2) foi diferente, sendo de uma forma geral superior no local 1. Em cada local, encontraram-se também diferenças entre as concentrações nos sedimentos das imediações das raízes e naqueles recolhidos junto da própria raiz.

Os pesticidas derivados do diclorodifeniletano, DDT e DDE acumularam junto das raízes dos *J. maritimus*, enquanto que o α -lindano e o β -lindano apresentaram uma tendência superior de acumulação nas zonas fora das raízes.

O heptacloro epóxido só foi detectado nos sedimentos das imediações da planta no local de recolha 1.

Os resultados obtidos indiciam que a presença da planta de sapal *J. maritimus* poderá influenciar o grau de contaminação, por alguns pesticidas organoclorados, dos sedimentos estuarinos estudados. Para confirmar esta hipótese será importante realizar, futuramente, uma comparação entre os teores de pesticidas dos sedimentos e dos tecidos da planta que os coloniza.

Bibliografia

- ¹ J.P.Thorez, Guia de Agricultura biológica, Livros de Vida Editores Lda, Nem Martins, 1997
- ² W.Chen, A.T.Kan, G.Fu e M.B.Tomson, Factors affecting the release of hydrophobic organic contaminants from natural sediments, *Environ Toxicol Chem*, 19 (2000) 2401-2408
- ³ Grau MDM, Toxicologia Ambiental - Evaluacion de riesgo para la salud humana, McGraw Hill, Madrid, 2003
- ⁴ J.Schnoor, L.Light, S.McCutcheon, N.Wolfe e L. Carreira, Phytoremediation of organic and nutrient contaminants, *Environ Sci Technol*, 29 (1995) 318-323
- ⁵ S.Susarla, V.F.Medina e S.C.McCutcheon, Phytoremediation: An ecological solution to organic chemical contamination, *Ecol Eng*, 18 (2002) 647-658
- ⁶ J.S.Lytle e T.F.Lytle, Use of plants for toxicity assessment of estuarine ecosystems, *Environ Toxicol Chem*, 20 (2001) 68-83
- ⁷ K.S.B.Miglioranza, J.E.A.Moreno e V.J.Moreno, Organochlorine pesticides sequestered in the aquatic macrophyte *Schoenoplectus californicus* (C.A. Meyer) Soják from a shallow lake in Argentina, *Water Res* 38 (2004) 1795-1772
- ⁸ K.S.B.Miglioranza, J.E.A.Moreno e V.J.Moreno, Dynamics of organochlorine pesticides in soils from the southeastern region of Argentina, *Environ Toxicol Chem* 22 (2002) 712-717
- ⁹ F.A.P.C.Gobas, E.J.McNeil, L.Lovett-Doust e G.Haffner, Biocentration of chlorinated hydrocarbons in aquatic macrophytes. *Environ Sci Technol* 25 (1991) 924-929
- ¹⁰ W.Wang, Use of plants for the assessment of environmental contaminants, *Environ Contamination Technol* 126 (1992) 87-127
- ¹¹ W. Wang e K.Freemark, The use of plants for environmental monitoring and assessment, *Ecotoxicol Environ Safety* 30 (1995) 289-301
- ¹² J.Doust, M. Schmidt e L.Doust, Biological assessment of aquatic pollution: a review, with emphasis on plants as biomonitors, *Biol* 69 (1994) 147-186
- ¹³ J.C.White, Phytoremediation of weathered *pp*-DDE residues in soil, *Int J Phytoremediation* 2 (2000) 133-144
- ¹⁴ Universidade de Osnabrueck – Departamento de Botânica, in <http://www.bogos.uni-osnabrueck.de> 10/01/2005

-
- ¹⁵ J.O.Bustnes, V.Bakken, J.U.Skaare, e K.E.Erikstad, Age and accumulation of persistent organochlorines: a study of arctic-breeding glaucous gulls (*Larus Hyperboreus*), *Environ Toxicol Chem* 22 (2003) 2173-2179
- ¹⁶ I.Brás, L.Santos e A.Alves, Monitoring organochlorine pesticides from landfill leachates by gás chromatography - electron capture detection after solid phase microextraction, *J Chromatogr A* 891 (2000) 305-311
- ¹⁷ A.Navalón, A.Prieto, L.Araújo e J.L.Vílchez, Determination of oxadiazon by headspace solid-phase microextraction and gás chromatography-mass spectrometry, *J Chromatogr A* 946 (2002) 239-245
- ¹⁸ F.Hernandez, J.Beltran, F.J.Lopez, J.V.Gaspar, Use of solid-phase microextraction for the quantitative determination of herbicides in soil and water samples. *Anal Chem* 72 (2000) 2313-2322
- ¹⁹ A.A.Boyd-Boland, S.Magdic e J.B.Pawliszyn, Simultaneous determination of 60 pesticides in water using solid-phase microextraction and gás chromatography-mass spectrometry, *Analyst* 121 (1996) 929-938
- ²⁰ P.Popp, K.kalbitz e G.Opperman, Application of solid-phase microextraction and gas chromatography with electron-capture and mass spectrometric detection for the determination of hexachlorocyclohexanes in soil solutions, *J Chromatogr A* 687 (1994) 133-140
- ²¹ M.L.S.S.Gonçalves, Métodos Instrumentais de Análise de Soluções – Análise Quantitativa, 3ª Edição, Fundação Calouste Gulbenkian, Lisboa, 1996
- ²² H.A. Strobel e W.R.Heineman, Chemical Instrumentation: a systematic approach, 3ª Edição, John Wiley Sons, New York, 1989
- ²³ H.J.C.das Neves, A.M.C.Freitas, Introdução à cromatografia Gás-Líquido de alta resolução, Dias de Sousa Lda., Póvoa de Santa Iria, 1996
- ²⁴ D.A.Skoog, D.M.West e F.J. Holler, Fundamentals of Analytical Chemistry, 7ª Edição, Saunders College Publishing, New York, 1996
- ²⁵ J.Pawliszyn, Solid phase microextraction theory and practice, Willey-VCH, Cambridge, 1997
- ²⁶ Supelco Bulletin 923, Solid phase microextraction: theory and optimization conditions, Sigma-Aldrich Co., 1998
- ²⁷ C.Almeida, P.Rosário, P. Serôdio e J.M.F.Nogueira, Boletim da sociedade portuguesa de química, (2004) 69-77

-
- ²⁸ W.Ho e S.Hsieh, Solid phase microextraction associated with microwave assisted extraction of organochlorine pesticides in medicinal plantes, *Anal Chem Acta* 428 (2000) 111-120
- ²⁹ F.Hernandez, J.Beltran, F.J.Lopez e J.V.Gaspar, Solid-Phase microextraction in pesticides residue analysis, *J Chromatogr A* 882 (2000) 389-404
- ³⁰ R.Boussahel, S.Bouland, K.M.Moussaoui, M.Baudu e A.Montiel, Determination of chlorinated pesticides in water by SPME/GC, *Water Res* 36 (2000) 1909-1911
- ³¹ R.Doong e P.Liã, Determination of organochlorine pesticides and their metabolites in soil samples using headspace solid-phase microextraction, *J Chromatogr A* 918 (2001) 177-188
- ³² I.Valor, M.Pérez, C.Cortada, D.Apraiz, J.C.Moltó e G.Font, SPME of 52 pesticides and polychlorinated byphenils: Extraction efficiencies of the SPME coatings poly(dimethylsiloxane) and Carbowax-divinylbenzene, *J Sep Sci* 24 (2001) 39-48
- ³³ M.M.B.Correia, Desenvolvimento de metodologias analíticas para a determinação de resíduos de produtos fitossanitários em vinhos, Dissertação de candidatura ao grau de doutor em Ciências da Engenharia apresentada á Faculdade de Engenharia da Universidade do Porto, 2003.
- ³⁴ D.Harris, Quantitative Chemical Analysis, 5ª Edição, Freeman, Nova Iorque, 2000
- ³⁵ J.C.Miller e J.N.Miller, Statistic for analytical chemistry, 3ª Edição, Ellis Horwood Ltd, Chichester, 1984
- ³⁶ E.Reis, P.Melo, R.Andrade e T.Calapez. Estatística aplicada, Edições sílabo Lda, Lisboa, 1996
- ³⁷ J.R. Dean e G. Xiong, Extraction of organic pollutants from environmental matrices: selection of extraction technique, *Anal Chem* 19 (2000) 553-564
- ³⁸ H.Li, G.Li e J.Jen, Determination of organochlorine pesticides in water using microwave assisted headspace solid-phase microextraction and gás chromatography, *J Chromatogr A* 1012 (2003) 129-137
- ³⁹ M.Lee, Y.Yeh, W.Hsiang e B.Hwang, Solid-phase microextraction and gas chromatography–mass spectrometry for determining chlorophenols from landfill leaches and soil, *J Chromatogr A* 806 (1998) 317-324
- ⁴⁰ S.Magdic e J.Pawliszyn, Analysis of organochlorine pesticides using solid-phase microextraction, *J Chromatogr A* 723 (1996) 111-122

-
- ⁴¹ B.D.Page e G.Lacroix, Application of solid-phase microextraction to the headspace gas chromatographic analysis of semi-volatile organochlorine contaminants in aqueous matrices, *J Chromatogr* 757 (1997) 173-182
- ⁴² A.Pereira, Pesticidas em sedimentos estuarinos. Seminário Científico, Dep. Química, FCUP 2002
- ⁴³ Dinis MDP. Pesticidas organoclorados em sedimentos de diferentes locais do estuário do Rio Douro. Seminário Científico, Dep. Química, FCUP 2003
- ⁴⁴ J. Pawliszyn, Applications of solid phase microextraction, RSC, Cambridge, 1999
- ⁴⁵ R.Eisert e K.Lavsen, Determination of pesticides in aqueous samples by solid-phase microextraction in-line coupled to gas-cromatography- mass spectrometry, *J Am Soc Mass Spectrom* 6 (1995) 1119-1130
- ⁴⁶ R.Eisert e K. Levsen, Determination of pesticides in aqueous samples by solid-phase microextraction, *J Anal Chem* 351 (1995) 555-568
- ⁴⁷ Reference sheet, Reference material IAEA-408, International Atomic Agency, Áustria, 1999
- ⁴⁸ C.Almeida, A.P.Mucha e M.T.Vasconcelos, Influence of the sea rush *Juncus maritimus* on metal concentration and speciation in estuarine sediment colonized by the plant, *Environ Sci Technol* 38 (2004) 3112-3118
- ⁴⁹ Y.Kang, G.Sheng, J.Fu e Z.Wang, Deposition record of organochlorine pesticides in a sedimentary core in Macao estuary, Pearl River, China, *J Environ Sci Health A36* (2001) 1873-1890