

António José Alves da Cunha Pereira

**Investigação da presença de compostos  
orgânicos voláteis e semivoláteis  
(pesticidas) em espécies biológicas com  
implicações na saúde pública**

*Dissertação para Mestrado em Química*



FC

FACULDADE DE CIÊNCIAS  
UNIVERSIDADE DO PORTO

Departamento de Química  
2005

António José Alves da Cunha Pereira

**Investigação da presença de compostos  
orgânicos voláteis e semivoláteis  
(pesticidas) em espécies biológicas com  
implicações na saúde pública**

*Dissertação para Mestrado em Química*



FC

FACULDADE DE CIÊNCIAS  
UNIVERSIDADE DO PORTO

Departamento de Química  
2005

A Presidente do júri

M. Agostinho Neto

1.9.2005

Aos meus pais e à Cláudia por  
todo o apoio e incentivos

“Nunca considere os seus estudos uma obrigação, mas sim uma oportunidade invejável para aprender a conhecer a influência libertadora da beleza do reino do espírito, para seu próprio prazer pessoal e para proveito da comunidade à qual o seu futuro trabalho pertence”  
(A. Einstein)

# Agradecimentos

À Professora Doutora Maria Teresa Vasconcelos por todo o apoio e conselhos dados durante todo este tempo.

Aos Licenciados Joaquim Guedes, Rafael Evangelista, Hugo Silva e Filipe Alves e às Doutoradas Marisa Almeida e Ana Paula Mucha pela ajuda e amizade em todos os momentos, principalmente nos mais difíceis.

À Doutora Clara Basto pela troca de ideias e por todo o conhecimento transmitido.

Ao Laboratório da Qualidade do Ar Interior pela realização de algumas determinações de COV's.

Ao Conselho de Prevenção do Tabagismo, presidido pelo Prof. Doutor M. Pais Clemente, o apoio recebido no âmbito de um protocolo estabelecido com a Associação para o Desenvolvimento da Faculdade de Ciências da Universidade do Porto.

À Lic. Helena Ribeiro pela disponibilidade e pelo apoio necessário na recolha de pólen e ao grupo de Palinologia do Departamento de Botânica da FCUP, coordenado pela Professora Doutora Ilda Noronha, pelas facilidades concedidas.

## Resumo

Este trabalho teve como um primeiro objectivo expandir as capacidades já existentes, sobre caracterização da qualidade do ar em termos de compostos orgânicos voláteis (COV's), a estudos de fenómenos de adsorção desses compostos a partículas. Como sistema modelo escolheu-se estudar a adsorção de tolueno a partículas de pólen. O tolueno foi escolhido por ser um poluente atmosférico muito comum em atmosferas abertas e interiores e apresentar toxicidade relativamente baixa. Os pólenes foram seleccionados por serem partículas que abundam na atmosfera, terem composição bem definida e são considerados responsáveis por alergias ao nível do sistema respiratório. A investigação da ocorrência de adsorção de poluentes químicos a pólenes é um tema de interesse em saúde pública ainda muito inexplorado. Experimentalmente, prepararam-se, em sistema dinâmico, atmosferas com concentração conhecida de vapor de tolueno a que foi exposto pólen a temperatura (23 °C) e pressão (1 atm) constantes. Após desadsorção do tolueno com metanol e amostragem por microextração para fase sólida (SPME), as determinações analíticas foram realizadas por cromatografia gasosa com detecção por espectrometria de massa após desadsorção térmica do tolueno adsorvido à fibra de SPME. Chegou-se à conclusão que aos níveis a que o tolueno ocorre na atmosfera (dezenas de  $\mu\text{g}/\text{m}^3$ ), a adsorção deste COV (e eventualmente outros de polaridade semelhante) a pólen não ocorria em extensão apreciável (níveis inferiores a  $0,82 \text{ mg}_{\text{tolueno}}/\text{g}_{\text{pólen}}$ , sendo este o limite de detecção do método). Este resultado é positivo do ponto de vista de saúde pública, uma vez que o pólen é comercializado como complemento nutricional. Porém, não se justificava prosseguir o estudo de adsorção de COV's a pólen e o tempo necessário para a implementação de um sistema modelo para estudos de adsorção a pólen de compostos orgânicos semi-voláteis (por exemplo pesticidas) seria incompatível com a extensão deste trabalho.

Passou-se, então, a investigar, utilizando basicamente a mesma metodologia analítica, se o tabaco de cigarros comercializado em Portugal e respectivo fumo continham pesticidas organoclorados perigosos para a saúde. Tal como no caso anterior, não existia qualquer trabalho sobre este tema em Portugal, sendo a informação publicada a nível internacional ainda muito escassa, embora se saiba que são usados pesticidas na produção do tabaco e na sua preservação durante o armazenamento. A presença de pesticidas foi investigada no próprio tabaco e na fracção particulada e gasosa do fumo que é inspirado pelo fumador e a análise foi efectuada por SPME associada a cromatografia gasosa com detecção por espectrometria de massa (SPME/GC/MS). Estudaram-se cigarros de cinco marcas comercializadas em Portugal. Foi detectada dieldrina no tabaco e na fracção particulada do fumo de

cigarro de apenas duas das marcas. Na fase gasosa do fumo não foi detectada dieldrina. Não foram detectados outros pesticidas.

## Abstract

The first objective of this work was expanding the existing capacities, on characterization of air quality in terms of volatile organic compounds, to adsorption phenomena of these compounds to particles. As a model system the toluene adsorption to pollen particles was chosen. The toluene was chosen as it is a very common atmospheric pollutant in outdoor and indoor atmospheres and because of its low toxicity. Pollens had been chosen because they are very abundant particles in the atmosphere, have well definite composition and are responsible by allergies in the respiratory system. The study of adsorption of chemical pollutants to pollens is a subject of interest in public health, still very unexplored. Experimentally, it was prepared, in a dynamic system, atmospheres with known concentration of toluene vapour to which pollen was exposed at constant temperature (23 °C) and pressure (1 atm). After desorption of toluene in a methanolic medium and sampling with solid phase micro-extraction (SPME), the analysis was carried out by gas chromatography with mass spectrometry detection, after thermal desorption of the toluene adsorbed to SPME fibre. It was observed when pollen was exposed to toluene levels identical to those found in real atmospheres (some tens of  $\mu\text{g}/\text{m}^3$ ), the adsorption of this VOC (and eventually others with similar polarity) to pollen doesn't occur in detectable extension ( $< 0,82 \text{ mg}_{\text{toluene}}/\text{g}_{\text{pollen}}$ , the detection limit of the method). This is a positive result for public health concerns, as pollen is commercialized as a nutritional complement. However, it did not justify to continue the adsorption study of VOC's to pollen and the time required to the implementation of a model system for adsorption studies of half-volatile organic compound (for example pesticides) to pollen was too long and incompatible with the extension of this work.

By using basically the same analytical method, it was decided to investigate whether cigarette tobacco commercialized in Portugal and respective smoke contained organochlorinated pesticides dangerous to health. Also in this case, any work on this subject has been carried out in Portugal before and the published information at international level is still very scarce. Pesticides are normally used in the production of the tobacco and in its preservation during storage. The pesticides under study had been extracted from samples to deionised water with microwaves radiation at high pressure, and sampled from the extract by SPME. Cigarettes of five national brands were studied. The pesticide dieldrin was found in cigarette tobacco and respective smoke particles of only two brands. In the gaseous phase of the tobacco smoke dieldrin was not detected. Any other pesticide was found.



# Índice

1 - Generalidades.....	1
1.1 - Enquadramento, objectivo e organização da tese.....	1
1.2 - Compostos orgânicos voláteis e sua eventual adsorção a partículas de pólen .	3
1.2.1 - Exposição humana a poluentes orgânicos atmosféricos.....	3
1.2.2 - Fenómenos de adsorção .....	6
1.2.3 - Pólen e poluição química atmosférica .....	7
1.3 - O interesse de investigar a presença de pesticidas no tabaco.....	9
1.3.1 - Malefícios de pesticidas no tabaco .....	9
1.3.2 - Presença de pesticidas no tabaco .....	10
1.4 - Amostragem e análise de compostos orgânicos voláteis e semivoláteis.....	13
1.4.1 - Preparação de padrões em fase gasosa para estudos de adsorção .....	13
1.4.2 - Amostragem de gases e vapores .....	16
1.4.3 - Microextracção para fase sólida .....	16
1.4.4 - Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrometria de Massa (GC/MS)..	21
1.4.5 - Cromatografia Gasosa acoplada a Captura Electrónica (GC/ECD).....	24
2 - Descrição Experimental .....	27
2.1 - Aspectos gerais .....	27
2.1.1 - Reagentes e materiais.....	27

---

2.1.2 - Acondicionamento e descontaminação do material .....	27
2.2 - Estudo de adsorção de tolueno a grãos de pólen .....	29
2.2.1 - Obtenção de atmosferas com concentração de tolueno conhecida.....	29
2.2.2 - Obtenção e tratamento do pólen .....	30
2.2.3 - Determinações analíticas de tolueno .....	31
2.2.4 - Soluções padrão de tolueno em sistema estático.....	32
2.2.5 - Exposição de pólen a tolueno .....	33
2.2.6 - Extração do tolueno adsorvido no pólen.....	33
2.3 - Estudo da presença de pesticidas em tabaco nacional.....	34
2.3.1 - Amostras de cigarros para análise .....	34
2.3.2 - Geração e recolha do fumo do tabaco .....	34
2.3.3 - Extração de pesticidas do tabaco e de partículas do fumo.....	36
2.3.4 - Determinações analíticas .....	38
3 - Resultados dos estudos de adsorção de tolueno a pólen.....	41
3.1 - Optimização de metodologias.....	41
3.1.1 - Considerações preliminares .....	41
3.1.2 - Análise de tolueno por SPME/GC/MS .....	42
3.1.2.1 - Amostras na fase gasosa .....	42
3.1.2.2 - Quantificação de tolueno adsorvido a partículas.....	45
3.1.3 - Optimização do sistema dinâmico de geração de uma atmosfera padrão de tolueno .....	47

---

3.2 - Adsorção de tolueno a grãos de pólen .....	50
3.2.1 - Influência do tempo de exposição .....	51
3.2.2 - Influência da concentração .....	51
3.2.3 - Influência da humidade.....	52
3.2.4 - Influência da natureza do pólen.....	52
3.2.5 - Exposição de pólen a fumo de tabaco.....	52
3.3 - Conclusões .....	53
4 - Resultados da investigação de pesticidas organoclorados em tabaco e respectivo fumo.....	55
4.1 - Optimização de metodologias.....	55
4.1.1 - Tempo de desadsorção.....	55
4.1.2 - Pesquisa de pesticidas organoclorados no tabaco.....	55
4.1.3 - Optimização do método para detecção da dieldrina.....	57
4.1.3.1 - Influência do tempo de exposição da fibra de SPME na intensidade do sinal .....	57
4.1.3.2 - Exposição da fibra de SPME em “headspace” vs imersão no extracto.....	58
4.1.4 - Repetibilidade .....	60
4.1.5 - Sensibilidade .....	60
4.2 - Investigação da presença de dieldrina no tabaco.....	61
4.3 - Confirmação da presença de dieldrina no tabaco por ECD.....	69

---

4.4 - Conclusões .....	70
4.5 - Investigação da presença de dieldrina em extractos da fracção particulada do fumo.....	71
4.6 - Estudos futuros .....	71
5 - Conclusões .....	75
6 - Bibliografia .....	77

# 1 - Generalidades

## 1.1 - Enquadramento, objectivo e organização da tese

O primeiro objectivo deste trabalho consistia na implementação de metodologias para estudar fenómenos de adsorção de compostos orgânicos voláteis (COV's) a partículas atmosféricas. O estudo de adsorção de poluentes atmosféricos a material particulado tem interesse, não só para aprofundar os conhecimentos existentes nesta área, mas também para fornecer bases científicas para a elaboração de modelos que traduzam o comportamento dos poluentes gasosos (transporte, adsorção e desadsorção a material particulado). Como sistema modelo escolheu-se estudar a adsorção de tolueno a partículas de pólen. O tolueno foi escolhido por ser um poluente atmosférico muito comum em atmosferas abertas e interiores e apresentar toxicidade relativamente baixa. Os pólenes foram seleccionados por serem partículas que abundam na atmosfera, terem composição bem definida e são considerados responsáveis por alergias ao nível do sistema respiratório. A investigação da ocorrência de adsorção de poluentes químicos a pólenes é um tema de interesse em saúde pública ainda muito inexplorado. No grupo de investigação onde se inseriu este trabalho existiam já capacidades científicas e técnicas para caracterização da qualidade do ar em termos de COV's.

O estudo revelou que aos níveis a que o tolueno ocorre na atmosfera urbana a adsorção de tolueno a grãos de pólen será incipiente (inferior ao limite de detecção do método implementado,  $0,82 \text{ mg}_{\text{tolueno}}/\text{g}_{\text{pólen}}$ ). Assim sendo, não se justificava prosseguir o estudo de adsorção de COV's a pólen. Por outro lado, a implementação de um sistema para estudo da adsorção de compostos semi-voláteis a pólen era demorada e incompatível com a duração estabelecida para este trabalho.

Optou-se por, tirando partido de um conjunto favorável de circunstâncias (existência de um projecto em curso, de meios técnicos e experiência prévia do investigador na determinação de analitos por cromatografia gasosa com detecção por espectrometria de massa), passar a realizar estudos exploratórios sobre a presença de pesticidas organoclorados no fumo de tabaco de cigarros comercializados em Portugal. Trata-se também de um tema de interesse em saúde pública e sobre o qual não existe qualquer dado em Portugal. Mesmo a nível internacional só muito recentemente começaram a surgir as primeiras informações publicadas.

As metodologias de análise usadas para tolueno e para pesticidas foram muito semelhantes, diferindo, basicamente, no processo de preparação das amostras. Assim sendo, a dissertação está organizada da seguinte forma: num capítulo introdutório, Cap. 1, descreve-se o estado da arte no que respeita aos temas abordados na dissertação; segue-se um capítulo experimental, Cap. 2, e dois capítulos com resultados e discussão, sendo um, Cap. 3, dedicado aos estudos de adsorção de tolueno a grãos de pólen e o outro, Cap. 4, dedicado à investigação da eventual presença de pesticidas no tabaco e no respectivo fumo. No último capítulo, Cap. 5, apresentam-se as principais conclusões do trabalho.

## **1.2 - Compostos orgânicos voláteis e sua eventual adsorção a partículas de pólen**

### **1.2.1 - Exposição humana a poluentes orgânicos atmosféricos**

A Organização Mundial de Saúde, em 1989<sup>1</sup>, introduziu uma classificação dos compostos orgânicos com base no valor do respectivo ponto de ebulição. A designação de Compostos Orgânicos Voláteis (COV's) aplica-se aos compostos com ponto de ebulição entre 50 e 240 °C, no caso de compostos apolares, e entre 100 e 260 °C, no caso de compostos polares.

O tolueno é um COV muito disseminado no ambiente e em particular na atmosfera. Por isso, e pelo facto da sua toxicidade não ser muito elevada (valor limite de exposição – média ponderada para ambientes ocupacionais é de 50 ppm)<sup>2</sup>, bastante inferior, por exemplo, à do benzeno (valor limite de exposição – média ponderada para ambientes ocupacionais é de 0,5 ppm)<sup>2</sup> foi seleccionado para este trabalho. À temperatura ambiente e pressão normal é um líquido incolor. É um dos solventes adicionados à gasolina (juntamente com benzeno e xilenos) para aumentar o número de octanas<sup>3</sup>. O tolueno ocorre naturalmente no petróleo e nos Bálsamos-da-américa (*Myroxylon toluiferum*). Industrialmente é produzido e obtido como produto secundário durante a refinação da gasolina e outros combustíveis obtidos a partir do petróleo, na produção de coque, a partir do carvão, e de estireno. O tolueno é ainda muito utilizado na criação de tintas, diluentes, verniz para as unhas, lacas, adesivos e borracha e também em alguns processos de impressão e de curtimento de peles<sup>4</sup>. Na forma de resíduo é considerado perigoso. Na forma de produtos finais residuais está presente em tintas, diluentes e vernizes das unhas que são frequentemente depositados em aterros. É possível sentir o cheiro de tolueno no ar a partir de 8 ppm,

e sentir o seu sabor na água a partir de uma concentração compreendida entre 0,04 e 1 ppm<sup>5</sup>.

O tolueno é suficientemente volátil (pressão de vapor = 28,4 mmHg a 25 °C) para que, quando libertado para o ambiente (tintas, diluentes, colas e gasolina) uma fracção apreciável deste composto se volatilize e se misture com o ar, constituindo assim um poluente atmosférico.

A introdução deste poluente em águas superficiais e subterrâneas resulta de derramamento de solventes e produtos petrolíferos, bem como de derrames de tubagens ou tanques subterrâneos (em postos de venda de gasolina e outros edifícios). Estas fugas também contaminam os solos com tolueno e outros componentes do petróleo. O tolueno lançado no solo ou na água facilmente evapora e o que se lá se mantém é degradado por microorganismos, designadamente, bactérias do género *Pseudomonas* e *Achromobacter*<sup>6</sup>. Como consequência da volatilização e degradação que ocorre no ar, solo e água, a tendência para um aumento de concentração de tolueno por acumulação ao longo do tempo é reduzida.

A concentração de tolueno encontrada no ar em zonas remotas é bastante baixa, mas em zonas suburbanas e urbanas é comum encontrar-se níveis de 4,9-24,9 µg/m<sup>3</sup>.<sup>7</sup> As emissões dos automóveis (na forma de gasolina não queimada) constituem a principal fonte de tolueno no ar, com níveis dependendo da intensidade de tráfego. Estas emissões aumentaram desde a proibição da utilização de chumbo nos combustíveis, visto que o Pb(CH<sub>3</sub>)<sub>4</sub>, que era utilizado para aumentar o índice de octanas, foi substituído por uma mistura denominada BTX (constituída por benzeno, tolueno e xilenos). Actualmente, a gasolina vendida no Estados Unidos da América contém quantidades significativas de BTX (cerca de 40 % mais do que continha no passado)<sup>8</sup>.

O tolueno é também comum como contaminante de ambientes interiores, onde atinge valores bastante mais elevados do que em ambientes exteriores, por exemplo, da ordem dos 30,2 µg/m<sup>3</sup><sup>7</sup> ou dos 42 µg/m<sup>3</sup><sup>9</sup>. Este facto deve-se à libertação de tolueno



a partir dos componentes de interiores de edifícios (tintas e outros revestimentos, mobiliário, etc.) e do fumo de tabaco.

Ocasionalmente é detectado tolueno na água de consumo público. No entanto, estes acontecimentos são pouco frequentes, e a sua concentração encontra-se normalmente abaixo dos  $3 \mu\text{g}/\text{dm}^3$ . Em contraste, nas águas e solos circundantes dos aterros o tolueno é um contaminante muito comum, com concentrações médias de  $7\text{-}20 \mu\text{g}/\text{dm}^3$  na água e de mais de  $70 \mu\text{g}/\text{dm}^3$  no solo<sup>10</sup>.

A forma mais comum de exposição humana a tolueno é através da respiração de ar contaminado. Uma vez que as pessoas passam uma grande fracção do dia em ambientes interiores, os níveis presentes nestes ambientes são a principal fonte. Com base nos típicos  $8 \times 10^{-3}$  ppm de concentração em ambientes interiores<sup>11</sup>, a inspiração de  $20 \text{ m}^3/\text{dia}$  de ar e absorção de 50% do tolueno inalado, origina uma dose absorvida de  $300 \mu\text{g}/\text{dia}$ . Mas um fumador pode inalar quantidades de tolueno superiores a  $1 \text{ mg}/\text{dia}$ .

Quase todo o tolueno que entra no ambiente é libertado directamente no ar. A maior fonte de emissões é a gasolina, que tipicamente contém 5-7% de tolueno<sup>10</sup>. Em 1978, as emissões, nos Estados Unidos da América (E.U.A.), associadas à utilização de gasolina foram estimadas em  $7,5 \times 10^5$  toneladas, sendo  $7,0 \times 10^5$  toneladas libertadas por escapes de automóvel<sup>11</sup>. O tolueno utilizado em tintas, solventes, colas e produtos similares é também libertado para o ar. O total libertado, nos E.U.A., destas fontes não associadas com a gasolina foi estimado em  $4,1 \times 10^5$  toneladas em 1978<sup>11</sup>.

Durante os processos de tratamento de desperdícios também pode ser libertado tolueno. Baseado na informação recolhida em incineradoras hospitalares de 40 hospitais dos Estados Unidos da América e Canadá, as taxas de emissão de tolueno apresentavam nos finais dos anos 80, início dos anos 90, um valor médio de  $7,24 \text{ mg}/\text{m}^3$ .<sup>12</sup>

O tolueno na atmosfera é degradado por reacção com radicais hidroxilo dando origem a cresol e benzaldeído, com um tempo de semi-vida de aproximadamente 13 horas. Os compostos assim formados dão, por sua vez, origem a hidrocarbonetos por clivagem do anel aromático. O tolueno também pode ser oxidado por dióxido de enxofre, oxigénio e ozono, mas a velocidade destas reacções é duas ou mais vezes, inferior à da reacção com os radicais hidroxilo<sup>13,14,15</sup>. Nitrotolueno e nitrobenzil podem formar-se a partir da reacção fotoquímica do tolueno atmosférico com óxidos de azoto<sup>16</sup>. Porém, a degradação por fotólise não é um passo importante na degradação do tolueno comparativamente com as reacções atrás descritas. Experiências, com simulação das condições atmosféricas em câmaras, com nevoeiro fotoquímico contendo radicais hidroxilo, oxidam o tolueno produzindo numerosos produtos com grupos carbonilo<sup>11</sup>, sendo o formaldeído o produto encontrado em maior quantidade<sup>17</sup>.

### 1.2.2 - Fenómenos de adsorção

Adsorção é o processo de concentração de gases, vapores ou líquidos na superfície de poros de materiais sólidos, como resultado de forças de adsorção. Podem ser considerados dois tipos de forças de adsorção – físicas e químicas. Quando a substância adsorvida é ligada à superfície do agente adsorvente por forças intermoleculares, a adsorção é de natureza física. Adsorção química ocorre quando essas forças têm um carácter de interações químicas. O processo de adsorção depende da temperatura, pressão e composição química da substância química adsorvida e do material adsorvente. A adsorção está sempre ligada a libertação de calor de adsorção, portanto, a extensão da adsorção aumenta com a diminuição da temperatura.

Durante a adsorção física de uma substância presente num fluxo de gás à superfície de substâncias adsorventes, ocorrem diversos fenómenos sendo os mais importantes os seguintes: a difusão de moléculas da substância adsorvida à superfície externa do

adsorvente – difusão externa; a difusão de moléculas da substância adsorvida nos poros do adsorvente – difusão interna; e a adsorção propriamente dita<sup>18</sup>. Mais detalhes podem ser encontrados em literatura específica<sup>19</sup>.

### 1.2.3 - Pólen e poluição química atmosférica

A presença simultânea de grãos de pólen e poluentes químicos na atmosfera terrestre pode levar à concentração/adsorção destes últimos à superfície dos primeiros, o que poderia explicar o aumento das alergias ao pólen registado nos últimos anos. Porém, ainda muito pouco se sabe sobre essas interações.

Os pólenes são constituintes importantes do bioaerosol. O seu transporte e deposição são influenciados, essencialmente, pelas respectivas características físicas (tamanho, densidade e forma) e por parâmetros ambientais (humidade, temperatura e intensidade das correntes de ar). A exposição humana a estas partículas de origem natural têm importantes efeitos ao nível da saúde humana, uma vez que os casos de alergias polínicas têm vindo a aumentar acentuadamente em número e gravidade ao longo dos últimos anos, com particular incidência nas zonas urbanas. Efectivamente, nos últimos 30 anos o número de doentes afectados por polinoses aumentou mais de cinco vezes, valor que continua a subir<sup>20</sup>.

Sabe-se que a concentração de grãos de pólen na atmosfera é relativamente elevada, chegando muitas vezes a ultrapassar a concentração de partículas inorgânicas<sup>21</sup>.

As propriedades adsorptivas do pólen poderão variar com a origem do mesmo. Por isso, a obtenção, para estudo, de pólen de origem conhecida deverá passar pela extracção do mesmo directamente dos estames do androceu das respectivas flores. Um modo alternativo de obter pólen consiste em utilizar o que foi recolhido e armazenado por abelhas, se houver garantias de que a recolha realizada pelas abelhas foi selectiva, no que respeita à fonte de pólen. Neste caso, o pólen encontra-se aglutinado por meio de cera (numa mistura de mel e ácido 10-hidroxi-2-decenóico)<sup>22</sup>,

formando pequenas aglomerações de pólen. Essa cera terá de ser removida na totalidade antes de se poder utilizar esse pólen, o que se constatou experimentalmente ser uma tarefa muito complexa e, cuja eficácia é difícil de comprovar.

## **1.3 - O interesse de investigar a presença de pesticidas no tabaco**

### **1.3.1 - Malefícios de pesticidas no tabaco**

O tabaco prejudica a saúde dos fumadores activos e passivos, conforme está amplamente demonstrado. Mesmo no que respeita a fumadores passivos está provado o aumento de risco de cancro do pulmão, doença isquémica cardíaca e perturbações do tracto respiratório.

Nos últimos 15 anos têm vindo a surgir directivas ao nível da Comunidade Europeia (que implicam transposição para a legislação dos países membros) sobre a composição e rotulagem dos produtos do tabaco. Essas iniciativas legislativas<sup>23</sup> visam, por um lado, controlar a composição dos produtos do tabaco, com vista a minorar os respectivos efeitos tóxicos e, por outro lado, alertar os consumidores para os riscos para a saúde associados ao consumo do tabaco.

Apesar de se saber que “*o fumo do tabaco faz mal e pode acelerar a morte*” de quem o inala activa ou passivamente, o número de fumadores é ainda muito elevado e a percentagem de fumadores jovens e do sexo feminino tem vindo mesmo a aumentar. As reacções à proibição de fumar em recintos fechados é sempre muito contestada e, por isso, muito difícil de implementar.

Em termos estritos, a relação causa-efeito do fumo do tabaco na saúde não é ainda bem conhecida. Porém, obviamente, os malefícios do tabaco resultam da composição do fumo inalado, o qual, por sua vez resulta da pirólise dos constituintes naturais do tabaco e de outros constituintes no caso dos cigarros (papel de cigarro, cola de costura, papel para filtro, cola para filtro e materiais para filtração) e de aditivos do tabaco usados para variados fins, como por exemplo, melhorar o sabor e o aroma do fumo, alterar a temperatura de queima, etc. Como nas culturas de tabaco e durante o

tratamento e conservação das folhas são normalmente usados pesticidas, o tabaco poderá conter resíduos destes. Da pirólise do cigarro resulta um número muitíssimo elevado e diversificado de compostos químicos e radicais livres<sup>24</sup>, muitos dos quais já foram identificados.

Não obstante o nível de conhecimento já existente sobre a composição qualitativa do fumo, a legislação comunitária e nacional, actualmente, só fixa os teores máximos de alcatrão, nicotina e monóxido de carbono<sup>23</sup>. E, mesmo em relação a estes constituintes, o Estado Português só dispõe de informação fornecida pelas empresas que comercializam tabaco, não existindo nenhum Laboratório independente a realizar essa caracterização.

Ao nível da Comunidade Europeia existem já alguns laboratórios especializados na caracterização qualitativa e quantitativa do fumo do tabaco. A lista dos componentes do fumo do tabaco que actualmente estão a ser determinados, por exemplo, num laboratório alemão é muito extensa (Anexo 1) e dá uma ideia da complexidade e perigosidade da mistura inalada por fumadores activos e passivos.

### **1.3.2 - Presença de pesticidas no tabaco**

Existem suspeitas e alguns resultados experimentais<sup>25</sup> sobre a presença de pesticidas sintéticos no fumo do tabaco (a nicotina é um insecticida natural do tabaco). Mas a informação é ainda muito escassa e, tanto quanto se sabe, este tipo de compostos não está a ser determinado em regime de rotina em nenhum laboratório europeu. Investigadores alemães estão já a otimizar metodologias para a futura determinação de 20 pesticidas organoclorados, nos produtos do tabaco, entre os quais constam os compostos encontrados no tabaco da Arménia, incluindo o 1,1-bis(4-clorofenil)-2,2,2-tricloroetano (DDT) e seus derivados<sup>26</sup>. As elevadas exigências científicas e tecnológicas de tais determinações levou a que só muito recentemente se começasse a sua investigação. Não obstante, sabe-se<sup>27,28</sup> que na cultura do tabaco são usados

pesticidas diversos: insecticidas, produtos químicos para controlar as culturas (adicionadas depois do corte das flores), fungicidas e outros compostos para facilitar a maturação do tabaco no campo. Posteriormente, em armazém, são por vezes usados pesticidas para eliminar roedores, baratas, etc. Entre os pesticidas de uso autorizado na cultura do tabaco<sup>29</sup> encontram-se alguns compostos perigosos para a saúde<sup>30</sup>. Porém, num documento do Ministério da Agricultura, do Desenvolvimento Rural e das Pescas/ Direcção Geral dos Produtos das Culturas (DGPC) sobre “Limites Máximos de Resíduos (LMR) de Produtos Fitofarmacêuticos em Portugal” disponível na Internet<sup>28</sup> pode ler-se a este propósito “As substâncias activas autorizadas especificamente para (..) o tabaco também não têm LMR estabelecidos na lei, tal como acontece em outros Estados Membros. Porém, a DGPC assegurou, mediante a avaliação de risco, que os produtos transformados com origem (..) no tabaco, *tratados de acordo com as condições de utilização autorizadas*, conduzem igualmente a uma exposição aceitável do consumidor aos resíduos de pesticidas.”

Os pesticidas são substâncias usadas com o fim de prevenir, destruir, repelir ou atenuar pragas, tais como insectos, ratos ou outros animais, plantas indesejadas, fungos, ou microorganismos como bactérias ou vírus<sup>31</sup>. Portanto abrange os insecticidas, herbicidas, fungicidas, etc. Os pesticidas podem ser classificados, conforme a sua constituição química, em organoclorados, organofosforados, triazinas, tiocarbamatos, uracilos substituídos, derivados de ureia e dinitroanilinas, entre outros<sup>32</sup>.

Por sua vez, muitos pesticidas fazem parte de um grupo de compostos, mais amplo, denominados poluentes orgânicos persistentes (POP's), porque resistem à degradação química, fotolítica e biológica, permanecendo muito tempo no meio ambiente. A maioria tem origem antropogénica. Alguns deles, tais como as dioxinas e furanos formam-se, involuntariamente, em processos de combustão. São compostos que possuem baixa solubilidade em água, mas alta solubilidade nos lípidos, o que tem como principal consequência a sua acumulação nos tecidos adiposos. Esta

característica, aliada à sua persistência, potencia a sua perigosidade ao nível da cadeia alimentar e, conseqüentemente, os riscos de exposição dos consumidores de topo, como é o caso do Homem. A sua semi-volatidade permite o seu aparecimento na atmosfera e a adsorção em partículas atmosféricas, o que facilita o transporte aéreo a longas distâncias.

O fabrico de alguns deles foi sujeito a fortes restrições, mas a sua utilização é ainda comum em muitos países. É, nomeadamente o caso do DDT que vinte e cinco países estão ainda autorizados a usar para combater a malária, de acordo com as directrizes da Organização Mundial de Saúde, até desenvolvimento de soluções mais seguras.

Em Maio de 2001 foi assinada a Convenção de Estocolmo, cujo principal objectivo é eliminar os doze POP's considerados mais perigosos, onde se incluem cinco pesticidas organoclorados, designadamente, aldrino, DDT, dieldrina, endrino e heptacloro. A convenção determina a proibição de utilização de parte dessas doze substâncias, embora com pequenas excepções para alguns países, em determinadas circunstâncias e apenas, para resolver problemas de saúde pública<sup>33</sup>. Como esses compostos são muito persistentes no meio ambiente (solos e sedimentos), os respectivos resíduos poderão continuar a ser encontrados em produtos agrícolas ou em animais.



## **1.4 - Amostragem e análise de compostos orgânicos voláteis e semivoláteis**

As técnicas instrumentais usadas para determinar quantidades vestigiais de compostos orgânicos têm sido continuamente melhoradas, o que se traduz num aumento da capacidade de detecção de uma cada vez maior variedade de compostos em amostras ambientais. Em paralelo, também as técnicas de preparação das amostras para análise estão a evoluir no sentido de uma maior simplicidade e maior fiabilidade.

### **1.4.1 - Preparação de padrões em fase gasosa para estudos de adsorção**

Concentrações estáveis e conhecidas de uma substância na fase gasosa são, em geral, muito mais difíceis de obter do que quando se trata de fases condensadas, em particular de fase líquida por várias razões. Na fase gasosa a pressões baixas, por exemplo à pressão atmosférica, as concentrações dos analitos são, necessariamente, muito baixas, pelo que as perdas por adsorção e efusão se tornam muito significativas e difíceis de eliminar. Se as misturas gasosas de concentração conhecida tiverem sido preparadas a partir de compostos que podem existir no estado líquido nas condições de pressão e temperatura normais, os erros de diluição podem também ser elevados. Além disso, o volume de gases (e logo as concentrações) varia acentuadamente com a pressão e com a temperatura, ao contrário do que sucede com as fases condensadas.

Por outro lado, a amostragem de analitos a partir dessas atmosferas é também difícil. Além de fugas associadas ao procedimento de amostragem, a recolha de um volume suficiente de amostra sem variação de pressão obriga à introdução simultânea no recipiente que contém o analito de um número de moles de um gás "branco", igual ao que está a ser retirado.

A obtenção de uma concentração conhecida de um dado gás ou vapor pode ser obtida de vários modos, designadamente os seguintes: (i) colocação, num recipiente que possa ser fechado hermeticamente, de um volume conhecido da substância em estudo, no estado líquido, sabendo que, nas condições de pressão e temperatura usadas, todo o líquido passará ao estado gasoso, isto é, o número de moles introduzido é inferior à correspondente pressão de vapor dessa substância à temperatura considerada. A concentração do analito na atmosfera é calculada através da equação dos gases ideais, corrigida para os gases reais, se tal se justificar; (ii) colocação num recipiente que possa ser fechado hermeticamente, de um volume de analito na fase líquida (ou sólida), suficientemente grande para permitir que após o estabelecimento do equilíbrio termodinâmico, as duas fases líquido/vapor ou sólido/vapor, coexistam. A concentração de vapor do analito, após se atingir o equilíbrio, será a correspondente à pressão de vapor (ou pressão parcial, se se tratar de mistura) dessa substância nas condições de pressão e temperatura usadas. Estes dois processos são normalmente designados por *estáticos*; (iii) existem também métodos designados por *dinâmicos*, que se baseiam na utilização de *tubos de permeação*.

A utilização de tubos de permeação para produzir soluções gasosas padrão foi documentada, pela primeira vez, em 1969, por O'Keefe e Ortman<sup>34</sup>. O princípio básico deste método consiste na efusão de um gás ou vapor através de uma membrana polimérica, a intensidade (ou taxa) de emissão muito baixas. Um tubo de permeação não é mais do que uma secção de um tubo selado de politetrafluoretileno (PTFE) inerte, contendo um gás liquefeito ou um líquido volátil. Quando exposto a um fluxo de ar (ou gás inerte) controlado, o tubo de permeação é capaz de manter uma emissão baixa e constante de gás ou vapor da substância que está dentro dele. A medição rigorosa da perda de massa do tubo de permeação, durante um dado período de tempo, rigorosamente medido, constitui um método gravimétrico de calibração do sistema, permitindo assim obter atmosferas com concentração conhecida de um dado

gás ou vapor. A concentração do gás ou vapor na atmosfera controlada, expressa em ppm (v/v), é calculada através da razão fluxo de permeação/fluxo de gás diluidor, tal como se mostra na Figura 1.1. A intensidade de efusão não é uma função linear da temperatura. Portanto, a temperatura deve ser mantida constante durante as experiências. Para além da temperatura, a intensidade de emissão depende da diferença entre a pressão externa e interna, espessura da parede do tubo e da área de superfície (e conseqüentemente comprimento) do tubo.

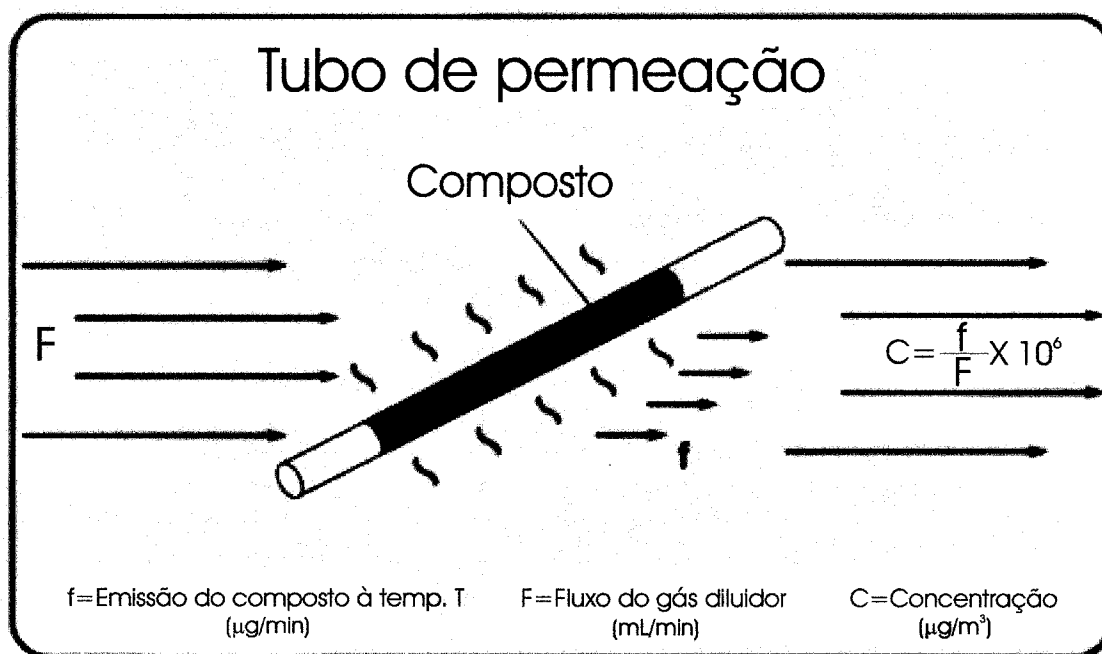


Figura 1.1 - Tubo de permeação

Um parâmetro muito importante na calibração de um sistema gasoso usando tubos de permeação é o tempo necessário para se alcançar o equilíbrio de efusão e para que a perda de massa líquida no tubo seja mensurável. Poderão ser necessários de dois a cinco dias a temperatura constante ( $\pm 0,1$  °C para 1% de precisão), sob um fluxo constante de gás de arraste. O tempo dependerá da intensidade de efusão permitida pelo tubo de permeação e da sensibilidade do sistema de pesagem. Para testar se a efusão é constante a literatura<sup>34</sup> sugere que o tubo seja removido rapidamente do sistema, pesado e recolocado no sistema, até se verificar uma perda de massa, por unidade de tempo, constante. Este procedimento é muito pouco prático, uma vez que

a remoção do tubo para pesagem exige depois um longo período de espera para estabilização do sistema.

Os tubos de permeação podem ser adquiridos prontos a usar ou vazios e cheios no laboratório de acordo com o método proposto por O'Keefe e Ortman<sup>34</sup>.

### **1.4.2 - Amostragem de gases e vapores**

Para a recolha de amostras a partir de uma dada atmosfera recorre-se frequentemente a um destes procedimentos:

- (i) seringas de gases, onde se recolhe um volume de gás de modo semelhante ao que se usa para recolher um líquido em seringa;
- (ii) tubos com enchimento adsorvente através do qual se faz passar (usando uma bomba de sucção) um volume medido rigorosamente de gás ou vapor;
- (iii) microextracção para fase sólida (Solid Phase Microextraction - SPME). Este processo pode ser usado para amostragem de compostos orgânicos presentes em quantidades vestigiais, quer na forma de vapores quer na forma líquida. Como este processo foi utilizado ao longo deste trabalho será descrito, em detalhe, na secção seguinte.

### **1.4.3 - Microextracção para fase sólida**

A SPME é uma metodologia de extracção, recentemente desenvolvida, que apresenta muitas vantagens relativamente aos métodos analíticos tradicionais, por combinar amostragem, pré-concentração e a transferência directa (num só passo) de analitos para um cromatógrafo<sup>35</sup>.

A parte fulcral da SPME reside numa fibra de sílica (ou outro material adequado) com cerca de um centímetro de comprimento, que está revestida com um polímero que tem afinidade para as espécies químicas que se pretende amostrar.

Os revestimentos das fibras diferem uns dos outros não só pelo tipo de revestimento mas também na espessura, uma vez que ambos influenciam a adsorção/absorção dos analitos<sup>36</sup>.

Geralmente, os compostos voláteis requerem revestimentos espessos, enquanto que revestimentos com menor espessura são mais eficientes para analitos semi-voláteis. A escolha da fibra é feita em função da polaridade dos analitos que se pretende estudar. Para SPME associada a cromatografia gasosa, usam-se principalmente cinco revestimentos: polidimetilsiloxano (PDMS), polidimetilsiloxano-divinilbenzeno (PDMS-DVB) e carboxen-polidimetilsiloxano (CAR-PDMS) com maior afinidade para compostos apolares e poliacrilato (PA) e carbowax-divinilbenzeno (CW-DVB), ambas de características polares. O desenvolvimento de novos revestimentos reside, essencialmente, na necessidade de encontrar materiais mais específicos e mais estáveis para a extração de diferentes analitos<sup>37</sup>.

Na Figura 1.2 encontra-se esquematizado um sistema para SPME.

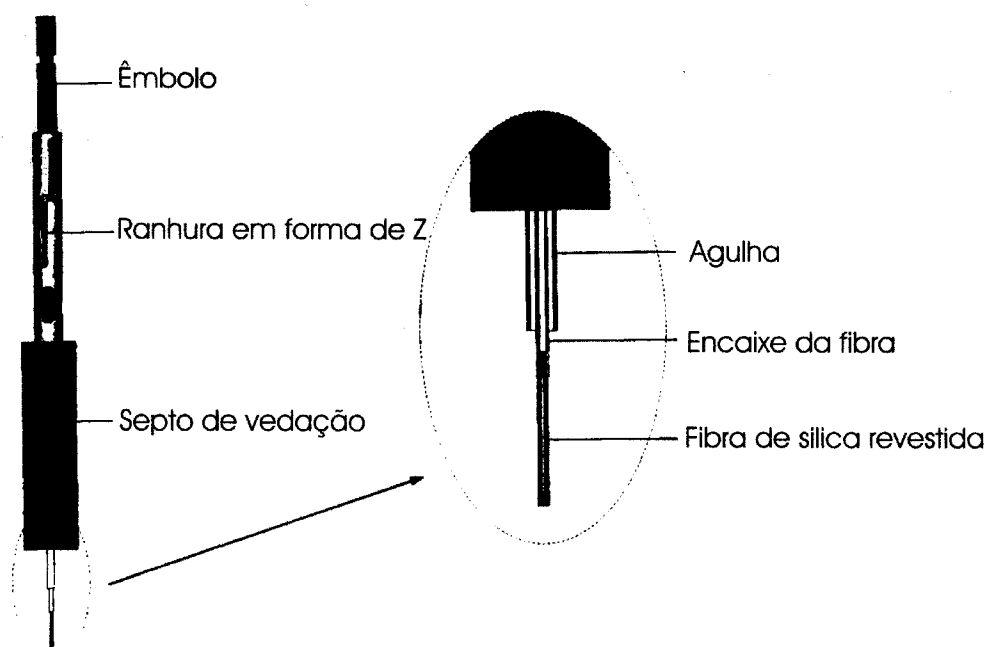


Figura 1.2 - Diagrama de um sistema de SPME<sup>38</sup>

A fibra está ligada a um êmbolo de aço inoxidável montado num suporte que se assemelha a uma microseringa modificada. O êmbolo desloca a fibra para fora e para dentro da seringa.

O processo de SPME está esquematizado na Figura 1.3. Para usar a unidade de SPME em laboratório, o operador tem de perfurar o septo que veda o recipiente que contém a amostra (frasco de vidro ou saco de gases) e descer o êmbolo, expondo, dessa forma, a fibra à amostra (que pode ser líquida ou gasosa). Os analitos orgânicos serão adsorvidos/absorvidos no revestimento da fibra.

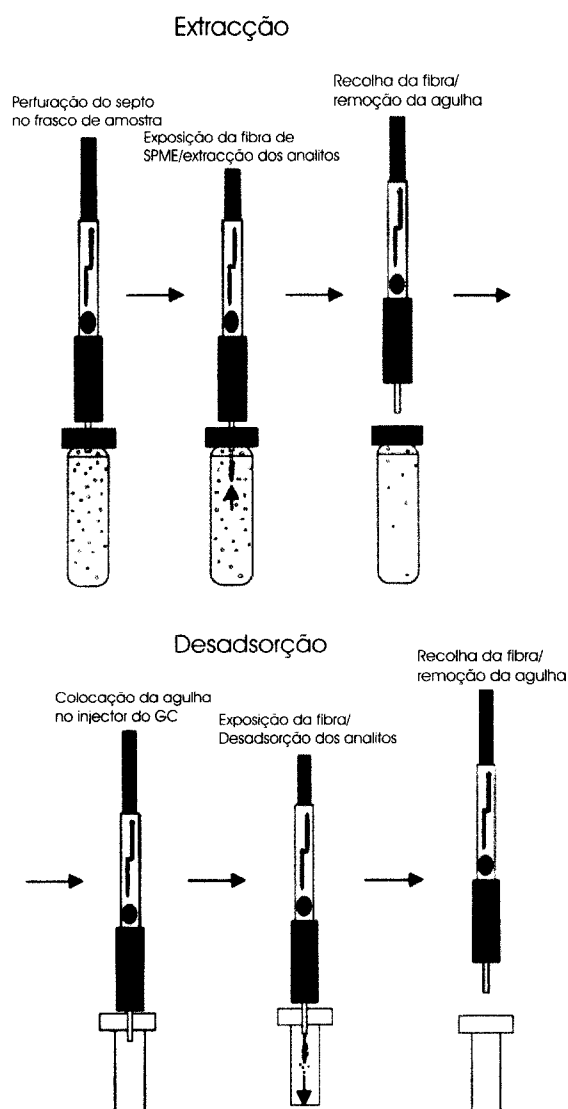


Figura 1.3 – Processo de microextração para fase sólida<sup>39</sup>

Após a amostragem (idealmente deverá esperar-se o tempo necessário para se estabelecer o equilíbrio do analito entre a fibra e a amostra) a fibra é recolhida, novamente, para dentro da agulha, e a unidade é retirada do contentor da amostra. Logo de seguida, a agulha é introduzida no injector do cromatógrafo onde a fibra é de novo exposta, os analitos são termicamente desadsorvidos, sendo libertados na coluna de um GC, ou na interface SPME/HPLC.

Quando a fibra é exposta no “headspace” de um recipiente que contém a amostra, a quantidade de analito adsorvido à fibra em situação de equilíbrio é, a temperatura constante, directamente proporcional à concentração do analito na amostra líquida e obedece à equação (1)<sup>38</sup>.

$$n = \frac{K_{fa}V_f C_0 V_a}{K_{fa}V_f + K_{ha}V_h + V_a} \quad (1)$$

Onde  $n$  é a quantidade de analito,  $V_f$ ,  $V_h$  e  $V_a$  são os volumes do revestimento da fibra, do headspace e da amostra líquida, respectivamente.  $C_0$  é a concentração inicial do analito na amostra e  $K_{fa}$  e  $K_{ha}$  são as constantes de distribuição entre o revestimento e o analito e entre o headspace e o analito, respectivamente.

Na ausência de “headspace” (fibra mergulhada na amostra líquida), os termos  $K_{ha}V_h$  no denominador podem ser eliminados, obtendo-se assim a seguinte equação:

$$n = \frac{K_{fa}V_f C_0 V_a}{K_{fa}V_f + V_a} \quad (2)$$

Ambas as equações mostram que a relação entre a concentração inicial do analito na amostra e a quantidade de analito adsorvido pela fibra é linear.

Como os revestimentos usados em SPME são escolhidos de forma a terem afinidade elevada para os compostos orgânicos a ser extraídos, os valores de  $K_{fa}$  para estes analitos são elevados. No entanto, os valores de  $K_{fa}$  raramente são suficientemente

grandes para extrair exaustivamente o composto da matriz da amostra, razão pela qual a SPME é um método de amostragem em equilíbrio. Através de uma calibração adequada, a SPME pode ser usada para determinar a concentração de analitos numa amostra.

A equação (2) também mostra que se o volume da amostra,  $V_a$ , for suficientemente grande, a quantidade de analito extraído pela fibra não dependerá do volume da amostra. Este facto torna a SPME ideal para amostragem e análise no campo.

A quantidade de analito retida na fibra aumenta com o tempo de exposição até se atingir a situação de equilíbrio, como ilustra a Figura 1.4. Porém, desde que se verifique experimentalmente que o sinal analítico é mensurável e tem precisão aceitável pode-se usar tempos de exposição inferiores ao valor de equilíbrio. Obviamente, tal procedimento implica que o processo de calibração seja realizado em condições experimentais rigorosamente idênticas às da extracção de analitos das amostras.

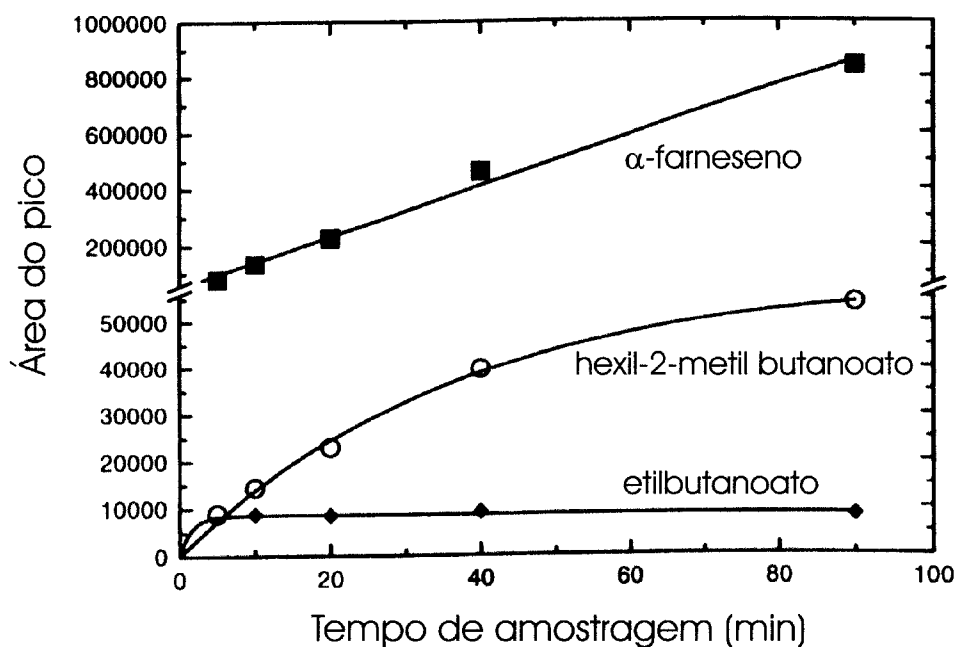


Figura 1.4 - Ilustração para três compostos, da variação do sinal obtido por meio de SPME em função do tempo de exposição<sup>38</sup>.



#### **1.4.4 - Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrometria de Massa (GC/MS)**

Na grande maioria dos problemas analíticos, as amostras são apresentadas sob a forma de misturas mais ou menos complexas. O grande impacto dos métodos cromatográficos reside na sua capacidade para separar os componentes presentes numa mistura. Porém, o processo cromatográfico não possui, em si mesmo, capacidade analítica, exigindo a associação a um detector adequado. Um método cromatográfico não sendo um método absoluto de análise, só permite analisar componentes cuja existência na amostra possa ser confirmada através do traçado de cromatogramas para soluções padrão. No entanto, a identificação inequívoca de uma espécie química só será possível se se dispuser de um detector específico, isto é, de um sistema de detecção tal que gere para cada substância detectada informação característica e susceptível de a distinguir de todas as outras. É o caso da detecção por espectrometria de massa.

Quando substâncias puras, em fase gasosa, são introduzidas num sistema de alto vácuo, onde as suas moléculas se movem livremente, estas podem ser excitadas pelo fornecimento de energia até um ponto em que, por razões de estabilidade, algumas ligações se quebram e, simultaneamente ocorre ionização da molécula (ião molecular) e de fragmentos da mesma. Os diferentes iões gerados, idealmente apenas de carga +1, podem ser separados, por acção de um campo magnético, de acordo com a relação massa/carga ( $m/z$ ) dando origem a um padrão de distribuição bem definido do número de iões presentes (intensidade do sinal) por cada valor daquela relação. Este padrão de distribuição é chamado o espectro de massa e contém informação única, característica de cada substância (desde que o problema das interferências seja devidamente controlado). Os instrumentos capazes de produzir espectros de massa são designados, de um modo geral, por espectrómetros de massa.

Se os componentes de uma mistura, separados por cromatografia, forem introduzidos num espectrómetro de massa à medida que eluem da coluna e os seus espectros de massa registados pode-se afirmar que o espectrómetro de massa se transforma num detector específico para cromatografia, uma vez que cada substância origina agora um “sinal” característico e único. Este é o princípio da técnica designada por cromatografia gasosa com detecção por espectrometria de massa (GC/MS), que foi usada neste trabalho. O elevado poder separativo da cromatografia gasosa pode, assim, por associação em linha (hifenação) com o elevado potencial identificativo da espectrometria de massa, tornar-se numa ferramenta analítica poderosíssima.

Em GC/MS os eluatos do cromatógrafo passam directamente no espectrómetro de massa, e este regista a corrente total relativa a todos os iões com diferentes massas, num intervalo amplo, seleccionado. O cromatograma da Figura 1.5 é um gráfico da corrente de iões total em função do tempo de eluição, obtido a partir de um padrão muito simples só com tolueno.

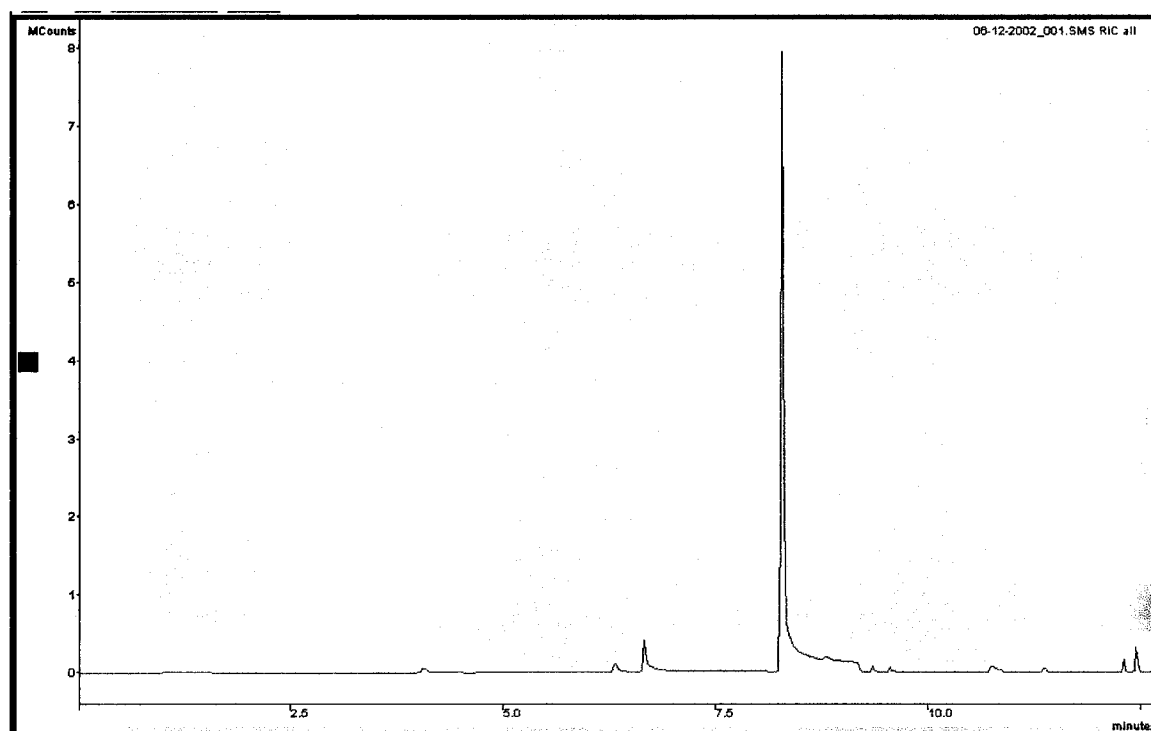


Figura 1.5 - Cromatograma de uma amostra de tolueno

A unidade das ordenadas “Mcounts = Megacounts” (total de iões adquiridos  $\times 10^{-6}$ ) corresponde à intensidade do sinal fornecido pelo equipamento e está directamente relacionado com o número de iões detectados pelo espectrómetro de massa. É uma unidade arbitrária. No caso de amostras simples este tipo de cromatograma é suficiente, não sendo necessário recorrer ao espectro de massa (mostrado na Figura 1.6 para tolueno) onde estão identificados os diferentes fragmentos (massa do ião em unidades de massa atómica (u.m.a.), dividida pelo valor da carga eléctrica desse ião) por comparação com os dados de uma biblioteca de espectros conhecidos e existentes no software do sistema.

Muitos iões têm uma carga unitária, pelo que  $m/z$  é normalmente equivalente à massa do ião, em u.m.a.

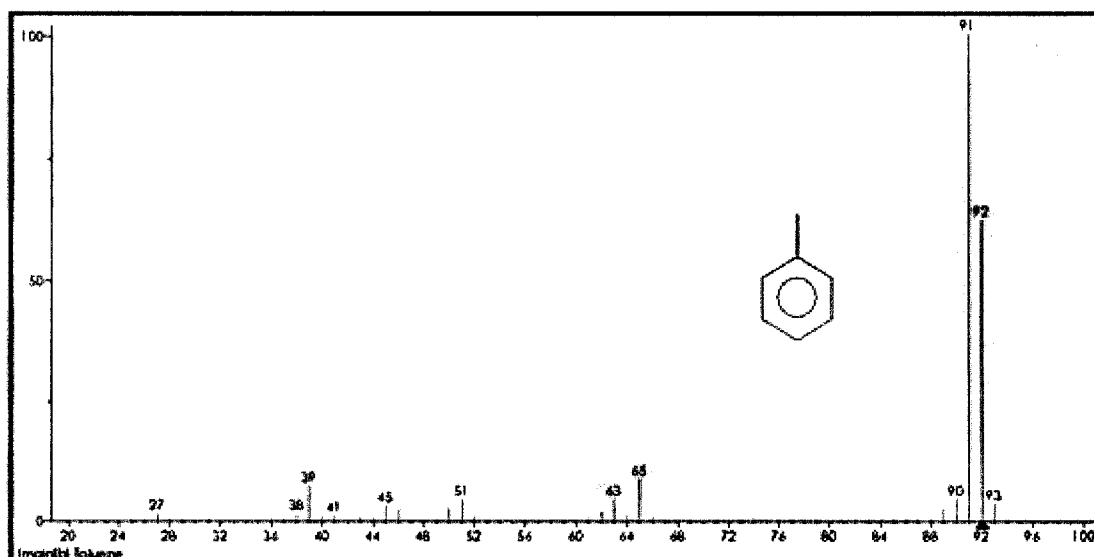


Figura 1.6 - Espectro de massa do tolueno

Os espectrómetros de massa mais modernos e sofisticados permitem a utilização de um método denominado armazenamento do ião seleccionado (do inglês “Selected Ion Storage”, SIS). Este método é vantajoso na análise de amostras complexas, quando não se deseja adquirir todos os iões num dado intervalo de  $m/z$ , para minimizar interferências. Por exemplo, numa amostra de tabaco que apresenta uma matriz

bastante complexa, na qual se queria analisar heptacloro, as massas que interessa adquirir são a 100, 272, 274 u.m.a., por corresponderem aos iões de carga +1 que apresentam um sinal mais intenso no respectivo espectro de massa (existem bases de dados de espectros de massa para numerosas substâncias). Escolhe-se, portanto, para armazenamento na armadilha de iões, um intervalo de 99 a 101 e outro de 271 a 275 u.m.a. Este processo elimina outros iões (interferentes que apresentam massas muito próximas destes valores) da armadilha de iões e assegura uma melhor sensibilidade e qualidade do espectro para o intervalo pretendido.

É, ainda, possível eliminar um ião que esteja num intervalo pretendido, mas que seja de um interferente. No exemplo dado para o heptacloro, se aparecer no espectro um ião com razão massa/carga de 273 com grande intensidade, este só pode ser devido a um outro composto da matriz, logo, é de todo o interesse rejeitá-lo, de modo a não comprometer a qualidade dos resultados. No traçado do cromatograma com sistema SIS é possível eliminar interferentes no processo de cálculo das áreas do pico. Para tal, fornece-se ao computador as razões massa/carga que devem ser usadas nos cálculos. O programa usará, dos dados armazenados, apenas aqueles que interessa considerar (no caso do heptacloro apenas as intensidade dos sinais para 100, 272 e 274 u.m.a.) e desprezará os restantes. O cromatograma será refeito, bem como o cálculo das áreas dos picos.

#### **1.4.5 - Cromatografia Gasosa acoplada a Captura Electrónica (GC/ECD)**

O detector de captura electrónica (ECD) é normalmente usado para análise de compostos que têm elevadas afinidades electrónicas, como pesticidas clorados, drogas, e os seus metabolitos. Este detector é algo selectivo na sua resposta, sendo altamente sensível a moléculas contendo grupos electronegativos: halogéneos, peróxidos e grupos nitro. É insensível a grupos funcionais como aminas, álcoois e hidrocarbonetos.

---

O detector opera passando o efluente da coluna de cromatografia gasosa sobre um emissor radioactivo de partículas beta ( $\beta$ ), normalmente  $^{63}\text{Ni}$  ou  $^3\text{H}$  adsorvido numa película de platina ou titânio. Um electrão do emissor ioniza o gás de arraste (He, Ar e/ou  $\text{N}_2$ ) e produz um feixe de electrões. Cerca de 100 electrões secundários são produzidos por cada partícula  $\beta$  inicial. Parte destes electrões serão capturados, por colisão, pelas moléculas da amostra provocando a sua ionização.

A população electrónica na célula do ECD é recolhida periodicamente aplicando um curto impulso de voltagem aos eléctrodos da célula e a corrente resultante é comparada com a corrente de referência. Quando moléculas de analito com afinidade electrónica elevada entram no detector, elas são capazes de captar alguns electrões. O detector responde variando a frequência dos impulsos de voltagem entre o ânodo e o cátodo de modo a manter uma corrente eléctrica constante. O modo como varia a frequência dos impulsos está relacionada com a concentração do analito na amostra.

## **2 - Descrição Experimental**

### **2.1 - Aspectos gerais**

#### **2.1.1 - Reagentes e materiais**

Os reagentes utilizados ao longo de todo o trabalho foram tolueno (Merck para análise), metanol (Panreac para análise), uma mistura padrão, com concentração certificada de 18 pesticidas da Sigma, com a designação TCL – Pesticidas mix 2000  $\mu\text{g}/\text{cm}^3$  (de cada pesticida) em tolueno:hexano (50:50) e dieldrina ref. 291218, Aldrich. Usou-se água desionizada com condutividade inferior a  $0,1 \mu\text{S}/\text{cm}$ .

Todo o material de vidro para medições volumétricas (balões volumétricos e pipetas), era de classe A. Na medição de volumes exactos foram utilizadas pipetas de marca Gilson, periodicamente calibradas por gravimetria, de capacidades 10, 5 e 1  $\text{cm}^3$  e 100 e 20  $\text{mm}^3$ . Estas pipetas utilizam pontas descartáveis que foram trocadas após cada medição. Para medir volumes de amostras no estado gasoso foi utilizada uma seringa de gases VICI, série A-2 de 25  $\text{mm}^3$ .

As amostras foram preparadas e/ou guardadas em frascos de 22  $\text{cm}^3$  de vidro providos de um septo de politetrafluoretileno (PTFE)/silicone, ambos da Supelco.

As fibras usadas em SPME foram de PDMS 100  $\mu\text{m}$ , da Supelco, para pesticidas e a PDMS/DVB 65  $\mu\text{m}$ , da Supelco, para tolueno.

#### **2.1.2 - Acondicionamento e descontaminação do material**

Os compostos orgânicos foram sempre manipulados dentro de uma hotte.

Antes de serem utilizados, os septos foram acondicionados a 250  $^{\circ}\text{C}$  durante uma hora, tal como é indicado no seu folheto informativo. Os septos eram usados uma só

vez, visto que ficavam perfurados, perdendo assim a sua capacidade de vedar os frascos.

As fibras de SPME eram acondicionadas (descontaminadas) no início de cada utilização sujeitando-as à temperatura de 250 °C durante 30 minutos. Esta operação era realizada no injector do GC.

Todo o material, antes da primeira utilização e depois de utilizado e devidamente lavado, era descontaminado em ácido nítrico, a 20% v/v, durante, pelo menos 24 horas. Após esse período o material era lavado com água desionizada e colocado numa estufa (especialmente destinada a este fim) a 60 °C para secar. Apenas as tampas dos frascos de 22 cm<sup>3</sup> não podiam ser imersas em HNO<sub>3</sub> porque causava a sua deterioração. Por isso e também porque nunca entravam em contacto com a amostra, uma vez que um septo se entrepunha entre a tampa e o conteúdo do frasco, as tampas eram apenas lavadas com água desionizada e colocadas a secar.

A máquina de fumar era completamente desmontada e descontaminada, com metanol, antes de cada análise para que resíduos do fumo de uma marca de cigarros não interferissem no de outra marca. Seguia-se a recolha do fumo.

Para limpeza da coluna do GC, o forno da coluna era, diariamente, colocado à temperatura máxima do programa a utilizar (adiante indicada), durante 30 minutos (o mesmo período de tempo de limpeza da fibra). Após este tempo, era traçado um cromatograma na presença da fibra para confirmação da ausência de contaminantes no sistema.

## 2.2 - Estudo de adsorção de tolueno a grãos de pólen

### 2.2.1 - Obtenção de atmosferas com concentração de tolueno conhecida

Para obter uma atmosfera de concentração de tolueno conhecida concebeu-se e optimizou-se o sistema dinâmico que está esquematizado na Figura 2.1.

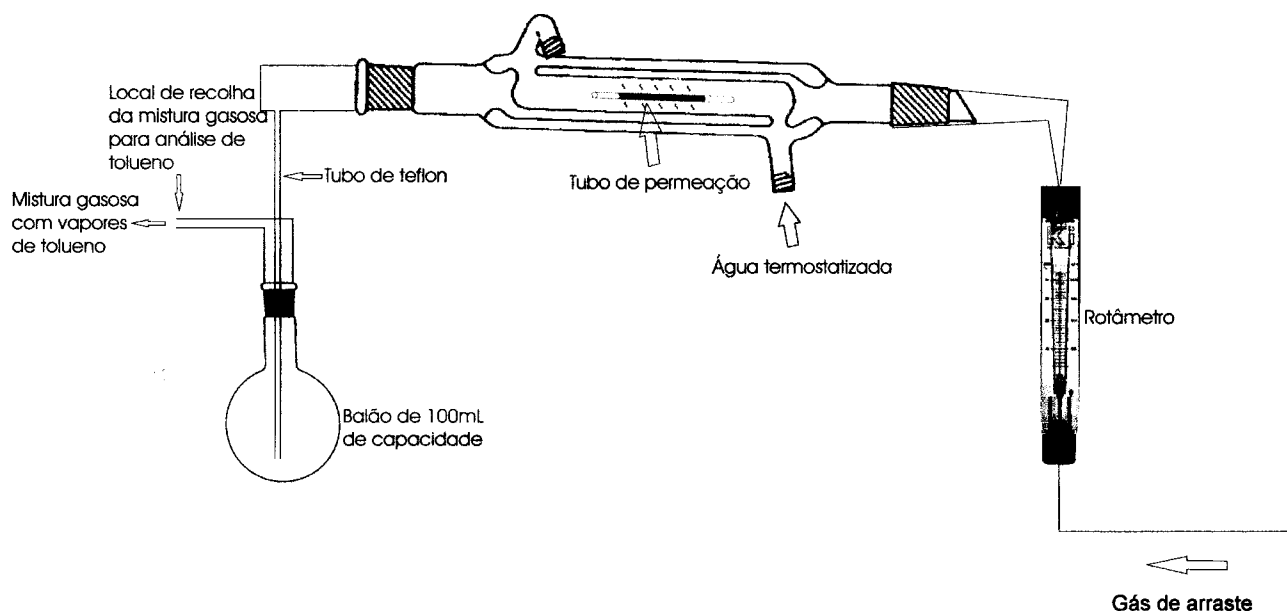


Figura 2.1 - Sistema dinâmico concebido para originar concentrações de vapor de tolueno conhecidas

O tubo de permeação (Kin-Tek, com 6 cm de comprimento) foi enchido com tolueno líquido. Começou por se otimizar o sistema em termos de fluxo de gás de arraste (medido com um rotâmetro Gilmont, modelo GF-2260 – escala 20 a 2100  $\text{cm}^3/\text{min}$  devidamente calibrado, por meio de um calibrador primário de marca Gilian modelo Standard Flow Cell P/N 800266-1), temperatura e tempo necessário para obter uma concentração de vapor de tolueno constante e conhecida. A temperatura do sistema foi mantida constante por circulação da água termostaticada (cabeça de aquecimento Selecta TetronBio). Durante a optimização do sistema a concentração de vapor de



tolueno à saída do balão era medida periodicamente. Para tal a amostra de ar era recolhida em tubos de aço contendo Tenax-TA (Supelco), desadsorvida termicamente (Dani 3350) em linha com um GC/MS (Agilent Technologies 6890N/ Agilent Technologies 5973), com uma coluna cromatográfica HP-PONA, 0,2 mm x 50 m x 0,5 µm. Estas determinações foram realizadas, por um técnico especializado, no “Laboratório da Qualidade do Ar Interior” (LQAI), criado em parceria entre a FCUP (Prof. Doutora M. T. Vasconcelos) e o IDMEC-FEUP (Prof. Doutor E. O. Fernandes), seguindo a norma ISO 16017 – 1:2000, sendo os resultados regularmente testados através de programas de intercalibração laboratorial.

As amostras para medir a concentração de tolueno presente na atmosfera urbana, foram recolhidas em tubos de aço contendo Tenax-TA (Supelco), ao nível do 1º andar na Rua do Campo Alegre, no dia 14 de Janeiro de 2004, entre 18h30m e as 19h30m (hora de maior tráfego). A análise foi, posteriormente realizada pelo técnico no LQAI, nas condições indicadas no parágrafo anterior.

### **2.2.2 - Obtenção e tratamento do pólen**

O pólen utilizado foi extraído directamente dos estames do androceu de flores naturais (lílio e *Cryptomeria japonica*).

Para obter pólen a partir de flores de lílio, colocou-se uma quantidade conveniente de estames de lílio num almofariz e adicionou-se cerca de 50 cm<sup>3</sup> de água desionizada. Seguidamente, esmagaram-se bem os estames para libertar o pólen. Removeram-se os estames, por filtração através de uma rede de nylon de 20 µm de porosidade, e transferiu-se a suspensão de pólen em água para tubos de centrifuga de 50 cm<sup>3</sup>. Procedeu-se a uma centrifugação (J.P. Selecta, modelo Mix Tasel 7000575) durante 20 minutos a 3000 rpm, decantou-se, rejeitou-se a fase líquida e deixou-se o pólen a secar durante 48 h, à temperatura ambiente.

Relativamente ao pólen de *Cryptomeria japonica*, este foi recolhido directamente da planta no Jardim Botânico, por agitação dos androceus dentro de uma caixa de petri, onde ficava depositado apenas o pólen.

O pólen era conservado em exsiccador com gel de sílica até à sua utilização.

Para todas estas operações contou-se com o apoio da Lic. Helena Ribeiro, investigadora do grupo de Palinologia do Departamento de Botânica da FCUP (coordenadora Prof. Doutora Ilda Noronha).

### 2.2.3 - Determinações analíticas de tolueno

As determinações analíticas de tolueno recolhido por SPME foram realizadas num equipamento GC Varian, modelo 3900, acoplado a um detector de massa, Varian, modelo 2100T. O cromatógrafo dispunha de um sistema de injeção para SPME e estava equipado com uma coluna de separação Varian, referência CP-SIL 8 CB low bleed/MS, com 60m (comprimento) e 0,250mm (diâmetro interno) de dimensões, e 0,25 µm de espessura de filme.

Os programas de temperatura a que se sujeitou a coluna cromatográfica no forno do cromatógrafo foram estabelecidos com base em informações da literatura<sup>40</sup> e também em testes experimentais prévios. As condições instrumentais optimizadas utilizadas foram as seguintes:

Rampa de aquecimento do forno da coluna:  $40\text{ }^{\circ}\text{C}$   $\xrightarrow[3.75\text{ min}]{20^{\circ}\text{C/min}}$   $160\text{ }^{\circ}\text{C}$  (3 min)

Temperatura do injector: 240 °C

Temperatura da linha de transferência: 170 °C

Temperatura da armadilha de iões: 150 °C

Intervalo de aquisição de massas: 40 – 95 m/z

O injector permitia repartição/não repartição (“split/splitless”) do fluxo gasoso, e foi mantido com a válvula de repartição fechada durante 6 minutos, para desadsorção do analito da fibra de SPME. Seguidamente a válvula de repartição abria com um “split” de 15, mantendo-se assim até ao término do traçado do cromatograma. O caudal do gás de arraste (hélio, 99.9999%) foi de  $1,0 \text{ cm}^3 \text{ min}^{-1}$ .

O equipamento GC/MS era, antes de cada dia de trabalho, verificado e ajustado. Para se verificar e ajustar o detector era realizado um “auto-tune”. Durante este procedimento o aparelho verifica a razão ar/água (se este valor for superior a 10 significa que existe um problema no sistema de vácuo), calibra a armadilha de iões, ajusta o multiplicador de electrões e calibra o sistema de determinação das massas através de um gás de calibração.

#### **2.2.4 - Soluções padrão de tolueno em sistema estático**

Para testar e otimizar a resposta da fibra de SPME (PDMS/DVB 65  $\mu\text{m}$ ) começou por se preparar uma solução contendo  $4,7 \times 10^{-1} \text{ mol dm}^{-3}$  de tolueno em metanol (1  $\text{cm}^3$  de tolueno medido com uma micro pipeta Gilson de 1  $\text{cm}^3$ , num balão volumétrico de 20  $\text{cm}^3$ ). Desta, preparou-se uma solução  $2,36 \times 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$  e desta retiraram-se seis tomas de 5  $\text{mm}^3$  (micro pipeta Gilson de 20  $\text{mm}^3$ ) para seis frascos de vidro de 22  $\text{cm}^3$ . Deixou-se vaporizar toda a solução durante 24 h obtendo-se assim  $|\text{tolueno}|_{\text{atmosfera}} = 49,4 \text{ mg/m}^3$ . Usando uma seringa de gases de 25  $\text{mm}^3$ , retirou-se de um desses frascos para outro de 22  $\text{cm}^3$  (vazio e seco) um volume de gás de 25  $\text{mm}^3$ . O tempo de recolha de vapor na seringa foi de 3-4 minutos (não controlado com rigor). De outro dos frascos retirou-se apenas 20  $\text{mm}^3$  e assim sucessivamente até retirar apenas 5  $\text{mm}^3$ . Obteve-se assim concentrações de tolueno variáveis entre 11,2  $\mu\text{g/m}^3$  e 56,2  $\mu\text{g/m}^3$ .

### **2.2.5 - Exposição de pólen a tolueno**

Para estudar a adsorção de tolueno a pólen pesava-se, para o balão do sistema da Figura 2.1, uma massa conhecida de pólen seco. O balão com o pólen era colocado, durante um certo período de tempo rigorosamente medido, no sistema que gerava uma concentração constante e conhecida de vapores de tolueno. O tempo de exposição variou entre 2 e 72 horas dependendo da experiência (ver 3.2 adiante).

### **2.2.6 - Extracção do tolueno adsorvido no pólen**

Após exposição do pólen a uma atmosfera enriquecida com vapores de tolueno, retirava-se o balão do sistema da Figura 2.1 e, de imediato, pesava-se rigorosamente (em balança Mettler Toledo AG245, sensível a 0,01 mg) uma toma de pólen para um frasco de vidro de 22 cm<sup>3</sup>. Adicionava-se 10 cm<sup>3</sup> de metanol e fechava-se hermeticamente o frasco. Submetia-se a mistura, à temperatura constante de 40 °C (banho termostaticado por cabeça de circulação Selecta Tetron Bio), com agitação (agitador magnético, Framo-Geratetechnik, M21/1), durante 30 minutos. Seguidamente, introduzia-se a unidade de SPME no “headspace” do frasco com a amostra durante 20 minutos, mantendo a agitação e a mesma temperatura, após o que se procedia à análise do tolueno adsorvido à fibra por GC/MS. As condições experimentais aqui referidas foram objecto de optimização prévia, que será descrita e discutida em 3.1.

## **2.3 - Estudo da presença de pesticidas em tabaco nacional**

### **2.3.1 - Amostras de cigarros para análise**

Os estudos incidiram sobre cigarros adquiridos no mercado em diferentes datas e locais de venda da região do Porto entre Maio e Agosto de 2004. Adquiriu-se dois maços de cada marca, e cinco marcas diferentes, designadas por A, B, C, D e E.

### **2.3.2 - Geração e recolha do fumo do tabaco**

Para gerar fumo de cigarros utilizou-se um equipamento especialmente concebido para o efeito, de origem alemã, Borgwaldt modelo RM1/Plus (Figura 2.2) cujas especificações satisfazem as normas ISO 3308 e ISO 4387.

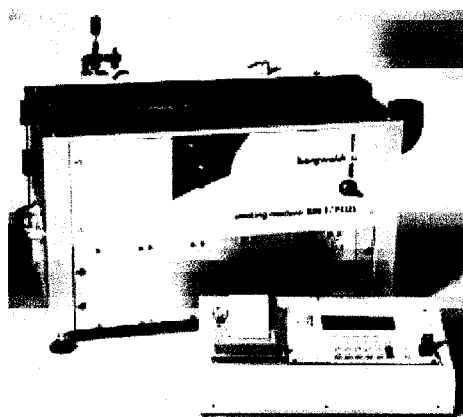


Figura 2.2 - Vista geral da máquina usada para gerar o fumo do tabaco

Este equipamento imita o funcionamento do pulmão humano através do deslocamento de um êmbolo no interior de uma cavidade cilíndrica, permitindo fumar cigarros individuais mecanicamente. Cada cigarro foi fumado em condições previamente estabelecidas e padronizadas, designadamente: 35 cm<sup>3</sup> de volume de puxada de ar, 2 s de duração de puxada de ar e 58 s de pausa entre puxadas de ar sucessivas. Na pausa entre puxadas de ar o cigarro continua a arder mas nenhum

fumo era aspirado. O valor do volume de cada puxada de ar era verificado por meio de um medidor de fluxo de bolha de sabão. A quantidade de cigarro a ser fumada foi controlada por meio de um detector de infravermelho que se move até à posição desejada (comprimento de cigarro a queimar). Na prática, a forma como o cigarro é queimado depende também das condições atmosféricas, particularmente da velocidade do ar junto ao cigarro. A norma ISO 3308 prescreve uma velocidade de fluxo de ar junto ao cigarro de  $200 \pm 30$  mm/s. Este de fluxo de ar é medido com um anemómetro colocado no canal de fluxo de ar, de forma a medir esse fluxo no lugar onde fica a ponta do cigarro a arder. A máquina possui no fundo do “corredor de fluxo de fumo” um sistema que aspira o fumo que se produzir na combustão/pirólise do cigarro e que é emitido directamente para a atmosfera. Esse fumo é depois encaminhado por um tubo para o exterior da máquina. Por isso o equipamento está colocado numa hotte, para não contaminar o ambiente do laboratório.

O cigarro é acendido manualmente usando um acendedor eléctrico externo. Na realidade, alguns outros métodos de ignição podem contribuir com mensuráveis quantidades de analitos na fase de vapor, contaminando a amostra.

O sistema está equipado com dois suportes para filtros (Borgwaldt Technik GmbH, ref<sup>a</sup> 80202851) de fibra de vidro de 44 mm de diâmetro. A parte rugosa do filtro é colocada voltada para a entrada do fumo. O primeiro filtro está ligado ao suporte onde o cigarro é colocado para ser queimado, de modo a filtrar imediatamente o fumo produzido. Foi neste filtro, após a máquina ter fumado, sucessivamente, 5 cigarros da mesma marca, que foi investigada a presença de pesticidas. Foi também nesta posição que se expôs pólen ao fumo de tabaco, colocando-o antes do filtro. Um segundo filtro, chamado de segurança, está ligado ao primeiro por um tubo e está colocado antes da seringa (ou “pulmão” da máquina) e tem como principal função garantir que a fase particulada fica completamente retida e não passa para o interior do equipamento.

As amostras correspondentes ao fumo aspirado durante as puxadas de ar foram recolhidas à saída do equipamento para sacos Tedlar<sup>®</sup>, construídos em filme de PVF (fluoreto de polivinilo) transparente, que são adequados para armazenar compostos na forma gasosa. O material dos sacos é inerte à maioria dos gases. Os sacos possuem uma válvula que permite admitir ou remover gás do saco, para além de possuírem um septo para o mesmo fim. Foi no interior de um saco de Tedlar<sup>®</sup> que se expôs pólen ao fumo de tabaco. Para tal, o saco teve de ser cortado de um dos lados e depois voltado a fechar.

### **2.3.3 - Extracção de pesticidas do tabaco e de partículas do fumo**

Os pesticidas foram extraídos da amostra sólida (tabaco ou filtros expostos na máquina de fumar onde ficava retida a fase particulada do fumo de cigarros) e analisadas seguindo, de perto, um método da literatura para determinação de pesticidas organoclorados em plantas medicinais<sup>41</sup>. Este método, que foi aplicado apenas com pequenas alterações de pormenor, consistiu em submeter o substrato (tabaco de um cigarro ou um filtro onde haviam sido retidas as partículas de fumo inalável), imerso em 3 cm<sup>3</sup> de água desionizada, à acção de micro-ondas (sistema Milestone 1200 Mega), a alta pressão durante 10 minutos. Começou por se usar uma potência de 520 W, mas passou-se a usar apenas 250 W, para reduzir as perdas por excesso de pressão (abertura da válvula e libertação de gás para o exterior). Após a extracção, os extractos aquosos foram filtrados, sob pressão, usando filtros de lã de vidro (para evitar a retenção de pesticidas durante esta operação). Para a análise de pesticidas no tabaco juntavam-se os extractos de vários cigarros (15 na maioria dos casos) diluídos a 100 cm<sup>3</sup>. No caso dos filtros foram efectuadas duas extracções consecutivas a cada filtro, sendo depois as soluções misturadas para análise e os extractos de cada um dos filtros analisados individualmente, após diluição a 20 cm<sup>3</sup> com água desionizada. Para análise dos extractos do tabaco ou do fumo, 20 cm<sup>3</sup> de

extracto era introduzido num frasco de 22 cm<sup>3</sup> que era fechado hermeticamente. Punha-se a solução em agitação (agitador magnético) à temperatura ambiente, introduzia-se e imergia-se na solução a fibra de SPME durante 90 minutos. Seguidamente, procedia-se à análise dos compostos adsorvidos na fibra por cromatografia gasosa. Para identificação dos sinais observados no cromatograma, amostras dopadas com uma alíquota de solução padrão de mistura de pesticidas (cada pesticida numa concentração de 13 µg/dm<sup>3</sup>) foi seguidamente analisada. O volume de padrão adicionado variou, normalmente, entre 5 e 20 mm<sup>3</sup>.

Não foi possível testar a percentagem de recuperação do processo de extracção por não existir material de referência no mercado para pesticidas organoclorados em plantas. Também não foram feitos testes de recuperação, em grande parte por falta de tempo. Como se tratou de um estudo exploratório, a detecção consistiu o objectivo prioritário. Faz-se notar que esta metodologia exige um tempo muito elevado para processamento da amostra. Além do tempo de análise a que já se fez referência (90 minutos de extracção para SPME, mais 40 minutos para a desadsroção térmica e traçado do cromatograma, por ponto experimental), para obter o fumo necessário ao estudo de uma amostra é necessário um dia de trabalho. Outro dia é requerido para preparar os extractos aquosos.

Para averiguar a presença de pesticidas na fracção gasosa do fumo, expôs-se durante 90 minutos, a 23 °C (temperatura do laboratório), a fibra de SPME no interior do saco de gases onde havia sido recolhido o fumo de 5 cigarros de uma mesma marca, procedendo-se de imediato à análise dos compostos adsorvidos.

Todos os procedimentos foram acompanhados de análise de brancos do processo total para testar eventuais contaminações durante a manipulação da amostra.



### 2.3.4 - Determinações analíticas

Na análise de pesticidas usou-se o mesmo GC/MS Varian utilizado nas análises de tolueno, nas condições instrumentais seguintes:

Rampa de aquecimento do forno da coluna:

$40\text{ }^{\circ}\text{C}$   $\xrightarrow[5\text{ min}]{30\text{ }^{\circ}\text{C/min}}$   $160\text{ }^{\circ}\text{C}$   $\xrightarrow{5\text{ }^{\circ}\text{C/min}}$   $275\text{ }^{\circ}\text{C}$   $\xrightarrow[3\text{ min}]{30\text{ }^{\circ}\text{C/min}}$   $300\text{ }^{\circ}\text{C}$

Temperatura do injetor:  $250\text{ }^{\circ}\text{C}$

Temperatura da linha de transferência:  $220\text{ }^{\circ}\text{C}$

Temperatura da armadilha de iões:  $180\text{ }^{\circ}\text{C}$

A aquisição de massas no MS foi realizada com recurso ao sistema SIS.

Este programa havia sido já utilizado anteriormente (para determinação de pesticidas em sedimentos estuarinos<sup>42</sup> usando no detector de MS, o modo de varrimento total entre 50 e 400 m/z) e tinha-se constatado que permitia obter resposta linear para concentrações dos pesticidas entre  $0,87\text{ }\mu\text{g/dm}^3$  e  $2,1\text{ }\mu\text{g/dm}^3$ .

Dada a complexidade da matriz das amostras, a análise dos cromatogramas traçados com varrimento total de massas é muito complicado. Por isso, recorreu-se a um programa de armazenamento de iões seleccionados (SIS). Com base nos dados já disponíveis sobre os tempos de retenção dos pesticidas, estabeleceu-se inicialmente o programa para aquisição de iões característicos apresentado na Tabela 2.1. Embora os iões característicos de cada pesticida fossem em número superior aos seleccionados para a aquisição, só foram seleccionados iões com uma abundância relativa superior a 600. Dada a proximidade dos tempos de retenção de alguns dos pesticidas em estudo, certos intervalos de aquisição englobaram mais do que um analito, seleccionando-se os iões de acordo com os diversos pesticidas presentes em cada intervalo.

Uma análise da solução padrão de 18 pesticidas, cada um deles numa concentração de  $13 \mu\text{g}/\text{dm}^3$ , mostrou que o programa criado permitia detectar e identificar todos os pesticidas.

Tabela 2.1 - Segmentos de cromatograma (intervalo de tempos de aquisição de iões) e respectivas massas adquiridas, utilizando SIS, para pesquisa de pesticidas organoclorados por GC-MS

Pesticida(s) alvo	Tempo de retenção (min)	Segmento		
		Início (min)	Fim (min)	Massas adquiridas (m/z)
Lindano	22,173	20,0	24,5	109, 111, 181, 183, 217, 219
Heptacloro	25,256	24,5	26,0	100, 272, 274
Aldrino	26,669	26,0	27,5	66
Heptacloro-epóxido	28,131	27,5	28,8	81, 353, 355
Endossulfano I	29,576	28,8	29,8	69, 75, 195, 197, 207, 237, 239, 241, 243, 277
DDE/DDD/Dieldrina	30,127/30,437/30,616	29,8	31,0	79, 235, 237, 246, 248, 318
Endrino/DDT/Endossulfano II	31,458/31,752/31,832	31,0	32,0	81, 82, 159, 195, 197, 207, 235, 237, 239, 241, 243, 263, 339
Endrino aldeído	32,354	32,0	32,7	67
DDT/Endossulfano sulfato	33,036/33,069	32,7	34,0	229, 235, 237, 272, 274, 387
Metoxicloro	34,616	34,0	35,83	227

Os primeiros resultados obtidos para extractos de tabaco mostravam a ocorrência de um pico apenas para o tempo de retenção da dieldrina. Em consequência disso, passou-se a usar um programa cromatográfico muito mais específico em que apenas eram adquiridos, no intervalo de tempos de retenção entre 30 e 31 minutos, os iões correspondentes às massas 77 a 82, 107, 108 e 261 a 265 u.m.a. Estes intervalos incluem os iões de maior abundância no espectro de massa da dieldrina (ver Tabela 2.2) que faz parte da base de dados do GC-MS utilizado.

O espectro de massa da dieldrina apenas contém um ião de carga de +1 muito abundante que é o de 79 u.m.a. Trata-se de um fragmento muito pequena que aparece nos espectros de massa de diversos compostos o que constitui uma dificuldade adicional à identificação da dieldrina. Por isso, decidiu-se adquirir também outros iões que, embora de abundância relativamente baixa (ver Tabela 2.2) permitem, no seu conjunto, uma melhor identificação do pesticida.

Tabela 2.2 - Iões e respectivas intensidades presentes no espectro de massa da dieldrina

Name: Dieldrin

Formula: C<sub>12</sub>H<sub>8</sub>Cl<sub>6</sub>O

MW: 378 CAS#: 60-57-1 NIST#: 114985 ID#: 36793 DB: mainlib

Other DBs: None

Contributor: NIST Mass Spectrometry Data Center, 1990.

140 m/z Values and Intensities:

27	67	29	58	38	19	39	119	40	22	41	19	50	41	51	87	52	37	53	110
54	53	55	27	57	19	61	24	62	33	63	54	65	37	66	44	67	21	69	15
73	55	74	47	75	54	77	267	79	999	80	126	81	363	82	327	83	37	84	28
85	51	86	51	87	34	88	13	89	22	91	28	96	27	97	39	98	37	99	38
101	23	106	18	107	130	108	153	109	60	110	27	111	25	113	46	115	26	117	26
119	29	120	27	121	33	122	15	123	18	125	18	130	20	131	24	132	19	133	35
135	22	137	24	138	22	139	32	141	30	143	45	145	29	147	36	149	36	165	18
167	32	169	28	170	24	171	21	172	21	173	53	174	19	175	33	181	20	183	30
191	46	193	51	195	25	201	22	203	32	204	24	205	24	206	23	207	37	208	20
209	49	211	17	216	21	217	29	218	17	219	31	229	15	230	25	235	70	236	32
237	110	238	32	239	80	240	21	241	42	242	17	243	90	244	26	245	76	246	24
247	31	251	21	253	20	255	29	257	20	261	125	263	202	264	24	265	140	266	21
267	50	270	18	272	31	273	21	274	25	275	81	276	20	277	151	278	25	279	148
280	24	281	73	283	24	309	14	343	33	345	60	347	37	378	27	380	46	382	42

Na parte final do trabalho, apenas para confirmar resultados obtidos por GC-MS usou-se também um cromatógrafo gasoso com detector de captura electrónica (GC/ECD) da marca Varian modelo CP-3800, provido de uma coluna de separação idêntica à usada no GC-MS.

As condições instrumentais utilizadas nestas determinações foram as seguintes:

Rampa de aquecimento do forno da coluna:

40 °C  $\xrightarrow[5\text{ min}]{30^\circ\text{C/min}}$  160 °C  $\xrightarrow{5^\circ\text{C/min}}$  275 °C  $\xrightarrow[3\text{ min}]{30^\circ\text{C/min}}$  300 °C

Temperatura do injector: 250 °C

Temperatura do detector: 320 °C

## **3 - Resultados dos estudos de adsorção de tolueno a pólen**

### **3.1 - *Optimização de metodologias***

#### **3.1.1 - Considerações preliminares**

Conforme se referiu inicialmente, o objectivo específico deste estudo era avaliar a capacidade do pólen para fixar vapores de tolueno. Não dispondo, à partida, de qualquer informação sobre o tópico, era necessário encontrar resposta para uma multiplicidade de perguntas, nomeadamente as seguintes: (1) será que o pólen é capaz de adsorver tolueno?; (2) em caso afirmativo, quanto tempo será necessário para se estabelecer um equilíbrio tolueno atmosférico/particulado?; (3) que concentração de vapor de tolueno será necessário para obter resultados mensuráveis do que foi adsorvido ao pólen?; (4) que massa de pólen se deve expor a uma dada atmosfera de tolueno para ser possível quantificar o tolueno adsorvido com os meios disponíveis?; (5) como se deve proceder com vista a determinar a quantidade de tolueno adsorvido por unidade de massa de pólen? A resposta a cada uma destas perguntas depende, em muitos casos, da resposta a outras perguntas, pelo que se teve de ir avançando por tentativas, variando um número muito reduzido de parâmetros de cada vez. De notar que a ausência completa de informação que servisse de ponto de partida inviabilizou a utilização de concepções experimentais (“experimental design”) mais expeditas, tais como o uso de “factorial design” incluindo os testes de robustez dos métodos analíticos<sup>43</sup>. Na verdade, não estava apenas em causa conhecer em que extensão a variação no valor de um dado parâmetro experimental perturbaria o sistema. Era necessário começar por definir o próprio sistema.

### 3.1.2 - Análise de tolueno por SPME/GC/MS

#### 3.1.2.1 - Amostras na fase gasosa

Partiu-se de um programa da literatura para análise de tolueno (e outros COV's) por GC/MS, referido em 2.2.3, e apenas se optimizou o tempo necessário para a desadsorção completa de tolueno da fibra de SPME. Para tal, expôs-se a fibra a uma atmosfera saturada em tolueno ( $112 \text{ mg/m}^3$ ) durante cerca de 10 minutos (o tempo de amostragem não era muito importante nesta fase) à temperatura ambiente e, seguidamente, procedeu-se a desadsorção do COV no GC/MS durante 5 minutos. Obteve-se um sinal mensurável, mas a remoção de tolueno da fibra não foi completa (ao traçar um novo cromatograma a partir da fibra ainda se obteve um sinal para tolueno).

Repetiu-se a experiência alterando o tempo de desadsorção para 6 minutos e o resultado foi satisfatório, em termos quer de características do sinal quer de remoção total do tolueno adsorvido (ausente no cromatograma da Figura 3.1). Assim sendo, para todo o trabalho subsequente fixou-se o tempo de desadsorção em 6 minutos.

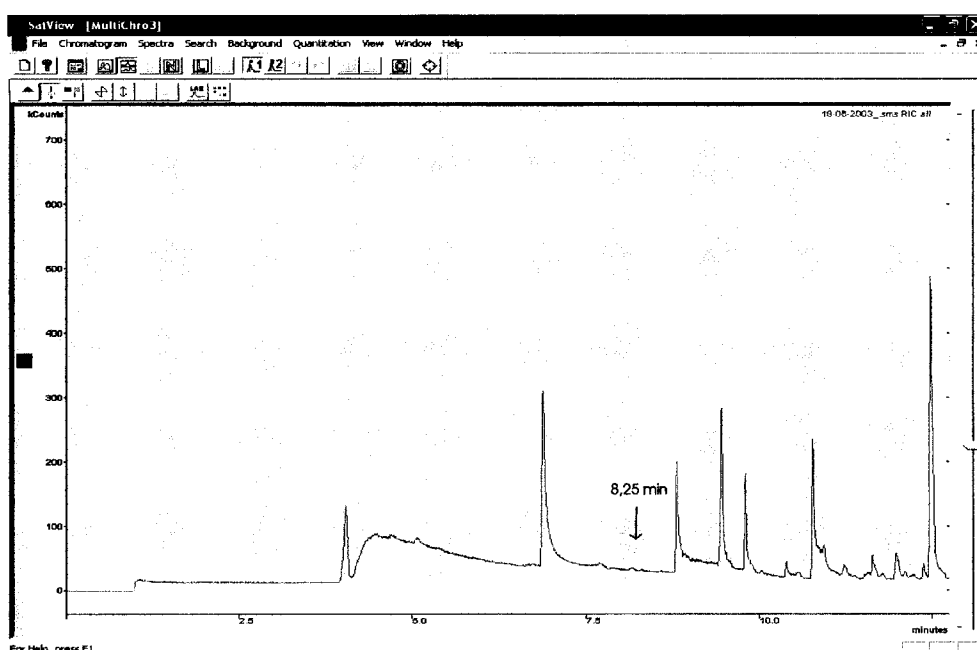


Figura 3.1 - Cromatograma obtido para tolueno, com 6 minutos de desadsorção térmica, numa experiência de optimização do sistema analítico. A seta indica o tempo de retenção onde deveria aparecer o pico de tolueno

Para avaliar a capacidade da fibra para análise de vapores de tolueno, expôs-se a fibra a concentrações de tolueno entre 11,2 e 56,2  $\mu\text{g}/\text{m}^3$  à temperatura ambiente do laboratório (aproximadamente 20 °C). O tempo de amostragem (SPME) foi de 25 minutos e traçou-se uma recta de calibração. Os resultados (Figura 3.2) mostram que se obteve uma resposta aproximadamente linear.

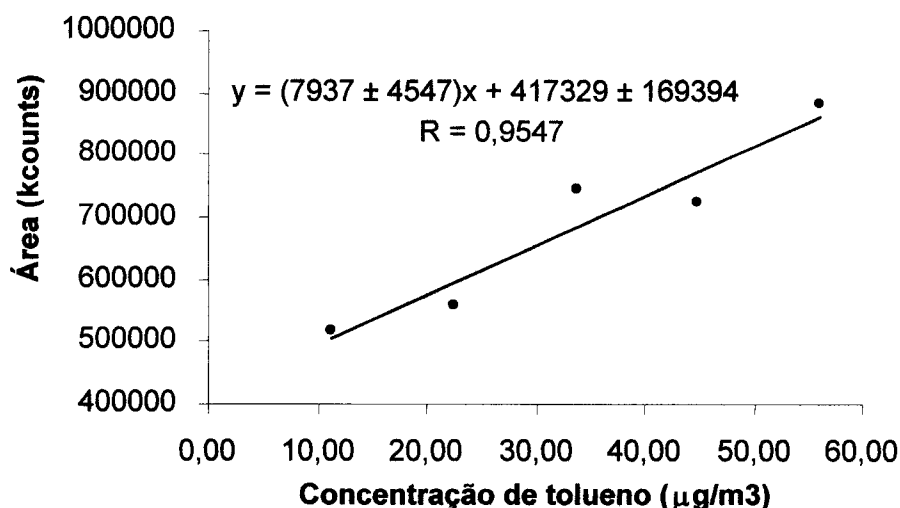


Figura 3.2 - Resposta do SPME/GC/MS a tolueno para padrões preparados usando seringa de gases

Esta experiência permitiu concluir que: (1) a fibra, exposta 25 minutos a vapores de tolueno (dezenas de  $\mu\text{g}/\text{m}^3$ ), adsorveu quantidades mensuráveis deste COV; (2) a quantidade adsorvida aumentou proporcionalmente à concentração de tolueno.

Para testar a repetibilidade dos resultados repetiu-se dez vezes a amostragem e análise para uma concentração de vapores de tolueno, de 3,95  $\text{mg}/\text{m}^3$  (Figura 3.3). O DPR foi de 13,5%, valor aceitável neste tipo de estudos.

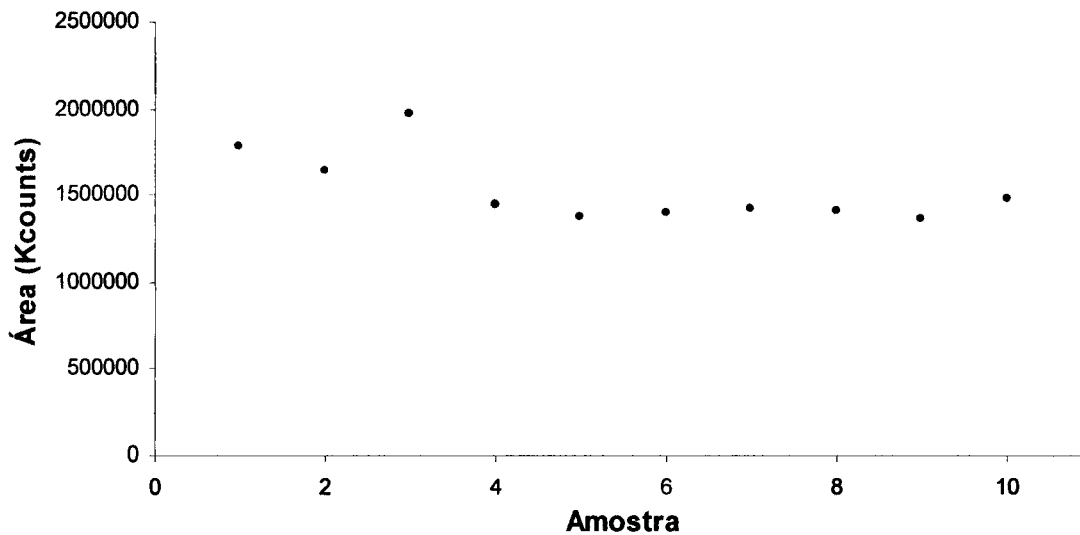


Figura 3.3 - Sinais obtidos para dez réplicas independentes de amostras com 3,95 mg/m<sup>3</sup> de tolueno

Expôs-se também a fibra de SPME a uma concentração de 56,2 µg/m<sup>3</sup> de tolueno em triplicado. Obteve-se um desvio padrão relativo (DPR) de 15% (n=3), não muito diferente do observado anteriormente.

Para estudar a influência do tempo de exposição na quantidade de COV adsorvido à fibra, esta foi exposta a uma atmosfera de 57,5 µg/m<sup>3</sup>, durante períodos de tempo compreendidos entre 1 e 25 minutos. Para 10 minutos de exposição realizaram-se dois ensaios e para 25 minutos três ensaios (ver resultados na Tabela 3.1).

Tabela 3.1 - Sinais obtidos após exposição de fibra de SPME a uma atmosfera com 57,5 µg/m<sup>3</sup> de tolueno

Amostra	Tempo (min)	Sinal (kcounts)
1	1	2564213
2	10	11747737
3	10	11870784
4	15	15500790
5	25	18779872
6	25	13509734
7	25	18325524

Na Figura 3.4 apresentam-se os valores médios dos resultados da Tabela 3.1. A figura mostra que o sinal aumentou regularmente com o tempo de exposição, sendo 25 minutos um período de tempo já próximo do da situação de equilíbrio.

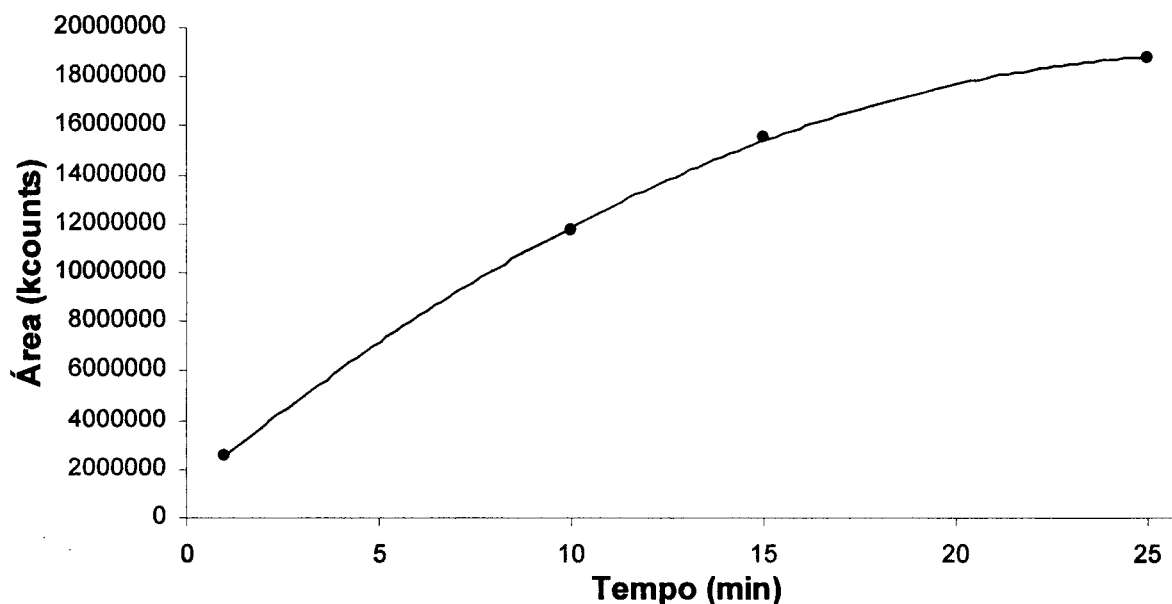


Figura 3.4 - Sinais obtidos quando a fibra foi exposta a uma concentração de  $57,5 \mu\text{g}/\text{m}^3$  de tolueno durante tempos variados

### 3.1.2.2 - Quantificação de tolueno adsorvido a partículas

Testou-se a possibilidade de quantificar o tolueno adsorvido às partículas, removendo o COV com metanol e recolhendo-o por SPME no “headspace” do sistema líquido-vapor após equilíbrio. A imersão da fibra numa suspensão de pólen levaria, provavelmente, à aderência de pólen à fibra, o que iria reduzir, consideravelmente, o tempo de vida da fibra, ou mesmo danificá-la. Este facto implicaria um aumento do custo do processo e perdas de tempo consideráveis. Por isso, optou-se por realizar as amostragens em “headspace”. Para tal, começou-se por estabelecer um sistema estático, com uma fase líquida constituída por misturas de tolueno e metanol. O metanol serviria de solvente para remover o tolueno adsorvido à superfície de pólen, de modo a permitir a sua posterior determinação.



Uma vez que vapor de metanol poderia interferir na adsorção do tolueno à fibra, começou-se por averiguar a precisão que se poderia obter com amostragem por SPME, a partir de atmosferas de “headspace” de soluções de tolueno em metanol. Para tal, preparou-se quatro soluções idênticas, com concentrações de tolueno de  $1,51 \times 10^{-4} \text{ mol/dm}^3$  e, após deixar o sistema ( $10 \text{ cm}^3$  de solução num frasco de  $22 \text{ cm}^3$ ) a equilibrar a  $40 \text{ }^\circ\text{C}$  durante 30 minutos, recolheu-se amostras por exposição da fibra durante 10 minutos. Três dos resultados obtidos foram concordantes entre si (área média de  $12,0 \times 10^6$  kcounts e  $\text{DPR} = 6,6\%$ ) e um deles foi muito mais baixo (por razão desconhecida) e foi rejeitado.

Seguidamente, averiguou-se se seria possível analisar várias vezes, com repetibilidade aceitável, a mesma amostra, isto é, recolher várias amostras de vapor a partir do “headspace” de um mesmo frasco com mistura de tolueno e metanol. Concretamente, retiraram-se cinco amostras sucessivas de vapor de um frasco com concentração de tolueno na solução líquida de  $1,51 \times 10^{-4} \text{ mol/dm}^3$ , realizando sucessivos períodos de 10 minutos de exposição da fibra em “headspace” a  $40 \text{ }^\circ\text{C}$ . Entre duas amostragens sucessivas procedia-se à análise e à limpeza da fibra. Os três primeiros sinais foram concordantes (média= $12,7 \times 10^6$  kcounts,  $\text{DPR} = 15,9 \%$ ) e os dois últimos foram muito mais baixos. Estes resultados indicaram que a quantidade de tolueno removida pela fibra não alterava significativamente a composição do sistema líquido/gás, permitindo realizar réplicas analíticas para uma mesma solução. Tal procedimento terá interesse para o futuro estudo do tolueno adsorvido à superfície de uma dada amostra de pólen.

Passou-se, seguidamente, a averiguar como variava o sinal analítico obtido por este método com a concentração de tolueno na mistura líquida. Para tal, prepararam-se soluções de tolueno em metanol com concentrações de tolueno variáveis entre  $0,4 \text{ mg/dm}^3$  e  $18,4 \text{ mg/dm}^3$ . Os resultados obtidos (Figura 3.5) indicaram que se poderia determinar a quantidade de tolueno adsorvido a pólen por este método. O limite de detecção foi de  $3,3 \text{ mg/dm}^3$ . Considerando uma massa de pólen de  $40 \text{ mg}$ , exposto a

tolueno e tratado com metanol, o limite de detecção corresponderia a  $0,82 \text{ mg}_{\text{tolueno}}/\text{g}_{\text{pólen}}$ .

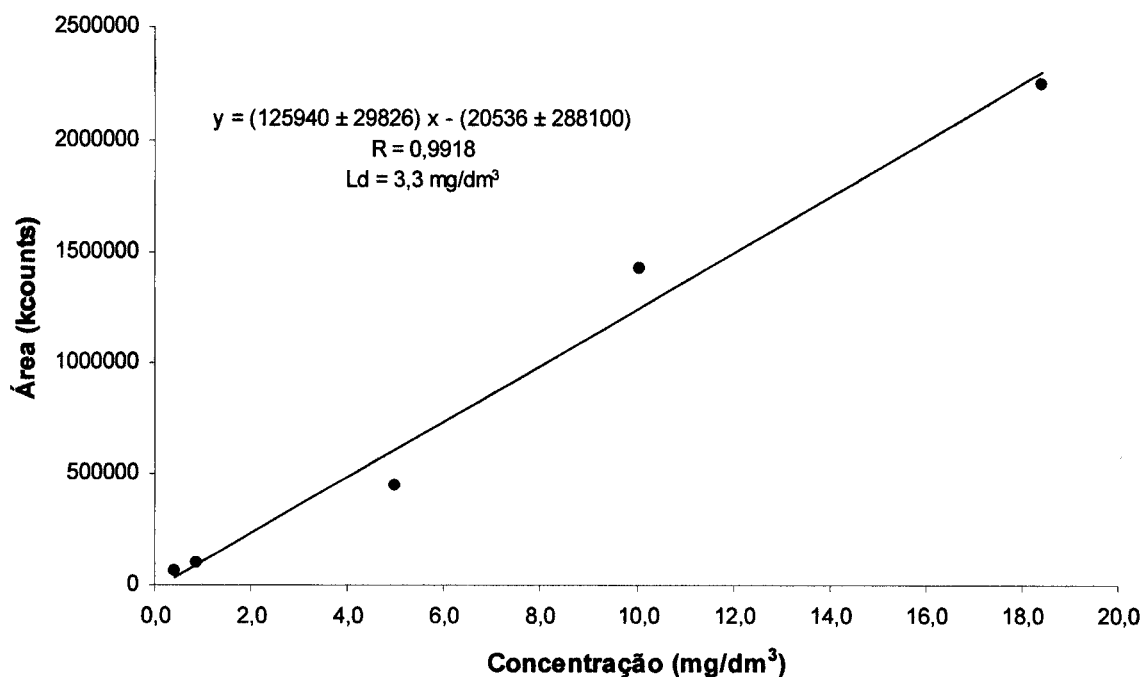


Figura 3.5 - Recta de calibração obtida a partir de padrões líquidos de tolueno preparados em metanol com concentrações compreendidas entre 0,4 e 18,4 mg/dm<sup>3</sup>

### 3.1.3 - Optimização do sistema dinâmico de geração de uma atmosfera padrão de tolueno

Como ponto de partida para o estabelecimento de um sistema dinâmico que gerasse uma concentração de vapor de tolueno típica da existente em atmosfera aberta, mediu-se a concentração de tolueno presente na atmosfera da Rua do Campo Alegre, uma das ruas com maior movimento da cidade do Porto, em dia útil à hora de ponta. A concentração média observada foi de  $83,5 \mu\text{g}/\text{m}^3$ . Este valor foi da ordem de grandeza dos valores encontrados na literatura para atmosfera urbana<sup>7</sup>.

Com base nos valores reais de tolueno na atmosfera, passou-se a otimizar as condições do sistema dinâmico para produzir uma atmosfera com concentração de tolueno constante e da ordem de grandeza dos valores reais. Para tal realizou-se uma série de experiências, em que se variou o tempo de estabilização a partir da colocação do tubo de permeação no sistema da Figura 2.1, e o caudal de gás de arraste (e a temperatura). As condições experimentais e os resultados obtidos estão resumidos na Tabela 3.2.

Numa primeira fase (experiência I) a temperatura do sistema foi controlada (23°C) apenas pelo sistema de ar condicionado existente no laboratório. O caudal de gás de arraste (azoto) foi regulado para 500 cm<sup>3</sup>/min e mediu-se periodicamente a concentração de tolueno à saída do sistema (recolha periódica de uma amostra de 1 dm<sup>3</sup> de ar em tubo com Tenax-TA), após tempos de estabilização do sistema entre 2,7 e 6,2 horas. Observou-se que a concentração de tolueno se manteve a cerca de 21 mg/m<sup>3</sup> (20,9 ± 1,0 mg/m<sup>3</sup>), portanto relativamente estável. As oscilações de concentração foram atribuídas a uma deficiente estabilização do valor da temperatura.

Passou-se, seguidamente, a controlar a temperatura rigorosamente por meio de circulação de água termostaticada conforme está descrito na parte experimental. Na experiência II a temperatura foi inicialmente ajustada a 25 °C, mas constatou-se que originava um aumento da velocidade de efusão e logo da concentração dos vapores de tolueno. Reduziu-se, então, a temperatura para 23 °C, mantendo o caudal a 500 cm<sup>3</sup>/min. A concentração de tolueno baixou para valores da ordem das centenas de µg/m<sup>3</sup>, ainda muito superior ao real. Mantendo o valor da temperatura, aumentou-se o caudal para 2000 cm<sup>3</sup>/min e prosseguiu-se a experiência durante 6,2 horas. Desligou-se o sistema e recomeçou-se noutra dia durante o mesmo tempo. A concentração de tolueno baixou para menos de metade da observada anteriormente, mas ainda não estava estabilizada ao fim de 6,2 horas (ver Tabela 3.2).

Tabela 3.2 - Estudo para optimização do sistema dinâmico para geração de uma atmosfera com concentração de tolueno constante e conhecida

Experiência	Temp. (°C)	Gás de arraste		Tempo de estabilização (h)	Concentração (mg/m <sup>3</sup> )	Média (mg/m <sup>3</sup> )	Desvio padrão (mg/m <sup>3</sup> )
		Natureza	Caudal (cm <sup>3</sup> /min)				
I	23*	Azoto	500	2,7	19,9	20,9	1,0
	23*	Azoto	500	3,7	21,9		
	23*	Azoto	500	4,2	21,7		
	23*	Azoto	500	6,2	20,2		
II	25±0,1	Azoto	500	4,0	30,1		
	25±0,1	Azoto	500	4,2	24,8		
	23±0,1	Azoto	500	6,0	0,827		
	23±0,1	Azoto	500	6,2	0,839		
	23±0,1	Azoto	500	23,5	0,626		
	23±0,1	Azoto	500	23,7	0,495		
	23±0,1	Azoto	2000	6,0	0,164		
	23±0,1	Azoto	2000	6,2	0,140		
	23±0,1	Azoto	2000	6,0	0,346		
	23±0,1	Azoto	2000	6,2	0,328		
III	23±0,1	Ar	2000	168	0,123	0,117	0,007
	23±0,1	Ar	2000	170	0,117		
	23±0,1	Ar	2000	171	0,116		
	23±0,1	Ar	2000	192	0,106		
	23±0,1	Ar	2000	196	0,122		

\* Esta temperatura foi controlada apenas pelo sistema de ar condicionado do laboratório. Nas experiências II e III, a temperatura foi rigorosamente controlada (ver secção 2.2.1).

Constatou-se a necessidade de manter o sistema a estabilizar durante períodos de tempo muito mais longos, de vários dias, como aliás a literatura<sup>44</sup> recomenda. O uso de azoto, adquirido em garrafa, como gás de arraste acarretava problemas económicos e logísticos difíceis de ultrapassar. Foi, então, necessário arranjar uma alternativa que permitisse ultrapassar estes problemas. O sistema de ar comprimido presente no laboratório poderia ser uma alternativa, pelo que se procedeu ao estudo da respectiva composição em termos de COV's, com recurso a adsorção em tubos com Tenax-TA e determinação por GC-MS. Os resultados obtidos (Tabela 3.3) indicaram que a concentração de tolueno era a mais elevada de todos os compostos quantificáveis mas inferior à que se pretendia obter no sistema. As dos restantes

compostos eram bastante baixas. Além disso, como são constituintes do ar a que o pólen normalmente está exposto, a sua presença tornaria o estudo mais realista.

Tabela 3.3 - Resultados obtidos nas determinações de COV's no ar comprimido

Composto	Concentração (mg/m <sup>3</sup> )
2-butanona	0,018
heptano	0,006
tolueno	0,034
etilbenzeno	0,002
m/p-xileno	0,005
1,3,5-trimetilbenzeno	0,002
Limoneno	0,002
ácido benzóico	0,006
Decanal	0,004
tetradecano	0,003
2,6-bis(1,1-dimetiletil)-2,5-ciclohexanodieno	0,001
eicosano	0,002
HTB	0,004
ácido dodecanóico	0,005
fetalato de dietilo	0,002
hexadecano	0,003

Passou-se, então, a usar ar comprimido como gás de arraste.

Realizou-se uma experiência em que só se começou a medir os níveis de tolueno na atmosfera do sistema dinâmico após 7 dias (168 h) de estabilização e se realizou a monitorização até 196 horas. Os resultados da experiência III (Tabela 3.2) mostram que deste modo foi possível obter uma atmosfera estável com níveis de tolueno de  $0,117 \pm 0,007$  mg/m<sup>3</sup>. Como esta concentração era relativamente próxima da existente em atmosferas reais, fixaram-se estas condições experimentais para os estudos subsequentes.

### 3.2 - Adsorção de tolueno a grãos de pólen

Passou-se ao estudo da adsorção de tolueno a grãos de pólen utilizando o sistema dinâmico de geração de uma atmosfera com concentração constante de tolueno. Foi utilizado pólen de lílio e de *Cryptomeria japonica*. Os resultados obtidos estão reunidos na Tabela 3.4 e serão discutidos a seguir.

### 3.2.1 - Influência do tempo de exposição

O objectivo das experiências 1 a 3 foi averiguar o efeito do tempo de exposição no sinal analítico (medido após desadsorção conforme descrito em 3.1.2.2). Não se detectou tolueno adsorvido ao pólen mesmo após 72 horas consecutivas de exposição a uma concentração de tolueno de  $0,117 \text{ mg/m}^3$ .

Tabela 3.4 - Resultados obtidos para várias experiências realizadas com pólen, a  $23 \pm 0,1^\circ\text{C}$

Experiência	Pólen		$T_{\text{exposição}}$ (h)	Caudal <sub>ar</sub> ( $\text{cm}^3/\text{min}$ )	Tolueno  <sub>ar</sub> ( $\text{mg/m}^3$ )	Sinal <sup>#</sup>
	Origem	Massa (mg)				
1	Lílio	59,5	24	2000	0,117	n.q.
2	Lílio	55,1	48	2000	0,117	n.q.
3	Lílio	53,1	72	2000	0,117	n.q.
4	Lílio	48,2	48	2000	0,117	n.q.
5	Lílio	43,3	48	1000	*	n.q.
6	Lílio	62,2	48	500	*	n.q.
7	Lílio	46,9	48	200	20,9	158900
8	Lílio	63,3	48	2000	0,117	n.q.
9	<i>Cryptomeria</i>	31,3	48	2000	0,117	n.q.
10	<i>Cryptomeria</i>	26,0	2	0 <sup>##</sup>	40	n.q.
11	<i>Cryptomeria</i>	16,6	-	Não quantificado	Não quantificado**	n.q.
12	<i>Cryptomeria</i>	30,9	5	0 <sup>##</sup>	141000	48668480

<sup>#</sup> expresso em kcounts, que é o modo de exprimir o sinal analítico usado pelo cromatógrafo. n.q.= não quantificável

\* valores não quantificados mas que estariam compreendidos entre  $0,117$  e  $20,9 \text{ mg/m}^3$

<sup>##</sup> sistema estático

\*\* fumo de 5 cigarros

### 3.2.2 - Influência da concentração

Aumentou-se a concentração de tolueno na atmosfera, reduzindo o caudal do gás de arraste (experiências 4 a 7). Constatou-se que apenas para uma concentração de tolueno de  $20,9 \text{ mg/m}^3$  se observou adsorção mensurável. Mas esta concentração é cerca de 1000 vezes superior à existente em atmosfera urbana (dezenas de  $\mu\text{g/m}^3$ ), pelo que se afasta muito da realidade, não tendo interesse prático.

### **3.2.3 - Influência da humidade**

Pôs-se, então, a hipótese da humidade presente no ar usado como gás de arraste estar a dificultar a adsorção de tolueno ao pólen, uma vez que se sabe que o pólen é hidrofílico. Para testar esta hipótese, faz-se passar o ar por uma coluna com exsicante,  $\text{CaCl}_2$ , antes de entrar no sistema e repetiu-se a experiência 2. A experiência 8 revelou que, mais uma vez, não foi detectada adsorção de tolueno ao pólen em quantidades mensuráveis. Logo, não se tratava de interferências de vapor de água.

### **3.2.4 - Influência da natureza do pólen**

Repetiu-se a experiência 4, (experiência 9) mas desta vez com pólen de *Cryptomeria* (massa de pólen foi um pouco menor do que a usada na experiência 4, apesar do volume de pólen ser semelhante). Mas, o resultado foi igual ao obtido com pólen de lílio, isto é, não foi detectada adsorção.

### **3.2.5 - Exposição de pólen a fumo de tabaco**

Na experiência 10, uma massa de 26 mg de pólen de *Cryptomeria*, foi colocado durante 2 horas num saco contendo fumo de tabaco a que havia sido retirada a fracção particulada, e no qual a concentração de tolueno era de  $40 \text{ mg/m}^3$  (informação fornecida por Susana Martins, que estava a estudar COV's em fumo de tabaco). Mais uma vez não foi detectada adsorção. Apesar de neste caso a concentração de tolueno ter sido cerca do dobro da usada na experiência 7 em que foi detectada adsorção, o tempo de exposição foi muito mais pequeno (2 h versus 48 h), o que explica a diferença de resultados. Além disso, o pólen foi de natureza diferente nas experiências 7 e 10, e, neste último caso, a amostra continha muitos outros COV's que competirão com o tolueno pelos locais de adsorção da fibra, reduzindo a eficiência de adsorção.

Realizou-se a experiência 11 expondo 16,6 mg de pólen de *Cryptomeria* a fumo de tabaco (5 cigarros consecutivos) à saída do pulmão da máquina de fumar, portanto antes da remoção da fracção particulada. Não se observou também adsorção de tolueno.

O pólen de *Cryptomeria* foi finalmente exposto, durante 5 horas, num sistema estático com  $141 \text{ g/m}^3$  de tolueno e ocorreu adsorção numa extensão muito apreciável.

### **3.3 - Conclusões**

O conjunto de resultados obtidos indicou que os grãos de pólen não adsorvem significativamente tolueno (e provavelmente outros COV's não polares, como é o caso do benzeno, ou fracamente polares) aos níveis de concentração a que eles ocorrem nas atmosferas abertas e interiores. O facto de os grãos de pólen não terem adsorvido tolueno directamente a partir do fumo do tabaco poderá ter resultado de adsorverem preferencialmente compostos mais polares, que também estão presentes no fumo do tabaco. Este aspecto não foi investigado neste trabalho, mas merece investigação futura.

A ausência de adsorção significativa de tolueno (níveis abaixo do limite de detecção que é de  $0,82 \text{ mg/g}$  de pólen) e, provavelmente também compostos com estrutura semelhante, é um resultado positivo em termos de saúde pública. Efectivamente, o pólen é comercializado como um complemento alimentar altamente nutritivo e a adsorção de poluentes químicos do ar desvirtuaria as suas capacidades nutricionais.

O pólen que se liberta para a atmosfera mistura-se ou agrega-se a outras partículas atmosféricas podendo os próprios grãos de pólen servir de núcleos de condensação para poluentes químicos. Nas partículas de composição complexa que então se



formam poderá ocorrer adsorção indirecta de COV's, mas o papel do pólen neste fenómeno é muito difícil de confirmar experimentalmente.

## **4 - Resultados da investigação de pesticidas organoclorados em tabaco e respectivo fumo**

### **4.1 - *Optimização de metodologias***

#### **4.1.1 - Tempo de desadsorção**

O tempo necessário para desadsorção completa de pesticidas previamente adsorvidos na fibra foi testado sujeitando esta a diferentes tempos de exposição no injector, mantido a 250 °C, e mantendo a válvula de repartição fechada. Concluiu-se que era necessário um tempo mínimo de 7 minutos para que a desadsorção dos pesticidas fosse completa, isto é, para que o cromatograma obtido a partir da exposição da fibra no injector do cromatógrafo não apresentasse picos correspondentes às espécies em estudo. Fixou-se, então, em 7 minutos o tempo de desadsorção da fibra, durante o qual a válvula de partição do injector permanecia fechada e a fibra exposta.

#### **4.1.2 - Pesquisa de pesticidas organoclorados no tabaco**

Começou-se por pesquisar, sumariamente, a presença de resíduos de pesticidas organoclorados no tabaco de cinco marcas comercializadas em Portugal (A, B, C, D e E). Para tal usou-se a metodologia descrita e traçou-se cromatogramas, por GC/MS, para extractos de tabaco de diferentes marcas e para extractos idênticos dopados com 5 e 10 mm<sup>3</sup> de padrão de uma mistura de 18 pesticidas organoclorados, cada um numa concentração de 13 µg/dm<sup>3</sup>. Por sobreposição dos cromatogramas de amostra simples e dopada, e análise dos espectros de massa de cada pico, foi possível identificar os tempos de retenção dos diferentes pesticidas. Para duas amostras, A e B, ocorreu um sinal mensurável apenas para dieldrina, conforme ilustram as Figura 4.1 e Figura 4.2 (escolheu-se só alguns fragmentos do cromatograma, para

simplificar). Nas amostras das restantes marcas não foi identificado nenhum dos pesticidas em estudo.

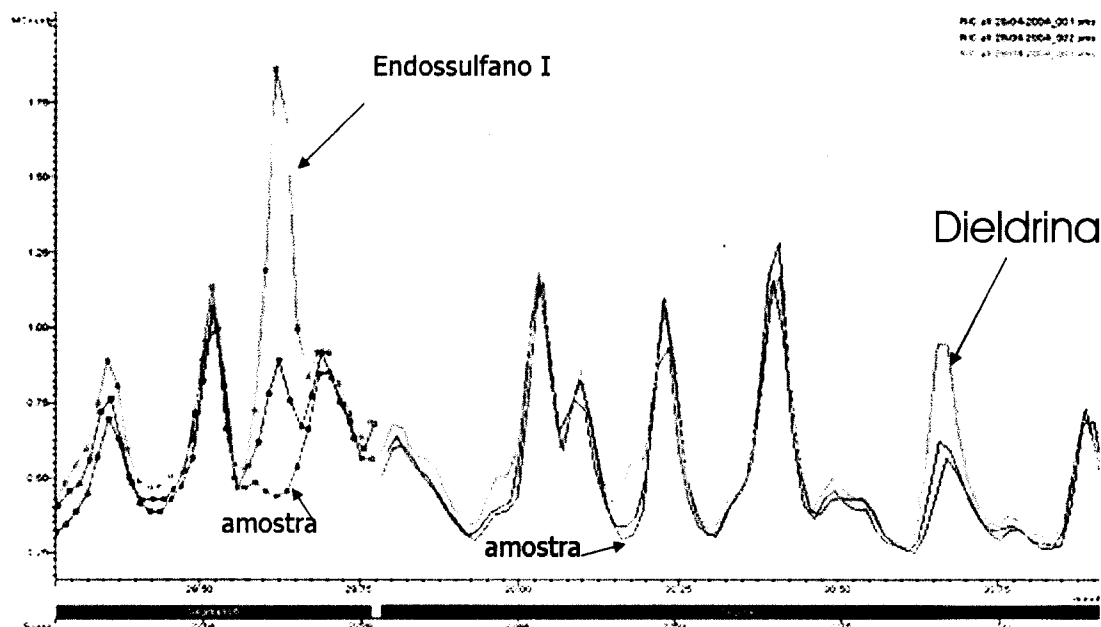


Figura 4.1 - Evidência da presença de dieldrina e não de endossulfano num extracto de cigarros

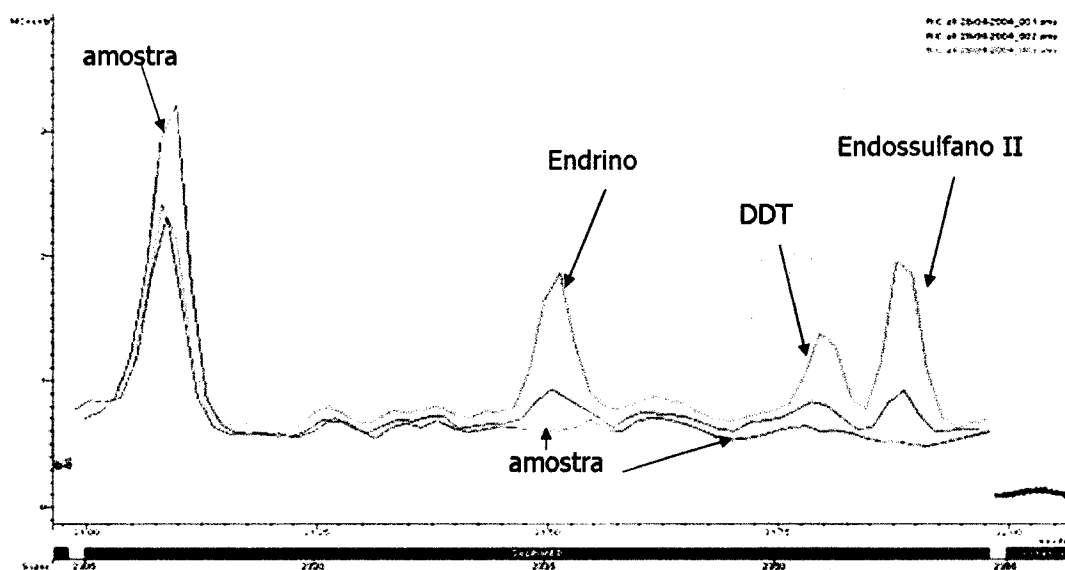


Figura 4.2 - Evidência da ausência de 3 pesticidas num extracto de cigarros

A hipótese do sinal observado para dieldrina resultar de uma contaminação durante o manuseamento da amostra foi excluída, uma vez que os brancos (água processada em

paralelo com extracto de tabaco) não apresentavam um pico cromatográfico para o tempo de retenção da dieldrina, como ilustra a Figura 4.3.

Em face destes resultados, os estudos passaram a incidir apenas na dieldrina.

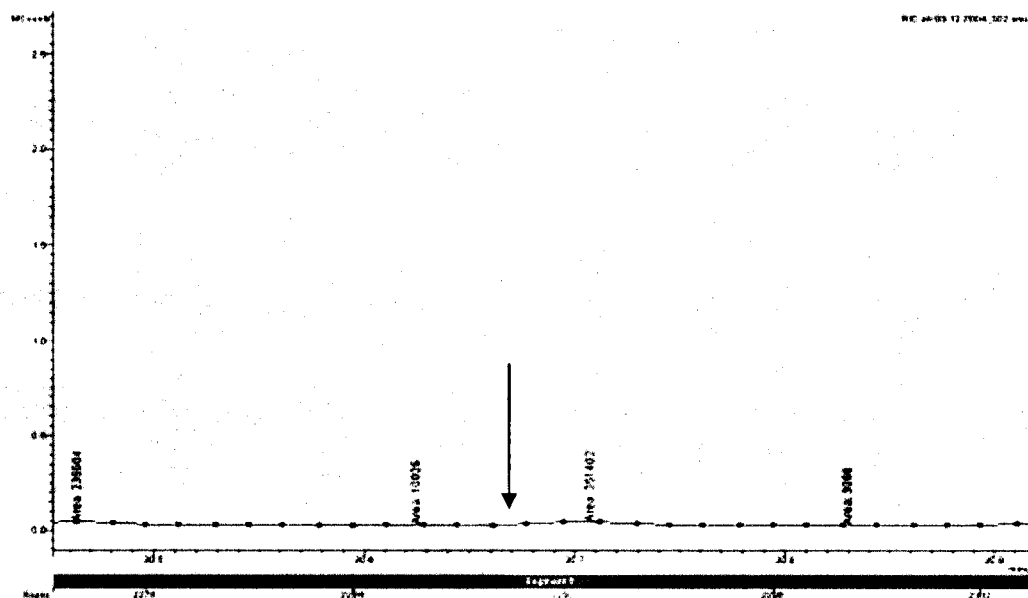


Figura 4.3 - Cromatograma de um branco na zona do tempo de retenção da dieldrina (seta)

### 4.1.3 - Optimização do método para detecção da dieldrina

#### 4.1.3.1 - *Influência do tempo de exposição da fibra de SPME na intensidade do sinal*

O artigo em que o presente método se baseou<sup>41</sup> recomenda que a fibra de SPME esteja exposta à solução a estudar durante 90 minutos no extracto com pesticidas. Apesar disso, estudou-se a influência do tempo de exposição (entre 10 e 90 min) na intensidade do sinal, para um extracto de tabaco enriquecido com  $0,78 \mu\text{g}/\text{dm}^3$  de dieldrina. Os resultados (Figura 4.4) mostram que o sinal, efectivamente aumenta com tempo de exposição da fibra de SPME e ainda não havia sido atingido o

equilíbrio entre a fase líquida (solução) e a fase sólida (fibra) após 90 minutos. Como este período de tempo é já bastante longo, não se testaram valores superiores e adoptaram-se 90 minutos nos ensaios posteriores.

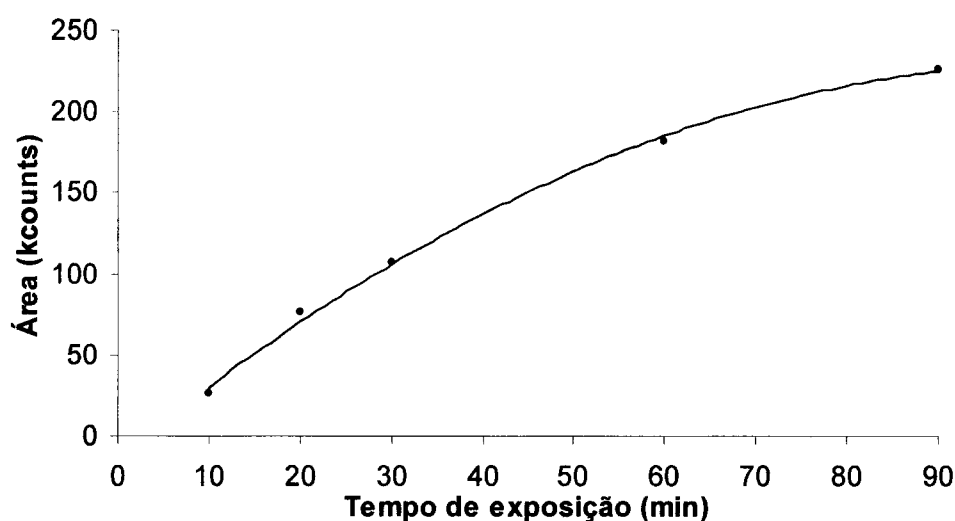


Figura 4.4 - Variação do sinal, correspondente à dieldrina, em função do tempo de exposição da fibra de SPME no extracto de tabaco

#### 4.1.3.2 - Exposição da fibra de SPME em "headspace" vs imersão no extracto

No trabalho em que este estudo se baseou<sup>41</sup> a fibra era exposta directamente na solução do extracto. Averiguou-se se este procedimento seria vantajoso relativamente à exposição em "headspace". Os dois procedimentos foram testados, para comparação. Para tal, duas amostras idênticas (extracto de 3 cigarros) foram estudadas em paralelo, uma com exposição em "headspace" (10 cm<sup>3</sup> de solução num frasco de 22 cm<sup>3</sup>) e a outra por imersão (20 cm<sup>3</sup> de solução num frasco de 22 cm<sup>3</sup>). Em ambos os casos a exposição durou 90 minutos e a temperatura foi de 80 °C. Uma temperatura elevada favorece a concentração de espécies a determinar na fase de vapor. Os resultados obtidos (Figura 4.5) mostraram que no caso da exposição da fibra em "headspace" a linha de base (sinal de fundo) e os sinais correspondentes a espécies diferentes dos pesticidas em estudo eram mais elevados do que no caso de imersão da fibra. Por exemplo, para o tempo de retenção 25,6 minutos a razão

sinal/ruído foi de 105, com imersão da fibra, e de 36 com exposição da fibra no “headspace”. Um ruído de fundo elevado aumenta o limite de detecção e resultará de o tabaco conter muitos compostos voláteis que passam facilmente para o “headspace” e que são adsorvidos na fibra. Decidiu-se, então, optar por imergir a fibra na solução (para aumentar a sensibilidade do método) embora este procedimento reduza o tempo de vida da fibra, uma vez que aderem à fibra impurezas em suspensão na solução que a vão, progressivamente, danificando.

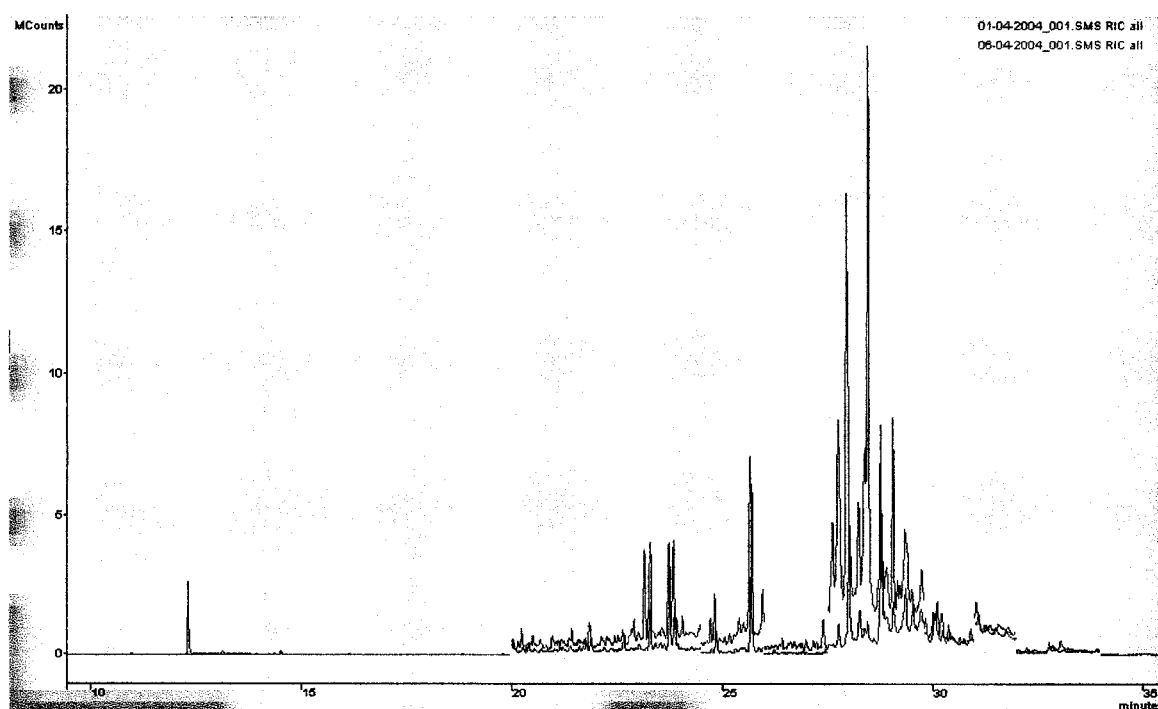


Figura 4.5 - Cromatogramas obtidos com extracção para SPME por imersão (vermelho) e com extracção em headspace (verde)

Optou-se também por realizar a extracção dos compostos do extracto aquoso para a fibra à temperatura ambiente (*ca.* 20 °C) e não aos 80 °C usados anteriormente, visto que um abaixamento de temperatura favorece a adsorção de pesticida à fibra de SPME, a partir da solução. No trabalho anterior sobre pesticidas em plantas medicinais<sup>41</sup> a extracção também foi realizada à temperatura ambiente.

#### 4.1.4 - Repetibilidade

Para avaliar a repetibilidade do método realizaram-se seis determinações sucessivas para soluções de extracto de tabaco dopado com  $0,78 \mu\text{g}/\text{dm}^3$  de dieldrina. Obteve-se um sinal médio (área do pico) de 547 kcounts e um desvio padrão relativo de 5,7%.

#### 4.1.5 - Sensibilidade

Para avaliar as características de resposta do método analítico, em particular da influência da matriz do tabaco na intensidade do sinal, prepararam-se e analisaram-se soluções padrão em água e em extracto de tabaco onde o sinal da dieldrina não era detectável. As concentrações de padrão variaram entre  $0,5$  e  $3 \mu\text{g}/\text{dm}^3$ , no caso da matriz aquosa, e  $0,5$  e  $2 \mu\text{g}/\text{dm}^3$ , no caso da matriz do tabaco. Os resultados, apresentados na Figura 4.6 (matriz aquosa) e na Figura 4.7 (matriz de tabaco), permitiram concluir o seguinte:

- (1) - O método permite obter resposta praticamente linear no intervalos de concentração testados, tanto para solução aquosa como para extracto de tabaco;

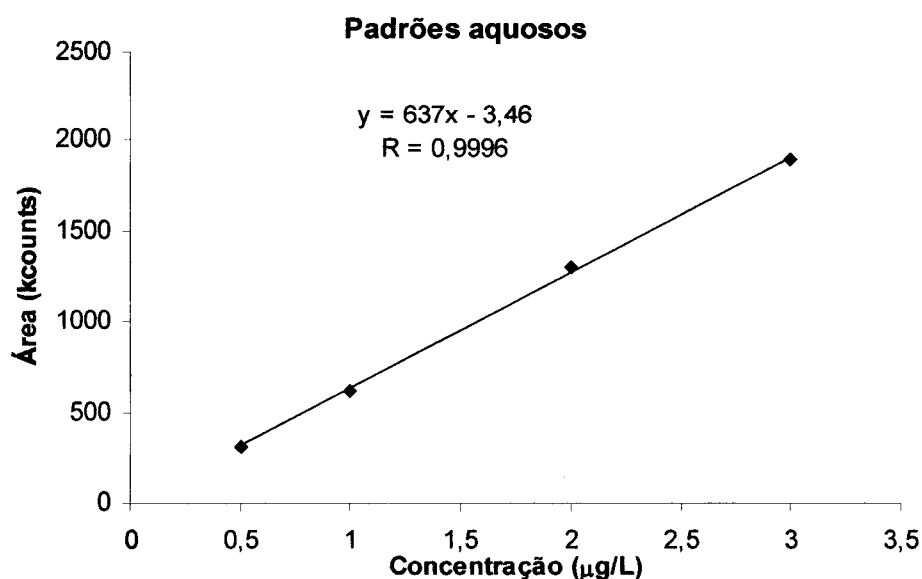


Figura 4.6 - Recta de calibração obtida para padrões de dieldrina em água

- (2) - A matriz de tabaco afecta marcadamente a resposta, pelo que não será aceitável realizar determinações analíticas em extractos de tabaco com base em calibração com padrões aquosos.

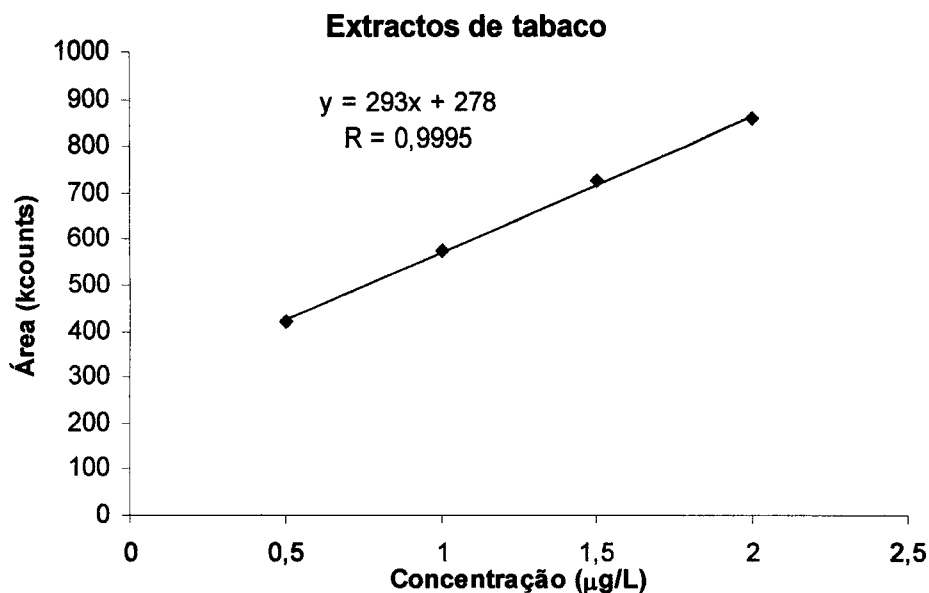


Figura 4.7 - Recta de calibração obtida para padrões de dieldrina em extracto de tabaco

- (3) - A partir dos parâmetros das rectas de calibração obtiveram-se<sup>45</sup> limites de detecção muitos semelhantes, para padrões aquosos,  $0,10 \mu\text{g}/\text{dm}^3$ , e para extractos de tabaco,  $0,07 \mu\text{g}/\text{dm}^3$ .

## **4.2 - Investigação da presença de dieldrina no tabaco**

O facto de ocorrer um pico cromatográfico precisamente no tempo de retenção da dieldrina, sugere fortemente a presença do pesticida no tabaco. Impunha-se, portanto, realizar a identificação através da análise do espectro de massa desse pico.



Começou-se por traçar cromatogramas de dieldrina em água desionizada (Figura 4.8) e analisar o espectro de massa referente aos iões adquiridos com o programa SIS descrito na secção 2.3.4.

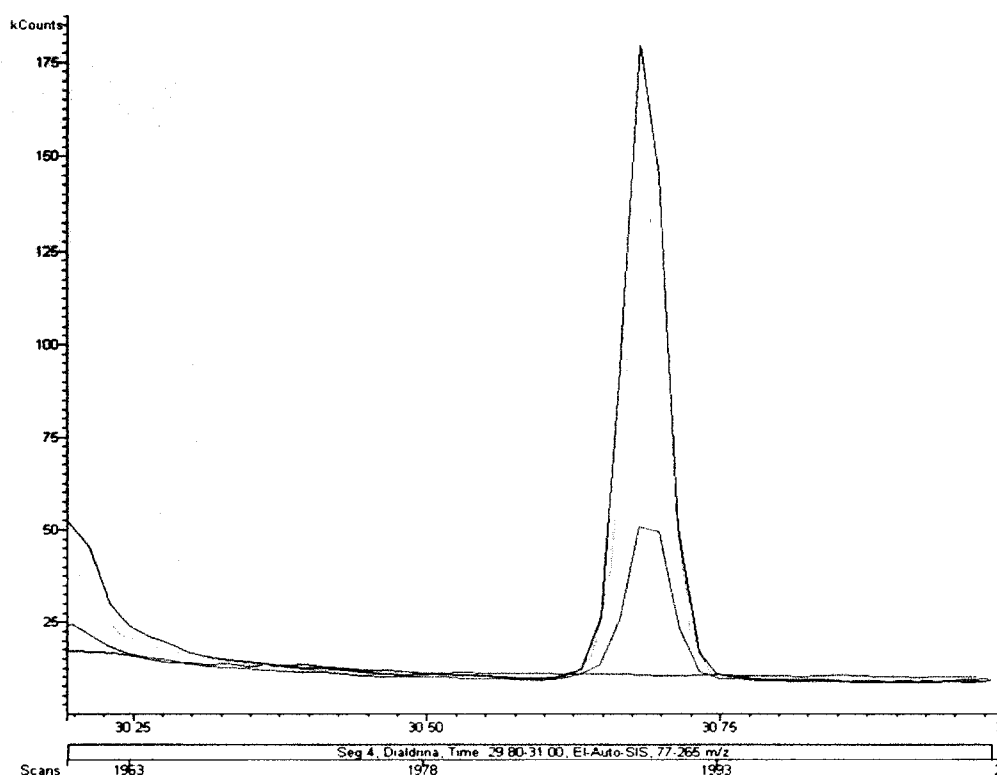


Figura 4.8 - Cromatogramas obtidos para dieldrina em solução padrão preparadas em água desionizada. O cromatograma do branco foi incluído

A Figura 4.9 mostra o espectro massa para uma solução com padrão de dieldrina. O pico mais intenso corresponde ao ião de 79 u.m.a. Segue-se em intensidade o ião 81 e 77. São visíveis mas muito pouco intensos os iões 107 e 108 u.m.a e entre 261 e 265 u.m.a. De notar que a intensidade relativa dos picos não é igual à que consta da Tabela 2.2 (por exemplo, na tabela o ião 82 tem uma intensidade superior à do ião 77, o que contrasta com o obtido experimentalmente), mas tem-se constatado que diferentes fontes da literatura, apresentam espectros de massa de um mesmo composto ligeiramente diferentes.

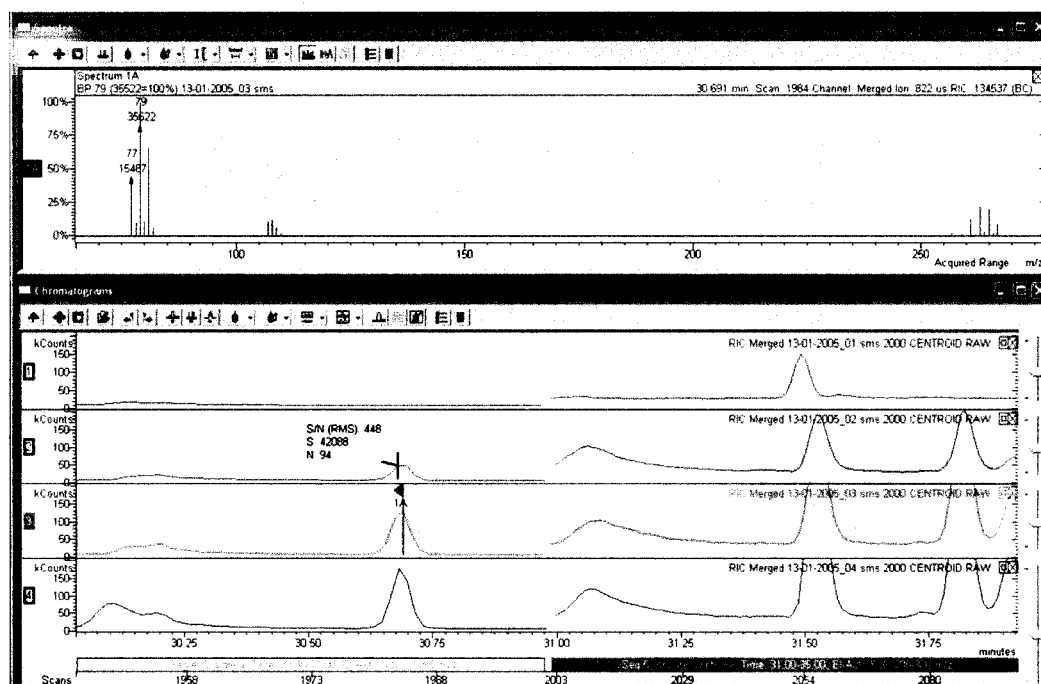


Figura 4.9 - Espectro de massa de um padrão de dieldrina e cromatogramas do branco e dos padrões que constam na Figura 4.8

Traçaram-se depois cromatogramas para extractos de tabaco da marca A (Figura 4.10 a Figura 4.12) e do mesmo extracto após adição de  $1,3 \mu\text{g}/\text{dm}^3$  de padrão (Figura 4.13 a Figura 4.15). Os cromatogramas da parte inferior da Figura 4.10 mostram que a amostra apresentava um pico com cotovelo e que o cotovelo não aumentava com a adição de padrão, ao contrário do que sucedia com o pico.

A partir dos cromatogramas obtidos, analisaram-se os espectros de massa referentes ao lado esquerdo, parte central e lado direito do pico da amostra (parte superior das Figura 4.10 a Figura 4.12). Procedeu-se do mesmo modo para o pico que se obteve após a adição de padrão de dieldrina (Figura 4.13 a Figura 4.15).

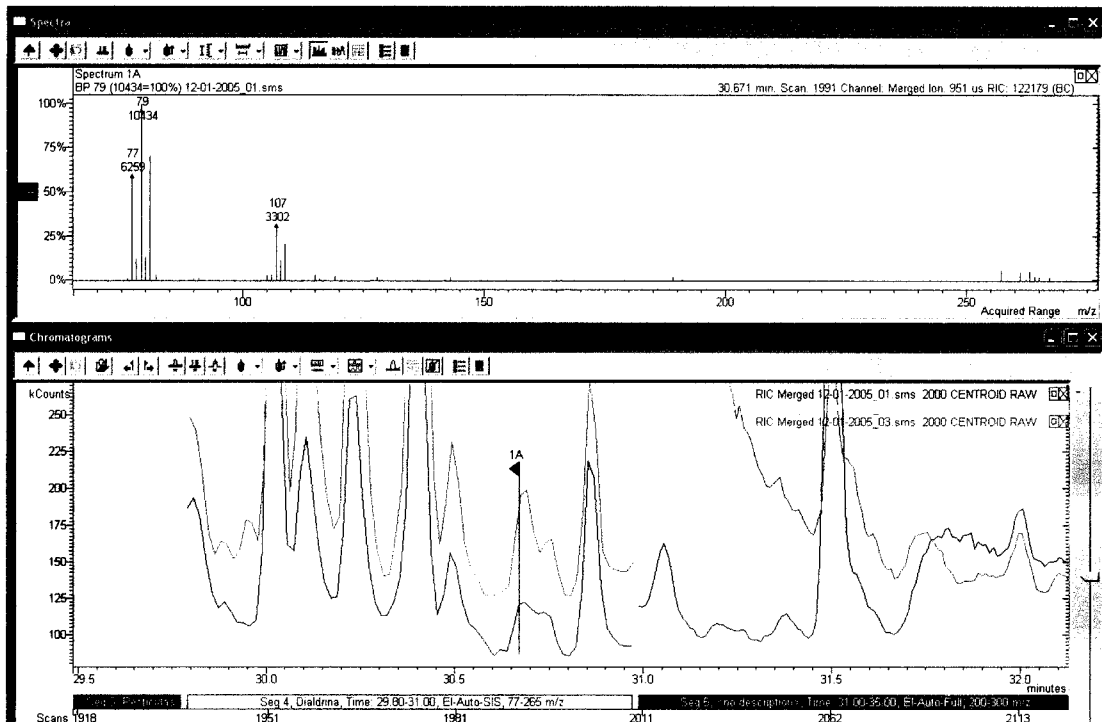


Figura 4.10 - Espectro de massa referente ao lado esquerdo do sinal da amostra, para o tempo de retenção da dieldrina, e cromatogramas da amostra (vermelho) e amostra com padrão (laranja)

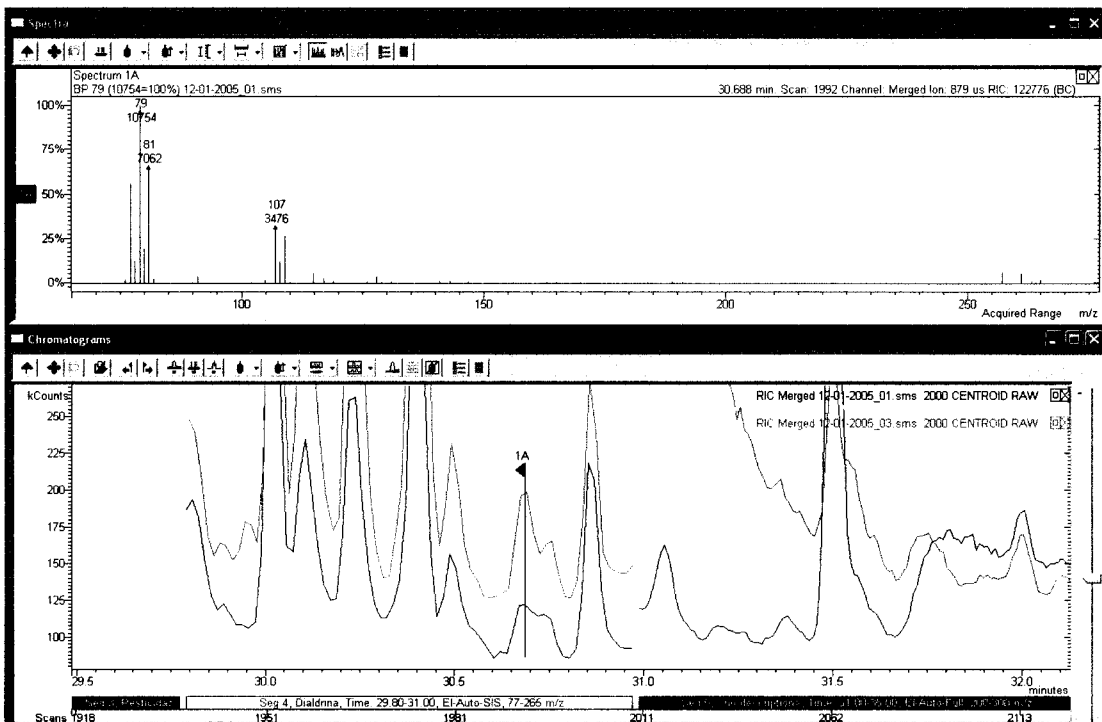


Figura 4.11 - Espectro de massa referente ao centro do sinal da amostra, para o tempo de retenção da dieldrina, e cromatogramas da amostra (vermelho) e amostra com padrão (laranja)

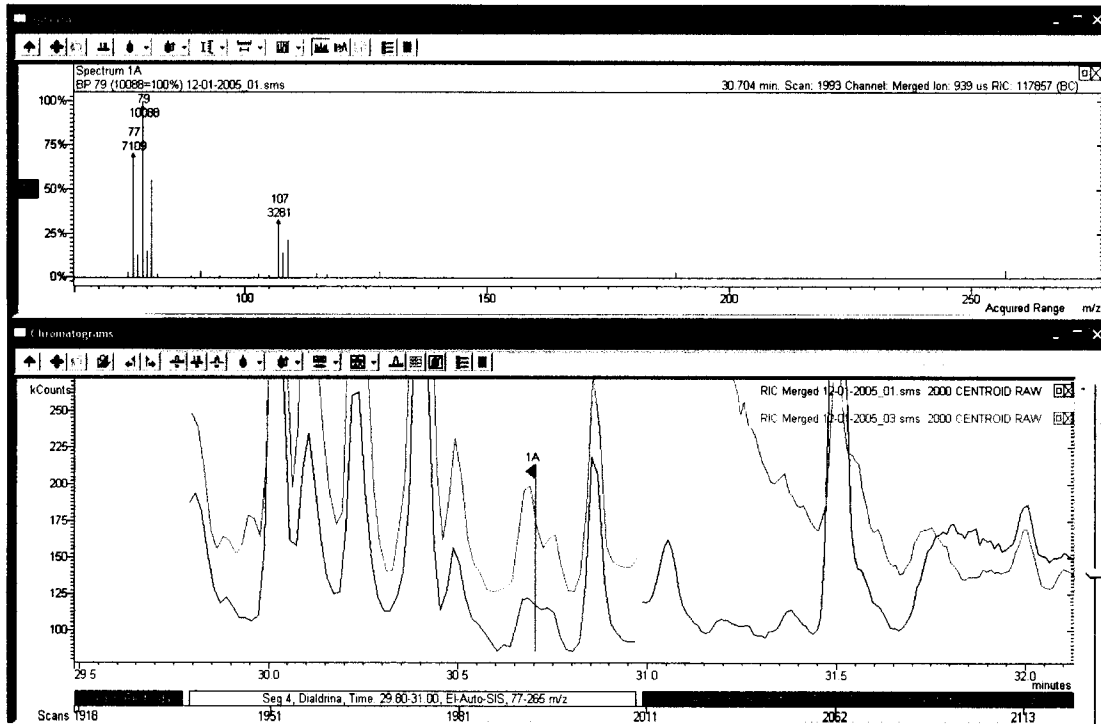


Figura 4.12 - Espectro de massa referente ao lado direito do sinal da amostra, para o tempo de retenção da dieldrina, e cromatogramas da amostra (vermelho) e amostra com padrão (laranja)

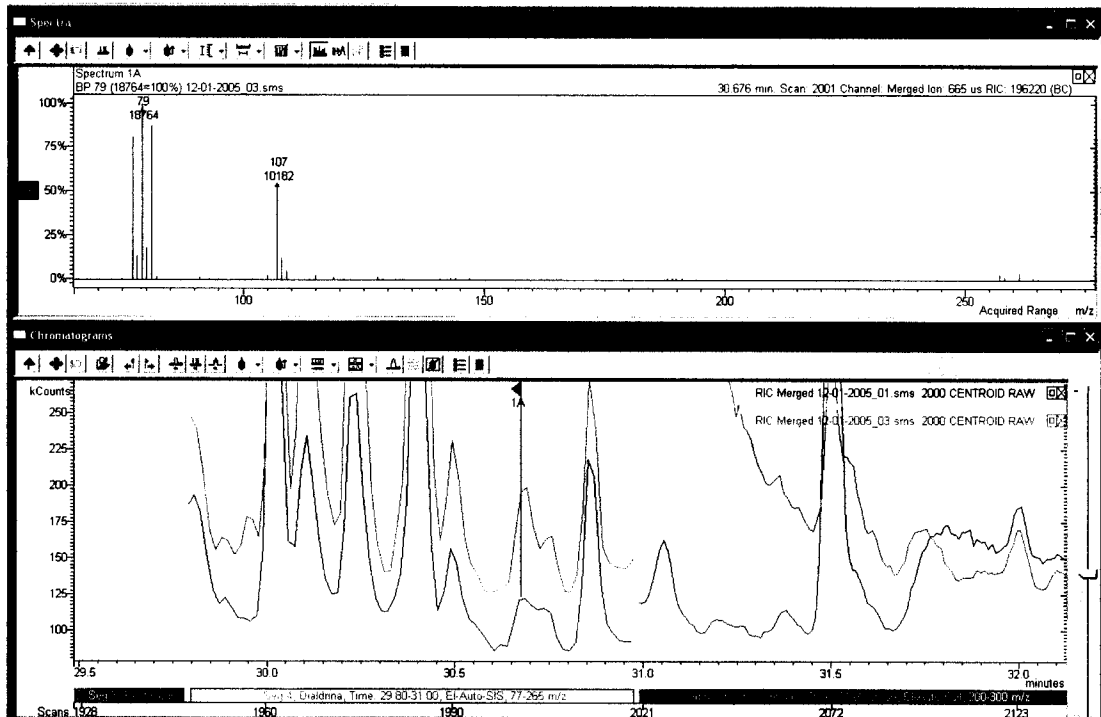


Figura 4.13 - Espectro de massa referente ao lado esquerdo do sinal, para o tempo de retenção da dieldrina na amostra após adição de padrão e cromatogramas da amostra (vermelho) e amostra com padrão (laranja)

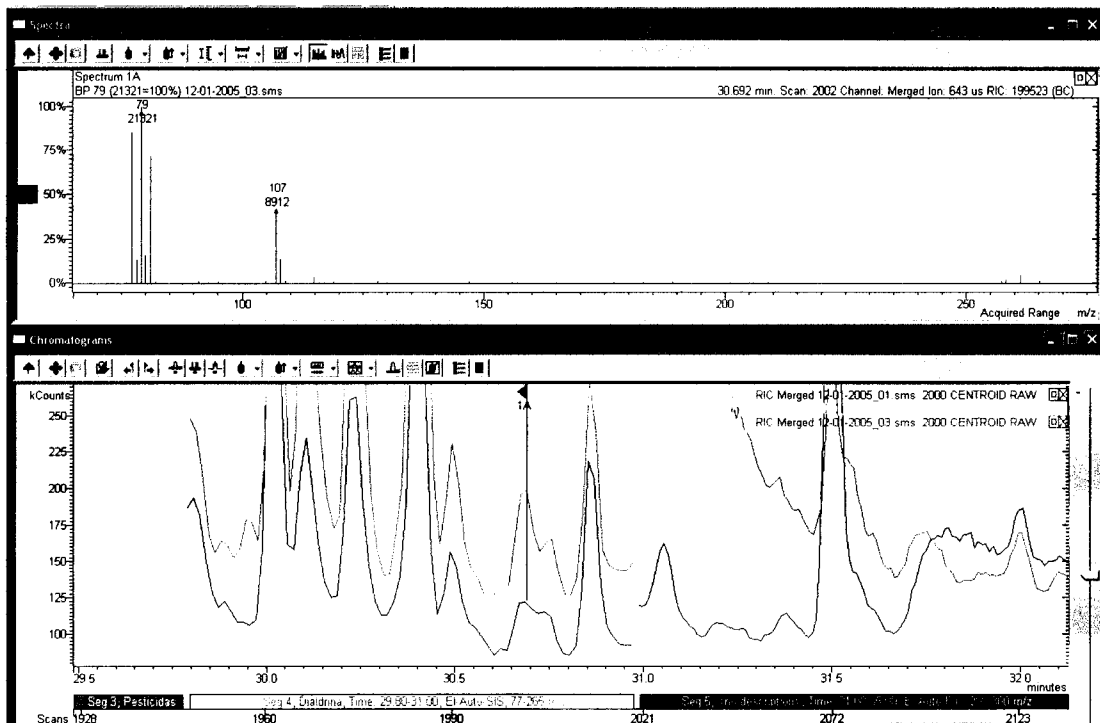


Figura 4.14 - Espectro de massa referente ao centro do sinal, para o tempo de retenção da dieldrina na amostra após adição de padrão e cromatogramas da amostra (vermelho) e amostra com padrão (laranja)

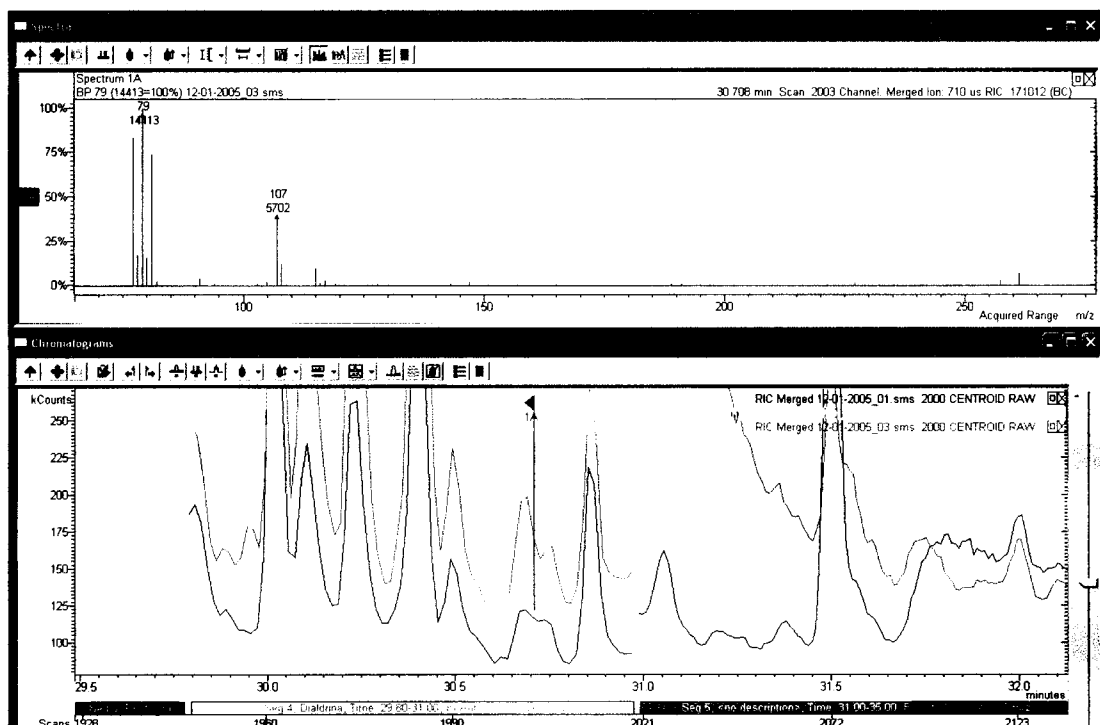


Figura 4.15 - Espectro de massa referente ao lado direito do sinal, para o tempo de retenção da dieldrina na amostra após adição de padrão e cromatogramas da amostra (vermelho) e amostra com padrão (laranja)

As figuras mostram o seguinte: (1) o espectro de massa para a amostra foi idêntico no meio do pico e dos lados esquerdo e direito, não evidenciando, por isso, que o pico corresponda a uma mistura de dois compostos com estruturas diferentes; (2) após adição de  $1,3 \mu\text{g}/\text{dm}^3$  de padrão o pico mantém as mesmas características no espectro de massa, sugerindo que a composição da amostra não se alterou notoriamente após a adição do padrão; (3) os espectros de massa para o extracto de tabaco foram semelhantes aos da dieldrina em água, particularmente no que se refere aos iões mais intensos (79, 77 e 81 u.m.a.). O sinal do ião 107 u.m.a. foi mais intenso no extracto de tabaco dopado e não dopado do que na amostra aquosa.

Estes resultados são indicadores da presença de dieldrina no tabaco da marca A. Resultados idênticos foram obtidos para o tabaco da marca B.

De notar, no entanto, que a análise do espectro de massa é indispensável na identificação de compostos por cromatografia com detecção por espectrometria de massa. Este aspecto é seguidamente ilustrado.

Na primeira fase do estudo, quando se estava a pesquisar a presença de pesticidas organoclorados em diversas marcas de cigarros usando o programa de aquisição de dados em SIS mais geral que consta da Tabela 2.1, observou-se, para extracto de tabaco da marca C, um pico bem definido ao tempo de retenção da dieldrina (Figura 4.16). Esse pico aumentou de intensidade quando o extracto foi dopado com padrão de dieldrina (Figura 4.16). Porém, seleccionando apenas os iões característicos da dieldrina, repetindo o traçado do cromatograma (parte inferior da Figura 4.17) verificou-se que o pico da amostra diminui muito de intensidade.

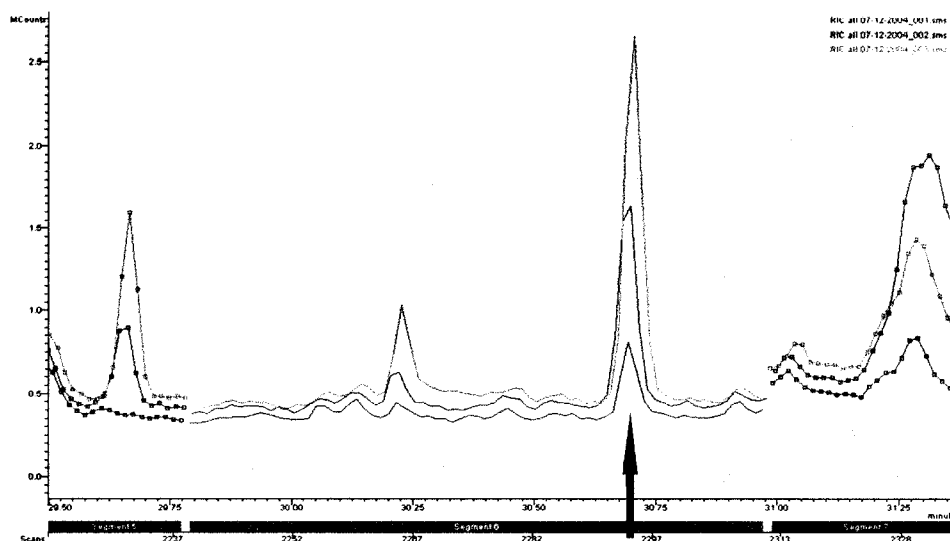


Figura 4.16 - Cromatogramas obtidos para a amostra de tabaco da marca C (vermelho), 1ª adição de padrão (verde) e 2ª adição de padrão (laranja)

A análise do respectivo espectro de massa (parte superior da Figura 4.17) mostra que os iões que tinham sido responsáveis pelo pico eram de natureza completamente diferente dos iões característicos da dieldrina. Na amostra dopada, os iões da dieldrina (77, 79 e 81 u.m.a.) já predominam no espectro de massa do pico (Figura 4.18).

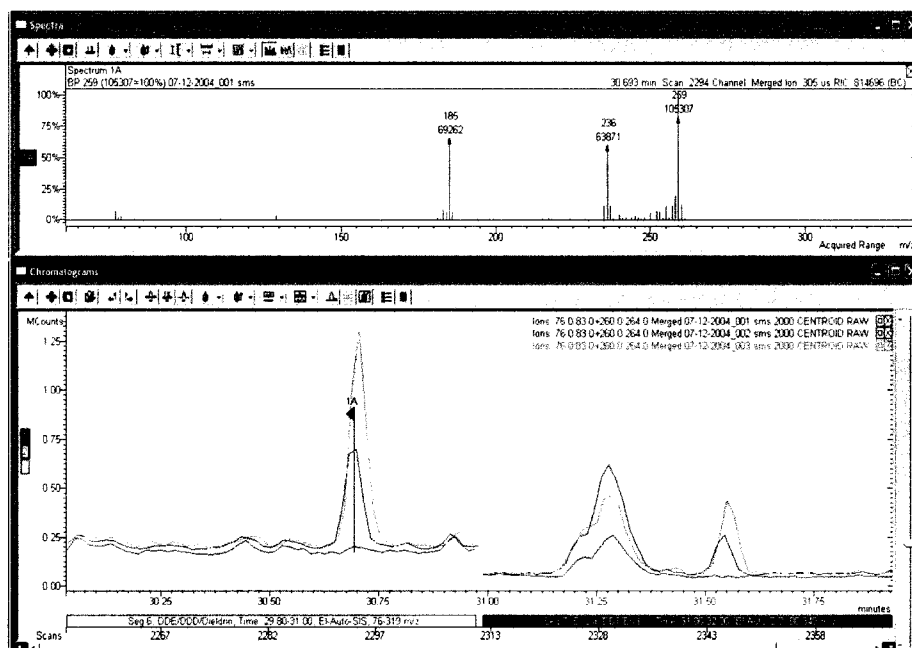


Figura 4.17 - Espectro de massa do sinal presente na amostra de tabaco da marca C e cromatogramas obtidos para a amostra (vermelho), 1ª adição de padrão (verde) e 2ª adição de padrão (laranja), traçando os cromatogramas seleccionados apenas os iões característicos da dieldrina

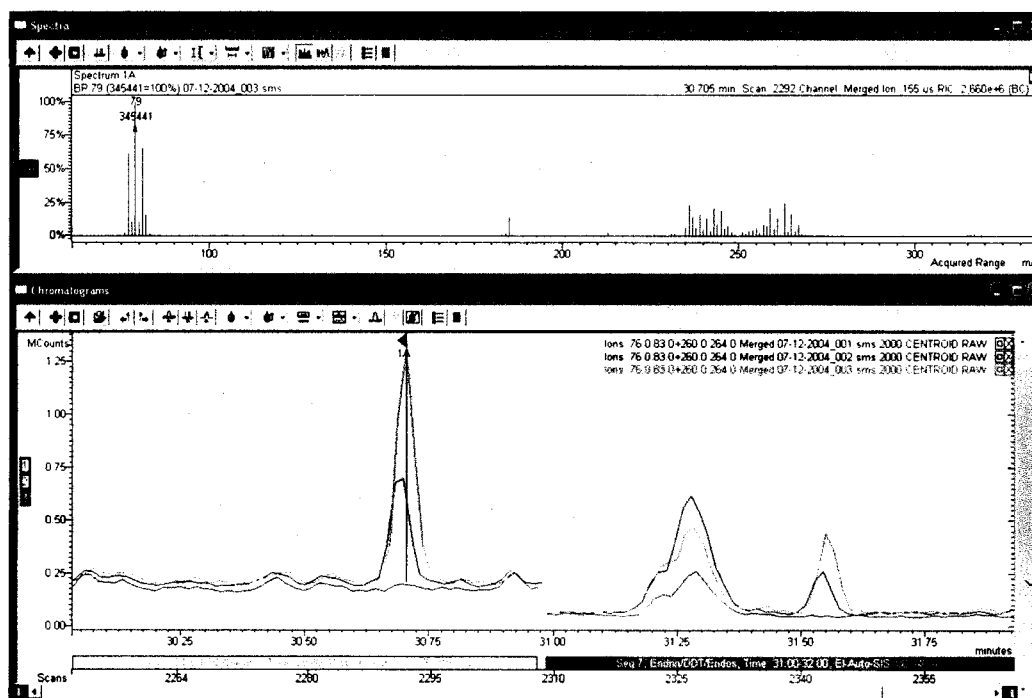


Figura 4.18 - Espectro de massa do sinal da 2ª adição de padrão e cromatogramas obtidos para a amostra (vermelho), 1ª adição de padrão (verde) e 2ª adição de padrão (laranja). Para o traçado dos cromatogramas foram seleccionados apenas os iões característicos da dieldrina

### 4.3 - Confirmação da presença de dieldrina no tabaco por ECD

Apesar do espectro de massa obtido para extracto de tabaco ao tempo de retenção da dieldrina ser muito semelhante ao observado para uma solução padrão do pesticida em água, achou-se de interesse investigar a presença do pesticida através de um detector que assenta em princípios de funcionamento completamente diferentes e que é específico para compostos com átomos com afinidade electrónica elevada, como é o caso dos pesticidas organoclorados: o ECD.

A análise de extractos de tabaco de cigarros das marcas A e B por GC-ECD também evidenciou a presença de um pico a um tempo de retenção que coincide com o que se observa para padrões de dieldrina, conforme ilustra a Figura 4.19.



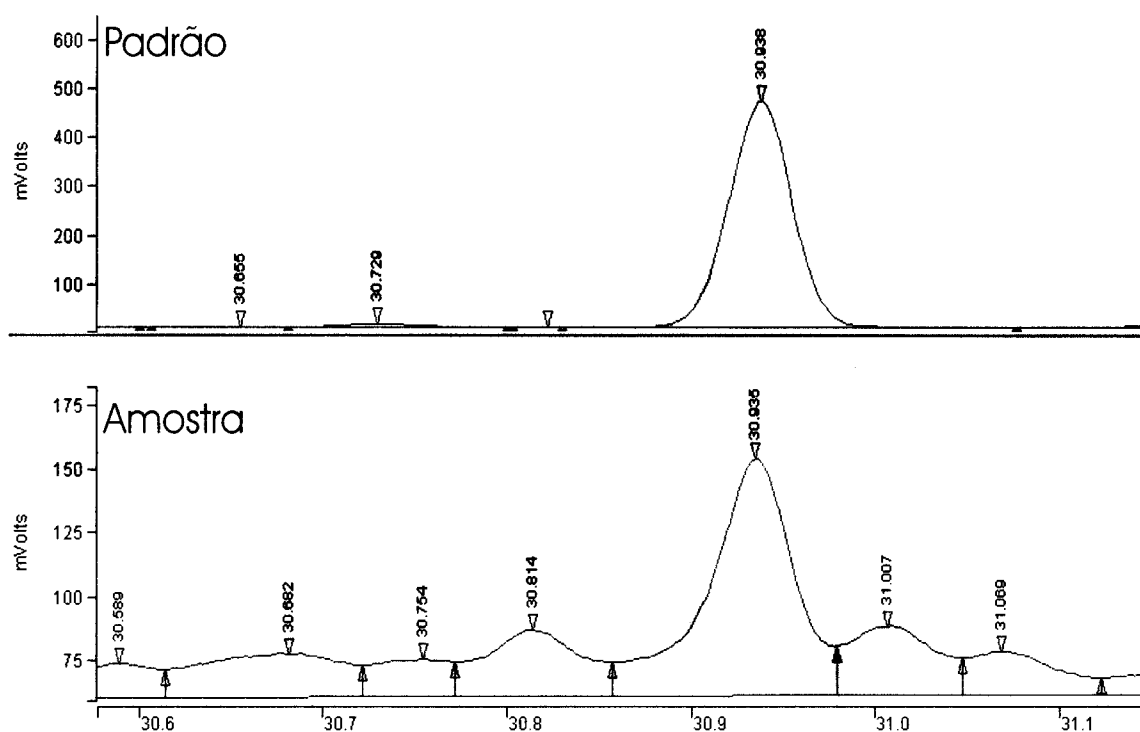


Figura 4.19 - Cromatogramas obtidos por GC-ECD para um padrão de dieldrina e para uma amostra de extracto de tabaco

## 4.4 - Conclusões

Este estudo permitiu concluir que o tabaco de cigarros das marcas A e B analisado continha um composto que por cromatografia gasosa apresentava um sinal no tempo de retenção da dieldrina. Esse sinal apresentava um espectro de massa muito semelhante ao da dieldrina e continha átomos com elevada afinidade electrónica, tal como os pesticidas organoclorados.

Por conseguinte, o conjunto de dados disponíveis indicou a presença de resíduos de dieldrina no tabaco estudado, em quantidades suficientes para serem detectadas através dos métodos utilizados.

## **4.5 - Investigação da presença de dieldrina em extractos da fracção particulada do fumo**

Cigarros das marcas A e B, onde havia sido detectada a presença de resíduos de dieldrina foram fumados automaticamente e extractos da fracção particulada do fumo de 5 cigarros foram analisados seguindo procedimentos semelhantes aos usados para os extractos de tabaco. Constatou-se a presença de um pico no tempo de retenção da dieldrina. Este pico apresentava um espectro de massa semelhante ao do pesticida e originava também um sinal detectável por GC-ECD.

Estes resultados indicaram que a pirólise do tabaco do cigarro não foi eficaz na destruição dos resíduos do composto em estudo.

## **4.6 - Estudos futuros**

Ultrapassada a fase de detecção do pesticida, será necessário proceder à respectiva quantificação. A quantificação do pesticida no tabaco ou no fumo implica não só a quantificação do sinal analítico nos extractos das amostras, mas também a determinação da percentagem de pesticida que o processo de extracção permite remover dos componentes sólidos da amostra, isto é, a percentagem de recuperação.

Para quantificação analítica terá de se recorrer a um dos seguintes métodos: calibração externa, adição de padrão ou padrão interno.

A calibração externa só pode ser usada quando a matriz da amostra não afecta significativamente as características de resposta, em termos de declive e ordenada na origem da recta de calibração. Ora tal não se verificou, conforme já foi mostrado na secção 4.1.5. Logo a calibração externa com padrões aquosos não é aplicável neste caso.

A calibração externa com extractos de tabaco ou de partículas de fumo isentos de pesticida, poderá ser uma metodologia aceitável, mas tal pressupõe que as interferências sejam as mesmas e tenham a mesma intensidade para dois tipos diferentes de tabaco, o que não está garantido à partida.

A quantificação através do método de adição de padrão só corrige interferências que afectam o valor do declive. Portanto, se a amostra contiver interferências que afectem o valor da ordenada na origem, como é o caso do tabaco, estas serão contabilizadas juntamente com o sinal da amostra induzindo a resultados afectados de erro por excesso. Logo, o método também não é aplicável.

A adição de padrão interno poderá ser um método adequado. Consiste em adicionar à amostra uma quantidade conhecida de um outro composto semelhante que tenha um tempo de retenção próximo do do analito. Previamente, será necessário determinar os factores de resposta do padrão interno (i) e do pesticida (p), para soluções de concentração conhecida nas espécies de interesse e matrizes semelhantes àquelas em que se pretende realizar os estudos:

$$\frac{A_i}{A_p} = \frac{K_i}{K_p} \times \frac{[i]}{[p]}$$

$$\frac{A_i}{A_p} = F \times \frac{[i]}{[p]}$$

onde  $A_i$  e  $A_p$  são, respectivamente, as áreas dos picos referentes às concentrações  $[i]$  e  $[p]$ . Nas análises subsequentes, a concentração do analito será calculada através da expressão:

$$[p] = F \times [i] \times \frac{[A_p]}{[A_i]}$$

Só quando se dispuser de um método de quantificação que se considere aceitável se poderá passar ao estudo da percentagem de recuperação de pesticida em tabaco e fumo. No entanto, este passo é indispensável para se poder quantificar o resíduo de pesticida no tabaco, uma vez que não está disponível no mercado tabaco de referência com concentrações, de pesticidas, certificadas.

## 5 - Conclusões

Este estudo demonstrou que aos níveis em que o tolueno ocorre em atmosfera urbana com intensidade de tráfego elevada (dezenas de  $\mu\text{g}/\text{m}^3$ ) a adsorção deste COV (e provavelmente outros de estrutura semelhante) directamente a grãos de pólen é incipiente, mais concretamente inferior a  $0,82 \text{ mg}_{\text{tolueno}}/\text{mg}_{\text{pólen}}$ , que foi o valor do limite de detecção do método utilizado. Este resultado é positivo do ponto de vista de saúde pública, uma vez que o pólen é comercializado como complemento alimentar de elevado valor nutricional. O facto de o pólen não adsorver COV's apolares ou de polaridade reduzida não garante que não sejam capazes de adsorver compostos semi-voláteis como é o caso de pesticidas, dioxinas e furanos. Mas a dificuldade de obter atmosferas com concentrações padronizadas destes compostos impediu que fossem estudados neste trabalho.

Investigou-se a presença de 18 pesticidas organoclorados no tabaco e no fumo aspirável de cigarros de cinco marcas comercializadas em Portugal. Em cigarros de duas marcas, e respectiva fracção particulada do fumo, detectou-se dieldrina. Actualmente, em Portugal, não estão fixados valores máximos de concentração de resíduos de pesticidas em tabaco e respectivo fumo. No entanto, este estudo merece ser continuado, no sentido de otimizar metodologias que possam permitir no futuro o controlo dos níveis deste tipo de compostos. Efectivamente, os métodos utilizados revelaram-se sensíveis e selectivos. A composição do tabaco ou do respectivo fumo é muito complexa, isto é, tem um número muito elevado de compostos, podendo alguns deles interferir na determinação de outros, nomeadamente mascarando o sinal e/ou aumentando o limite de detecção da técnica. Assim, certos componentes da amostra poderão não ser detectados por não conseguirem ser "vistos" pelo detector. Os métodos utilizados neste estudo devem a sensibilidade e selectividade elevadas às características de duas das fases do processo analítico: (1) Os compostos a estudar são extraídos da amostra (nas formas líquida ou gasosa) por um processo designado

---

por “microextracção para fase sólida (SPME)”. Com este sistema, a amostra não é analisada no seu todo, apenas o sendo espécies criteriosamente seleccionadas. Assim, as espécies interferentes são minimizadas e as espécies de interesse são concentradas;

(2) O detector do sistema analítico e o processo de cálculo das áreas dos picos tem capacidade de rejeitar a grande maioria das espécies indesejadas que lá chegam num determinado instante, registando apenas as espécies previamente definidas inerentes aos compostos em estudo. Deste modo, a grande maioria dos inteferentes que não foram eliminados no passo 1, e chegam ao detector, poderão ser eliminados.

Nestas condições o sinal (ruído) de fundo é reduzido, permitindo atingir limites de detecção mais baixos e selectividade superiores às de métodos mais tradicionais.

Este trabalho incidiu apenas na identificação do composto, merecendo ser continuado com vista à quantificação dos resíduos detectados.

## 6 - Bibliografia

- <sup>1</sup> Tirkkonen T., Mroueh U.M. e Orko I., Tenax as a collection medium for volatile organic compounds. 06: E. NKB Committee and work reports, Helsinki, 1995.
- <sup>2</sup> Norma Portuguesa nº 1796 de 2002.
- <sup>3</sup> EPA, Drinking water criteria document for toluene. U. S. Environmental Protection Agency, Office of Health and Environmental Assessment, Research and Development, ECAO-CIN-408, Cincinnati, O.H., 1990.
- <sup>4</sup> IARC, Toluene: uses, occurrence and exposure. Em: Fishbein L., O'Neill I.K., eds. Environmental carcinogens methods of analysis and exposure measurement. Lyon, France: International Agency for Research Cancer, 1988.
- <sup>5</sup> HSDB, Hazardous substances data base. National Library of Medicine, National Toxicology Information Program, Bethesda, M.D., 1998.
- <sup>6</sup> Fewson C. A., Biodegradation of aromatics with industrial relevance. Em T. Leisinger and A. M. Cook (ed.), Microbial degradation of xenobiotics and recalcitrant compounds. Academic Press, London, U.K., 1981.
- <sup>7</sup> Toxicological profile for toluene, Agency for Toxic Substances and Disease Registry – <http://www.atsdr.cdc.gov/toxprofiles/tp56.pdf>, 20 de Setembro de 2004.
- <sup>8</sup> Baird C., Environmental Chemistry, 2<sup>nd</sup> Ed., W. H. Freeman and Company Ed., 2000.
- <sup>9</sup> Crump D.R., Volatile organic compounds in the atmosphere, R. E. Hester and R. M. Harrison eds., Royal Society of Chemistry, Cambridge, 1995.
- <sup>10</sup> Verschueren K., ed. Handbook of environmental data on organic chemicals. 1<sup>st</sup> ed., NY: Van Nostrand Reinhold Company, New York, 1977.
- <sup>11</sup> EPA. Exposure and risk assessment for toluene. Final Draft Report.: U.S. Environmental Protection Agency. Office of Water Regulations and Standards. Washington DC, 1981.
- <sup>12</sup> Walker B.L. e Cooper C.D. Air pollution emission for medical waste incinerators. *J Air Waste Manage*, 42: 784, 1992.

- 
- <sup>13</sup> Altshuller A.P., Lonneman W.A., Sutterfield F.D. et al., Hydrocarbon composition of the atmosphere of the Los Angeles Basin – 1967. *Environ Sci Technol* 5: 1009, 1971.
- <sup>14</sup> Dilling W.L., Bredeweg C.J., Tefertiller N.B., Simulated atmospheric photodecomposition rates of methylene chloride, 1,1,1-trichloroethane, trichloroethylene, tetrachloroethylene and other compounds, *Environ Sci Technol* 10: 341, 1976.
- <sup>15</sup> Wei K.S., Aldeman A.H., The photooxidation of toluene: the role of an excited charge transfer complex. *Tetrahedron Lett* 38: 3297, 1969.
- <sup>16</sup> Atkinson R., Gas-phase tropospheric chemistry of organic compounds: A review. *Atmos Environ* 24: 1, 1990.
- <sup>17</sup> Alloway B.J. e Ayres D.C., Chemical principles of environmental pollution, 2nd. Ed., Blackie A & P, London, 1997.
- <sup>18</sup> Moncmanová A., Palatý J., Emission Control, em “Chemistry and biology of water, air and soil – environmental aspects”, Elsevier, Bratislava, Checoslováquia.
- <sup>19</sup> Wetzel R., Ion chromatography : further applications, *Environ Sci Technol*, 13: 1214, 1979.
- <sup>20</sup> Palma Carlos A.G., Germination and metabolism of *Pinus radiata* pollen in the presence of sulfur dioxide, *J Plant Physiol*, 126: 373, 1991.
- <sup>21</sup> Carinanos P., Prieto J. e Domingez E., Solid suspended particles affects the quality of air in urban environments, *Bull Environ Contam Toxicol*, 67: 385, 2001.
- <sup>22</sup> Prodapys – Produtos Naturais, [http://www.prodapys.com.br/br/pdp\\_apit\\_polem.htm](http://www.prodapys.com.br/br/pdp_apit_polem.htm), 20 de Junho de 2003.
- <sup>23</sup> Decreto-lei nº 25/2003 de 4 de Fevereiro, Diário da República, 1ª Série A.
- <sup>24</sup> Church D.F., Cigarette Smoke, *Anal Chem*, 66: 424, 1994.
- <sup>25</sup> Zhitku F.G., Determination of organophosphorous insecticides in tobacco smoke by gas chromatography, *Gigiene I Sanitaria*, 83, 1990 (em Russo).
- <sup>26</sup> Divanidis S., Koller W.D., Range P., Tobacco pesticide residues, LAP Forchheim, 1998.
- <sup>27</sup> Haib J., Hofer I. e Renaud J., Analysis of multiple pesticide residues in tobacco using pressurized liquid extraction, automated solid-phase extraction clean-up and gás chromatohraphy-tandem mass spectrometry, *J Chromatogr A*, 1020: 173, 2003.



- 
- <sup>28</sup> Ministério da Agricultura, do Desenvolvimento Rural e das Pescas – Direcção Geral de Protecção das Culturas, Limites máximos de resíduos de produtos fitofarmacêuticos em Portugal, [http://www.dgpc.min-agricultura.pt/fitofarmaceuticos/Residuos/LMR/lmr\\_intro.htm](http://www.dgpc.min-agricultura.pt/fitofarmaceuticos/Residuos/LMR/lmr_intro.htm), 19 de Fevereiro de 2004
- <sup>29</sup> Decreto-Lei nº 94/98 de 15 de Abril
- <sup>30</sup> North Carolina Department of Labor, <http://www.nclabor.com/ash/postpan.pdf>, 20 de Setembro de 2004.
- <sup>31</sup> U.S. Environmental Protection Agency, About pesticides - <http://www.epa.gov/pesticides/about/>, 20 de Setembro de 2004.
- <sup>32</sup> Beltran J., Lopez F.J. e Hernandez F., Solid-phase microextraction in pesticide residue analysis – Review, *J Chromatogr A*, 885: 389, 2000.
- <sup>33</sup> Fulgêncio C., Convenção sobre poluentes orgânicos persistentes - <http://www.naturlink.pt/canais/Artigo.asp?iArtigo=5835&iLingua=1>, 22 de Setembro de 2004.
- <sup>34</sup> O’Keefe A.E. e Ortman G.C., *Anal Chem*, 38: 761, 1969.
- <sup>35</sup> Pawliszyn J., Solid-phase microextraction: theory and practice; Wiley-VCH: New York, 1997.
- <sup>36</sup> Brás I., Santos L., Alves A., Monitoring organochlorine pesticides from landfill leachates by gas chromatography-electron-capture detection after solid-phase microextraction, *J Chromatogr A*, 891: 305, 2000.
- <sup>37</sup> Valor I., Pérez M., Cortada C., Apraiz D., Moltó J.C., Font G., SPME of 52 pesticides and polychlorinated biphenyls: extraction efficiencies of the SPME coatings poly(dimethylsiloxane), polyacrilate, poly(dimethylsiloxane)-divinylbenzene, carboxen-poly(dimethylsiloxane) and carbowax-divinylbenzene, *J Sep Sci* 24: 39, 2001.
- <sup>38</sup> Pawliszyn J., Applications of solid phase microextraction, the Royal Society of Chemistry, Cambridge, 1999.
- <sup>39</sup> Bulletin 923, Supelco, Bellefonte, PA, 1998.
- <sup>40</sup> Li K., Santilli A., Goldthorp M., Whitaric S., Lambert P., Fingas M., Solvent vapour monitoring in work space by solid phase micro extraction, *J Hazard Mater*, 83: 83, 2001.
- <sup>41</sup> Ho Wu-Hsiung, Hsieh S.J., Solid phase microextraction associated with microwave assisted extraction of organochlorine pesticides in medicinal plants, *Anal Chim Acta*, 428: 111, 2001.
- <sup>42</sup> Pereira A.C., Pesticidas em sedimentos estuarinos, Seminário Científico, FCUP, 2002.

<sup>43</sup> Kateman G., Buydens L., Quality control in analytical chemistry”, 2<sup>nd</sup> Ed. Wiley, New York, 1993.

<sup>44</sup> Harrison R.M., Handbook of air pollution analysis, Harrison R.M. e Perry R. (Ed.), 2<sup>nd</sup> Ed., Chapman and Hall, New York, 1986.

<sup>45</sup> Miller J.C., Miller J.N, Statistics for analytical chemistry, 3<sup>rd</sup> Ed., Ellis Horwood Limited, 1993.

# Anexo 1

Lista dos componentes do tabaco identificados e quantificados num laboratório alemão\* :

Amoníaco

Aminas aromáticas:

1-Aminonaftaleno

2-Aminonaftaleno

3-Aminobifenil

4-Aminobifenil

Hidrocarbonetos poli-aromáticos

Carbonilos:

Formaldeído

Acetaldeído

Acetona

Acroleína

Propenaldeído

Crotonaldeído

Butiraldeído

Metiletilcetona

Hidrogeno cianeto

Monóxido de carbono

Óxido de azoto

Mercúrio

Metais:

Níquel

Chumbo

Cádmio

Crómio

Arsénio

Selénio

Nitrosaminas:

NNN

NNK

NAT

NAB

Semi-Voláteis:

Piridina

3-Vinilpiridina

Quinolina

Fenóis:

Catecol

Fenol

Hidroquinona

Resorcinol

m-e p-Cresol

o-Cresol

Nicotina

Água

Compostos orgânicos voláteis:

1,3-Butadieno

Isopreno

Acrilonitrilo

Benzeno

Tolueno

Estireno

\* <http://www.aristalabs.com/MainstreamSmoke.htm> em 20-10-2004