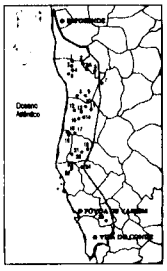
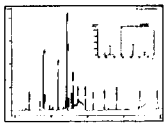
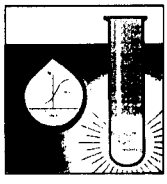


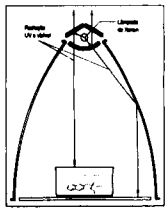
DESENVOLVIMENTO DE MÉTODOS ANALÍTICOS AVANÇADOS PARA A AVALIAÇÃO DA CONTAMINAÇÃO COM PESTICIDAS NA ÁREA DE PROTECÇÃO DO AQUÍFERO LIVRE ENTRE ESPOSENDE E VILA DO CONDE







Carlos Manuel Oliveira Gonçalves



Porto 2006

U.PORTO
FACULDADE DE FARMÁCIA
UNIVERSIDADE DO PORTO

Carlos Manuel Oliveira Gonçalves

Licenciado em Ciências Farmacêuticas

DESENVOLVIMENTO DE MÉTODOS ANALÍTICOS AVANÇADOS PARA A AVALIAÇÃO DA CONTAMINAÇÃO COM PESTICIDAS NA ÁREA DE PROTECÇÃO DO AQUÍFERO LIVRE ENTRE ESPOSENDE E VILA DO CONDE

FACULDADE DE FARMACIA
U. P.
BIBLIOTECA
Data 04/04/2007
Reg. 4946
Cota

T D
G DN

Dissertação de candidatura ao grau de Doutor
apresentada à Faculdade de Farmácia
da Universidade do Porto

Orientadora: Prof. Doutora Maria de Fátima Alpendurada

DEPARTAMENTO DE HIDROLOGIA | FACULDADE DE FARMÁCIA | UNIVERSIDADE DO PORTO

2006

Aos meus PAIS,

Ao meu IRMÃO, Martinho

Aos meus tios e ao Paulo

O trabalho apresentado nesta dissertação decorreu nos seguintes laboratórios:

IAREN – Instituto da Água da Região Norte

Laboratório de Hidrologia da Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto

Departamento de Química Ambiental, Centro de Investigación y Desarrollo - Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Barcelona, Espanha

Laboratório de Química Industrial e Alimentar, Departamento de Química da Universidade de Ioannina, Ioannina, Grécia

Este trabalho foi realizado com o apoio das seguintes entidades e projectos:

Fundação para a Ciência e Tecnologia, através da bolsa PRAXIS XXI/BD/21823/99, no âmbito do III Quadro Comunitário de Apoio, com comparticipação do Fundo Social Europeu e de fundos nacionais do Ministério da Ciência e Ensino Superior

IAREN – Instituto da Água da Região Norte

Programa de Cooperação Bilateral entre Portugal e Espanha intitulado "Determinação de pesticidas e produtos de degradação em águas utilizando métodos automáticos e biossensores" com a referência: ICCTI/CSIC Programa 2001, Processo 423/Espanha

Programa FACC, Ministério da Ciência e Ensino Superior, com financiamentos em 2001 (processo n.º 01/5/108) e 2004 (processo nº 04/5/876)

AGRADECIMENTOS

O trabalho aqui apresentado não teria atingido o mesmo grau de desenvolvimento se não tivesse sido possível contar com o contributo e apoio de várias pessoas e entidades, pelo que me cumpre prestar reconhecimento público:

À Prof. Doutora Maria de Fátima Alpendurada, orientadora científica desta dissertação, agradeço a confiança, o encorajamento e as críticas e sugestões que marcaram a diferença. Agradeço ainda, enquanto Directora do Serviço de Hidrologia da Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto, a oportunidade que me foi concedida de realizar este trabalho, e a quem devo grande admiração pelo profundo conhecimento na área da qualidade da água e a vontade de tomar a linha da frente no desenvolvimento de metodologias analíticas mais eficientes. Na qualidade de Presidente da Direcção do IAREN - Instituto da Água da Região Norte, manifesto a minha gratidão pela disponibilização de um conjunto de meios técnicos invulgares num laboratório, imprescindíveis à realização deste trabalho, bem como o suporte financeiro na realização dos ensaios interlaboratoriais.

Ao Prof. Doutor Damiá Barceló agradeço a partilha de conhecimentos que me proporcionou na realização dos ensaios de ecotoxicidade no Departamento de Química Ambiental do CSIC de Barcelona, e aos seus colaboradores, Doutora Sílvia Lacorte e Doutora Marinel.la Farré, pela simpatia e acolhimento afável com que me distinguiram, para além da supervisão cuidada dos ensaios.

Ao Prof. Doutor Triantafyllos Albanis agradeço ter colocado à minha disposição todo o conhecimento e experiência acumulada no Departamento de Química da Universidade de Ioannina na realização de ensaios de fotodegradação, e me ter acolhido como um membro efectivo do laboratório, senão mesmo um membro privilegiado. Agradeço ainda aos Doutores Ioannis Konstantinou, Vasilis Sakkas, Dimitra Lambropoulou, Katerina Dimou e restantes colaboradores o auxílio prestado e o convívio aprazível que me proporcionaram.

Aos Prof.s Doutores Joaquim Carlos Esteves da Silva e Manuel Azenha do Departamento de Química da Faculdade de Ciências da Universidade do Porto agradeço, muito reconhecido, a prestimosa colaboração que permitiu a aplicação de métodos quimiométricos no desenvolvimento das metodologias analíticas bem como no tratamento estatístico dos resultados.

À Fundação para a Ciência e Tecnologia (FCT) agradeço o apoio financeiro concedido no âmbito da bolsa de doutoramento PRAXIS XXI/BD/21823/99. Agradeço ainda o tratamento expedito de todos os processos e o clima amistoso propício à realização deste trabalho.

À Direcção Regional de Agricultura de Entre Douro e Minho (DRAEDM) agradeço o apoio institucional. Ao Eng. António Matos, responsável pela Zona Agrária da Póvoa de Varzim, agradeço a colaboração empenhada neste trabalho e a grande disponibilidade e esforço na interpretação dos resultados analíticos à luz das práticas fitossanitárias vigentes. À Dra. Eduarda Ferreira manifesto a minha gratidão pela realização da análise dos solos.

À Prof. Doutora Euphemia Papadopoulou-Mourkidou agradeço as sugestões recebidas para a resolução de algumas dificuldades analíticas. Ao Prof. Doutor Veloso Gomes, Presidente da Direcção do Instituto de Hidráulica e Recursos Hídricos (IHRH) agradeço a sua disponibilidade imediata para ceder informação hidrogeológica.

À Prof. Doutora Ana Gago Martinez e todo o grupo do Departamento de Química Analítica e Alimentar da Universidade de Vigo manifesto estima pela relações cordiais e pelo companheirismo. Ao Prof. Doutor José Manuel Leão Martins, manifesto o meu grande apreço pelo seu incentivo, a sua amizade e a sua boa disposição contagiante.

Agradeço aos Docentes da FFUP por me honrarem com uma palavra de incentivo.

À Eng. Maria Margarida Vieira, da Direcção Geral de Protecção das Culturas (DGPC), agradeço a amabilidade em ceder informação actualizada sobre o consumo de pesticidas em Portugal na fase de pré-publicação.

A todos os colaboradores do IAREN, tanto aos que acompanharam este trabalho desde o início: Manuel, Ana, Andreia e Marta, até aos mais recentes: João, Sandra e demais colaboradores, agradeço a amizade, a convivência agradável e as conversas proveitosas.

À Edite Cunha agradeço, reconhecido, a amizade, os conselhos e a disponibilidade sempre demonstrada neste percurso. À Isabel Filipa Almeida manifesto o meu apreço pela amizade incondicional e ajuda em momentos críticos. Estou igualmente grato por ser interlocutora das minhas incertezas e dilemas mais ou menos científicos.

Aos meus amigos: Domingos, Filipe, Joana, João Paulo, Luís, Nélia, Paula, Rui, Sílvia, Sónia, Susana e a todos os não mencionados, agradeço a compreensão dos rigores da investigação e manifesto a minha elevada estima. À Fátima e à Madalena agradeço a amizade e o companheirismo nesta actividade.

Aos meus pais agradeço a compreensão e a disponibilidade inexcedível que facilitaram a colocação deste trabalho no topo das prioridades. Ao Martinho agradeço a valiosa ajuda na preparação de figuras e tabelas em momentos críticos e a serenidade do carácter.

Muito obrigado, Gracias, Ευχαριστώ!

"Water is a divine gift, but much abused. We depend on groundwater, and we must safeguard it. At the moment, we do not even have enough data about the quality of this vitally important resource in Europe."

Margot Wallström, Ex-Comissária Europeia do Ambiente, 2003

RESUMO

A contaminação ambiental com pesticidas é um assunto ao qual, na sociedade actual, ninguém pode passar indiferente, suscitando preocupações à escala global e podendo originar sequelas que vão além do imediato no tempo e no espaço. Este tipo de contaminação difusa das águas e dos solos é um problema grave do ponto de vista ambiental e da saúde humana, o qual justifica a imposição de legislação restritiva na União Europeia e a mobilização de avultados recursos financeiros e técnicos para a sua vigilância. Quer pela multiplicidade de compostos químicos que a classe dos pesticidas congrega, quer pela complexidade do seu comportamento no ambiente, são várias as áreas de estudo que se estabeleceram: ciência analítica, distribuição e degradação, ecotoxicidade e monitorização ambiental, entre outras.

O aumento da intensidade de monitorização de pesticidas em matrizes ambientais só será possível, com custos razoáveis, através do desenvolvimento de técnicas para a análise simultânea de múltiplos resíduos, altamente eficientes, automatizáveis, de baixo custo e que não originem resíduos prejudiciais para o ambiente. Neste trabalho, a microextracção em fase sólida (SPME), com uma fibra de poli(dimetilsiloxano-divinilbenzeno) (PDMS-DVB), e a extracção por fluidos supercríticos (SFE), com CO_2 + 8% metanol, demonstraram possuir essas características para a análise de pesticidas em águas e solos, respectivamente, depois de um processo de optimização e validação exaustivo. No caso da SPME, estudaram-se diversos parâmetros que afectam a eficiência de extracção, entre eles: o tipo de revestimento adsorvente, a temperatura de extracção, a força iónica, a agitação, o pH e o tempo de extracção. No caso da SFE, usou-se um desenho experimental composto (multivariável) para a construção de superfícies de resposta com vista à optimização dos seguintes parâmetros: temperatura de extracção, pressão e volume do fluido supercrítico, e conteúdo de modificador (% metanol). A extracção por ultrassons foi usada devido à sua eficiência e facilidade de implementação. A cromatografia gasosa (GC) foi a técnica de separação eleita beneficiando da elevada sensibilidade dos detectores selectivos de captura electrónica (ECD) e termoiónico específico (TSD), ou da selectividade e capacidade de confirmação inequívoca típica da espectrometria de massa (MS). Cumpre, a este respeito, realçar as virtudes da análise por GC-MS-MS, a qual apresenta uma insuperável sensibilidade e selectividade para a análise e confirmação de vestígios de pesticidas em matrizes ambientais.

Após a demonstração da sua capacidade analítica, as técnicas referidas foram usadas na determinação de pesticidas (organoclorados, organofosforados, triazinas, piretróides,

cloroacetanilidas, entre outros) e seus produtos de degradação em águas subterrâneas e solos colhidos na Zona Vulnerável n.º 1 (onde se incluem as masseiras da Póvoa de Varzim). Esta zona foi reconhecida como sendo vulnerável do ponto de vista hidrogeológico e propensa à contaminação resultante de uma intensa actividade agrícola aí desenvolvida. O plano de monitorização decorreu durante 2 anos e incluíu 8 amostragens em 23 locais de colheita de água e 5 de solo. Os resultados recolhidos forneceram informações importantes relativamente à distribuição e prevalência dos pesticidas na zona. Dos 42 pesticidas pesquisados, quantificaram-se 22 nas águas subterrâneas e 16 nos solos. Os pesticidas detectados com maior frequência nas águas foram: lindano (53%), endossulfão sulfato, endossulfão e pendimetalina, enquanto que nos solos foram: alacloro (39%), clorpirifos, endossulfão sulfato e atrazina. Observou-se com grande frequência a presença simultânea de múltiplos pesticidas (>3) nestas amostras. Em 17,7% das amostras de água e 27,5% das amostras de solo não foi detectado qualquer pesticida. Os resultados obtidos foram ainda submetidos a um tratamento estatístico quimiométrico através da análise de aglomeração, análise discriminante e análise de componentes principais. Este tratamento permitiu evidenciar as principais tendências na distribuição geográfica dos pesticidas e a sua relação com as práticas de horticultura intensiva dominantes na zona.

Para complementar a compreensão do comportamento e impacto dos pesticidas naquela região efectuaram-se estudos de fotodegradação do quinalfos em condições de irradiação solar simulada, quer em águas quer em solos, estabelecendo-se a sua cinética de degradação bem como os possíveis produtos de fotodegradação. Avaliou-se, ainda, o potencial dano ambiental (ecotoxicidade) associado a diversos pesticidas através do uso de dois biossensores (ToxAlert e Cellsense), que incorporam bactérias como elementos sensíveis.

Os estudos efectuados constituem uma abordagem de vanguarda na análise de pesticidas, interpretação dos resultados e avaliação do comportamento em matrizes ambientais que contribuem para um melhor entendimento do impacto destes compostos numa zona particularmente sensível – a Zona Vulnerável n.º 1 (litoral norte de Portugal).

ABSTRACT

Environmental contamination by pesticides is a subject that leaves no one thoughtless, in our society. Pesticides generate concerns at the global scale that can go much farther than the immediate event in time and space. Diffuse pollution of water and soil resources by pesticides is recognized as a serious injury to the environment and potentially to the human health. In this regard, extremely restrictive legislative measures have been adopted at the European Union level, whereas huge financial budgets and technical resources have been devoted to pollution assessment and control. Due to the multitude of chemical compounds used as pesticides and their complex behaviour in the environment several study areas have been developed to characterize them, namely: analytical science, transport and degradation, ecotoxicity, monitoring and interpretation of data, amongst others.

The urgent need to increase the frequency and scope of environmental monitoring studies can only be achieved at affordable costs through the development and use of suitable multiresidue methods that combine high efficiency, low cost, automation and an environmental friendly performance. Solid-phase microextraction (SPME), using a poly(dimethylsiloxane-divinylbenzene) (PDMS-DVB) fibre, and supercritical fluid extraction (SFE), using CO_2 + 8% methanol, have been proven in an extensive optimization and validation procedure to hold some of these ideal features for the analysis of pesticides in water and soils, respectively. For SPME optimization several parameters that affect the extraction efficiency were studied, such as: coating type, extraction temperature, ionic strength, agitation, sample pH and extraction time. SFE optimization was carried out through an experimental design approach (central composite design) that allowed to build response surfaces in order to derive the optimum levels of the following variables: extraction temperature, pressure and volume of supercritical fluid, and modifier content (% methanol). Ultrasonic extraction was also used due to its efficiency and easy implementation. Gas chromatography (GC) was chosen as the analytical technique taking advantage of the high sensitivity and selectivity of the electron-capture (ECD) and the thermoionic-specific detectors (TSD) or the inherent selectivity and unequivocal confirmation capabilities that are attributed to mass spectrometry (MS). It should be highlighted the unsurpassed selectivity and sensitivity of GC-MS-MS that greatly simplified the analysis and confirmation of trace level pesticide residues in environmental matrices and improved the quality of data.

After the developed techniques have been demonstrated "fit for purpose", they were used in a monitoring study of pesticides (organochlorine, organophosphorous, triazine,

pyrethroids, chloroacetanilide and miscellaneous) and degradation products in groundwater and soil samples collected in the Vulnerable Zone n.o 1 (including the "masseiras" of Póvoa de Varzim). This region was identified as susceptible to contamination due to hydrogeological vulnerability and to the intensive agriculture activity that takes place. The monitoring study involved 23 water sampling points and 5 soil sampling points and it was undertaken in 8 sampling campaigns during 2 years. Enough data was gathered to deduce the distribution and frequency of pesticide contamination. Forty-two pesticides belonging to the above-referred chemical families were determined. Twenty-two were quantitated in groundwater samples whereas 16 were quantitated in soils. The pesticides most frequently encountered in groundwater were: lindane (53%), endosulfan sulphate, endosulfan and pendimethalin, whereas in soils were: alachlor (39%), chlorpyrifos, endosulfan sulphate and atrazine. The coexistence of several pesticides (>3) in the same sample must be highlighted. Also, 17,7% of water samples and 27,5% of soil samples were free from any pesticide contamination. The results were further subjected to chemometric statistical handling through cluster analysis, discriminant analysis and principal component analysis in order to uncover the main trends regarding the pesticides' geographical distribution and their relation to the predominant horticultural activities.

In order to improve the understanding of the pesticides' behaviour and ecological impact in the region, photolysis studies of quinalphos were carried out in water and soil matrices under simulated solar irradiation conditions. The corresponding kinetic parameters were estimated in both matrices and putative photodegradation products were proposed. An assessment of the ecotoxicity of several pesticides was also conducted using two whole-cell bacterial biosensors (ToxAlert and Cellsense).

The studies reported here consist of a modern approach to pesticide analysis, comprehensive interpretation of results and assessment of their behaviour in environmental matrices, that jointly contribute to improve the knowledge on the impact of pesticides on a particularly sensitive region, as the Vulnerable Zone n.° 1 (littoral north of Portugal).

RÉSUMÉ

La contamination de l'environnement par les pesticides est un sujet qui ne laisse personne indifférent dans notre société. En fait, ce problème engendre des préoccupations à l'échelle mondiale car ses conséquences vont au-delà de l'impact immédiat dans le temps et l'espace. Ce type de contamination diffuse dans les eaux et les sols ce qui entraîne de sérieux dommages sur l'environnement et potentiellement sur la santé humaine. C'est pourquoi des mesures législatives sévères ont été adoptées au niveau de l'Union Européenne et que d'importantes ressources techniques ainsi que d'importants budgets ont été alloués à l'évaluation et au contrôle de cette pollution. La multitude des composants chimiques utilisés comme pesticides et leur parcours complexe dans l'environnement ont nécessité le développement de nombreux secteurs d'étude pour les caractériser plus précisément. Parmi ces secteurs on trouve les sciences analytiques, l'étude de leur distribution et de leur dégradation, leur écotoxicité, le suivi et l'interprétation des données.

L'augmentation de la fréquence et du nombre des études de suivi environnemental sur les pesticides ne pourra aboutir qu'au travers du développement et de l'utilisation de méthodes multi résidus appropriées. Elles doivent être à la fois d'une grande efficacité, d'un coût raisonnable, automatisables et non polluantes. Dans ce travail, la microextraction sur phase solide (SPME), pour les eaux, utilisant une fibre de poly(dimethylsiloxanedivinylbenzene) (PDMS-DVB), et une extraction par fluide supercritique (SFE) pour les sols, utilisant du CO_2 + 8% de méthanol, ont présenté ces caractéristiques pour l'analyse des pesticides. Afin d'optimiser la SPME plusieurs paramètres modifiant l'efficacité de l'extraction ont été étudiés : la nature et l'épaisseur du revêtement de la fibre, la température d'extraction, la force ionique, la vitesse d'agitation, le pH de l'échantillon et le temps d'extraction. L'optimisation de la SFE a été effectuée selon une approche expérimentale multifactorielle («central composite design») pour pouvoir construire des surfaces de réponses et définir les niveaux optima de différentes variables : température d'extraction, pression et volume du fluide supercritique, et le pourcentage du modificateur (méthanol). L'extraction par ultrasons a été également utilisée pour son efficacité et sa facilité de mise en œuvre. La chromatographie en phase gazeuse (CPG) a été sélectionnée du fait des détecteurs qui peuvent y être associé : le détecteur à capture d'électrons (ECD) et le détecteur thermoionique (TSD) qui sont très sélectifs et sensibles et la spectrométrie de masse (MS) pour ses capacités de sélectivité et de confirmation de la composition chimique des composés. Il est à noter que la CPG-MS-MS grâce à sa sensibilité et sa sélectivité a

grandement simplifié l'analyse et la confirmation de traces de résidus des pesticides dans les matrices étudiées tout en améliorant la qualité des données.

Une fois que les techniques développées ont montré leur adéquation avec le projet, elles ont été utilisées dans une étude d'identification des pesticides (organochlorés, organophosphorés, triazines, pyréthrinoïdes, chloroacétanilides, d'entre autres), de leurs produits de dégradation dans des échantillons d'eaux souterraines et de sols collectés sur la zone vulnérable n°1 (dont le « masseiras » de Póvoa de Varzim). Cette région a été sélectionnée à cause de sa sensibilité à la contamination, due à sa fragilité hydrologique ainsi qu'à l'agriculture intensive qui y est pratiquée. L'étude de suivi environnemental a duré deux ans comprenant huit campagnes d'échantillonnages : avec 23 points d'échantillonnages pour les eaux et 5 points d'échantillonnages pour les sols. La quantité de données récoltées a été suffisante pour déduire la distribution et la fréquence de la contamination par les pesticides. Vingt-deux pesticides ont été quantifiés dans les échantillons d'eaux et seize dans les sols. Les pesticides les plus fréquemment rencontrés dans les eaux ont été : le lindane (53%), l'endosulfan sulfate, l'endosulfan et la pendiméthaline. Dans les sols ont été retrouvés : l'alachlore (39%), le chlorpyrifos, l'endosulfan sulfate et l'atrazine. La présence simultanée de plusieurs pesticides (>3) dans le même échantillon a pu être mise en évidence. L'absence de contamination par pesticides a été observée dans 17,7% des échantillons d'eaux et 27,5% des échantillons de sols. Les résultats ont été soumis à un traitement statistique chimiométrique en utilisant une méthode d'agrégation des groupes, une analyse discriminante et une analyse des composantes principales. Ce traitement des résultats a permis de mettre en évidence des tendances dans la distribution géographique des pesticides en relation avec les pratiques horticoles intensives de la région.

Pour permettre une meilleure compréhension du comportement et l'impact des pesticides dans cette région, des études de photodégradation ont été menées sur le pesticide quinalphos. Une simulation des conditions du rayonnement solaire sur les eaux et les sols a été effectuée afin d'établir la cinétique de dégradation ainsi que les probables sous-produits de photodégradation du quinalphos. De plus, les potentiels dommages environnementaux (écotoxicité) associés aux divers pesticides ont été évalués en utilisant deux biodétecteurs (ToxAlert et Cellsense) avec des bactéries comme éléments sensibles.

Les études présentées ici sont une approche avant-gardiste de l'analyse des pesticides, de l'interprétation des résultats et de l'évaluation de leur comportement dans les matrices environnementales. Cela contribue donc à une meilleure compréhension de l'impact de ces composés sur une zone sensible, la zone vulnérable n° 1 (le littoral nord du Portugal).

PUBLICAÇÕES/COMUNICAÇÕES

Os resultados apresentados nesta dissertação constam das seguintes publicações e comunicações, ao abrigo do artigo 8º do Decreto-Lei n.º 388/70:

PUBLICAÇÕES:

1. Gonçalves, C., Alpendurada, M.F. – *Comparison of three different poly(dimethylsiloxane)-divinylbenzene fibres for the analysis of pesticide multiresidues: structure and efficiency.* J. Chromatogr. A, 963 (2002) 19-26.

2. Gonçalves, C., Alpendurada, M.F. – *Multiresidue method for the simultaneous determination of four groups of pesticides in ground and drinking waters , using solid-phase microextraction-gas chromatography with electron-capture and thermionic specific detection.* J. Chromatogr. A, 968 (2002) 177-190.

3. Farré, M., Gonçalves, C., Lacorte, S., Barceló, D., Alpendurada, M.F. – *Pesticide toxicity assessment using an electrochemical biosensor with Pseudomonas putida and a bioluminescence inhibition assay with Vibrio fischeri.* Anal. Bioanal. Chem. 373 (2002) 696-703

4. Gonçalves, C., Alpendurada, M.F.– *Solid-phase micro-extraction-gas chromatography-(tandem) mass spectrometry as a tool for pesticide residue analysis in water samples at high sensitivity and selectivity with confirmation capabilities.* J. Chromatogr. A, 1026 (2004) 239-250.

5. Gonçalves, C., Alpendurada, M.F. – *Assessment of pesticide contamination in soil samples from an intensive horticulture area, using ultrasonic extraction and gas chromatography-mass spectrometry.* Talanta, 65 (2005) 1179-1189.

6. Gonçalves, C., Matos, A., Alpendurada, M.F. – *Situação e evolução da contaminação com pesticidas na área de protecção do aquífero livre entre Esposende e Vila do Conde.* Recursos Hídricos, 26 (2005) 89-98.

7. Gonçalves, C., Esteves da Silva, J.C.G., Alpendurada, M.F. – *Chemometric interpretation of pesticide occurrence in soil samples from an intensive horticulture area in north Portugal.* Anal. Chim. Acta, 560 (2006) 164-171.

8. Gonçalves, C. Carvalho, J.J., Azenha, M.A., Alpendurada, M.F. – *Optimization of supercritical fluid extraction of pesticide residues in soil by means of central composite design and analysis by gas chromatography-tandem mass spectrometry.* J. Chromatogr. A, 1110 (2006) 6-14.

9. Gonçalves, C., Dimou, A., Sakkas, V., Alpendurada, M.F., Albanis, T.A. – *Photolytic degradation of quinalphos in natural waters and on soil matrices under simulated solar irradiation.* Chemosphere, 64 (2006) 1375-1382.

10. Gonçalves, C., Esteves da Silva, J.C.G., Alpendurada, M.F. – *Characterization of the pesticide contamination of groundwater samples from a vulnerable zone located in north Portugal based on a 2-year study: descriptive and chemometric interpretation.* Submetido para publicação na revista Environmental Pollution, Setembro (2006).

COMUNICAÇÕES ORAIS:

1. Gonçalves, C. Alpendurada, M.F. – *Desenvolvimento de um método de SPME-GC-ECD-TSD para a determinação de multiresíduos de pesticidas em águas subterrâneas e confirmação por GC-MS.* XV Encontro Galego-Português de Química, Coruña, 21-23 de Novembro de 2001.

2. Gonçalves, C., Alpendurada, M.F. – *Determinação de pesticidas e seus produtos de degradação em águas subterrâneas.* 6° Congresso da Água – a água é d'ouro, Porto, 18-22 de Março de 2002.

3. Gonçalves, C., Alpendurada, M.F. – *Implicações na qualidade das águas subterrâneas e na saúde humana resultantes do uso de pesticidas em culturas intensivas na região das masseiras, Póvoa do Varzim.* Jornadas do Ambiente "Usos da Água e Ambiente", Esposende, 30 de Maio de 2003.

4. Gonçalves, C., Dimou, A., Sakkas, V., Alpendurada, M.F., Albanis, T.A. – *Photodegradation of quinalphos in different water and soil matrices under simulated solar irradiation.* The 11th Symposium on Sample Handling for Environmental and Biological Analysis, Bayona, Espanha, 18-21 de Abril de 2004.

5. Gonçalves, C., Azenha, M., Alpendurada, M.F. – *Improving selectivity of pesticide analysis in soil samples using supercritical fluid extraction-gas chromatography-tandem mass spectrometry (SFE-GC-MS-MS).* 3rd European Conference on Pesticides and Related Organic Micropollutants in the Environment. Halkidiki, Grécia, 7-9 de Outubro de 2004.

6. Gonçalves C., Esteves da Silva, J.C.G., Alpendurada, M.F. – *Monitoring study of pesticides in groundwater samples from a vulnerable zone located in north Portugal: descriptive and multivariate statistical analysis.* Aceite para apresentação na 4th European Conference on Pesticides and Related Organic Micropollutants in the Environment / 10th Symposium on Chemistry and Fate of Modern Pesticides, Almeria, Espanha, 26-29 de Novembro de 2006.

APRESENTAÇÕES EM PAINEL:

1. Gonçalves, C., Alpendurada, M.F. – *Simultaneous solid-phase microextraction of different groups of pesticides - Organochlorine, Organophosphorous and Triazines - in water samples.* The 10th Symposium on Handling of Environmental and Biological Samples in Chromatography, Mainz, Alemanha, 01-04 de Abril de 2001.

2. Gonçalves C., Alpendurada, M.F. – *Comparison of three different PDMS-DVB fibres for the analysis of pesticide multiresidues: structure and efficiency.* The Third International Symposium on Extraction Technologies ExTech 2001, Barcelona, Espanha, 17-19 de Setembro de 2001.

3. Gonçalves C., Alpendurada, M.F. – *Determination of target analytes from four groups of pesticides in water samples using a bipolar SPME fibre and GC-MS or GC-MS-MS.* ISEAC 32 – International Symposium on the Environment and Analytical Chemistry, Plymouth, Reino Unido, 17-21 de Junho de 2002.

4. Gonçalves C., Alpendurada, M.F. – *Assessment of pesticides contamination in soil samples from an intensive horticulture area in Portugal, using ultrasonic extraction and GC-MS.* 2nd European Conference on Pesticides and Related Organic Micropollutants in the Environment, Corfu, Grécia, 26-29 de Setembro de 2002.

5. Gonçalves C., Alpendurada, M.F. – *Solid-phase microextraction-gas chromatography-(tandem) mass spectrometry as a tool for pesticide residue analysis in water samples at high sensitivity and selectivity with confirmation capabilities.* 16th IMSC03 International Mass Spectrometry Conference, Edimburgo, Reino Unido, 01-05 de Setembro de 2003.

ABREVIATURAS

2,4-D	Ácido 2,4-diclorofenoxiacético
3,4-DCA	3,4-dicloroanilina
ACS	Sociedade de Química Americana (American Chemical Society)
ADI	Dose diária aceitável (acceptable daily intake)
AED	Detector de emissão atómica (atomic emission detector)
AGC	Controlo automático do ganho (automatic gain control)
AMD	Desenvolvimento automático de métodos (automated method development)
AOP	Processos avançados de oxidação (advanced oxidation processes)
APCI	Ionização química à pressão atmosférica (atmospheric pressure chemical ionization)
API	Interface à pressão atmosférica (atmospheric pressure interface)
ASE	Extracção por solvente acelerada (accelerated solvent extraction)
BTEX	Benzeno, tolueno, etilbenzeno e xilenos
CE	Electroforese capilar (capillary electrophoresis)
CEE	Comunidade Económica Europeia (agora designada União Europeia). CE - designa a Comunidade Europeia
CID	Dissociação induzida por colisão (collision induced dissociation)
CW	Carbowax ou poli(etilenoglicol)
DAD	Detector de fotodíodos (diode-array detector)
DBCP	1,2-dibromo-3-cloropropano
DCAD	Detector amperométrico de corrente directa (direct current amperometrical detector)
DCM	Diclorometano
DEA	Desetilatrazina
DGPC	Direcção Geral de Protecção das Culturas
DGS	Direcção Geral de Saúde
DIA	Desisopropilatrazina
DNA	Ácido desoxiribonucleico (Desoxiribonucleic acid)
DOM	Matéria orgânica dissolvida (dissolved organic matter)
DQA	Directiva Quadro da Água (Directiva 2000/60/CE)
DT_{50}	Tempo de semi-vida (time for 50% loss)
DVB	Divinilbenzeno
ECD	Detector de captura electrónica (electron-capture detector)
ECPA	Associação Europeia de Protecção das Culturas (European Crop Protection Association)
Ed(s).	Editor(es)
EDB	Dibrometo de etileno (ethylene dibromide)
EEA	Agência Europeia do Ambiente (European Environment Agency)

EI	Impacto electrónico (electron impact)
EIC	Cromatograma extraído por ião (extracted ion chromatogram)
ELISA	Ensaio imunoenzimático (enzyme-linked immunosorbent assay)
ESE	Extracção com solvente melhorada (enhanced solvent extraction)
ESI	Ionização por "electrospray" (electrospray ionization)
EUA	Estados Unidos da América (igual a US)
EUROSTAT	Serviço de estatísticas da UE (Statistical Office of the European Communities)
FAO	Organização para a Alimentação e Agricultura (Food and Agriculture Organization)
FAOSTAT	Serviço de estatísticas da FAO (Statistical Division of the FAO)
FIV	Valor fixado de impacto (fixed impact value)
FMN	Flavina-mononucleótido
$FMNH_2$	Flavina-mononucleótido reduzido
FPD	Detector fotométrico de chama (flame photometric detector)
FTD	Detector termoiónico de chama (flame termoionic detector)
GC	Cromatografia gasosa (gas chromatography)
GCB	Carvão activado grafitizado (grafitized carbon black)
GUS	Groundwater Ubiquity Score
HA	Valor recomendado de saúde (health advisory)
HCB	Hexaclorobenzeno
HCH	Hexaclorociclohexano
HPLC	Cromatografia líquida de alta eficiência (high performance liquid chromatography)
IARC	Agência Internacional para a Investigação do Cancro (International Agency for Research in Cancer)
INAG	Instituto da Água
IPCS	International Programme on Chemical Safety
IRAR	Instituto Regulador de Águas e de Resíduos
ISO	Organização Internacional de Padronização (International Organization for Standardization)
IUPAC	União Internacional de Química Pura e Aplicada (International Union of Pure and Applied Chemistry
JECFA	Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives
JMPR	Joint FAO/WHO Meeting on Pesticide Residues
K_d	Coeficiente de partição solo/água (soil/water partition coefficient)
K_{oc}	Coeficiente de partição carbono orgânico/água (organic carbon/water partition coefficient)
K_{ow}	Coeficiente de partição octanol/água (octanol/water partition coefficient)
LC	Cromatografia líquida (liquid chromatography)
LC_{50}	Concentração letal para metade da população (lethal concentration 50%)

LD_{50}	Dose letal para metade da população (lethal dose 50%)
LDA	Análise discriminante linear (linear discriminant analysis)
LIC	Limite inferior de controlo
LLE	Extracção líquido-líquido (liquid-liquid extraction)
LOD	Limite de detecção (limit of detection)
LOQ	Limite de quantificação (limit of quantitation)
LPME	Microextracção líquida (liquid phase microextraction)
LSC	Limite superior de controlo
MAE	Extracção assistida por microondas (microwave-assisted extraction)
MCPA	Ácido 4-cloro-2-metilfenoxiacético
MIP	Polímero de impressão molecular (molecularly imprinted polymer)
MRC	Material de referência certificado
MRL	Limite máximo de resíduos (maximum residue limits)
MRM	Monitorização de múltiplas reacções (multiple reaction monitoring)
MS	Espectrometria de massa (mass spectrometry)
MSPD	Dispersão da matriz em adsorvente de fase sólida (matrix solid phase dispersion)
NPD	Detector de azoto e fósforo (nitrogen and phosphorous detector)
OCDE	Organização para a Cooperação e o Desenvolvimento Económico (Organization for Economic Co-operation and Development)
OCPs	Pesticidas organoclorados (organochlorine pesticides)
OH-TSO	Óleo de silicone com terminações hidroxilo (hydroxy-terminated silicone oil)
OMS	Organização Mundial de Saúde
ONU	Organização das Nações Unidas
OPPs	Pesticidas organofosforados (organophosphorous pesticides)
PA	Poliacrilato (polyacrylate)
PAHs	Hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (polycyclic aromatic hydrocarbons)
PBDEs	Éteres difenílicos polibromados (polybrominated diphenyl ethers)
P_c	Pressão crítica
PCA	Análise dos componentes principais (principal component analysis)
PCBs	Bifenilos policlorados (polychlorinated biphenyls)
PCDD	Policlorodibenzodioxinas (polychlorodibenzodioxins)
PDMS	Poli(dimetilsiloxano) (poly(dimethylsiloxane))
PEC	Concentração ambiental prevista (predicted environmental concentration)
PFE	Extracção por fluido pressurizado (pressurized fluid extraction)
PIC	Procedimento de prévia informação e consentimento (Prior informed consent)
PLE	Extracção com solvente líquido pressurizado (pressurized liquid extraction)
POPs	Poluentes orgânicos persistentes (persistent organic pollutants)

PPY	Polipirrole (polypyrrole)
PS-DVB	Poli(estireno-divinilbenzeno) (poly(styrene-divinylbenzene))
RAM	Adsorvente de acesso restrito (restricted access material)
Ref.	Referência bibliográfica
RP	Fase reversa (reversed phase)
RSD	Desvio padrão relativo (relative standard deviation)
s.a.	Substância activa
SAESC	Extracção assistida por ultra-sons em colunas (sonication-assisted extraction in small columns)
SAU	Superfície agrícola utilizada
SDME	Microextracção em gota (single drop microextraction)
SFE	Extracção por fluidos supercríticos (supercritical fluid extraction)
SIM	Monitorização selectiva de iões (selected ion monitoring)
SIS	Armazenamento selectivo de iões (selected ion storage)
SLM	Extracção por solvente em suporte de membrana (supported liquid membrane)
SNIRH	Sistema Nacional de Informação de Recursos Hídricos
SPE	Extracção em fase sólida (solid-phase extraction)
SPME	Microextracção em fase sólida (solid-phase microextraction)
T_c	Temperatura crítica
TEPP	Tetraetilpirofosfato
TIC	Cromatograma total dos iões (total ion chromatogram)
TOF	Detector por tempo de voo (time-of-flight)
TSD	Detector termoiónico específico (thermoionic-specific detector)
UE	União Europeia
UK	Reino Unido (United Kingdom)
UNEP	Programa Ambiental das Nações Unidas (United Nations Environmental Programme)
US EPA	Agência de Protecção Ambiental Americana (United States Environmental Protection Agency)
USE	Extracção por ultra-sons (ultrasonic extraction)
USGS	Serviços Geológicos dos Estados Unidos (United States Geological Survey)
UV-Vis	Detector de ultravioleta-visível
VMA	Valor máximo admissível
VOCs	Compostos orgânicos voláteis (volatile organic compounds)
WHO	Organização Mundial de Saúde (World Health Organization)
WWTP	Estação de tratamento de águas residuais (wastewater treatment plant)
ZV1	Zona Vulnerável nº 1 (Aquífero livre de Esposende-Vila do Conde)

Nota: em certos casos optou-se por usar as abreviaturas derivadas da designação anglo-saxónica dado o seu carácter mais universal

ÍNDICE GERAL

RESUMO IX

ABSTRACT XI

RÉSUMÉ XIII

PUBLICAÇÕES/COMUNICAÇÕES XV

ABREVIATURAS XVII

ÍNDICE GERAL XXI

ÍNDICE DE TABELAS XXVII

ÍNDICE DE FIGURAS XXXI

1. INTRODUÇÃO GERAL 1
   - 1.1 OS PESTICIDAS NO AMBIENTE 1
   - 1.2 MONITORIZAÇÃO AMBIENTAL 6
   - 1.3 ESTUDO DOS PESTICIDAS NA ZONA VULNERÁVEL Nº 1: OBJECTIVOS 9
   - 1.4 ORGANIZAÇÃO DA DISSERTAÇÃO 13
   - 1.5 BIBLIOGRAFIA 14

2. USOS E CARACTERÍSTICAS DOS PESTICIDAS 17
   - 2.1 DEFINIÇÃO DE PESTICIDAS 17
   - 2.2 UTILIZAÇÃO HISTÓRICA DE PESTICIDAS 19
   - 2.3 CARACTERIZAÇÃO DOS PESTICIDAS 22
     - 2.3.1 **Classificação segundo o uso** 23
       - 2.3.1.1 Insecticidas 25
       - 2.3.1.2 Fungicidas 27
       - 2.3.1.3 Herbicidas 28
     - 2.3.2 **Efeitos toxicológicos** 29
     - 2.3.3 **Classificação toxicológica dos pesticidas** 33
     - 2.3.4 **Intoxicações humanas e efeitos nos ecossistemas** 35
   - 2.4 ASPECTOS LEGISLATIVOS RELATIVOS AOS PESTICIDAS 36
     - 2.4.1 **Regulamentação das substâncias perigosas** 36
     - 2.4.2 **Avaliação de novas substâncias activas** 37
     - 2.4.3 **Resíduos de pesticidas no ambiente** 39
       - 2.4.3.1 Resíduos nas águas 40
       - 2.4.3.2 Resíduos no solo 44
   - 2.5 CONCLUSÕES 46
   - 2.6 BIBLIOGRAFIA 47

3. PRESENÇA E COMPORTAMENTO AMBIENTAL DOS PESTICIDAS 51
3.1 EVOLUÇÃO DO MERCADO DE PESTICIDAS E PERSPECTIVAS FUTURAS 51
3.1.1 Consumo de pesticidas a nível mundial e na Europa 53
3.1.2 Consumo de pesticidas em Portugal 58
3.2 COMPORTAMENTO E DESTINO DOS PESTICIDAS NO AMBIENTE 61
3.2.1 Mecanismos de transporte e de retenção 64
3.2.1.1 Distribuição no ar 64
3.2.1.2 Comportamento no solo 65
3.2.1.3 Mobilização na água 68
3.2.2 Mecanismos de degradação e metabolismo 70
3.2.2.1 Hidrólise 70
3.2.2.2 Fotodegradação 72
3.2.2.3 Oxidação-redução 75
3.2.2.4 Degradação biológica 76
3.2.3 Previsão do comportamento ambiental dos pesticidas 77
3.3 OCORRÊNCIA DE PESTICIDAS NO AMBIENTE 79
3.3.1 Contaminação das águas subterrâneas 79
3.3.2 Contaminação dos solos 88
3.4 CONCLUSÕES 91
3.5 BIBLIOGRAFIA 91

4. ANÁLISE DE PESTICIDAS EM AMOSTRAS AMBIENTAIS 99
4.1 ANÁLISE DE MULTIRESÍDUOS DE PESTICIDAS 99
4.2 EXTRACÇÃO E CONCENTRAÇÃO DE AMOSTRAS DE ÁGUA 101
4.2.1 Extracção em fase sólida 102
4.2.1.1 Fundamento e aplicações 102
4.2.1.2 Tendências recentes em adsorventes 104
4.2.2 Microextracção em fase sólida 105
4.2.2.1 Fundamento e operação 105
4.2.2.2 Factores que influenciam a extracção 108
4.2.2.3 Aplicações e dificuldades analíticas 112
4.2.2.4 Novos adsorventes de SPME 116
4.2.3 Outras técnicas 118
4.3 EXTRACÇÃO E CONCENTRAÇÃO DE AMOSTRAS DE SOLO 118
4.3.1 Extracção assistida por ultra-sons 119
4.3.2 Extracção por fluidos supercríticos 121
4.3.2.1 Fundamentos e condições de funcionamento 121
4.3.2.2 Aplicações de SFE na análise de pesticidas 127
4.3.3 Outras técnicas instrumentais 130
4.4 SEPARAÇÃO E DETECÇÃO DOS PESTICIDAS 132

4.5 BIOENSAIOS 137
4.5.1 Imunoensaios 138
4.5.2 Biossensores 139
4.6 CONCLUSÕES 144
4.7 BIBLIOGRAFIA 144

5. MONITORIZAÇÃO DE PESTICIDAS NA ZONA VULNERÁVEL Nº 1 155
5.1 MOTIVAÇÕES E PLANO DE MONITORIZAÇÃO 155
5.2 CARACTERIZAÇÃO DA ZONA DE ESTUDO 156
5.2.1 Localização da Zona Vulnerável nº 1 156
5.2.1.1 Localização dos pontos de amostragem 156
5.2.2 Características hidrogeológicas 158
5.2.2.1 Composição físico-química das águas subterrâneas 161
5.2.2.2 Composição físico-química dos solos 162
5.2.3 Condições climáticas 163
5.2.4 Práticas culturais e fitossanitárias 164
5.3 DETERMINAÇÃO DE PESTICIDAS EM ÁGUAS E SOLOS 166
5.3.1 Amostragem 166
5.3.2 Análise e quantificação 166
5.4 VALIDAÇÃO E CONTROLO DE QUALIDADE ANALÍTICO 167
5.4.1 Cartas de controlo de qualidade 169
5.4.2 Ensaios interlaboratoriais (Aquacheck) 175
5.5 BIBLIOGRAFIA 181

6. DESENVOLVIMENTO DE MÉTODOS ANALÍTICOS AVANÇADOS PARA A DETERMINAÇÃO DE PESTICIDAS EM ÁGUAS E SOLOS 183
6.1 COMPARAÇÃO DE TRÊS FIBRAS DE POLI(DIMETILSILOXANO)-DIVINILBENZENO PARA A ANÁLISE DE MULTIRESÍDUOS DE PESTICIDAS EM AMOSTRAS DE ÁGUA: ESTRUTURA E EFICIÊNCIA 183
6.1.1 Introdução 185
6.1.2 Parte experimental 186
6.1.2.1 Produtos químicos, reagentes e equipamento 186
6.1.2.2 Fibras de SPME e condições de extracção 187
6.1.3 Resultados e discussão 187
6.1.4 Conclusões 191
6.2 MÉTODO MULTIRESÍDUO PARA A DETERMINAÇÃO SIMULTÂNEA DE 4 GRUPOS DE PESTICIDAS EM ÁGUAS SUBTERRÂNEAS E PARA CONSUMO HUMANO ATRAVÉS DE MICROEXTRACÇÃO EM FASE SÓLIDA E CROMATOGRAFIA GASOSA COM DETECÇÃO POR CAPTURA ELECTRÓNICA E TERMIÓNICA ESPECÍFICA 193
6.2.1 Introdução 195
6.2.2 Parte experimental 196
6.2.2.1 Produtos químicos e reagentes 196

6.2.2.2 Equipamento e fibras de SPME 197
6.2.3 Resultados e discussão 197
6.2.3.1 Desenvolvimento do método 197
6.2.3.2 Validação do método 203
6.2.4 Conclusões 206
6.3 APLICAÇÃO DA MICROEXTRACÇÃO EM FASE SÓLIDA SEGUIDA DE CROMATOGRAFIA GASOSA E ESPECTROMETRIA DE MASSA SEQUENCIAL PARA A ANÁLISE DE RESÍDUOS DE PESTICIDAS EM AMOSTRAS DE ÁGUA, COM ELEVADA SENSIBILIDADE, SELECTIVIDADE E CAPACIDADE DE CONFIRMAÇÃO 209
6.3.1 Introdução 211
6.3.2 Parte experimental 212
6.3.2.1 Produtos químicos e reagentes 212
6.3.2.2 Procedimento de extracção por SPME 212
6.3.2.3 Análise por cromatografia gasosa 212
6.3.2.4 Condições instrumentais da análise por espectrometria de massa 213
6.3.3 Resultados e discussão 213
6.3.3.1 Detalhes de SPME 213
6.3.3.2 Análise por MS 213
6.3.3.3 Análise por MS-MS 216
6.3.4 Conclusões 221
6.4 AVALIAÇÃO DA CONTAMINAÇÃO COM PESTICIDAS EM SOLOS DE UMA ZONA DE HORTICULTURA INTENSIVA, USANDO A EXTRACÇÃO POR ULTRA-SONS SEGUIDA DE ANÁLISE POR CROMATOGRAFIA GASOSA – ESPECTROMETRIA DE MASSA 223
6.4.1 Introdução 225
6.4.2 Parte experimental 226
6.4.2.1 Produtos químicos e reagentes 226
6.4.2.2 Amostras de solo 226
6.4.2.3 Procedimento de extracção por ultra-sons 227
6.4.2.4 Análise cromatográfica 227
6.4.3 Resultados e discussão 228
6.4.3.1 Desenvolvimento do método 228
6.4.3.2 Características de desempenho do método 228
6.4.3.3 Programa de monitorização 232
6.4.4 Conclusões 234
6.5 OPTIMIZAÇÃO DA EXTRACÇÃO DE PESTICIDAS EM SOLOS ATRAVÉS DE FLUIDOS SUPERCRÍTICOS, RECORRENDO A UM DESENHO EXPERIMENTAL COMPOSTO, E POSTERIOR ANÁLISE POR CROMATOGRAFIA GASOSA E ESPECTROMETRIA DE MASSA SEQUENCIAL 237
6.5.1 Introdução 239
6.5.2 Parte experimental 240
6.5.2.1 Produtos químicos e reagentes 240

6.5.2.2 Preparação das amostras de solo 240
6.5.2.3 Extracção por fluidos supercríticos 240
6.5.2.4 Análise cromatográfica por GC-MS-MS 241
6.5.3 Resultados e discussão 241
6.5.3.1 Condições optimizadas de funcionamento em MS-MS 241
6.5.3.2 Optimização da SFE através de um desenho experimental 242
6.5.3.3 Desempenho analítico obtido por SFE-GC-MS-MS 243
6.5.3.4 Avaliação dos cromatogramas e análise de amostras reais 245
6.5.4 Conclusões 246

7. RESULTADOS DA MONITORIZAÇÃO DE PESTICIDAS EM ÁGUAS E SOLOS DA ZONA VULNERÁVEL N.º 1, NO PERÍODO 2001-2003 251

7.1 CARACTERIZAÇÃO DA CONTAMINAÇÃO COM PESTICIDAS EM AMOSTRAS DE ÁGUA SUBTERRÂNEA DE UMA ZONA VULNERÁVEL LOCALIZADA NO NORTE DE PORTUGAL, BASEADA NUM ESTUDO DE 2 ANOS: ANÁLISE DESCRITIVA E QUIMIOMÉTRICA 251
7.1.1 Introdução 253
7.1.2 Parte experimental 254
7.1.2.1 Caracterização das amostras e da zona de amostragem 254
7.1.2.2 Periodicidade da amostragem e trabalho analítico 255
7.1.2.3 Descrição da matriz de dados e do tratamento preliminar 256
7.1.2.4 Tratamento estatístico dos resultados da monitorização de pesticidas 256
7.1.3 Resultados e discussão 257
7.1.3.1 Ocorrência de pesticidas nas amostras de água subterrânea 257
7.1.3.2 Análise de aglomeração 263
7.1.3.3 Análise discriminante linear 264
7.1.3.4 Identificação das fontes de poluição através da análise de PCA 265
7.1.4 Conclusões 266

7.2 INTERPRETAÇÃO QUIMIOMÉTRICA DA OCORRÊNCIA DE PESTICIDAS EM SOLOS DE UMA ZONA DE HORTICULTURA INTENSIVA NO NORTE DE PORTUGAL 269
7.2.1 Introdução 271
7.2.2 Parte experimental 272
7.2.2.1 Âmbito, localização e características da área de estudo 272
7.2.2.2 Amostragem e análise de resíduos de pesticidas em solos 272
7.2.2.3 Arranjo inicial dos dados e seu pré-tratamento 273
7.2.2.4 Análise quimiométrica 273
7.2.3 Resultados e discussão 274
7.2.3.1 Análise de aglomeração 274
7.2.3.2 Análise discriminante linear 275
7.2.3.3 Análise de factores 276
7.2.4 Conclusões 277

8. ESTUDO DO COMPORTAMENTO E EFEITOS DOS PESTICIDAS NO AMBIENTE 279

8.1 DEGRADAÇÃO DO QUINALFOS EM ÁGUAS NATURAIS E SOLOS POR MEIO DE FOTÓLISE, EM CONDIÇÕES DE IRRADIAÇÃO SOLAR SIMULADA 279

8.1.1 Introdução 281

8.1.2 Parte experimental 282

8.1.2.1 Produtos químicos e aparelhos 282

8.1.2.2 Estudos de cinética 282

8.1.2.3 Estudo dos subprodutos da fotólise 283

8.1.3 Resultados e discussão 284

8.1.3.1 Cinética de fototransformação na água 284

8.1.3.2 Cinética de fototransformação no solo 285

8.1.3.3 Subprodutos resultantes da fototransformação 286

8.1.4 Conclusões 287

8.2 AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE DE ALGUNS PESTICIDAS UTILIZANDO UM BIOSSENSOR ELECTROQUÍMICO CONTENDO A *PSEUDOMONAS PUTIDA* E UM ENSAIO DE INIBIÇÃO DA BIOLUMINESCÊNCIA COM O *VIBRIO FISCHERI* 289

8.2.1 Introdução 291

8.2.2 Parte experimental 292

8.2.2.1 Produtos químicos e reagentes 292

8.2.2.2 Ensaios de toxicidade 292

8.2.2.3 Análise cromatográfica 293

8.2.2.4 Estudo do efeito de matriz 293

8.2.2.5 Avaliação da toxicidade de águas subterrâneas 293

8.2.3 Resultados e discussão 293

8.2.3.1 Desempenho do ToxAlert 100 e do Cellsense 293

8.2.3.2 Efeito de matriz 294

8.2.3.3 Amostras reais 296

8.2.4 Conclusões 297

9. CONCLUSÕES FINAIS 299

ANEXO I – CLASSIFICAÇÃO TOXICOLÓGICA DE DIVERSOS PESTICIDAS 305

ANEXO II – PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS DE VÁRIOS PESTICIDAS 308

ANEXO III – COMPOSIÇÃO DAS ÁGUAS SUBTERRÂNEAS NA ZV1 309

ANEXO IV – CONCENTRAÇÃO DE PESTICIDAS NAS ÁGUAS SUBTERRÂNEAS 312

ANEXO V – FREQUÊNCIA DE DETECÇÃO DE PESTICIDAS NOS SOLOS 313

ANEXO VI – CONCENTRAÇÃO DE PESTICIDAS NOS SOLOS 314

ANEXO VII – FIGURAS ILUSTRATIVAS DOS ENSAIOS DE FOTÓLISE 315

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 2.1 – Classificação dos principais tipos de pesticidas segundo o organismo alvo 24

Tabela 2.2 – Famílias de pesticidas mais importantes segundo a sua estrutura química 24

Tabela 2.3 – Classificação dos principais pesticidas segundo o seu modo de acção 25

Tabela 2.4 – Principais fontes de exposição humana aos pesticidas e respectivas vias de entrada 32

Tabela 2.5 – Classificação da toxicidade aguda dos pesticidas segundo a OMS 33

Tabela 2.6 – Critérios de classificação da toxicidade aguda dos pesticidas segundo a USEPA 34

Tabela 2.7 – Valores máximos recomendados de pesticidas na água para consumo humano com base em critérios toxicológicos, segundo a OMS e a US EPA 41

Tabela 2.8 – Valores guia de investigação e intervenção em solos contaminados com pesticidas fixados por diversas normas nacionais da Holanda, França e Espanha 45

Tabela 3.1 – Evolução do mercado de pesticidas no período 1960-2001 e sua distribuição pelas principais categorias de pesticidas 51

Tabela 3.2 – Evolução da contribuição das diversas regiões do mundo para o valor anual de consumo de pesticidas, no período 1983-2000 e alteração da repartição percentual 52

Tabela 3.3 – Consumo de pesticidas (toneladas de substâncias activas) a nível mundial e na Europa em 2000 e 2001, distribuídos pelas principais categorias 54

Tabela 3.4 – Pesticidas mais usados a nível mundial e na Europa 55

Tabela 3.5 – Consumo de pesticidas, em toneladas de s.a., nos Estados-membros da UE, no período entre 1998 e 2003 56

Tabela 3.6 – Substâncias activas mais vendidas em 2003 (kg), por classe de actividade 59

Tabela 3.7 – Pesticidas pesquisados e efectivamente detectados nas águas subterrâneas em 9 países europeus com programas de monitorização (INFU 1995) 81

Tabela 3.8 – Ocorrência de pesticidas em captações de água subterrânea destinada ao abastecimento público, em países europeus, entre 1999-2000 82

Tabela 3.9 – Frequência de captações contaminadas e percentagem de detecção dos respectivos pesticidas de acordo com valor limite da UE 87

Tabela 3.10 – Concentrações de pesticidas quantificadas em várias amostras de solo (nº), colhidas em diversas culturas no México e em Espanha 89

Tabela 4.1 – Tipos de fibras de SPME comercializadas e suas aplicações 109

Tabela 4.2 – Aplicações de SPME na análise de pesticidas em águas e solos desde 2000.. 114

Tabela 4.3 – Aplicações de novos adsorventes de SPME na determinação de pesticidas em águas ou amostras aquosas 117

Tabela 4.4 – Variáveis que influenciam um sistema de extracção por fluidos supercríticos 124

Tabela 5.1 – Localização, profundidade e geologia dos pontos de colheita na ZV1 158

Tabela 5.2 – Distribuição dos locais de amostragem de acordo com os valores médios de pH, condutividade e concentração de nitratos encontrados nas águas subterrâneas 161

Tabela 5.3 – Composição físico-química e propriedades texturais dos solos colhidos na ZV1 162

Tabela 5.4 – Culturas encontradas ao longo do período de monitorização nas proximidades dos locais de amostragem 165

Tabela 5.5 – Pesticidas com registo ou evidências de utilização na ZV1 165

Tabela 5.6 – Pesticidas analisados nos ensaios da Aquacheck bem como a gama das concentrações determinadas e o número de resultados satisfatórios 177

Tabela 6.1 – Estrutura das três fibras comercializadas com o polímero poroso PDMS-DVB 187

Tabela 6.2 – Parâmetros de validação do método de SPME em condições óptimas de extracção 204

Tabela 6.3 – Pesticidas incluídos nos métodos de SPME-GC-MS ("full scan", SIS e μSIS), respectivos tempos de retenção (t_R) e iões (m/z) usados para quantificação 214

Tabela 6.4 – Condições instrumentais de operação do espectrómetro de massa em modo de armazenamento selectivo de iões (SIS): segmentos de SIS, gamas de massas e número de compostos monitorizados 215

Tabela 6.5 – Condições de funcionamento do espectrómetro de massa para efectuar a detecção em modo MS-MS: isolamento do ião percursor, dissociação induzida por colisão e fragmentos obtidos nas condições instrumentais usadas 218

Tabela 6.6 – Pesticidas incluídos no método de SPME-GC-MS-MS e respectivos parâmetros de desempenho: sensibilidade, precisão e calibração 221

Tabela 6.7 – Características físico-químicas do solo usado no desenvolvimento do método e das amostras reais 227

Tabela 6.8 – Parâmetros de validação do método USE-GC-(SIM)MS usado na análise de pesticidas em solos: precisão, limites de detecção, recuperações e calibração 229

Tabela 6.9 – Condições instrumentais de GC-MS usadas na análise em modo de monitorização selectiva de iões, incluindo os segmentos de tempo e os iões (m/z) a monitorizar 230

Tabela 6.10 – Concentrações de pesticidas (μg kg^{-1}, peso seco) quantificadas num programa de monitorização de solos em 5 pontos de colheita e 3 profundidades desenvolvido numa zona de horticultura intensiva, na Póvoa de Varzim, durante 1 ano 231

Tabela 6.11 – Condições instrumentais para a análise dos pesticidas seleccionados por GC-MS-MS: isolamento do ião percursor, dissociação induzida por colisão e iões produzidos na fragmentação 241

Tabela 6.12 – Correspondência entre os valores reais das variáveis e os valores codificados gerados pelo desenho experimental composto, incluindo os

pontos factoriais (-1,1), axiais (-2,2) e centrais (0). Factores com significado estatístico e condições de SFE optimizadas 242

Tabela 6.13 – Parâmetros de qualidade do método de extracção de multiresíduos de pesticidas em solos por SFE seguido da análise por GC-MS-MS: sensibilidade, precisão, eficiência e calibração 244

Tabela 6.14 – Pesticidas, e respectivas concentrações, determinados em 5 amostras de solo colhidas em Agosto de 2004, no âmbito de uma amostragem suplementar 245

Tabela 7.1 – Ocorrência de pesticidas em amostras de água subterrânea e sua distribuição de acordo com o valor limite imposto pela Directiva 98/83/CE. Valores de concentração médios, medianos, mínimos e máximos nas amostras 258

Tabela 7.2 – Contaminação das amostras de água acima do valor imposto pela Directiva 98/83/CE e pesticidas detectados, organizados por ponto de colheita 259

Tabela 7.3 – Concentrações das dez amostras mais contaminadas encontradas na ZV1 no período entre Setembro de 2001 e Outubro de 2003 262

Tabela 7.4 – Coeficientes dos componentes principais após rotação Varimax da função canónica, numa análise de PCA 265

Tabela 7.5 – Valor médio ($\mu g\ kg^{-1}$), e respectivo desvio padrão, das concentrações de pesticidas incluídos em cada uma das classes formada pela análise de aglomeração e análise discriminante 275

Tabela 7.6 – Significância estatística das funções discriminantes: lambda de Wilks e teste *F* das médias dos grupos 275

Tabela 7.7 – Função canónica da análise dos componentes principais, após rotação Quartimax, e coeficientes das variáveis predominantes (negrito) nos factores principais 276

Tabela 8.1 – Características físico-químicas das águas naturais e dos solos usados nos estudos de degradação do quinalfos em fase aquosa e adsorvida 282

Tabela 8.2 – Parâmetros típicos de um modelo com cinética de primeira ordem estimados para a degradação do quinalfos por fotólise em meio aquoso 284

Tabela 8.3 – Parâmetros dos modelos de degradação com cinética de dupla primeira ordem ajustados ao processo de fotólise do quinalfos num solo arenoso, franco-arenoso e franco-arenoso em camada fina (375 μm), sujeitos a irradiação solar artificial 285

Tabela 8.4 – Características dos espectros de massa dos subprodutos de fotólise do quinalfos identificados nos estudos efectuados em matrizes de água e solo ... 287

Tabela 8.5 – Concentração efectiva em 50% (EC_{50}), unidades de toxicidade (TU), ajuste das curvas (R^2), desvio padrão residual (Sy.x) e equações teóricas das curvas sigmoidais ajustadas para os ensaios com *V. fischeri* e *P. putida* após 30 minutos de exposição 295

Tabela 8.6 – Valores de toxicidade expressos em % inibição de 4 matrizes diferentes de água analisadas com o ToxAlert 100, contendo o *V. fischeri*, e o Cellsense, contendo *P. putida* 295

Tabela 8.7 – Resultados de toxicidade, expressos como percentagem de inibição da bioluminescência, e concentrações de pesticidas nas mesmas águas subterrâneas analisadas através de SPME-GC-ECD-TSD 297

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 3.1 – Evolução do consumo de pesticidas, em toneladas de s.a., na União Europeia e em Portugal no período compreendido entre 1991 e 2004 55

Figura 3.2 – Quantidades de pesticidas consumidas nos Estados-membros da UE durante o ano de 2001. O Luxemburgo não apresentou resultados 56

Figura 3.3 – Consumo de fungicidas por unidade de área agrícola cultivada, na Europa, em 1996 57

Figura 3.4 – Consumo de herbicidas por unidade de área agrícola cultivada, na Europa, em 1996 57

Figura 3.5 – Consumo de insecticidas por unidade de área agrícola cultivada, na Europa, em 1996 57

Figura 3.6 – Evolução do consumo de pesticidas em Portugal, no período 1991-2004, segundo as principais classes de actividade 58

Figura 3.7 – Repartição percentual dos consumos de pesticidas pelas suas principais categorias, no ano de 2003 59

Figura 3.8 – Gráfico de Pareto com a identificação dos pesticidas mais importantes no panorama dos tratamentos fitofarmacêuticos em Portugal, em 2003 60

Figura 3.9 – Evolução do consumo de pesticidas e da SAU em Portugal (A) e correspondente estimativa da intensidade de aplicação de pesticidas (kg s.a./ha) em Portugal, em comparação com a média da UE-15 (B) 61

Figura 3.10 – Principais mecanismos de distribuição e interacção que influenciam o comportamento dos pesticidas no ambiente 64

Figura 3.11 – Reacções envolvidas nos processos de: A) fotólise directa; B) fotólise indirecta; C) formação de radicais livres de oxigénio e D) fotocatálise heterogénea 73

Figura 4.1 – Componentes de SPME: à esquerda – esquema de uma montagem de SPME; ao centro – pormenor de uma fibra de SPME; à direita – modos de operação de SPME: A - por imersão, B - no "headspace" 106

Figura 4.2 – Diagrama de fases evidenciando as condições de fluido supercrítico 122

Figura 4.3 – Eléctrodo descartável fornecido para o uso com o biossensor Cellsense® 142

Figura 5.1 – Carta topográfica da ZV1 com a representação dos pontos de colheita (1 a 25) 157

Figura 5.2 – Mapeamento de vulnerabilidade da ZV1 segundo o método DRASTIC 160

Figura 5.3 – Variação dos valores da temperatura média semanal mínima e máxima no período entre 28 de Maio de 2001 e 02 de Novembro de 2003, bem como dos valores de precipitação registados na estação meteorológica de Viana do Castelo. 163

Figura 5.4 – Cartas de controlo de indivíduos para os pesticidas mais encontrados nas águas 172

Figura 5.5 – Cartas de controlo de indivíduos para os pesticidas mais frequentes nos solos 175

Figura 5.6 – Evolução dos "z-scores" obtidos na análise de diversos pesticidas incluídos no programa de ensaios interlaboratoriais da Aquacheck 179

Figura 6.1 – Representação gráfica das áreas de pico médias (n=6) obtidas para os OCPs e piretróides (ECD) num estudo comparativo das 3 fibras PDMS-DVB disponíveis 188

Figura 6.2 - Representação gráfica das áreas de pico médias (n=6) obtidas para os OPPs e triazinas (TSD) num estudo comparativo de 3 fibras PDMS-DVB diferentes 189

Figura 6.3 – Cromatograma obtido em ECD após extracção de uma solução aquosa de pesticidas por SPME. A fibra usada foi a PDMS-DVB de 60 μm 190

Figura 6.4 – Cromatograma obtido em TSD após extracção de uma solução aquosa de pesticidas por SPME. A fibra usada foi a PDMS-DVB de 60 μm 191

Figura 6.5 – Eficiência de extracção de 6 fibras de SPME avaliada com base na área média dos picos cromatográficos de cada um dos pesticidas organoclorados .198

Figura 6.6 – Eficiência de extracção de 6 fibras de SPME avaliada com base na área média dos picos cromatográficos obtidos para os pesticidas organofosforados 199

Figura 6.7 - Eficiência de extracção de 6 fibras de SPME representada pela área média dos picos cromatográficos obtidos na análise de triazinas 199

Figura 6.8 – Optimização da temperatura de extracção para a análise de 3 grupos de pesticidas. Foram testadas as seguintes temperaturas: 25, 40, 50, 60 e 70 °C .200

Figura 6.9 – Influência da força iónica da amostra na eficiência de extracção de pesticidas por SPME usando uma fibra PDMS-DVB. Foram ensaiadas as seguintes condições: 0, 3,3, 8,3, 16,7% NaCl e saturação 201

Figura 6.10 – Perfil de extracção dos grupos de pesticidas alvo com o aumento do tempo de ensaio, usando uma fibra PDMS-DVB. Foram testadas as seguintes condições: 30, 40, 50, 60 e 75 minutos. 202

Figura 6.11 – Separação cromatográfica de OCPs e piretróides detectados por ECD, após extracção de uma solução de pesticidas na concentração de 0,1 μg L^{-1} por SPME 205

Figura 6.12 – Separação cromatográfica de OPPs e triazinas detectados por TSD, após extracção de uma solução de pesticidas na concentração de 0,1 μg L^{-1} por SPME 206

Figura 6.13 – Cromatograma obtido em ECD representativo da análise de uma amostra real contendo concentrações diversas de pesticidas 207

Figura 6.14 – Cromatogramas de GC-MS, obtidos em μSIS, após a extracção por SPME de uma solução de pesticidas fortificada com 0,1 μg L^{-1} e uma amostra de água subterrânea contaminada 217

Figura 6.15 – Espectros de MS-MS dos seguintes pesticidas: alacloro, propizamida, clorfenvinfos e endossulfão II, mostrando o padrão de fragmentação obtido nas condições seleccionadas 219

Figura 6.16 – Cromatogramas (extraídos por ião) obtidos na análise por SPME-GC-MS-MS de uma solução aquosa contendo 0,01 μg L^{-1} dos seguintes pesticidas: (a) lindano, (b) paratião-etilo, (c) endossulfão I e (d) endossulfão sulfato 219

Figura 6.17 – Cromatograma de GC-MS-MS, representativo da análise de uma solução padrão de pesticidas contendo 0,1 μg L^{-1} através SPME. Cromatograma de MS-MS obtido para a mesma amostra também analisada por μSIS 220

Figura 6.18 – Mapa da região norte de Portugal evidenciando a Zona Vulnerável n.º 1, onde se localizam os pontos de colheita de solos 227

Figura 6.19 – Cromatograma de GC-MS (modo SIM) obtido na análise de um solo fortificado com pesticidas na concentração de 50 μg kg^{-1}, após a sua extracção por USE nas condições optimizadas 230

Figura 6.20 – Picos cromatográficos obtidos por GC-MS, em modo SIM, de alguns pesticidas detectados na amostra 18 (superfície) em Julho de 2002 e respectivos espectros de massa 233

Figura 6.21 – Representação gráfica da ocorrência de pesticidas e respectivas gamas de concentração em 60 solos colhidos na Póvoa de Varzim entre Setembro de 2001 e Julho de 2002. Apresenta-se também o número de amostras não contaminadas 234

Figura 6.22 – Sobreposição de 3 cromatogramas evidenciando a elevada selectividade conseguida na determinação de pesticidas por SFE-GC-MS-MS: (A) branco de solo, (B) extracto de solo fortificado com 50 μg kg^{-1}, (C) padrão de pesticidas com uma concentração correspondente a 50 μg kg^{-1} 245

Figura 6.23 – Traçado cromatográfico e espectros de MS-MS dos pesticidas presentes na amostra de solo 5, obtidos nas condições optimizadas de SFE-GC-MS-MS .. 246

Figura 6.24 – Gráficos de Pareto mostrando a significância estatística ($p=0,05$) dos efeitos principais (lineares e quadráticos) e as interacções entre variáveis para vários conjuntos de pesticidas considerados na análise das superfícies de resposta 248

Figura 6.25 – Representação das respostas obtidas *versus* respostas previstas com base no modelo de superfície de resposta (CCD) ajustado ao comportamento das diversas variáveis com influência em SFE 248

Figura 6.26 – Algumas superfícies de resposta ajustadas pelo desenho central composto com base nos resultados experimentais obtidos na extracção de pesticidas por SFE 249

Figura 7.1 – Mapa da zona vulnerável n.º 1 definida no âmbito da Directiva 91/676/CEE onde se mostra a localização dos pontos de amostragem usados neste estudo 255

Figura 7.2 – Representação gráfica dos valores absolutos da ocorrência de pesticidas em águas subterrâneas e a respectiva frequência acima do limite regulamentar de 0,1 μg L^{-1} 260

Figura 7.3 – Dendrograma obtido na análise de aglomeração dos 11 pesticidas mais relevantes usando o método de Ward e com base na (distância Euclideana)^2 263

Figura 7.4 – Distribuição geográfica das amostras de acordo com a classificação produzida na análise de aglomeração e posteriormente usada na análise discriminante 264

Figura 7.5 – Mapa da zona vulnerável n.º 1, localizada no norte de Portugal, onde se evidenciam os pontos de amostragem de solo e a distribuição das amostras pelas respectivas classes formadas na análise de aglomeração 273

Figura 7.6 – Dendrograma produzido numa análise de aglomeração das variáveis (pesticidas) usando o método aglomeração de Ward. O grupo formado pelos pesticidas que não foram detectados encontra-se ausente 274

Figura 7.7 – Representação gráfica das amostras de acordo com as funções canónicas discriminantes da análise de LDA, após a sua distribuição em 10 classes. Apenas as variáveis (pesticidas) que contêm informação relevante foram consideradas nas funções discriminantes 276

Figura 8.1 – Curvas de degradação com cinética de primeira ordem obtidas nos estudos de fotólise do quinalfos em meio aquoso e em condições de irradiação solar simulada 284

Figura 8.2 – Comportamento fotoquímico do quinalfos no solo. Curvas de dissipação em condições de irradiação solar simulada e na ausência de luz para os vários tipos de solo 286

Figura 8.3 – Curvas de inibição da *Pseudomonas putida* e do *Vibrio fischeri* após 30 minutos de exposição das bactérias a soluções padrão de pesticidas 294

Figura 8.4 – Toxicidade expressa como percentagem de inibição da bioluminescência do *Vibrio fischeri* em 4 tipos de água diferentes, sem fortificação e após fortificação com as misturas de pesticidas M1 e M2 296

Figura 8.5 – Toxicidade expressa como percentagem de inibição da *Pseudomonas putida* em 4 tipos de água diferentes, sem fortificação e após fortificação com a mistura de pesticidas M3 297

Capítulo 1

INTRODUÇÃO GERAL

1.1 OS PESTICIDAS NO AMBIENTE

A utilização de substâncias de natureza diversa com fins pesticidas, quer sejam elas naturais ou sintéticas, orgânicas, inorgânicas ou até mesmo agentes biológicos, não é recente. Na verdade, existem relatos da aplicação de substâncias com vista a proteger as culturas das pragas com milhares de anos (1). Contudo, apenas a história recente pôs em grande evidência a sua importância do ponto de vista económico, ao nível da produção industrial e nos ganhos de produtividade e qualidade dos produtos agrícolas. A revolução gerada nas práticas agrícolas com a introdução massiva de pesticidas na agricultura, que teve lugar em meados do século XX, e as enormes expectativas criadas quanto à satisfação das necessidades de bens alimentares para uma população crescente depressa sofreram um rude golpe com a descoberta de que os pesticidas não eram substâncias completamente inofensivas como até aí se pensava ou se esperava que fossem. A partir daí, e com a experiência obtida, infelizmente em muitos casos altamente penalizadora para ambiente, ecossistemas naturais e para o Homem, foi estabelecido um critério muito mais exigente para a aceitação de substâncias com potencial acção pesticida. Estas deverão apresentar vantagens relativamente às suas predecessoras, entre as quais, evidenciar alta selectividade no efeito biológico para o organismo alvo. Afinal, muitos dos mecanismos biológicos considerados na actividade dos pesticidas, de que é exemplo o bloqueio da transmissão do impulso nervoso produzido pelos pesticidas organofosforados e carbamatos, também ocorrem em organismos não alvo, que habitam o meio aquático ou terrestre, entre eles o Homem (2).

No passado, já 25 anos depois da introdução dos pesticidas orgânicos sintéticos, o conhecimento dos seus efeitos no ambiente aquático era reconhecidamente insuficiente. Apesar dos desenvolvimentos extremamente significativos que este assunto tem sofrido recentemente, mantém-se longe de estar completamente explorado, dada a multiplicidade de condições ambientais possíveis e da complexa dependência do comportamento dos

pesticidas relativamente aos factores bióticos e edáficos. Para esta situação concorre também o facto de a indústria dos pesticidas estar em contínua evolução.

Os resíduos de pesticidas no ambiente podem originar um ou mais dos seguintes efeitos nefastos (3):

i) ruptura do equilíbrio natural, com extinção progressiva de espécies susceptíveis (alvo e/ou não alvo) e, eventualmente, aumento populacional de espécies que anteriormente eram presas das agora extintas;

ii) selecção de indivíduos, ou de espécies, mais resistentes aos pesticidas, cujo controlo deixa de ser eficaz;

iii) acumulação de produtos tóxicos estáveis na água, no solo e nos alimentos com efeitos directos nos organismos vivos ou indirectamente através da acumulação nas cadeias tróficas;

iv) perigos para o Homem e seus descendentes, a curto, médio ou longo prazo.

As propriedades carcinogénicas, mutagénicas e teratogénicas dos pesticidas, bem como a sua persistência e bioacumulação nos ecossistemas da Terra fazem destes compostos um dos grupos de substâncias químicas mais tóxicas a que o homem está exposto (4). Em 1987, a IARC (International Agency for Research in Cancer) classificou alguns pesticidas e seus produtos de degradação como potenciais agentes carcinogénicos para o Homem (5). Verificou-se ainda que, pequenas doses de pesticidas constituem uma importante ameaça para o equilíbrio das populações animais (2, 6). Diversos estudos efectuados tendo em consideração apenas a toxicidade aguda levaram a uma subavaliação dos efeitos tóxicos dos pesticidas. Por vezes, mesmo em áreas de intensa utilização de pesticidas a mortalidade não se verifica imediatamente. A acumulação de pesticidas pode ocasionar mortalidade tardia ou, redução da capacidade reprodutiva, do ritmo de crescimento ou da capacidade que os seres aquáticos têm de enfrentar alterações de pH, temperatura e oxigénio dissolvido no meio.

Desde a década de 60 que começou a ser estabelecida uma relação entre a contaminação das águas naturais e a detecção de pesticidas, principalmente organoclorados, nos tecidos de alguns seres vivos. Os organismos aquáticos e, indirectamente, algumas aves que se alimentavam de peixe foram os primeiros a sofrer os efeitos negativos dos pesticidas, dando origem à criação de um novo conceito - bioacumulação (7). Mas, nem só a vida selvagem é alvo dos efeitos dos pesticidas. Desde finais da década de 70 que a contaminação das águas tem vindo a merecer uma preocupação crescente, em parte devido ao maior número de pesticidas detectados. Têm sido implementadas iniciativas legislativas cada vez mais restritivas com vista à protecção das origens de água para consumo humano, com especial relevo nos países mais desenvolvidos da América e da Europa. A detecção de resíduos de

pesticidas, principalmente herbicidas, nas origens de águas potável representaram uma evidência clara da falta de conhecimento exacto dos mecanismos que regem o seu comportamento, levando ao aparecimento de uma área da ciência dedicada ao estudo do ciclo de vida – transporte e dissipação – dos pesticidas (8). Após a sua aplicação, usualmente apenas uma pequena parte dos pesticidas é responsável pelo efeito biológico esperado, enquanto que uma parte significativa acaba por se distribuir no solo, ar e água. A presença de pesticidas no solo gera paralelamente duas preocupações principais: a lixiviação para as águas subterrâneas e a possibilidade de escorrimento para os lagos, rios e diques existentes na zona envolvente. O problema do escorrimento e contaminação das águas superficiais precedeu as atenções actuais mais viradas para as águas subterrâneas (9). A partir dos relatos de contaminação das águas subterrâneas com pesticidas nos Estados Unidos da América (EUA) e na Europa, resultante do seu uso na agricultura, a comunidade científica está cada vez mais interessada em entender os mecanismos que regem o processo de lixiviação. Tal será também útil, por outro lado, para poder prever o comportamento que novas moléculas irão apresentar (10, 11).

Ultimamente, tem-se tentado implementar novas estratégias mais benignas para o ambiente baseadas no uso de práticas agrícolas inovadoras e/ou de novas variedades de plantas mais resistentes ao ataque pelos infestantes. Assim, têm sido propostas como opções o uso de organismos predadores, agentes microbianos e modificação genética das plantas, mas neste momento ainda não constituem alternativas dada a grande rapidez de acção, abundante disponibilidade comercial e relação custo/benefício encontrada nos pesticidas sintéticos (12). Uma outra razão que justifica o seu lento processo de aceitação e uso efectivo prende-se com o facto de apresentarem algumas desvantagens e, também nestes casos, não existirem estudos exaustivos que ponham de parte de forma inequívoca todo e qualquer efeito nefasto imprevisível a longo termo.

De realçar que, os pesticidas, substâncias intrinsecamente criadas para provocar algum tipo de efeito tóxico ou mesmo letal em espécies de seres vivos alvo, estão hoje em dia ao alcance de qualquer pessoa. Se é certo que a esmagadora maioria dos pesticidas vendidos se destina à agricultura, outros porém encontram utilização a nível doméstico, em campanhas de sanitização, na manutenção de espaços exteriores ou mesmo directamente no meio aquático para reduzir a proliferação de algas. Assim, não é de estranhar que grande parte do meio que nos rodeia esteja, em algum grau, inquinado com resíduos de pesticidas.

A partir do momento da aplicação do pesticida, o seu tempo de vida, produtos de transformação e transporte passam a ser inteiramente determinados pelas características

intrínsecas da molécula e da sua associação com diversos factores bióticos e abióticos (13). Uma vez que está demonstrado que, em certas condições, os pesticidas podem efectivamente contaminar as águas subterrâneas, existe a consciência de que sendo a actividade biológica nessas águas relativamente baixa devido aos baixos teores de oxigénio acompanhados da ausência de luz, os pesticidas encontram condições favoráveis de permanência e acumulação durante longos períodos de tempo. Contudo, a actividade biológica não está totalmente ausente, variando de aquífero para aquífero e, por consequência, existem evidências suficientes para considerar que as concentrações embora já de si baixas não se manterão estáveis (9). Ainda assim, certamente que a intervenção para recuperação dessas águas que não seja por mecanismos naturais se afigura de execução impossível, o que reforça a necessidade de protecção das águas.

O grau de alerta público que se verifica relativamente ao uso de pesticidas encontrará, porventura, fundamentos no facto de os resíduos da sua aplicação poderem contaminar bens que todos consideramos essenciais ou mesmo vitais, como são os alimentos ou a água (14). A esta motivação que, além de racional é também instintiva, no sentido de assegurar a qualidade dos bens necessários à subsistência, acresce a sua não inevitabilidade.

Mohr, citado por Stephenson, define de forma curiosa um comportamento encontrado nas sociedades mais desenvolvidas a que chama de "The Mental Affluence Trap" (15). Segundo este conceito, a disponibilidade das pessoas para aceitar novas tecnologias é inversamente proporcional ao seu grau de bem-estar social. Aplicado ao tema dos pesticidas, permite explicar a atitude que evidenciam em relação a estes e, de forma simplista, a diferença entre países desenvolvidos e em vias de desenvolvimento. Assim, a opinião pública em países em desenvolvimento deverá favorecer o seu uso, de forma a melhorar a qualidade de vida (ex.: saúde e alimentação), enquanto que nos países desenvolvidos poder-se-á registar alguma resistência ao uso de pesticidas, no sentido de preservar a boa qualidade de vida que usufruem, pelo conhecimento dos perigos a eles associados (15).

Se as vantagens do uso de pesticidas são inquestionáveis, e até certo ponto a sua utilização se torna indispensável, não deverá a contaminação ambiental ser aceite como algo inevitável. Na formação de uma consciência critica intervêm, por vezes, grupos de influência com interesses na prevalência de um alarmismo exacerbado ou, pelo contrário, numa aceitação pacífica dos pesticidas, em que os produtores, ambientalistas e os meios de comunicação social desempenham diferentes papeis. Qualquer juízo sobre o uso de pesticidas implica que se tenham em conta as suas vantagens e desvantagens, não podendo ignorar-se pela sua relevância os enormes benefícios económicos e para a saúde humana que

o controlo dos insectos comporta (16). As instituições que deverão merecer maior crédito neste âmbito são as instituições supranacionais como a Organização para a Alimentação e Agricultura (FAO) e a Organização Mundial de Saúde (OMS), que são sustentadas por um painel de especialistas de prestígio reconhecido. A comunidade científica mantém-se em permanente diálogo no sentido de garantir que os potenciais benefícios ou malefícios de novas substâncias sejam demonstrados de forma transparente, em ensaios bem controlados e bem definidos. Contudo, a vocação dos cientistas por vezes falha na comunicação da verdade objectiva com o mundo exterior, que ultrapassa os círculos daqueles que entendem a sua linguagem. O conhecimento reduzido que a maior parte das pessoas tem sobre o extenso processo a que qualquer substância química sintética é submetida até obter licença de comercialização concorre para os receios que são genericamente sentidos relativamente aos pesticidas. Este efeito aparece ampliado pela imagem negativa a que desde cedo ficaram associados, e que dificilmente será ultrapassada, sendo os efeitos nocivos do DDT recorrentemente citados como paradigmáticos da vertente malévola dos pesticidas. Contudo, mesmo a utilização do DDT proporcionou enormes benefícios, e a OMS estimou que o seu uso terá permitido poupar 25 milhões de vidas humanas (16, 17).

Em face da longa experiência do uso de pesticidas, a questão que se coloca actualmente não é a proibição indiscriminada da sua utilização mas, tanto quanto possível, proceder à substituição de algumas substâncias por outras que sejam seleccionadas pela sua eficácia combinada com a sua segurança e inocuidade para o solo, água e seres vivos (16). Os objectivos passarão pela produção de substâncias que sofram degradação originando compostos não tóxicos, que em condições ambientais apresentem tempos de semi-vida de alguns dias em vez de semanas, ou que sofram adsorção (ou eventualmente precipitação) a um pH próximo da neutralidade (18). Têm também sido desenvolvidos estudos com vista à utilização de técnicas de descontaminação baratas e sem subprodutos perigosos, baseadas em processos avançados de oxidação (AOP) para efectuar a destruição de resíduos (19) e remediação de locais actualmente contaminados com quantidades massivas de pesticidas. Diversos países dispendem quantias extremamente avultadas na tentativa de recuperar locais afectados por poluição, que pelos mecanismos naturais demorariam centenas de anos a recuperar. No ano 2000, os Países Baixos investiram 550 milhões de euros em descontaminação, a Áustria 67 milhões e a Espanha 14 milhões (20).

1.2 MONITORIZAÇÃO AMBIENTAL

O estudo da presença de pesticidas nas águas subterrâneas é relativamente recente, enquanto que a presença destes nas águas superficiais é conhecida desde o início da década de 70. O pensamento comum, anterior a meados dos anos 70, atribuía ao solo a função de filtro protector impedindo que estas substâncias atingissem as águas subterrâneas. Contudo, vários estudos posteriores demonstraram que este pressuposto não se verificava. Nos EUA este problema começou a ser levantado quando em 1979 foram detectados múltiplos casos de contaminação com aldicarbe e DBCP (1,2-dibromo-3-cloropropano), e mais tarde o EDB (dibrometo de etileno). O mesmo problema estendeu-se depois ao Canadá e a alguns países europeus, entre eles a Holanda e a Alemanha, onde começaram a surgir resultados de contaminação, em meados da década de 80, atribuídos ao efeito da agricultura (21). No Reino Unido foi identificada também uma importante contribuição devida à aplicação de herbicidas, nomeadamente a atrazina, em estradas, caminhos-de-ferro e zonas envolventes de áreas industriais (22).

Actualmente é consensual que as águas subterrâneas são susceptíveis de contaminação por substâncias químicas provenientes da agricultura, indústria e deposição de resíduos. A agricultura é considerada a principal fonte de contaminação difusa das águas subterrâneas. Diversas instituições emitiram relatórios sobre a contaminação das águas subterrâneas e o papel da agricultura, entre elas, a Organização para a Cooperação e o Desenvolvimento Económico (OCDE), Sociedade de Química Americana (ACS), União Internacional de Química Pura e Aplicada (IUPAC) e Serviços Geológicos dos EUA (USGS) (18, 23). Mais recentemente, o conceito de desenvolvimento sustentável em matéria de ambiente abrange também a protecção dos solos da degradação provocada pelas actividades humanas e, em particular, a contaminação com compostos orgânicos dificilmente degradáveis, de que são exemplo os pesticidas, bifenilos policlorados (PCBs) e policlorodibenzo-p-dioxinas (PCDD). A União Europeia (UE) reconhece a necessidade de preservar a qualidade do recurso solo que, apesar de ser tão importante como a água ou o ar com os quais, aliás, mantém uma estreita interligação, tem sido largamente negligenciado. Neste sentido, os programas de monitorização desempenharão um papel extremamente importante, quer na descrição do seu estado real quer na avaliação do impacto das medidas entretanto implementadas (20).

Para lá das considerações toxicológicas e ecológicas que o uso de pesticidas suscita, também enquanto consumidores não existe o mais pequeno interesse na presença de pesticidas na água e alimentos, uma vez que estes não apresentam qualquer valor nutricional

e os potenciais efeitos adversos na saúde são altamente relevantes. No entanto, no estado actual de desenvolvimento das ciências agrárias considera-se necessário o recurso aos pesticidas para proporcionar um fornecimento adequado de alimentos, em quantidade e qualidade, resultando por vezes resíduos dessa prática. Um juízo consciente desta situação obriga a que se tomem todas as medidas necessárias para garantir que os resíduos eventualmente presentes no ambiente não produzam consequências irremediáveis no seu equilíbrio e que não excedam, em qualquer caso, os níveis estritamente necessários (24).

A OMS produziu definições precisas de perigo e risco com significados diferentes que devem ser usadas quando se pretende avaliar o impacto de substâncias químicas potencialmente nocivas (24). A aplicação destas definições ao caso concreto dos pesticidas origina um cenário que se pode descrever da seguinte forma: são diversos os estudos que atestam a perigosidade de certas substâncias usadas como pesticidas, a confirmá-lo estão as listas de substâncias perigosas prioritárias estabelecidas pelos organismos competentes na definição da ameaça para a saúde pública, sejam eles a OMS, UE ou USEPA. O perigo que determinada substância comporta é função das suas características físico-químicas. Por seu lado, a percepção do risco que os pesticidas representam está dependente da efectivação do perigo que encerram através da exposição de organismos susceptíveis (24, 25). Assim, muitas das vertentes em que os pesticidas possam representar perigo são estudadas no processo de caracterização do potencial pesticida, enquanto que o risco de provocar efeitos negativos no ambiente e nos organismos vivos é dado por programas de monitorização nos diversos compartimentos ambientais. Os programas de monitorização diferem conforme o objectivo que se pretende atingir, podendo ser assim divididos:

a) estudos retrospectivos de larga escala – permitem averiguar os problemas de contaminação da água e do solo após o uso de pesticidas nas condições preconizadas.
b) estudos retrospectivos de pequena escala – permitem averiguar se resíduos de uma dada substância permanecem nos solos ou atingiram as águas subterrâneas, em zonas com um historial bem conhecido de aplicação de pesticidas
c) estudos prospectivos de pequena escala – servem para tentar caracterizar o potencial que determinado pesticida possa ter, em condições normais de utilização, para originar resíduos persistentes no ambiente e/ou contaminar as águas subterrâneas.

Geralmente os programas de monitorização de pesticidas no meio terrestre podem dividir-se em duas áreas: estudos de degradação e movimento na zona não saturada e, estudo na zona saturada seguindo as concentrações e movimentos de manchas de contaminantes. Em qualquer caso, o estudo das águas subterrâneas dá imediatamente o pior cenário da

contaminação (26). É de esperar que, mais estudos e que envolvam um maior número de pesquisas possam originar uma maior frequência de casos positivos (21).

Na passagem de 40 anos após o primeiro alerta das consequências ambientais da utilização de pesticidas, com a publicação do livro "Silent Spring" por Rachel Carson em 1962, deve reconhecer-se que a química analítica sofreu um forte impacto destes relatos, que condicionaram decisivamente o papel que actualmente desempenha na segurança ambiental e alimentar. Praticamente nenhuma área da química analítica lhes foi indiferente, surgindo novos desenvolvimentos adaptados à pesquisa de pesticidas em águas, solos, alimentos e tecidos, que constituem o arsenal analítico tal como o conhecemos hoje (16). Salientam-se as técnicas de extracção e de concentração, as técnicas de separação dos analitos e os modos de detecção que tornaram possível a determinação de quantidades de partes por bilião, ou inferiores, em matrizes razoavelmente complexas. Possivelmente, a química analítica não gozaria da capacidade analítica que detém hoje, não fossem os problemas levantados pelos pesticidas e as suas consequências legislativas. Os programas de monitorização constituem já uma ocupação muito significativa dos laboratórios de análises contudo, o crescente número de pesticidas a pesquisar, as variadas matrizes ambientais e o número infinito de possíveis pontos de monitorização reduzem os programas em curso a uma porção ínfima do que seria desejável implementar.

Com a necessidade de alargamento do âmbito dos programas de monitorização geram-se custos analíticos aumentados, pelo que há uma clara necessidade de metodologias analíticas automáticas, rápidas e económicas para fazer face a esta demanda (8). Os encargos monetários inerentes à realização de estudos abrangentes poderão ser reduzidos se se tiver em conta o potencial de lixiviação dos diversos pesticidas, e se os programas de amostragem forem concebidos racionalmente, suportados por critérios de distribuição estatisticamente válida. Uma amostragem preliminar poderá fornecer informação sobre os contaminantes permitindo focalizar o estudo. Outra contribuição para a contenção de custos poderá advir da implementação de técnicas analíticas multiresíduo que permitam aumentar o rendimento analítico. A actividade dos laboratórios encarregados destes ensaios, por seu lado, é também passível de originar resíduos, nomeadamente solventes clorados tóxicos, prejudiciais para o ambiente. Esta consciência impõe um requisito adicional para os métodos analíticos do futuro: que sejam inócuos para o ambiente baseados em técnicas limpas ou "verdes".

Actualmente, tem sido atribuída uma importância crescente aos estudos de modelação. Com base nas propriedades físico-químicas conhecidas de certos pesticidas e com algumas constantes relativas à sua interacção e distribuição nos diversos compartimentos ambientais,

é possível gerar modelos matemáticos que permitam estimar o comportamento dessas substâncias no ambiente. Se é verdade que a modelação ambiental é responsável por progressos significativos na capacidade de prever que pesticidas geram maiores preocupações, fornecendo indicações preciosas no planeamento dos programas de monitorização, também é certo que a avaliação de amostras reais é insubstituível fornecendo os resultados mais precisos e exactos, necessários à gestão dos recursos naturais (21). A vigilância e prevenção do risco ambiental associado ao uso de pesticidas assumem um papel preponderante na sociedade actual, tanto mais que o tratamento ou remediação das águas ou solos contaminados é tecnicamente difícil e/ou apresenta custos muito elevados (20, 27).

1.3 Estudo dos pesticidas na Zona Vulnerável nº 1: objectivos

A atenção que as questões ambientais merecem actualmente constitui uma excelente oportunidade para o surgimento de tecnologias inovadoras. Os pesticidas são um dos grupos de contaminantes ambientais que reúne esforços de investigação mais alargados por todo o mundo, em particular nos países em que agricultura constitui uma utilização muito expressiva do solo, como é a zona mediterrânica. Contudo, como quase todos os avanços que emanam da ciência, as metodologias desenvolvidas têm que ultrapassar uma série de barreiras até encontrarem aceitação generalizada e uso efectivo em estudos ambientais (28). A investigação detém um papel importante de suporte às decisões legislativas e na definição do equilíbrio entre os diversos interesses que se geram em torno das questões ambientais, quer sejam económicos, ambientalistas ou políticos.

O trabalho que foi desenvolvido, e que constitui o objecto desta dissertação, encontra-se divido em diferentes áreas de estudo onde se pretendeu fornecer uma contribuição em ambas as vertentes da acção dos pesticidas - perigo/risco. Os estudos por nós efectuados contemplam a utilização de metodologias avançadas ou estratégias inovadoras para fazer a caracterização das propriedades toxicológicas e distribuição no ambiente de diversos pesticidas com actividades biológicas e propriedades físico-químicas distintas, nos compartimentos da hidrosfera (águas subterrâneas) e litosfera (solos).

Com estes estudos pretendeu-se contribuir para a caracterização de diversos aspectos relevantes do comportamento, destino e impacto da aplicação de pesticidas, tomando como zona alvo, a Zona Vulnerável nº. 1 (ZV1), definida por uma Portaria ministerial, e que inclui uma vasta área de características únicas conhecida como a zona das "masseiras da Póvoa de

Varzim". A ZV1 foi delimitada em território nacional na sequência da publicação de legislação na UE, para fazer face aos problemas de contaminação das águas subterrâneas por nitratos de origem agrícola em zonas especialmente sensíveis (29). A ZV1 constitui um espaço geográfico particularmente atractivo para a realização de estudos ambientais relacionados com os pesticidas em resultado da sua elevada vulnerabilidade à contaminação, para a qual contribuem as propriedades hidrogeológicas dominantes e a especificidade das práticas agrícolas que aí têm lugar.

Adoptando uma abordagem multidisciplinar das preocupações que a utilização de pesticidas suscita, foram previstos os temas de estudo que se apresentam a seguir. Estes serão explorados no decurso da presente dissertação com vista a responder aos três tópicos chave em estudos ambientais: ocorrência, toxicidade e comportamento.

1 – Desenvolvimento de métodos de análise de rotina para a determinação de quantidades vestigiárias de pesticidas, e seus produtos de degradação, em amostras de água subterrânea. Os compostos seleccionados fazem parte das listas de poluentes prioritários da UE e pertencem ao grupo dos pesticidas persistentes (POPs) e pesticidas com aplicação dominante na zona de estudo. Enquadram-se nestas características alguns elementos das famílias de pesticidas organoclorados, organofosforados, triazinas, piretróides, cloroacetanilidas, 2,4-dinitroanilinas, entre outros. No desenvolvimento de métodos multiresíduo deu-se preferência à aplicação da microextracção em fase sólida (SPME), técnica de preparação de amostras inovadora em análise ambiental, sempre que esta se mostrou adequada aos fins em vista. A análise cromatográfica das amostras de água subterrânea foi efectuada com recurso à cromatografia gasosa (GC), acoplada a diferentes detectores – detector de azoto e fósforo (NPD), detector de captura electrónica (ECD) e espectrómetro de massa (MS), de forma a efectuar a identificação, quantificação e confirmação dos pesticidas presentes.

2 – Desenvolvimento de métodos analíticos para a determinação de quantidades vestigiárias de pesticidas e produtos de degradação em solos, com vista à aplicação a amostras da zona de estudo. A pesquisa e quantificação em diferentes matrizes de solos dos mesmos pesticidas também analisados em águas envolveu uma fase prévia de extracção e concentração através de técnicas de ultra-sons ou por fluidos supercríticos (SFE). As características particulares dos fluidos supercríticos, aliadas à necessidade de reduzir o uso de solventes orgânicos nos métodos analíticos, justificam a preferência por esta técnica (30). A análise cromatográfica dos extractos processou-se através de cromatografia gasosa associada à espectrometria de massa.

3 – Avaliação da contaminação por pesticidas e produtos de degradação em águas subterrâneas e solos provenientes da ZV1, onde se desenrolam diversas actividades agrícolas das quais se destaca o sistema de horticultura intensiva em masseiras. A amostragem de águas subterrâneas e de solos teve por base o sistema de controlo da qualidade das águas subterrâneas implantado pelo Ministério do Ambiente na ZV1, sendo constituído por 23 pontos estrategicamente distribuídos de modo a fornecer um conjunto de amostras representativo das assimetrias verificadas nas actividades culturais e características dos terrenos agrícolas. A amostragem principal foi planeada com uma periodicidade aproximadamente trimestral prolongando-se por um período de dois anos.

4 – A monitorização de matrizes ambientais numa vasta área geográfica, para um número elevado de possíveis contaminantes e durante um período de tempo alargado, resultou numa base consistente de resultados sobre a ocorrência de pesticidas, inexistente até ao momento para esta zona geográfica. O objectivo principal foi a obtenção de uma quantidade de resultados significativa para a avaliação da contaminação por pesticidas em águas subterrâneas e solos, bem como a inferência sobre as tendências sazonais e geográficas, e a sua complexa relação com as estratégias de cultura. A interpretação desse conjunto de resultados foi efectuada mediante a aplicação de métodos quimiométricos que evidenciaram as tendências mais relevantes encontradas no padrão de distribuição dos pesticidas, permitindo interpretar eventuais razões subjacentes a essa ocorrência.

5 – Implementação de um sistema de controlo da qualidade dos resultados obtidos no decurso do projecto de monitorização através da participação em ensaios interlaboratorias promovidos por uma instituição de credibilidade reconhecida, a Aquacheck (Bury, Lancashire, Reino Unido), para a determinação de poluentes orgânicos em águas. A participação em ensaios interlaboratoriais dirigidos à análise de pesticidas da família dos organoclorados, organofosforados e triazinas, em águas subterrâneas, conjugou o duplo objectivo de aferir o funcionamento dos métodos analíticos usados na determinação de pesticidas em amostras reais e, simultaneamente, efectuar a validação dos métodos baseados na técnica de SPME de forma a demonstrar a sua validade como alternativa às actuais técnicas de preparação de amostras para análise de micropoluentes ambientais.

6 – Utilização de biossensores na avaliação do potencial impacto ecotoxicológico resultante da presença de pesticidas em matrizes ambientais. Os biossensores são aparelhos contendo um elemento biológico indicador da intensidade do efeito tóxico e poderão constituir a resposta à necessidade de um alerta precoce de dano ambiental (31). Devido

principalmente à sua versatilidade de funcionamento, os biossensores apresentam alto potencial para aplicações de "screening". Dependendo da sua especificidade, podem analisar a toxicidade total de uma matriz ou quantificar parâmetros químicos ou biológicos (32).

7 – Estudo da cinética de degradação de um pesticida representativo de uma família química com grande interesse nas actuais práticas fitossanitárias. A compreensão dos mecanismos de degradação dos pesticidas passa pelo estudo do impacto dos factores ambientais, tais como a luminosidade, a temperatura, o pH e a presença de substâncias dissolvidas e particuladas (33, 34). Foram efectuados estudos de simulação, em ambiente laboratorial, do efeito da luz solar na velocidade de fotodegradação do quinalfos, quer em meio aquoso quer adsorvido no solo. As experiências em condições laboratoriais bem controladas permitem estudar o comportamento de um pesticida face a um factor isolado de dissipação contudo, seria desejável complementar estes estudos com ensaios de campo.

Com estes estudos, fica contemplada a avaliação da contaminação por pesticidas e seus produtos de degradação em águas subterrâneas e solos da ZV1, permitindo construir uma base de dados para a região, que pode ser interligada com os estudos em curso efectuados pelas entidades competentes, no âmbito da aplicação da Directiva 91/676/CEE, de 12 de Dezembro (29). A estes estudos acrescem os ensaios de dissipação e de impacto ambiental efectuados para pesticidas com interesse na região. A relevância destes estudos pode situar-se a três níveis diferentes:

a) aquele que se relaciona com a zona particular em estudo, caracterizada por uma cultura intensiva que se desenvolve numa região com vulnerabilidade hidrogeológica demonstrada à contaminação com substâncias passíveis de sofrerem lixiviação.
b) aquele que se relaciona com as metodologias usadas, baseadas em técnicas que dispensam totalmente o uso de solventes orgânicos ou o reduzem drasticamente, para a análise de águas e de solos. Por seu lado, as determinações instrumentais usadas encontram-se entre as mais avançadas para análise de pesticidas permitindo fazer a quantificação de níveis vestigiários com elevada precisão, exactidão e confirmação inequívoca da sua identidade.
c) aquele que se relaciona com as conclusões a extrair do programa de monitorização, que inclui um número suficiente de amostras ambientais para permitir evidenciar as variações na natureza e concentração dos contaminantes segundo a sua distribuição geográfica, variação sazonal, dependência das culturas praticadas e relação entre a contaminação dos solos e das águas subterrâneas.

1.4 ORGANIZAÇÃO DA DISSERTAÇÃO

A presente dissertação encontra-se organizada em Capítulos onde é desenvolvido cada tema individual, incluindo também as respectivas conclusões e bibliografia. Os capítulos 6, 7 e 8 são constituídos por publicações científicas em revistas internacionais onde se apresentam os trabalhos experimentais que tiveram lugar e os respectivos resultados.

No Capítulo 1, "Introdução geral", onde se insere esta secção, foi feita uma caracterização dos pesticidas como contaminantes ambientais, relatando as razões do seu uso e os perigos que daí decorrerem para os ecossistemas naturais e para a saúde humana. Foram também exploradas as razões que sustentam a necessidade de monitorização ambiental com vista a avaliar os impactos negativos dos pesticidas. Este capítulo comporta ainda diversas estratégias com que a química analítica pode contribuir para a caracterização dos pesticidas, tendo sido efectivamente usadas para produzir um trabalho válido e consequente nesta área.

No Capítulo 2, "Usos e características dos pesticidas", faz-se uma caracterização completa dos pesticidas enquanto produtos essencialmente químicos, salientando-se a evolução que têm sofrido ao longo da história, bem como a crescente importância que lhes tem sido atribuída. O reconhecimento de importantes efeitos adversos associados a alguns pesticidas fomentou o seu contínuo desenvolvimento e gerou a necessidade de apertada regulamentação que será também abordada.

No Capítulo 3, "Presença e comportamento ambiental dos pesticidas", faz-se uma revisão do mercado de pesticidas e tendências de evolução verificadas nos últimos anos, com incidência a nível mundial, europeu e em Portugal, na perspectiva de que o consumo de pesticidas se reflecte na pressão de contaminação ambiental. Depois de serem usados, restam no ambiente resíduos de pesticidas que têm um comportamento próprio, que deve ser alvo de estudo. Por fim, faz-se uma revisão do estado de contaminação das águas e dos solos.

No Capítulo 4, "Análise de pesticidas em amostras ambientais", apresentam-se as técnicas disponíveis para a análise de pesticidas em águas e solos, com especial relevo nas metodologias avançadas e com reduzido consumo de solventes orgânicos que mereceram preferência nos estudos efectuados. Para além das técnicas de preparação de amostras e das técnicas cromatográficas, abordam-se também os biossensores.

No Capítulo 5, "Monitorização de pesticidas na Zona Vulnerável nº 1", descreve-se a zona de monitorização e faz-se a sua caracterização em termos hidrogeológicos, climáticos, culturas dominantes e práticas fitossanitárias. São ainda mencionados os métodos analíticos empregados e os procedimentos de validação e controlo de qualidade usados.

No Capítulo 6, "Desenvolvimento de métodos analíticos avançados para a determinação de pesticidas em águas e solos", relata-se o trabalho de desenvolvimento de métodos para a análise de multiresíduos de pesticidas, nomeadamente através de processos de extracção ditos "amigos do ambiente" para a aplicação a amostras de água (SPME) e solos (SFE). A sua adequação à análise de matrizes ambientais é demonstrada através de um processo de validação completo.

No Capítulo 7, "Resultados da monitorização de pesticidas em águas e solos da Zona Vulnerável n.º 1, no período 2001-2003", apresentam-se os resultados finais do programa de monitorização levado a efeito naquela zona e é feita a sua interpretação através de métodos estatísticos quimiométricos.

No Capítulo 8, "Estudo do comportamento e efeitos dos pesticidas no ambiente", são desenvolvidas duas contribuições nesta área. A primeira é dedicada ao estudo da degradação do quinalfos através de fotólise em águas e solos, enquanto que a segunda descreve os efeitos ecotoxicológicos de vários pesticidas avaliados através de dois biossensores.

No Capítulo 9, "Conclusões finais", apresentam-se as conclusões mais relevantes sobre as diferentes fases em que este trabalho decorreu, nomeadamente, o desenvolvimento de técnicas analíticas avançadas, a monitorização de pesticidas em águas e solos e o estudo do seu comportamento no ambiente.

1.5 BIBLIOGRAFIA

(1) Waxman, M.F. – The Agrochemical and Pesticides Safety Handbook, CRC Press LLC, Boca Raton, FL, USA, 1998.

(2) Stenersen, J. – Chemical Pesticides: Mode of Action and Toxicology. CRC Press, Boca Raton, FL, USA, 2004.

(3) Mendes, B., Oliveira, J.F.S. – Qualidade da Água para Consumo Humano, Lidel, Lisboa, 2004, p. 444.

(4) Biziuk, M., Przyjazny, A., Czerwinsky, J., Wiergovski, M. – Occurrence and determination of pesticides in natural and treated waters. J. Chromatogr. A, 754 (1996) 103-123.

(5) IARC Monographs, Vol 54, Suppl. 7, International Agency for Research in Cancer, Lyon, França, 1987, pp. 40-47.

(6) Delpuech, J.-M., Gareau, E., Terrier, O., Fouillet, P. – Sublethal effects of the insecticide chlorpyrifos on the sex pheromonal communication of *Trichogramma brassicae*. Chemosphere, 36 (1998) 1775-1785.

(7) Robinson, J., Richardson, A., Crabtree, A.N., Coulson, J.C., Potts, G.R. – Organochlorine residues in marine organisms, Nature, 214 (1967) 1307-1311.

(8) Barceló, D., Hennion, M-C. - Trace determination of pesticides and their degradation products in water. Elsevier Science B. V, Amsterdão, Holanda, 1997.

(9) Roberts, T.R. - Environmental fate of pesticides: a perspective. In: D. H. Hutson, T. R. Roberts (Eds.), Environmental Fate of Pesticides, Volume 7, Progress in Pesticide Biochemistry and Toxicology, John Wiley and Sons, Chichester, UK, 1990, pp. 1-12.

(10) Aharonson, N., Cohen, S.Z., Drescher, N., Gish, T.J., Gorbach, S., Kearney P.C., Otto, S., Roberts T.R., Vonk, J.W. - Potential contamination of groundwater by pesticides, Pure Appl. Chem., 59 (1987) 1419-1446.

(11) Cohen, S.Z. Carsel, R.F., Creeger, S.M., Enfield C.G. - Potential for pesticide contamination of ground water from agriculture uses, In: R.F. Kreuger and J.N. Seiber (Eds.), Treatment and Disposal of Pesticide Wastes, ACS Symposium series no. 259, Washington DC, EUA, 1984, pp 297-325.

(12) Nriagu, J., Lakshminarayna, J.S.S. - Aquatic toxicology and water quality management. In: J. Nriagu (Ed.) Advances in Environmental Sciences and Technology series, Volume 22, Canada, 1989.

(13) Holland, J., Sinclair, P. – Environmental fate of pesticides and the consequences for residues in food and drinking water. In: D. Hamilton, S. Crossley (Eds.) Pesticides Residues in Food and Drinking Water: Human Exposure and Risks. John Wiley & Sons, Chichester, UK, 2004, pp. 27-62.

(14) Osteen, C.D., Padgitt, M. – Economic issues of agricultural pesticide use and policy in the United States. In: Willis B. Wheeler, Pesticides in Agriculture and the Environment, Marcel Dekker Inc. Nova Iorque, USA, 2002.

(15) Stephenson, G.R. – Pesticide use and world food production. In: J. R. Coats, H. Yamamoto (Eds.), Environmental Fate and Effects of Pesticides, ACS Symposium series 853, American Chemical Society, Washington DC, USA, 2003.

(16) Murray, R. – Editorial: Forty years after Silent Spring. Anal. Chem., 74 (2002) 501-A.

(17) Mörner, J., Bos, R., Fredrix, M. – Reducing and Eliminating the Use of Persistent Organic Pesticides. Guidance on alternative strategies for sustainable pest and vector management. WHO, UNEP, FAO, Genebra, 2002.

(18) Smith, C.J. - Hydrogeology with respect to groundwater contamination. In: D. H. Hutson, T. R. Roberts (Eds.), Environmental Fate of Pesticides, Volume 7, Progress in Pesticide Biochemistry and Toxicology, John Wiley and Sons, Chichester, UK, 1990.

(19) Malato, S., Blanco, J., Cáceres, J., Fernández-Alba, A.R., Agüera, A., Rodrígues, A. – Photocatalytic treatment of water soluble pesticides by photo-Fenton and TiO2 using solar energy. Catal. Today, 76 (2002) 209-220.

(20) UE, Comunicação da Comissão ao Conselho, ao Parlamento Europeu, ao Comité Económico e Social e ao Comité das Regiões, "Para uma estratégia temática de protecção do solo", COM(2002) 179 final, Comissão das Comunidades Europeias, Bruxelas, Bélgica, 2002.

(21) Cohen, S.Z. - Pesticides in groundwater: an overview. In: D. H. Hutson, T. R. Roberts (Eds.), Environmental Fate of Pesticides, Volume 7, Progress in Pesticide Biochemistry and Toxicology, John Wiley and Sons, Chichester, UK, 1990, pp. 13-25.

(22) Croll, B.T. – Pesticides and organic chemicals, Symposium on Catchment Quality Control, Institution of Water and Environmental Management, Scientific Section, Londres, 1988.

(23) USGS – Pesticides in ground water. Fact Sheet FS-244-95 U.S. Geological Survey, Sacramento, CA, USA, 1996.

(24) Hamilton, D., Crossley, S. – Introduction. In: D. Hamilton, S. Crossley (Eds.) Pesticides Residues in Food and Drinking Water: Human Exposure and Risks. John Wiley & Sons, Chichester, UK, 2004, pp. 1-25.

(25) Maud, J., Edwards-Jones, G., Quin, F. – Comparative evaluation of pesticide risk indices for policy development and assessment in the United Kingdom. Agric. Ecosyst. Environ., 86 (2001) 59-73.

(26) Jones, R.L. - Pesticides in ground water: conduct of field research studies. In: D. H. Hutson, T. R. Roberts (Eds.) Environmental Fate of Pesticides, Volume 7, Progress in Pesticide Biochemistry and Toxicology, John Wiley and Sons, Chichester, UK, 1990, pp. 27-46.

(27) Batista, S., Silva, E., Cerejeira, M.J. – Pesticidas e nitratos na água subterrânea em diversos ecossistemas agrícolas do Ribatejo e Oeste e da Beira Litoral (Portugal). In: Actas do seminário - Cargas contaminantes al suelo en regiones de actividad agricola intensa y su afección a las aguas subterráneas. Lisboa, 2004.

(28) Rogers, K.R., Koglin, E.N. – National Exposure Research Program, U. S. Environmental Protection Agency, Las Vegas, NV 89193-3478, USA.

(29) CEE - Directiva 91/676/CEE do Conselho, de 12 de Dezembro de 1991, relativa à protecção das águas contra a poluição causada por nitratos de oridem agrícola. Comissão da Comunidade Europeia, J. Ofic. L 375 de 31/12/1991, Bruxelas, Bélgica.

(30) Hawthorne, S.B. – Analytical-scale supercritical fluid extraction. Anal. Chem., 62 (1990) 633A-636A.

(31) Quereshi, A.A., Coleman, R.N., Paran, J.H. - Evaluation and refinement of the Microtox test for use in toxicity screening. In: D. Liu, B.J. Datku (Eds.), Toxicity Screening Procedures Using Bacterial Systems. Marcel Dekker, Nova Iorque, USA, 1984, pp. 1-22.

(32) Rogers, K.R., Koglin, E. - Biosensors for environmental monitoring: an EPA perspective. In: D. Nikolelis, U.J. krull, J. Wang, M. Mascini (Eds.) Biosensors for Direct Monitoring of Environmental Pollutants in Field. NATO ASI Series 2, vol. 38, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Holanda, 1997, pp. 335-349.

(33) Ferrer, I., Barceló, D. – Determination and stability of pesticides in freeze-dried water samples by automated on-line solid-phase extraction followed by liquid chromatography with diode-array detection. J. Chromatogr. A, 737 (1996) 93-99.

(34) Castillo, M., Domingues, R., Alpendurada, M.F., Barceló, D. – Persistence of selected pesticides and their phenolic transformation products in natural waters using off-line liquid solid extraction followed by liquid chromatographic techniques. Anal. Chim. Acta, 353 (1997) 133-142.

Capítulo 2

USOS E CARACTERÍSTICAS DOS PESTICIDAS

2.1 DEFINIÇÃO DE PESTICIDAS

A FAO, constituída no seio da ONU (Organização das Nações Unidas), define pesticidas como sendo: toda a substância ou mistura de substâncias usadas com a finalidade de prevenir, destruir ou controlar a população de determinado organismo vivo, incluindo vectores de doenças humanas ou animais, espécies indesejadas de plantas ou animais causadoras de risco potencial ou que, sob qualquer forma, possam interferir com a produção, processamento, armazenamento, transporte ou comercialização de alimentos ou produtos agrícolas, madeiras e produtos derivados ou mantimentos para alimentação animal, ou ainda, qualquer substância que possa ser administrada aos animais com a finalidade de controlar os insectos, aracnídeos ou outros organismos que vivam à superfície ou no interior do seu corpo. A mesma definição inclui ainda as substâncias usadas nas plantas como reguladores do crescimento, desfoliantes, dessecantes ou agentes de condicionamento dos frutos e preventivos da queda prematura, bem como, as substâncias aplicadas nas culturas antes ou após a colheita com o objectivo de prevenir a deterioração dos produtos durante o seu armazenamento ou transporte (1). Usualmente, a definição de pesticidas exclui as substâncias activas (s.a.) utilizadas no controlo ou eliminação de organismos que infectam directamente o homem (ou animais domésticos) causando doença, ex.: os antibióticos. Contudo, é possível encontrar alguma sobreposição de utilizações: as mesmas substâncias activas poderão ser usadas como fungicidas na agricultura e ter igualmente aplicação no combate a fungos patogénicos em terapêutica humana (2).

A definição da FAO estabelece como alvo principal, mas não exclusivo, da acção dos pesticidas todos os organismos capazes de afectar de forma negativa a produtividade de espécies vegetais com interesse nutricional, económico ou ecológico, ou ainda as condições de vida e desenvolvimento de espécies animais. Sendo a função dos pesticidas actuar sobre os agentes a que se convencionou chamar pestes (ou também pragas) convirá, antes de mais,

identificar os modos de acção que os classificam como tal. Assim, são alvo dos pesticidas todos os agentes capazes de:

- competir com os seres humanos, animais domésticos e culturas pelo alimento, mantimento, ração ou água,
- molestar os seres humanos, animais, culturas ou provocar danos nas estruturas e bens,
- propagar doenças aos seres humanos, animais domésticos ou culturas, ou
- provocar incómodo nos seres humanos ou animais domésticos.

Os agentes responsáveis por estas acções podem classificar-se em cinco categorias principais: insectos (e animais relacionados), agentes causais das doenças das plantas, ervas daninhas ou joio, moluscos e vertebrados (3).

A designação de pesticidas ou produtos fitofarmacêuticos engloba uma grande variedade de substâncias e meios de acção, de que se destacam as actividades insecticida, fungicida, herbicida, acaricida, nematodicida, moluscicida e rodenticida. Numa acepção mais alargada do termo, nomeadamente considerando os efeitos esperados, poderemos não restringir este entendimento apenas a substâncias de natureza química com origem natural ou sintética, mas englobar também microrganismos (ex.: fungos ou bactérias), seus produtos de metabolismo (ex.: endotoxinas produzidas pelo *Bacillus thruringiensis*) ou mesmo os macrorganismos usados como predadores de espécies prejudiciais às culturas (ex.: as vespas *Trichogramma evanescens*) (4). Neste sentido, existem produtos fitofarmacêuticos que integram cada um dos seguintes meios de protecção: biológica, biotécnica e química, esta última englobando a maior parte das substâncias actualmente disponíveis (5).

O entendimento estrito da designação de pesticidas obrigaria a excluir muitas substâncias que, por conveniência, são correntemente classificadas como tal. Algumas autoridades parecem evitar o uso deste termo em actos legislativos. Por exemplo, a UE refere-se a **produtos de protecção das plantas** e **biocidas**, sendo uma classificação mais adaptada à utilização que actualmente se faz destas substâncias. Os produtos de protecção das plantas surgem definidos como sendo produtos químicos ou biológicos destinados a: proteger as plantas ou produtos das plantas contra organismos que representem perigo; influenciar o desenvolvimento das plantas, excluindo a função de nutrientes (ex.: reguladores do crescimento); conservar os produtos vegetais; destruir plantas indesejáveis ou partes das mesmas e impedir o desenvolvimento de algumas delas. A designação de biocidas engloba uma grande variedade de substâncias incluindo: os desinfectantes (contra bactérias e vírus), os preservantes (para fungos, bolores e insectos), os insecticidas em higiene pública, os rodenticidas e as formulações "antifouling" usadas para prevenir o desenvolvimento de algas

nos cascos das embarcações (2). Por outro lado, as formulações de pesticidas comercializadas não são vulgarmente constituídas por uma única substância química. A substância activa, ou princípio activo, é a responsável pela acção tóxica desejada. Contudo, esta faz-se acompanhar de outras substâncias que funcionam como adjuvantes e que nem sempre são desprovidas de efeitos nocivos. Estas últimas não têm merecido a mesma atenção na caracterização dos seus potenciais efeitos nefastos para o homem ou para o ambiente.

Dada a sua utilização generalizada na agricultura, usualmente os pesticidas são entendidos como produtos destinados à protecção das plantas/culturas. No entanto, se atendermos à definição alargada adoptada pela FAO teremos que considerar outras utilizações possíveis para os pesticidas, entre elas, a nível doméstico e no ordenamento de espaços exteriores, de que são exemplo os campos de golfe, limpeza das bermas das estradas, entre outros.

2.2 UTILIZAÇÃO HISTÓRICA DE PESTICIDAS

Variados pesticidas de origem natural têm sido usados desde tempos longínquos para controlar as pragas que afectam as culturas. Mesmo sem recurso a substâncias químicas, a prática de culturas de companhia é ancestral. Baseia-se nas propriedades repelentes ou mesmo pesticidas de algumas espécies vegetais que, quando cultivadas nas proximidades de outra cultura mais susceptível ao ataque por pestes, beneficia a produtividade da mesma (4). Embora a utilização de pesticidas nas diversas vertentes a que a definição produzida pela FAO faz menção se tenha tornado mais efectiva ao longo do século XX, muitos séculos antes o homem recorria a substâncias químicas com o intuito de obter benefícios na agricultura.

Mesmo antes de 1000 a.C. o homem recorria ao uso de pesticidas. O enxofre terá sido das primeiras substâncias usadas com esse fim (3). Em 1958, a quantidade de enxofre usado como fungicida era o quádruplo das restantes substâncias usadas com o mesmo fim. De notar que o enxofre continua a ser usado nos dias de hoje, representando mesmo uma percentagem superior a 50% do volume de pesticidas vendidos em Portugal. Contudo, noutros países a sua quantidade não é considerada para efeitos estatísticos (5). Por volta do séc. XV generalizava-se o uso de substâncias químicas tóxicas como o arsénio, mercúrio e chumbo para combater as pestes nas culturas. No séc. XVII, tornou-se prática comum extrair sulfato de nicotina de folhas de tabaco e o seu uso posterior como insecticida. Também é referido o

uso de estricnina com os mesmos fins. No séc. XIX, assistiu-se à introdução de dois outros pesticidas naturais: as piretrinas, extraídas da planta *Chrysanthemum cinerariaefolium* (família Asteraceae), planta perene aparentada aos malmequeres e muito distribuída em África; e a rotenona, obtida de raízes, sementes e folhas de várias plantas tropicais, nomeadamente *Derris* e *Lanchocarpus spp.* (2, 3). Plantas do género *Chrysanthemums* eram conhecidas no Japão por volta de 800 a.C. e cultivadas na China com fins florais por volta de 1500 a.C. No séc. XVII foram trazidas para o Ocidente. Para além da sua utilização com fins ornamentais, a produção desta planta é importante do ponto de vista económico devido ao seu uso como fonte de insecticidas. Em 1998, o Quénia produzia 90% (6.000 toneladas) das piretrinas naturais, enquanto que a Tasmânia era o segundo produtor (6). Os extractos retirados de uma árvore da espécie *Azadirachta indica* foram também referenciados como contendo propriedades pesticidas. O modo de aplicação de diversos extractos naturais consistia na pulverização directa nas plantas a proteger, ou na sua vizinhança, de forma a afastar ou aniquilar as possíveis pragas. Muitas destas substâncias de origem inorgânica ou orgânica usadas com actividade pesticida apresentavam elevada toxicidade e, por consequência, representavam um risco assinalável para os utilizadores e consumidores de produtos vegetais, aumentando o risco de envenenamento acidental (4).

Os compostos inorgânicos de cobre têm vindo a ser usados desde o séc. XIX com fins fungicidas. A "calda bordalesa", constituída por uma mistura de sulfato de cobre e hidróxido de cálcio, foi introduzida em 1882 por Millardet (3). Na década de 30 começaram a ser desenvolvidos esforços no sentido de produzir insecticidas sintéticos. A empresa alemã IG Farbenindustrie liderou esses esforços empenhando-se num programa para elucidar as propriedades insecticidas de compostos orgânicos fosforados. Em finais desta década já eram conhecidos os efeitos do tetraetilpirofosfato (TEPP), do tabun e do sarin (2). Em 1939, o cientista suíço Paul Hermann Müller desvendou as interessantes propriedades insecticidas evidenciadas pelo DDT, que tinham permanecido ocultas desde a data da sua primeira síntese em 1873. Pelos esforços desenvolvidos nesta área, Müller recebeu em 1948 o prémio Nobel da Fisiologia e Medicina e marcou decisivamente o início de uma nova era na história dos pesticidas - a dos pesticidas sintéticos (3). Embora o uso de pesticidas de origem sintética tenha tido início nos primeiros anos da década de 30, com a demonstração das propriedades insecticidas de alguns alquiltiocianatos e organofosforados, e das propriedades fungicidas dos ditiocarbamatos, o verdadeiro arranque da indústria dos pesticidas aconteceu em 1942, data em que o DDT foi patenteado. Rapidamente se tornou o pesticida mais usado em todo o mundo e permaneceu como um dos mais usados durante duas décadas (3, 7). Foi

usado durante a 2ª Guerra Mundial pelas "tropas aliadas" e populações civis para evitar a propagação do tifo e da malária através de insectos vectores destas doenças. Pode dizer-se que o DDT foi o responsável pela diminuição drástica da incidência de tifo e pela erradicação da malária na Europa e América do Norte, após uma acção levada a cabo na década de 50 (8). Embora o DDT tenha sido útil inicialmente para debelar situações de risco de saúde pública, a partir de 1945 a sua aplicação estende-se em larga escala também à agricultura. Contudo, neste caso, foram necessárias concentrações superiores algumas ordens de magnitude, concentrações estas que viriam a ser duplicadas ou triplicadas com o surgimento de espécies de insectos resistentes ao DDT (9). Com os resultados obtidos pelo DDT generalizou-se também o uso de outros compostos organoclorados e organofosforados marcando a aplicação em larga escala de pesticidas na agricultura como factores de produção (4). Por fim, muitos dos pesticidas organoclorados caíram em desuso devido à sua elevada persistência no meio ambiente e na vida selvagem (3). Apesar disso, em 2001 a ONU aceitou o uso do DDT em certos casos de combate à malária, devido à sua eficácia em situações onde outros meios de combate falham (8).

Por volta de 1942, os herbicidas orgânicos selectivos começaram a ser introduzidos, iniciando-se a síntese do 2,4-D (ácido 2,4-diclorofenoxiacético), após a descrição do mecanismo de regulação do crescimento das plantas através das auxinas, por meio do sistema do ácido indoleacético. Os herbicidas do grupo do ácido fenoxiacético apresentam alta selectividade para as dicotiledóneas, não tendo acção sobre as monocotiledóneas (2, 3).

No período de 1945-1955 assistiu-se a um grande desenvolvimento dos chamados "pesticidas de segunda geração", que incluem os insecticidas organofosforados e carbamatos e o grupo de herbicidas das ureias, alguns dos quais continuam a ser usados actualmente. Os derivados de amónio quaternário e triazinas foram introduzidos entre 1955 e 1960. Na década de 60, assistiu-se ao desenvolvimento de grande parte dos fungicidas tais como os benzimidazóis, pirimidinas, triazóis e imidazóis (3 ,7). Durante esta década surgiram evidências de acumulação de alguns pesticidas em organismos de níveis tróficos superiores. Particularmente, foi demonstrado que o DDT podia provocar defeitos congénitos em alguns animais e nos seres humanos, para além de afectar gravemente a capacidade de reprodução de algumas aves (3).

O primeiro grande alerta e inspiração para os actuais movimentos contra o uso de substâncias químicas na agricultura foi dado por Rachel Carson, uma activista americana que no seu livro "Silent Spring" argumentava que o uso de pesticidas estava a ser o responsável pela contaminação de inúmeras espécies da vida selvagem, com efeitos nefastos na

biodiversidade, bem como da contaminação do ambiente em geral, pondo em perigo a saúde humana (3). A consciência crítica que se começou a formar relativamente a estes efeitos, nomeadamente os respeitantes à persistência dos compostos organoclorados, em particular o DDT e os ciclodienos, bem como à sua bioacumulação nos organismos e os efeitos toxicológicos graves que tal situação origina nos ecossistemas, desencadeou a tomada de medidas restritivas ou mesmo a proibição total do uso de determinadas substâncias (7, 10). Este conhecimento tem originado uma procura incessante de novos compostos que possam substituir as moléculas em uso, com vantagem em termos de eficácia e beneficiando de riscos diminuídos. Desta forma se tem feito grande parte da história mais recente da utilização de pesticidas sintéticos.

A terceira geração de pesticidas apareceu no período compreendido entre 1970-1980. Nela se incluem os piretróides e as sulfonilureias que, devido à sua acção biológica potente, podem ser usados em baixas dosagens, apresentando simultaneamente baixa toxicidade para os mamíferos. Nos últimos anos, têm sido desenvolvidos estudos com vista à produção de agentes esterilantes, feromonas e inibidores da síntese da quitina nos insectos (7).

As quantidades de pesticidas usadas actualmente são cerca de 50 vezes superiores às registadas em 1950, com cerca de 2,5 milhões de toneladas produzidas industrialmente. O grupo dos insecticidas organofosforados não persistentes é o mais representativo, onde se inclui o glifosato, provavelmente a substância mais usada em todo o mundo (6). Apesar da actual grande dependência de substâncias químicas, especialmente na agricultura, nem todas as substâncias sintéticas devem ser tidas imediatamente como prejudiciais. São diversos os compostos naturais reconhecidos como tóxicos mas não são sujeitos a estudos tão aprofundados como aqueles a que as substâncias sintéticas são submetidas. Daqui decorre que, nestes casos, a segurança da sua utilização é ainda desconhecida. Contrariamente aos pesticidas sintéticos, os pesticidas naturais são produzidos pelas plantas, bactérias e fungos para provocar o máximo de efeitos deletérios, indiscriminadamente em todos os seres que possam representar perigo para essa espécie (4).

2.3 CARACTERIZAÇÃO DOS PESTICIDAS

A classificação dos pesticidas nas suas inúmeras vertentes: química, bioquímica, toxicológica, etc., é uma tarefa extremamente complexa que excede largamente a capacidade individual de a concretizar, dada a vastidão de substâncias químicas e a diversidade de

disciplinas a considerar. Nesta secção, serão apresentadas apenas algumas das classificações mais comuns (ou mais úteis) na definição dos grupos com afinidade de características.

2.3.1 Classificação segundo o uso

A designação de pesticidas abrange um número alargado de produtos e/ou substâncias que podem ser primariamente distinguidos entre inorgânicos e orgânicos, segundo a natureza química das substâncias: mineral (ex.: sais de cobre, arsénio, enxofre, estanho e mercúrio) ou orgânica (contendo carbono, hidrogénio e, eventualmente, heteroátomos). O uso de pesticidas inorgânicos ainda se mantém na actualidade, como preservantes da madeira e no controlo de doenças das plantas. No entanto, os pesticidas orgânicos têm sido os mais usados após a 2ª Guerra Mundial podendo ser obtidos por síntese ou extraídos a partir de plantas. De entre estes, os pesticidas sintéticos são os que têm maior utilização, tentando em certos casos mimetizar as substâncias naturais modelo, mas evidenciando maior selectividade.

Um outro grupo de pesticidas, em tudo diferente destes, é o dos pesticidas biológicos. Certos vírus, bactérias ou fungos são dispersos no ambiente em quantidades suficientes para controlar uma espécie indesejada, causando-lhe uma enfermidade. Um número reduzido destes agentes tem tido sucesso. Destaca-se o caso do *Bacillus thuringiensis* que se tem revelado eficaz no controlo de lagartas, moscas, mosquitos e vermes (3).

Outro tipo de classificação separa aqueles que se destinam ao uso na agricultura ou horticultura dos que se usam para fins não agrícolas. A principal consequência desta divisão prende-se com a atribuição das competências de tutela sobre estes produtos (2). Em Portugal, a DGPC (Direcção Geral de Protecção das Culturas), organismo oficial que detém a qualidade de Autoridade Fitossanitária Nacional, é a responsável pela autorização da introdução e comercialização de formulações pesticidas de uso agrícola, enquanto que a DGS (Direcção Geral de Saúde) detém a responsabilidade sobre outro tipo de usos. A distinção adoptada pela UE em produtos de protecção das plantas e biocidas estabelece um paralelo com esta nomenclatura. Seguindo uma estratégia de classificação mais detalhada, os pesticidas poderão ser agrupados de acordo com:

i) o organismo alvo em que actuam
ii) a sua estrutura química
iii) o modo de acção

A classificação dos principais pesticidas de acordo com estes três critérios levou à constituição das principais famílias que se apresentam na Tabela 2.1 (2, 3), Tabela 2.2 (2, 7) e Tabela 2.3 (2, 11). Não obstante, correntemente usam-se classificações híbridas das anteriores ou a combinação de algumas delas tomando, por exemplo, o organismo alvo como classe principal e de seguida a família química como subclasse (2).

Tabela 2.1 – Classificação dos principais tipos de pesticidas segundo o organismo alvo

Tipo de pesticida	Organismos alvo
Insecticida	Insectos
Fungicida	Fungos
Herbicida	Plantas
Moluscicida	Lesmas e caracóis
Rodenticida	Roedores
Acaricida	Ácaros
Nematodicida	Nemátodes

Tabela 2.2 – Famílias de pesticidas mais importantes segundo a sua estrutura química

Família química	Sub-família química
Amidas	Acilalaninas, cloroacetanilidas, dicloroanilidas
Azóis	Triazóis, conazóis, benzimidazóis
Ácidos ariloxialcanóicos	Ácidos fenoxiacéticos e seus sais
Bipiridilos	
Dinitroanilinas	
Diazinas	
Carbamatos	N-metilcarbamatos, tiocarbamatos, ditiocarbamatos e dimetilditiocarbamatos
Difeniléteres	
Fenóis	
Imidazolinonas	
Morfolinas	
Organoclorados (OCP)	
Organofosforados (OPP)	Fosfatos, fosfonatos, fosforotionatos, fosforoditioatos, fosforotiolatos, fosforotioamidatos
Organometálicos	
Piretrinas/piretróides sintéticos	
Pirimidinas	
Sulfonilureias	
Triazinas	1,3,5-triazinas, 1,3,5-triazinonas, 1,2,4-triazinas
Ureias	Fenilureias, tioureias
Diversos	Congrega outras famílias menos individualizadas

Numa publicação em que compila todos os produtos fitofarmacêuticos com venda autorizada em Portugal, a DGPC distingue as seguintes 14 categorias: algicidas, atractivos, bactericidas, feromonas, fungicidas, herbicidas, insecticidas e acaricidas, molhantes, outros

produtos de condicionamento fisiológico das culturas, moluscicidas, nematodicidas, reguladores do crescimento, repulsivos e rodenticidas (12). As famílias químicas mencionadas na Tabela 2.2 apresentam uma representatividade muito diferente, quer em termos de número de compostos quer de utilizações e quantidades aplicadas. Algumas famílias podem conter várias dezenas de compostos (ex.: organofosforados) enquanto que outras têm um número reduzido (ex.: imidazolinonas). Os azóis têm utilização essencialmente como fungicidas enquanto que os organofosforados, organoclorados e piretróides são essencialmente insecticidas, acaricidas e nematodicidas. Algumas famílias contêm principalmente herbicidas enquanto que os carbamatos podem apresentar actividade insecticida e herbicida (7).

Tabela 2.3 – Classificação dos principais pesticidas segundo o seu modo de acção

Mecanismo de acção bioquímico
Anticolinesterásicos (inibidores da acetilcolinesterase)
Inibidores da síntese da quitina
Agonistas da ecdisona
Bloqueadores do GABA (inibidores do ácido γ-aminobutírico)
Análogos de hormonas de crescimento (reguladores do crescimento dos insectos)
Anticoagulantes
Inibidores da glutamina sintetase
Inibidores da desmetilação dos esteroides (biosíntese do ergosterol)
Inibidores da oxídase do protoporfirinogénio
Inibidores da RNA-polimerase
Reactivos de tiol e produtores de radicais livres
Inibidores da síntese de aminoácidos e proteínas
Inibidores da cadeia de transporte de electrões na fotossíntese
Inibidores da respiração mitocondrial (síntese de ATP)
Inibidores da divisão celular
Inibidores da ATPase Na^+/K^+ nas células nervosas (tóxicos dos nervos)
Moduladores do comportamento (feromonas)

2.3.1.1 Insecticidas

O grupo dos insecticidas é provavelmente aquele que congrega maior número de compostos. Distribuem-se por várias famílias químicas importantes, entre as quais, a dos pesticidas organoclorados, organofosforados, carbamatos, piretróides e reguladores do crescimento dos insectos, sem esquecer os recentes compostos derivados de nicotinil e cloronicotinil (aparentados à nicotina) (13). Os insecticidas classificam-se como de efeito local quando entram em contacto directo com o organismo alvo ou exercem a sua função através da ingestão de partes da planta tratadas com o insecticida à superfície (ex.:

organoclorados). Pelo contrário, classificam-se como de efeito sistémico quando os insecticidas são absorvidos pela planta e posteriormente distribuídos a todos os tecidos. Quando ingeridos pelos insectos que deles se alimentam exercem a sua acção (ex.: organofosforados). Os insecticidas podem ainda agrupar-se em sete classes segundo o seu mecanismo de acção: bloqueio físico, venenos do protoplasma, venenos dos nervos, inibidores metabólicos, toxinas citolíticas, venenos dos músculos e agentes alquilantes (3).

O grupo de insecticidas organoclorados inclui o DDT e derivados, ciclodienos, hexaclorociclohexanos, hexaclorobenzeno (HCB), toxafeno, mirex e metoxicloro, entre outros, muitos dos quais são considerados POPs. Apesar de não apresentarem elevada toxicidade aguda para o homem, evidenciam elevada persistência no ambiente e capacidade de bioacumulação na cadeia alimentar, razão pela qual foram gradualmente substituídos. Ainda na actualidade é possível a detecção de resíduos da sua utilização, por vezes em locais remotos onde o seu uso nunca teve lugar, como nas regiões polares (14). Nem todos os OCPs foram banidos de uso à escala global pelo que, resíduos transportados de países onde a sua utilização é permitida ou resíduos resultantes de uma utilização passada têm sido, e continuarão a ser, detectados em matrizes ambientais e biológicas (9, 15). Os OCPs interferem com o equilíbrio Na^+/K^+ nas células nervosas originando convulsões em caso de intoxicação aguda e diversos distúrbios hepáticos, hematológicos e da visão (3).

Os insecticidas organofosforados têm sido largamente usados, particularmente após a interdição do uso de OCPs na agricultura, e como seus substitutos (16). Conjuntamente com os carbamatos e piretróides constituem, nas últimas décadas, cerca de 80% do mercado de insecticidas. A grande eficácia dos OPPs deve-se ao potente efeito tóxico que produzem nos insectos contudo, manifestam igualmente elevada toxicidade aguda em mamíferos. Não obstante, são geralmente considerados pesticidas seguros no tratamento das culturas devido à sua degradação relativamente rápida (13, 16). O mecanismo de acção dos OPPs consiste na inibição da acetilcolinesterase, enzima esta responsável pela remoção do mediador neuroquímico acetilcolina da fenda sináptica ou da junção neuromuscular (3). Como resultado sobrevém uma paralisia neuromuscular generalizada que conduz à morte.

Os carbamatos são outro grupo químico de grande significado qualitativo e quantitativo podendo ser utilizados tanto com fins insecticidas como fungicidas, herbicidas ou até mosluscicidas. O efeito insecticida desenvolve-se com base no mesmo processo bioquímico que os OPPs contudo, apresentam maior rapidez de acção e a recuperação é mais rápida. Apresentam também uma margem de segurança mais alargada (3, 13). Os piretróides sintéticos são insecticidas que entraram em uso mais recentemente sendo aparentados das

piretrinas naturais. Apesar de afectarem igualmente a transmissão do impulso nervoso interferindo, neste caso, com os canais de sódio das células nervosas, a sua acção é bastante mais selectiva para os insectos comparativamente aos mamíferos, uma vez que nestes últimos sofrem uma rápida degradação e excreção (3).

Uma nova geração de insecticidas tem ganho crescente aceitação. Exemplos destes são os nicotinoides e neonicotinoides sintéticos que exercem o seu efeito biológico ao nível do sistema nervoso central dos insectos actuando nos receptores acetilcolinérgicos nicotínicos. Outros exercem a sua acção interferindo com o desenvolvimento das formas juvenis dos insectos, quer bloqueando os processos hormonais envolvidos no crescimento quer na formação do exoesqueleto - reguladores do crescimento dos insectos. Apesar de serem altamente selectivos têm algumas limitações, relacionadas com a moderada rapidez de acção, a sua actividade restrita a formas juvenis e os seus custos de produção mais elevados (13).

2.3.1.2 Fungicidas

Os fungicidas são uma classe de compostos com grande utilização, quer seja na indústria, na agricultura ou a nível doméstico (17). Considerando a sua estrutura química, podem ser identificados dois grandes grupos de fungicidas: os inorgânicos e os de síntese orgânica. Cada um deles apresenta diversas subdivisões, embora os orgânicos sejam em muito maior número. Entre os orgânicos, destacam-se os azóis e os ditiocarbamatos, enquanto que dos inorgânicos, o enxofre e os sais de cobre apresentam também elevada utilização.

O efeito dos fungicidas sobre as culturas pode dever-se a dois tipos de interacção: por contacto ou sistémica. Os primeiros desenvolvem a sua acção por contacto no local de aplicação sem haver penetração nos tecidos vegetais, enquanto que os fungicidas sistémicos são absorvidos e posteriormente transportados, em maior ou menor grau, no sistema vascular das plantas em quantidades tais que permitem limitar o desenvolvimento do patogénio mesmo em partes distantes do local de aplicação (13, 17). Os fungicidas com actividade sistémica são em geral compostos orgânicos capazes de exercer uma função curativa, ou simplesmente preventiva, incluindo moléculas como os benzimidazóis, triazóis, pirimidinas, morfolinas, fenilaminas e dicarboximidas, entre outras. Por seu turno, os fungicidas de contacto podem desempenhar uma função protectora ou curativa podendo incluir substâncias inorgânicas não absorvidas, como os sais de cobre, mercúrio, enxofre e estanho, ou então compostos orgânicos da família dos ditiocarbamatos, tiazóis, dinitrofenóis e tioftalimidas,

entre outros (3). A acção dos fungicidas pode desenrolar-se de duas formas: parando ou retardando o desenvolvimento do micélio do fungo nos tecidos vegetais; ou então, impedindo a esporogénese ou a germinação do esporo (12). O maior grupo de fungicidas tem como alvo a síntese do ergosterol, que constitui a membrana celular dos fungos, através da inibição de várias enzimas envolvidas neste complexo processo. Outros, porém, actuam como inibidores da divisão celular ou como geradores de radicais livres (11).

2.3.1.3 Herbicidas

Os herbicidas são substâncias químicas usadas para controlar espécies vegetais infestantes, normalmente aplicadas nos estágios iniciais das culturas de forma a impedir a germinação ou o crescimento de espécies indesejadas e prejudiciais ao seu desenvolvimento. O uso destas substâncias tem-se mostrado mais eficaz, e economicamente mais vantajoso, comparativamente com a remoção mecânica de infestantes (3).

Vários critérios podem ser usados para classificar os herbicidas, nomeadamente: a sua estrutura química, o momento de aplicação relativamente à sementeira, o local de aplicação, o modo de acção na planta e a sua selectividade (3). Os herbicidas actualmente disponíveis são essencialmente orgânicos, podendo ser agrupados em herbicidas de pré-sementeira e de pré-emergência (aplicados directamente no solo) e herbicidas de pós-emergência (aplicados nas fases inicias após a emergência das culturas e eventuais infestantes) (12, 13). Qualquer destes grupos pode incluir herbicidas de acção sistémica, onde se pressupõe a absorção radicular e/ou foliar e posterior translocação no interior da planta, ou herbicidas de contacto com fraca ou nula translocação (12).

Diversos herbicidas exercem uma acção selectiva sobre certas famílias de plantas. Actualmente, a modificação genética de certas culturas permitiu que adquirissem resistência a alguns herbicidas, não sendo portanto afectadas pelas aplicações destinadas a eliminar os infestantes vegetais (ex.: milho resistente ao glifosato). Além disso, a maioria dos herbicidas sintéticos actuais possui baixa toxicidade para os mamíferos, uma vez que foram produzidos para actuar especificamente em vias metabólicas típicas das plantas. As triazinas, ureias, sulfonilureias e carbamatos são grupos importantes de herbicidas (13).

O grupo dos herbicidas compreende um número bastante alargado de funcionalidades químicas e modos de acção, de que se destacam 23 classes de compostos orgânicos e 4 de compostos inorgânicos (3). Dos primeiros, a classe das triazinas merece especial relevo,

sendo a atrazina considerada um dos pesticidas mais usados em todo o mundo, com igual paralelo na sua identificação como contaminante das águas. São diversos os mecanismos bioquímicos envolvidos na acção dos herbicidas: inibição da síntese de aminoácidos (ex.: glifosato), inibição da cadeia de transporte de electrões na fotosíntese (ex.: triazinas, fenilureias, acetanilidas e uracilos), agonistas do sistema das auxinas (ex.: herbicidas ácidos), produtores de espécies reactivas de oxigénio (ex.: paraquato), inibidores da divisão celular (ex.: carbamatos e dinitroanilinas) (3).

2.3.2 Efeitos toxicológicos

Qualquer substância pode evidenciar efeitos tóxicos, dependendo da dose em que é administrada (segundo Paracelsus) (11). A dose tóxica é condicionada por vários factores, entre os quais o organismo alvo. Uma vez que a constituição das células em todos os organismos vivos é, no essencial, muito similar, um efeito tóxico desejado, na perspectiva do mecanismo de acção do pesticida sobre o organismo alvo, poderá transformar-se num efeito adverso indesejado em espécies não alvo, que acidentalmente contactam com a substância tóxica. De facto, os pesticidas não reconhecem organismos alvo. Eles são produzidos para afectar um processo ou órgão, e todos os organismos que possuam esse processo ou órgão poderão sofrer consequências nefastas. De modo a limitar o risco para as espécies não alvo é sempre preferível utilizar pesticidas selectivos. A selectividade dos pesticidas é pois uma via para diminuir o impacto ecológico e o risco humano.

Aproveitando as diferenças morfológicas e fisiológicas das células dos fungos e das plantas, bem como certas especificidades dos insectos face aos restantes seres vivos, tem sido possível combatê-los com compostos químicos destinados a interferir com esses sistemas ou vias metabólicas que se encontram ausentes em espécies não alvo, sendo pouco nocivos para estas (17). Entre os insecticidas, estão nestas condições os inibidores da síntese da quitina e as hormonas de crescimento das formas juvenis. Entre os herbicidas, pode referir-se como exemplo máximo o caso do glifosato, que é um inibidor competitivo da enzima sintetase do 5-enoilshikimato-3-fosfato, indispensável para a biosíntese dos aminoácidos fenilalanina, tirosina e triptofano nas plantas, mas não existente nos mamíferos. Daí resulta a sua excelente selectividade (2). Contudo, nem todos os esforços de exploração destas diferenças têm resultado em compostos totalmente inócuos. Um composto tóxico pode seguir nos mamíferos um mecanismo de toxicidade distinto do usado como base do

efeito pesticida, expressando desta forma uma dupla via de toxicidade (17). Como exemplo, os herbicidas do grupo do ácido fenoxiacético actuam no sistema das auxinas, responsáveis pelo crescimento das plantas mas, nem por isso são totalmente desprovidos de toxicidade nos mamíferos (2).

As substâncias tóxicas podem ser classificadas de diferentes formas segundo o ponto de vista do químico, do médico, do ambientalista, etc. Do ponto de vista bioquímico, podem eleger-se sete categorias, de acordo com o tipo de biomoléculas com que o pesticida interfere, sendo estes considerados os sete mecanismos fatais. Para além disso, uma mesma substância química pode exercer a sua acção por mais do que um mecanismo (11). Há ainda a considerar que o tipo e/ou intensidade de um efeito tóxico pode depender da presença simultânea de outras substâncias, potenciando o efeito tóxico da primeira (efeito sinérgico) ou atenuando-o (efeito antagónico). Referem-se a seguir os sete mecanismos de toxicidade, em representação dos vários tipos de interacção entre os tóxicos e as células (11):

I. Inibição enzimática

Os inibidores enzimáticos apresentam elevada afinidade para uma enzima ou proteína transportadora inibindo o seu funcionamento normal. Um tal comportamento resulta da sua estrutura química que é semelhante à do substrato biológico, onde foram inseridas pequenas modificações que ocasionam a inibição e bloqueio da enzima ou proteína. Os pesticidas organofosforados e os carbamatos actuam por esta via inibindo a enzima acetilcolinesterase.

II. Interferência com a comunicação por sinais químicos

Os organismos usam mensageiros químicos como sinais de coordenação a vários níveis de organização. Certos pesticidas são capazes de interferir com estes sistemas vitais, frequentemente gerando efeitos tóxicos extremamente potentes e mais selectivos que os devidos a outras categorias. Estas substâncias podem gerar um estímulo por imitação do verdadeiro mediador químico, mas com maior intensidade, maior duração, ou a um tempo desajustado, actuando como agonistas. A nicotina é um agonista para a acetilcolina, enquanto que o 2,4-D é um agonista da hormona vegetal auxina. Os antagonistas bloqueiam a acção dos mediadores químicos endógenos ligando-se ao mesmo receptor.

III. Produção de substâncias reactivas que provocam danos nos componentes celulares.

Certas substâncias intervêm em reacções de oxidação ou de redução dando origem à formação de radicais livres. Estas espécies químicas, como o radical hidroxilo, são altamente reactivas e atacam os componentes celulares, indistintamente de quaisquer células, causando

danos irreversíveis, por exemplo na membrana celular e ácidos nucleicos. Os radicais livres entram em reacções em cadeia, desplotando um efeito tóxico alargado e frequentemente não selectivo. O paraquato e o ião Cu^{2+} exercem toxicidade através deste mecanismo.

IV. Alteração do gradiente de pH através das membranas

Diversas substâncias de natureza fracamente ácida ou alcalina são capazes de interferir com o equilíbrio de pH que se gera através da membrana mitocondrial e dos cloroplastos afectando, desta forma, gravemente a capacidade de produção de energia.

V. Incorporação nas membranas biológicas

Determinadas substâncias lipofílicas, apesar de serem pouco reactivas, podem dissolver-se na membrana celular alterando a sua estrutura e funcionalidade. Os álcoois e os hidrocarbonetos clorados podem seguir esta via de toxicidade.

VI. Perturbação do equilíbrio electrolítico e osmótico da célula

Diversos sais, como o cloreto de sódio, são necessários ao funcionamento normal da célula, mas quando em quantidades excessivas alteram o equilíbrio transmembranar afectando a homeostase celular essencial para a vida.

VII. Destruição dos tecidos, DNA e proteínas por substâncias electrofílicas fortes, ácidos e bases fortes ou oxidantes e redutores fortes. Diversas substâncias electrofílicas podem formar-se no próprio organismo a partir de substâncias inofensivas e por interacção com o DNA vão alterar os processos de controlo e desenvolvimento normal da célula.

A exteriorização dos diferentes tipos de efeitos tóxicos assume uma grande diversidade de manifestações em intensidade e forma. Têm sido observados os seguintes efeitos adversos após exposição aos pesticidas: toxicidade aguda (reflectindo o mecanismo de acção tóxica predominante), irritação local, sensibilização, efeitos neurotóxicos no sistema nervoso central e periférico, toxicidade no sistema reprodutivo e no desenvolvimento (teratogenicidade), oncogenicidade e efeitos imunotóxicos (18, 19). Por sua vez, os efeitos tóxicos podem ser agrupados em duas categorias segundo a sua evolução no tempo e intensidade (3), os que dizem respeito à:

toxicidade aguda – surge após um contacto esporádico e breve com um composto tóxico, gerando normalmente um efeito intenso. A intensidade do efeito tóxico depende, contudo, da toxicidade intrínseca do composto em causa, da duração da exposição ou dose administrada

e da via de entrada do tóxico. Os efeitos tóxicos agudos resultam, em geral, da perturbação de um sistema bioquímico ou mecanismo fisiológico identificável, sendo possível estabelecer uma relação de dose/resposta, que pode ser expressa pelo respectivo valor de LD_{50} ou LC_{50}. O valor de LD_{50} (ou LC_{50}) é uma estimativa da quantidade, em mg de um composto tóxico por kg de peso corporal (ou concentração), necessária para causar mortalidade em 50% de uma população de animais de ensaio.

toxicidade crónica – surge quando um indivíduo é sujeito a exposições repetidas ou continuadas de quantidades baixas e não letais de um agente tóxico por um tempo prolongado. A necrose nos rins e fígado e o carcinoma dos pulmões são manifestações de toxicidade crónica. Para além dos efeitos crónicos detectados em estudos epidemiológicos, são de considerar os efeitos crónicos no sistema reprodutivo, efeitos teratogénicos, mutagénicos e carcinogénicos (20). Neste caso, não é fácil definir uma relação de dose/resposta ou mesmo uma relação de causalidade.

Qualquer dos mecanismos de toxicidade supracitados exige um contacto íntimo e, em muitos casos, absorção de pesticidas pelos tecidos. As vias de entrada mais relevantes em toxicologia humana são as que se apresentam na Tabela 2.4 (2). Destas, a ingestão de resíduos presentes na água é a que mais directamente se relaciona com o âmbito deste trabalho. O contacto directo dos pesticidas com a pele, olhos e tracto respiratório constituem as vias de entrada preferenciais em exposição ocupacional, enquanto que para o público em geral existe a percepção de que a ingestão de alimentos e água contaminados são os principais veículos dos pesticidas. No entanto, outras vias podem ser citadas quando se trata do manuseamento de pesticidas domésticos e medicamentos veterinários (2).

Tabela 2.4 – Principais fontes de exposição humana aos pesticidas e respectivas vias de entrada

Fonte de exposição	Via(s) de entrada
Resíduos nos alimentos	Oral
Resíduos na água	Oral
Uso doméstico e na horticultura	Oral, percutânea, inalação
Uso em espaços públicos e sanitização	Oral, percutânea, inalação
Controlo de vectores de doenças	Oral, percutânea, inalação
Exposição ocupacional	Oral, percutânea, inalação
Uso em tratamentos humanos e veterinários	Oral, percutânea (ou inalação)

Tarazona et al. fazem notar a grande falta de estudos de toxicidade e critérios de classificação aplicáveis ao ambiente terrestre, tendo a grande maioria dos estudos sido dedicados à ecotoxicologia aquática, com a consequente publicação de legislação nesse

âmbito (21). Os estudos de ecotoxicidade são usualmente efectuados com espécies particularmente sensíveis de peixes, algas e *Daphnia*. Os riscos da presença de pesticidas no meio terrestre relacionam-se com a sua toxicidade intrínseca e o destino no ambiente, no que concerne à persistência, mobilidade e possibilidade de bioacumulação e biomagnificação na cadeia alimentar. São estes os principais critérios usados na quantificação do risco (21). Maud et al. fazem uma avaliação de cinco índices calculados com base nas propriedades toxicológicas e na extensão da aplicação de 133 pesticidas, de forma a obter um índice integrado do risco associado a cada pesticida (22). O índice mais abrangente ("Pesticide Índex") incorpora 10 variáveis devidamente ponderadas: actividade pesticida, local de aplicação, período de aplicação, persistência, eficácia, custos, efeitos ambientais, toxicidade nos mamíferos, compatibilidade com o controlo integrado de pestes e disponibilidade de alternativas (23). Concluiu-se que, as avaliações de risco obtidas usando apenas as propriedades toxicológicas dos pesticidas são muito divergentes entre os vários índices. Há melhoria da correspondência quando se usam dados de aplicação por área. O uso de um qualquer índice condiciona, portanto, as opções a serem tomadas em gestão ambiental (22).

2.3.3 Classificação toxicológica dos pesticidas

Vários organismos internacionais produziram classificações que expressam o grau de perigosidade para o Homem da exposição aos pesticidas ou a outras substâncias tóxicas. A Tabela 2.5 e a Tabela 2.6 apresentam as classificações toxicológicas baseadas em estudos com animais de experiência propostas pela OMS e pela US EPA para as substâncias activas com acção pesticida (2, 20, 24). Pode ser encontrada informação adicional no Anexo I (24).

Tabela 2.5 – Classificação da toxicidade aguda dos pesticidas segundo a OMS

Classe	Perigo	LD_{50} (mg kg^{-1}) em ratos			
		Via oral		Via percutânea	
		Sólidos	Líquidos	Sólidos	Líquidos
Ia	Extremo	≤ 5	≤ 20	≤ 10	≤ 40
Ib	Alto	5-50	20-200	10-100	40-400
II	Moderado	50-500	200-2000	100-1000	400-4000
III	Ligeiro	≥ 501	≥ 2001	≥ 1001	≥ 4000
Tabela 5 – pesticidas com risco agudo pouco provável		≥ 2000	≥ 3000	-	-
Tabela 6 – pesticidas não classificados, obsoletos					
Tabela 7 – pesticidas sujeitos ao procedimento PIC					
Tabela 8 – fumigantes, não classificados pela OMS					

Tabela 2.6 – Critérios de classificação da toxicidade aguda dos pesticidas segundo a USEPA

Classe	Toxicidade aguda em ratos		
	Via oral LD_{50} (mg kg^{-1})	Via percutânea LD_{50} (mg kg^{-1})	Inalação LC_{50} (mg L^{-1})
I	≤ 50	≤ 200	≤ 0.2
II	50-500	200-2000	0.2-2.0
III	500-5000	2000-20000	2.0-20
IV	≥ 5000	≥ 20000	≥ 20

Kamrim apresenta ainda diferentes categorias de ecotoxicidade tendo em conta a LD_{50} por via oral para as aves, a LC_{50} na dieta das aves e a LC_{50} na água para os peixes (20).

A classificação toxicológica dos pesticidas proposta pela OMS, que vem sendo usada desde 1975, parece ser a mais completa e realista. É dirigida à classificação de pesticidas e baseia-se na análise detalhada de dados experimentais de toxicidade aguda, por via oral e percutânea, obtidos em ratos em ambiente laboratorial segundo práticas consensuais em toxicologia. Incorpora ainda dados resultantes da experiência no uso destas substâncias (24, 25). Os critérios são fixados para várias vias de exposição e distingue o menor risco da exposição a sólidos comparativamente à exposição a líquidos. Para além disso, prevê alguma flexibilidade na classificação, uma vez que reconhece que alguns pesticidas podem provocar problemas de saúde que ultrapassam a toxicidade aguda por via oral e dérmica. Outras considerações podem ser tidas em conta sempre que se revelem mais ajustadas na avaliação do perigo para o Homem (24, 25). A classificação da OMS vai mais além, estabelecendo uma lista dos pesticidas para os quais é pouco provável o aparecimento de efeitos tóxicos, respeitando as condições normais de uso. O critério considerado para estabelecer um limite de toxicidade negligenciável por via oral, foi para os sólidos um LD_{50} de ≥2000 mg kg^{-1}, e para os líquidos de ≥3000 mg kg^{-1}.

A classificação adoptada na UE, inicialmente publicada na Directiva 67/548/CEE, de 27 de Junho, relativa às substâncias perigosas, foi sendo aperfeiçoada mas só com a Directiva 92/32/CEE, de 30 de Abril, foram introduzidas novas preocupações quanto à toxicidade dos pesticidas, especialmente as dirigidas aos efeitos teratogénicos, carcinogénicos, mutagénicos, toxicidade no sistema reprodutivo e danos ambientais tendo sido, ao mesmo tempo, redefinida a noção de perigo.

Em geral, a forma de apresentação dos pesticidas é importante para a sua toxicidade. Por exemplo, o fungicida etridiazole quando apresentado na forma de concentrado emulsificável pertence à categoria de toxicidade I (USEPA), enquanto que os pós molháveis pertencem à categoria II e os granulados pertencem à categoria III, a menos perigosa (3). A classificação

dos pesticidas recomendada pela OMS diz respeito às substâncias activas e apresenta também as regras a utilizar na classificação toxicológica de misturas de substâncias activas e de formulações. A classificação final de qualquer produto que se destine à comercialização deve ser feita segundo as características da formulação (24, 26).

Deve notar-se que, quando a substância activa exibe baixa toxicidade, a nocividade do produto formulado pode ser determinada numa extensão significativa por outras substâncias incluídas na formulação, por exemplo os solventes. Convém realçar o facto dos ensaios de toxicidade tenderem a centrar-se nas substâncias activas, esquecendo os adjuvantes que estão normalmente presentes em grandes quantidades e que poderão igualmente contribuir para a toxicidade da formulação (2).

2.3.4 Intoxicações humanas e efeitos nos ecossistemas

Os relatos de efeitos deletérios graves dos pesticidas no Homem têm sido, sobretudo, devidos à exposição ocupacional ou acidental no circuito de produção, distribuição e aplicação. Resíduos de pesticidas foram detectados no leite materno (9, 27) e outras matrizes biológicas como a urina e soro, quer após exposição ocupacional ou não ocupacional (28, 29). Historicamente, alguns dos casos mais graves de intoxicação por pesticidas ocorreram devido ao consumo desacautelado de cereais tratados com compostos de mercúrio (metil-mercúrio) ou hexaclorobenzeno, usados como fungicidas no tratamento de sementes destinadas à agricultura (3). Os compostos de mercúrio são dos pesticidas mais tóxicos alguma vez produzidos, quer em termos de toxicidade aguda quer crónica.

Os fungicidas podem divergir grandemente na gravidade dos efeitos tóxicos gerados nos mamíferos, embora os compostos actuais apresentem muito menor propensão para produzir intoxicações graves devido a: baixa toxicidade intrínseca, detalhes técnicos da formulação (pós, grânulos, etc.) ou da sua aplicação. Contudo, pensa-se que os fungicidas poderão estar implicados na incidência de processos teratogénicos e oncogénicos em maior percentagem do que os outros pesticidas. Apesar de serem responsáveis por apenas 5%, ou menos, dos casos de intoxicação reportados nos EUA (30, 31), e por casos de intoxicação fatal extremamente raros, foi estimado que mais de 80% do risco oncogénico é devido a um número limitado de fungicidas (17). Potencialmente, os insecticidas, muitos dos quais são desenvolvidos para actuar em sistemas comuns aos mamíferos e insectos, apresentam elevada toxicidade. Pelo contrário, no desenvolvimento de herbicidas e fungicidas pode ser

explorada a sua selectividade para sistemas existentes apenas nas plantas e fungos.

A presença de resíduos de pesticidas nos ecossistemas, em especial os POPs, tem sido implicada na origem de diferentes distúrbios nos hábitos da vida selvagem e na estrutura das populações animais. Os efeitos crónicos dos pesticidas, por exposição prolongada a concentrações sub-letais, são os responsáveis por estas desordens, das quais se destacam: bioacumulação e biomagnificação, disrupção dos sistemas reprodutivo, imunitário e endócrino, e carcinogenicidade. Na Europa, EUA e África foram detectadas concentrações elevadas de resíduos de pesticidas em peixes e aves predadoras (9, 32). Alguns dos efeitos desta exposição levam à infertilidade, fragilidade da casca dos ovos, redução do número de crias, malformações congénitas e deficiente desenvolvimento sexual e comportamental em espécies selvagens, com a consequente ameaça ao equilíbrio ecológico e biodiversidade. Têm sido recolhidas evidências suficientes que comprovam estas suspeitas e que sustentam também os receios de que fenómenos idênticos possam estar a acontecer nos seres humanos (33, 34). Devido a esta interferência com o sistema hormonal, muitos pesticidas foram incluídos no grupo dos disruptores endócrinos onde se incluem também alguns PCBs, alquilfenóis, fitoestrogéneos e ftalatos (7, 33).

A presença de pesticidas no meio aquático é susceptível de afectar seriamente a sobrevivência dos seres que aí vivem bem como de outros que pertencem à mesma cadeia alimentar. Contudo, os efeitos nocivos produzidos pela ingestão de água para consumo humano poderão verificar-se a longo prazo, sendo nessa altura difícil estabelecer uma relação de causalidade. Na certeza da existência desta relação, devem ser tomadas todas as medidas para evitar a exposição dos ecossistemas aos efeitos causados pelos pesticidas.

2.4 ASPECTOS LEGISLATIVOS RELATIVOS AOS PESTICIDAS

2.4.1 Regulamentação das substâncias perigosas

Na UE, a Directiva 67/548/CEE, relativa às substâncias perigosas, após sucessivas actualizações atendendo ao progresso científico e técnico, regula a classificação, embalagem e rotulagem de substâncias que possam constituir perigo para o homem e para o ambiente. A mesma Directiva designa como perigosa qualquer substância que possa ser explosiva, oxidante, inflamável, tóxica, nociva, corrosiva, irritante, sensibilizante, carcinogénica, mutagénica, tóxica para o sistema reprodutivo ou nefasta para o ambiente (35). Muitas destas propriedades são encontradas nos pesticidas. Nela se encontram descritos também os

métodos a usar na avaliação de todas as propriedades relevantes para a definição da perigosidade de uma substância, bem como os critérios de classificação do grau de toxicidade e os requisitos na etiquetagem que dela derivam (26). Com a publicação da Directiva 92/32/CEE passaram a ser adoptados símbolos de aviso e frases de Risco e de Segurança que traduzem a perigosidade do produto (21). O diploma actualmente em vigor é a Directiva 2001/59/CE, de 06 de Agosto, que adapta ao progresso técnico, pela 28ª vez, a Directiva 67/548/CEE (36). Por sua vez, a Directiva 2001/60/CE, de 07 de Agosto, adapta ao progresso técnico a anterior Directiva 1999/45/CE, sobre preparações perigosas.

A expressão da classe toxicológica, segundo a OMS, a que um pesticida pertence não é obrigatoriamente apresentada no rótulo de uma formulação pesticida contudo, devem ser apresentados símbolos ou palavras que exprimam o seu grau de perigosidade. Assim, as formulações das classes Ia e Ib devem indicar o elevado grau de perigosidade, normalmente através de uma caveira com ossos cruzados e juntamente a palavra Veneno ou Tóxico (24).

A Convenção de Roterdão entrou em vigor em 24 de Fevereiro de 2004 e estabelece uma lista de compostos para os quais as entidades responsáveis dos países importadores devem confirmar a autorização de importação junto do país exportador, através da emissão de um consentimento prévio (PIC). Este procedimento formal tem o objectivo subjacente de partilha de responsabilidades nos efeitos prejudiciais que tais substâncias possam produzir. Das 41 substâncias sujeitas ao procedimento PIC, 21 são pesticidas (37). A Convenção de Estocolmo entrou em vigor em 17 de Maio de 2004 e estabelece uma lista de compostos orgânicos persistentes (POPs) cuja produção e uso está proibida ou é alvo de severas restrições devido à sua propensão para a bioacumulação e toxicidade crónica. Esta lista inclui os pesticidas: aldrina, dieldrina, endrina, clordano, heptacloro, hexaclorobenzeno, DDT, toxafeno e mirex (9, 24, 38).

2.4.2 Avaliação de novas substâncias activas

A avaliação das substâncias activas e a autorização de comercialização dos pesticidas na UE tem por base um procedimento coordenado pela Comissão Europeia, com a participação dos 25 Estados-membros. Este procedimento visa à avaliação técnico-científica das substâncias químicas, incluindo a avaliação do risco para o homem, como utilizador e como consumidor, para os animais e para o ambiente e espécies não visadas, de modo a garantir que os pesticidas, quando utilizados de forma adequada, não representam perigo para aqueles

agentes, evidenciando contudo a necessária eficácia para as utilizações propostas (12). A doutrina a seguir está patente em duas Directivas principais: a Directiva 91/414/CEE, de 15 de Julho (39), relativa à colocação dos produtos fitofarmacêuticos no mercado e a Directiva 98/8/CE, de 16 de Fevereiro (40), relativa à colocação de produtos biocidas no mercado. A primeira Directiva ocupa-se essencialmente dos pesticidas usados na agricultura (26).

O procedimento harmonizado a seguir para a aprovação de pesticidas envolve duas etapas. Numa primeira etapa as substâncias activas são avaliadas exaustivamente segundo as indicações constantes da Directiva 91/414/CEE e, se aprovadas, passam a fazer parte do Anexo I da mesma Directiva, que constitui a "lista positiva" de substâncias activas. Somente as substâncias para as quais se demonstre não existir risco para a saúde humana, animal e ambiente, poderão ser incluídas neste anexo (26). Estas substâncias poderão ser incluídas numa formulação comercial, sendo neste caso a sua aprovação da responsabilidade de cada Estado-membro e culmina na concessão de uma autorização de venda nacional (12).

A necessidade premente de certos pesticidas na agricultura obrigou a que fosse autorizado o uso de produtos fitofarmacêuticos contendo substâncias activas pré-existentes no mercado, à data de entrada em vigor daquela Directiva, até serem reavaliadas e tomada uma decisão sobre a sua inclusão no Anexo I. O processo de revisão da informação de suporte às várias substâncias activas foi repartido por 4 fases: na primeira identificaram-se 90 substâncias alvo de maior prioridade (Regulamento 3600/92/CE), nas segunda e terceira fases, 148 e 389 substâncias, respectivamente (Regulamento 451/2000/CE) e na quarta fase, e última, 238 substâncias activas (Regulamento 1112/2002/CE) (26).

O processo de caracterização de uma substância activa candidata à inclusão no Anexo I, tal como descrito no Anexo II da Directiva 91/414/CEE, deverá compreender as seguintes secções: identidade da substância activa/produto ou microrganismo, propriedades físico-químicas ou biológicas, métodos analíticos, eficácia, estudos de toxicidade, resíduos nos produtos vegetais, comportamento e destino no ambiente, estudos de ecotoxicidade e uma proposta de classificação e etiquetagem. Em particular, o relatório da toxicidade deverá apresentar os resultados obtidos em diversas vertentes de toxicidade, que incluem: toxicidade aguda (oral, percutânea, inalação, irritação da pele, etc.) toxicidade sub-crónica, toxicidade crónica e carcinogenicidade, genotoxicidade, neurotoxicidade, toxicidade reprodutiva (fertilidade e desenvolvimento), metabolismo nos mamíferos e, eventualmente, dados médicos (ex.: antídotos, casos clínicos) (26, 39). Relativamente ao comportamento e destino no ambiente, mais concretamente no que diz respeito à persistência no solo, os critérios de decisão sugerem que não deva ser autorizada nenhuma substância activa que

persista mais do que um ano em condições ambientais, nem leve à formação de resíduos ligados ao solo numa extensão superior a 70% da quantidade aplicada, a menos que se prove que estas circunstâncias não conduzem à acumulação de resíduos nas culturas subsequentes, não produzem fitotoxicidade nem efeitos indesejáveis no ambiente. De sublinhar que, em diversas vertentes do processo, são utilizados critérios semelhantes às substâncias activas para eventuais metabolitos, produtos de degradação e de reacção dos pesticidas que levantem suspeitas de perigo para o Homem, animais e ambiente (41).

A homologação a nível nacional de uma formulação contendo uma substância activa autorizada também se faz segundo as linhas definidas pela UE, ao propor os "Princípios uniformes para a avaliação de produtos fitofarmacêuticos", que constituem o Anexo VI à Directiva 91/414/CEE. Desta forma estão reunidas as condições de harmonização para que uma determinada formulação autorizada num país membro possa ter autorização imediata em países vizinhos, para as mesmas condições de utilização (26). Em Portugal, o Decreto-Lei n.º 94/98, de 15 de Abril, actualiza o Decreto-Lei n.º 284/94, de 11 de Novembro, que transpôs a Directiva 91/414/CEE, e estabelece os princípios que servem de base à avaliação e concessão de autorizações de venda de produtos fitofarmacêuticos (42). A nível legislativo tem-se tentado adaptar os processos de avaliação de substâncias activas ao progresso científico e técnico no sentido de potenciar os ganhos de produtividade na agricultura e ao mesmo tempo reduzir os riscos para a saúde pública e para o ambiente.

2.4.3 Resíduos de pesticidas no ambiente

Contrariamente à regulamentação dos resíduos de pesticidas em alimentos, estabelecida inicialmente na UE em 1976, os resíduos de pesticidas na água, nomeadamente na água para consumo humano, não mereceram inicialmente igual relevância. Os limites máximos de resíduos de pesticidas (MRL) permitidos em alimentos foram definidos com o objectivo de disciplinar o uso de pesticidas e, simultaneamente, proteger a saúde humana, facilitando também as transacções internacionais (43). Também aqui se constata que os interesses económicos se sobrepuseram à consciência ambiental. Esta situação terá sido fundamentada na presunção de que a contaminação da água, em resultado do uso de pesticidas na agricultura, não consistia uma ameaça para a saúde humana, sendo o solo considerado como um filtro. Não é de supor que, em condições normais de utilização dos pesticidas, a ocorrência de casos de intoxicação aguda em humanos através da água tenha fortes

probabilidades contudo, o mesmo não se pode dizer sobre a mortalidade de seres aquáticos e até dos efeitos crónicos no Homem, por essa via (44). Apesar de, em termos de toxicidade humana, os resíduos de pesticidas na água representarem um risco de 10^3 - 10^5 vezes inferior aos alimentos, é necessário ter em conta que a água tem os mais diversos usos e uma vez contaminada a sua recuperação é difícil (45).

2.4.3.1 Resíduos nas águas

A regulamentação dos resíduos de pesticidas no meio aquático pode dirigir-se a diferentes compartimentos: águas superficiais, águas subterrâneas e águas para consumo humano, a que se poderia acrescentar as águas residuais. A Directiva 76/464/CEE, de 4 de Maio, lançou as bases legais para a eliminação ou redução da poluição do meio aquático por substâncias perigosas, agrupadas na Lista I (substâncias tóxicas, persistentes e bioacumuláveis) e Lista II (substâncias nocivas), respectivamente, e identificadas em actos legislativos posteriores. Muitos dos pesticidas apresentam características que os incluem nestas listas. As medidas a implementar, decorrentes desta Directiva, contemplam a fixação de limites de emissão e objectivos de qualidade das águas. Aproveitando este contexto legal, a Directiva 80/68/CEE, de 17 de Dezembro de 1979, impõe as disposições específicas para a limitação da contaminação das águas subterrâneas por substâncias perigosas, nomeadamente as tóxicas, persistentes e bioacumuláveis. A contaminação das águas pela rejeição de resíduos de hexaclorociclohexano (HCH) está limitada pela Directiva 84/491/CEE, de 09 de Outubro, que estabelece os valores limite, objectivos de qualidade e métodos analíticos a respeitar. A Directiva 86/280/CEE, de 12 de Junho, estabelece as restrições à contaminação do meio aquático por resíduos de DDT e seus derivados, tendo sido posteriormente modificada pela Directiva 88/347/CEE, de 16 de Junho, que alarga o âmbito de aplicação aos resíduos de hexaclorobutadieno, hexaclorobenzeno, aldrina, isodrina, dieldrina e endrina. Recentemente, o Decreto-Lei n.º 506/99, de 20 de Novembro, estabelece limites para diversos pesticidas organofosforados, triazinas e herbicidas ácidos, entre muitos outros poluentes. Este diploma sofreu posteriormente um aditamento através do Decreto-Lei n.º 261/2003, de 21 de Outubro, que fixa os limites para 5 outros pesticidas, entre 15 poluentes.

Os limites de pesticidas em água para consumo humano são estabelecidos de forma muito diferente dos limites em alimentos. Para além disso, os esforços de harmonização a nível internacional são escassos. A OMS publicou as "Guidelines for Drinking Water Quality"

onde inclui os limites máximos recomendados ("guideline values") para a presença de vários pesticidas na água para consumo humano. Contudo, servem apenas de guia e não têm força vinculativa a nível nacional ou internacional mas poderão servir de base à preparação de actos legislativos regionais. Na Tabela 2.7 apresentam-se os valores guia da OMS e da US EPA ("health advisories"- HA) (46, 47). Os valores guia são estabelecidos segundo critérios toxicológicos assumindo um certo grau de exposição aos pesticidas pelo consumo de água.

Tabela 2.7 – Valores máximos recomendados de pesticidas na água para consumo humano com base em critérios toxicológicos, segundo a OMS e a US EPA

Pesticida	Valor Guia OMS [a] ($\mu g\ L^{-1}$)	Valor HA US EPA [b] ($\mu g\ L^{-1}$)	Pesticida	Valor Guia OMS ($\mu g\ L^{-1}$)	Valor HA US EPA ($\mu g\ L^{-1}$)
Aldrina *	0,03 (3)	0,2 (B2) [c]	Diclorprope	100 (2B)	
Bentazona *	30	200 (E)	Diurão		10 (D)
Clordano *	0,2 (2B)	10 (B2) [c]	Fenamifos		2 (D)
DDT *	2 (2B)		Fenoprope	9 (2B)	
Dieldrina *	0,03 (3)	0,2 (B2) [c]	Fonofos		10 (D)
Endrina *		2 (D)	Glifosato		700 (D)
Heptacloro *	0,03 (2B)	0,8 (B2) [c]	Isoproturão	9	
Heptacloro epóxido *	0,03 (2B)	0,4 (B2) [c]	Malatião		100 (D)
Hexaclorobenzeno *	1	2 (B2) [c]	MCPA	2 (2B)	4
Lindano *	2 (2B)	0,2 (C)	Mecoprope	10 (2B)	
Permetrina *	20 (3)		Metomil		200 (E)
Alacloro	20	40 (B2) [c]	Metoxicloro	20 (3)	40 (D)
Aldicarbe	10 (3)	(D)	Metolacloro	10	100 (C)
Ametrina		60 (D)	Metribuzina		200 (D)
Atrazina	2 (2B)	200 R (C)	Molinato	6	
Bromacilo		90 (C)	Paraquato		30 (C)
Carbaril		700 (D)	Paratião-metilo		2 (D)
Carbofurão	5	40 (E)	Pendimetalina	20	
Clorotalonil		150 (B2) [c]	Pentaclorofenol	9 P (2B)	30 (B2) [c]
Clorpirifos		20 (D)	Propanil	20	
Cianazina		1	Propazina		10 (C)
Clorotolurão	30		Simazina	2 (3)	4 (C)
2,4-D	30 (2B)	70 (D)	2,4,5-T	9 (2B)	70 (D)
2,4-DB	90 (2B)		Terbacilo		90 (E)
Diazinão		0,6 (E)	Trifluralina	20 (3)	5 (C)

* A OMS atribui uma contribuição de 1% para a ADI (para os restantes é de 10%)
[a] - entre parêntesis apresenta-se o grupo de carcinogenicidade da IARC. [b] - considera um adulto com o peso de 70 kg, ao contrário da OMS que considera um indivíduo com 60 kg. Entre parêntesis apresenta-se o grupo de carcinogenicidade segundo a US EPA. [c] - concentrações responsáveis por um risco de cancro inferior a 10^{-4}. R - revisão, P - provisório

Na preparação dos valores guia, a OMS utiliza indicadores de toxicidade fornecidos por comissões especializadas (ex.: IPCS – International Programme on Chemical Safety, JMPR

– Joint FAO/WHO Meeting on Pesticide Residues, JECFA – Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives e IARC), assumindo o consumo de 2 litros de água por um indivíduo adulto com o peso de 60 kg. Nesse mesmo cálculo, em geral, considera-se que a exposição a pesticidas por via do consumo de água corresponde a 10% da dose diária aceitável (ADI) (43). A este respeito, exceptuam-se a aldrina, dieldrina, clordano, DDT, heptacloro e hexaclorobenzeno, entre outros, que sendo compostos organoclorados com elevada persistência e propensão para a bioacumulação, se presume que sejam veiculados essencialmente pelos alimentos. Por essa razão, considera-se o aporte pela água correspondente a 1% da ADI. Os valores obtidos desta forma reflectem verdadeiramente o possível impacto na saúde humana, sendo considerado seguro o consumo diário de tais doses na água durante o período completo da esperança de vida (43). Ainda assim, fica por considerar uma possível exposição cumulativa a vários pesticidas e por diferentes vias, mesmo que, se não impossível, esta seria uma tarefa extremamente difícil de levar à prática dada a enorme variabilidade de padrões de exposição.

Cada vez mais os governos parecem considerar que não existe nenhuma razão de compromisso a ponderar que aconselhe a aceitação de níveis de pesticidas na água para consumo humano. Terá sido esta uma das razões que norteou a imposição do limite legal que vigora na UE, de 0,1 $\mu g\ L^{-1}$ por substância individualizada, e que se traduz efectivamente na aceitação de concentrações nulas de pesticidas na água, à data da sua fixação (43). A filosofia que orienta a politica da UE nesta área baseia-se no "princípio da precaução" que, não tendo quaisquer bases toxicológicas, se limita a preconizar um nível de contaminação tão baixo quanto a capacidade de detecção dos métodos analíticos disponíveis consigam atingir. Não são tolerados resíduos de pesticidas na água, mesmo que em concentrações vestigiárias. Com estas fortes restrições decorrentes da legislação respeitante à qualidade da água, espera-se deter o aumento da contaminação com pesticidas e, eventualmente, conseguir uma baixa desses níveis no futuro (7). Também a OMS reconhece que, embora os seus valores guia correspondam a um nível de qualidade da água aceitável, a sua fixação não deve constituir uma justificação para permitir a degradação da qualidade da água para consumo humano até aos valores estabelecidos. Da confrontação do limite único imposto na UE com os valores propostos pela US EPA (Tabela 2.7), é possível encontrar situações como a do glifosato em que o limite em vigor na UE é inferior em mais de 1000 vezes. Este facto tem fortes consequências não só nas práticas agrícolas como também no esforço económico a empreender pelos laboratórios para efectuar a sua determinação em amostras de água, com respeito aquele nível de qualidade (7).

Na UE foram inicialmente expressos requisitos de qualidade da água para consumo humano através da Directiva 80/778/CEE, de 15 de Julho, que fixou a concentração máxima admissível de pesticidas em 0,1 $\mu g\ L^{-1}$ por substância individualizada e 0,5 $\mu g\ L^{-1}$ para o total de pesticidas presentes na água. Estes níveis foram igualmente definidos como valores máximos admissíveis (VMA) na legislação nacional, através do Decreto-Lei n.º 74/90, de 7 de Março. O Decreto-Lei n.º 236/98, de 01 de Agosto, que revoga o Decreto-Lei n.º 74/90, inclui também disposições relativas a pesticidas e compostos organoclorados que devem ser alvo de análise em águas superficiais, subterrâneas ou para consumo humano, fazendo uma transposição mais completa das Directivas comunitárias sobre substâncias perigosas, bem como da Directiva 80/778/CEE, relativa as águas para consumo humano (48).

A legislação comunitária que rege a qualidade da água para consumo humano é, actualmente, a Directiva 98/83/CE, de 3 de Novembro, transposta para o Direito Nacional através do Decreto-Lei n.º 243/2001, de 5 de Setembro. O âmbito da monitorização de pesticidas é agora mais alargado prevendo-se a pesquisa de pesticidas pertencentes a diversas classes de actividade, incluindo também os metabolitos mais relevantes, assim como os respectivos produtos de degradação e reacção (49, 50). As concentrações limite de pesticidas estabelecidas anteriormente são mantidas, com a excepção da aldrina, dieldrina, heptacloro e heptacloro epóxido que, sendo consideradas substâncias muito perigosas, vêm o seu limite alterado para 0,030 $\mu g\ L^{-1}$. Estes diplomas legislativos estabelecem ainda que, só necessitam de ser pesquisados os pesticidas cuja presença seja provável num determinado sistema de fornecimento de água para consumo humano (49, 50). Com esta cláusula, pretendeu-se inserir alguma racionalidade na implementação dos programas de monitorização de pesticidas contudo, abre-se uma nova brecha de subjectividade na definição dos pesticidas de interesse para pesquisar num contexto regional, em Portugal a cargo do Instituto Regulador de Águas e de Resíduos (IRAR), sob consultação da DGPC. Igual cenário se coloca na definição dos produtos de degradação a pesquisar que, antes de mais, terá que assentar em consensos científicos sob a sua relevância em termos quantitativos e toxicológicos.

Recentemente, um dos instrumentos de âmbito europeu mais importante na gestão sustentável da qualidade das águas constitui a Directiva 2000/60/CE, de 23 de Outubro, conhecida como Directiva Quadro da Água (DQA) (51). O anexo X a esta Directiva é estabelecido pela Decisão n.º 2455/2001/CE, de 20 de Novembro, que compila a lista das substâncias prioritárias no domínio da política da água, entre as quais se encontram muitos pesticidas, pelo seu risco para o meio aquático ou por intermédio deste, nomeadamente o risco de contaminação das fontes de água para consumo humano (52).

2.4.3.2 Resíduos no solo

O solo é dos compartimentos terrestres aquele que sofre um impacto mais imediato após a aplicação de pesticidas. Quantidades na ordem de miligramas de substâncias activas acabam por ser depositadas à sua superfície ou são directamente incorporadas para exercerem actividade contra espécies prejudiciais que habitam o solo. Os resíduos de pesticidas resultantes dos processos de fabrico são também um factor importante de deterioração do solo. Não obstante, as medidas legislativas que conduzam à prevenção da contaminação do solo por pesticidas e que incentivem a sua monitorização são escassas, particularmente quando comparadas com as mesmas medidas no domínio do meio aquático.

A importância da protecção do solo é reconhecida a nível da UE, que alertou para a necessidade de uma estratégia temática para a protecção do solo (53). Deverá avançar-se no sentido da preparação de legislação específica dirigida ao problema da contaminação local e difusa por substâncias químicas perigosas, incluindo uma rede europeia de monitorização do solo. Actualmente, as recomendações no âmbito da política geral de ambiente e política agrícola comum englobam já alguns princípios de protecção do solo (53). Um importante acto legislativo que aponta no sentido da redução dos resíduos de pesticidas no solo, e que continua a ser o suporte para uma avaliação racional das novas substâncias, é a Directiva 91/414/CEE (ver secção 2.4.2). São apresentados como critérios de decisão importantes a garantia de que o pesticida em causa não persista no solo nem com ele forme resíduos ligados de forma permanente (41). Outros diplomas têm sido produzidos na UE no sentido de regulamentar a eliminação e gestão de resíduos perigosos, desde logo estabelecendo as características e categorias de resíduos que obrigam a precauções especiais. Neste sentido, os biocidas e produtos fitofarmacêuticos foram incluídos no âmbito da Directiva 91/689/CEE, de 12 de Dezembro (54). A Decisão 2000/532/CE fixa uma lista de resíduos perigosos e substitui a Decisão 94/904/CE. Posteriormente foi alterada pela Decisão 2001/118/CE.

Embora a nível europeu as medidas legislativas com impacto na contaminação do solo com pesticidas sejam sobretudo de cariz regulador e preventivo, diversos países e instituições têm avançado com propostas que visam a avaliação e intervenção sobre solos contaminados. Na Europa, a norma holandesa é aquela que trata com maior profundidade este assunto, abrangendo simultaneamente poluentes inorgânicos e orgânicos, entre eles diversos pesticidas (55). Nesta norma, conhecida inicialmente como Lista ABC e mais tarde modificada para "New Dutch List", são apresentados valores guia para diferentes contaminantes em solos e águas subterrâneas. São fornecidos valores para um nível de

contaminação óptimo ou residual, que não afecta as propriedades naturais do solo e, valores de intervenção, acima dos quais se torna necessário proceder à remediação ou descontaminação do mesmo. Na Tabela 2.8 apresentam-se os valores limite para a presença de pesticidas em solos. Os valores guia de intervenção representam o limiar a partir do qual as características funcionais do solo são seriamente afectadas na sua relação com os animais e plantas, tendo em consideração estudos de toxicologia humana e ecotoxicologia. Os valores guia não são definidos para nenhum uso específico do solo, uma vez que se pretende que os solos alvo de intervenção fiquem aptos para qualquer tipo de actividade.

Tabela 2.8 – Valores guia de investigação e intervenção em solos contaminados com pesticidas fixados por diversas normas nacionais da Holanda, França e Espanha

	Norma Holandesa ($mg\ kg^{-1}$, peso seco)		Norma Francesa ($mg\ kg^{-1}$, peso seco)		Norma Espanhola ($mg\ kg^{-1}$, peso seco)		
Pesticida	Valor alvo	Valor de intervenção	FIV sensível	FIV não sensível	Uso industrial	Uso urbano	Outros usos
DDD/DDE/DDT [a]	0,01	4	4 [c]	20			
4, 4'-DDT					20	2	0,2
4, 4'-DDE					60	6	0,6
4, 4'-DDD					70	7	0,7
Total "Drinas"	0,005	4	4 [c]	20			
Aldrina	0,00006		4 [b]		1	0,1	0,01
Dieldrina	0,0005		[d]	[d]	1	0,1	0,01
Endrina	0,00004				1	0,1	0,01
Total HCH [a]	0,01	2	10 [b]	400 [b]			
α-HCH	0,003				1	0,1	0,01
β-HCH	0,009				1	0,1	0,01
γ-HCH (lindano)	0,00005		[d]	[d]	1	0,1	0,01
Atrazina	0,0002	6	6 [c]	30			
Carbaril	0,00003	5	5 [c]	25			
Carbofurão	0,00002	2	2 [c]	10			
Clordano	0,00003	4			1	0,1	0,01
Endossulfão	0,00001	4			60	6	0,6
Heptacloro	0,0007	4	[d]	[d]			
Heptacloro epóxido	0,0000002	4	[d]	[d]	1	0,1	0,01
Maneb	0,002	35	35 [c]	175			
MCPA	0,00005	4					
Organoestanhados	0,001	2,5					
Azinfos-metilo	0,000005	2 *					
Hexaclorobenzeno					1	0,1	0,01
Outros pesticidas			[d]	[d]			
Total pesticidas			[d]	[d]			

* - representa o valor limite para uma contaminação grave,

[a] – considera-se a soma dos respectivos isómeros; [b] - valores oficiais na Alemanha

[c] - valores da Holanda de 1994; [d] - valores a determinar caso a substância seja encontrada

A França, por seu turno, produziu um conjunto de valores guia para pesticidas, entre outros poluentes orgânicos e inorgânicos, na sua maioria tendo por base os valores guia holandeses e alemães. São fixados valores de impacto (FIV) para duas situações distintas de utilização do solo – uso sensível e não sensível (56). Também em Espanha foi recentemente publicada legislação conducente à identificação e caracterização de solos contaminados, no sentido de dar cumprimento à estratégia de UE relativa aos solos. O Real Decreto 9/2005, de 14 de Janeiro, aponta as actividades susceptíveis de contaminar o solo e as concentrações de referência de vários compostos orgânicos, incluindo pesticidas, para protecção da saúde humana e dos ecossistemas, tendo em perspectiva 3 cenários de utilização do solo (57). Tal como se apresenta na Tabela 2.8, a situação mais restritiva refere-se a "outros usos" do solo que podem incluir actividades agrícolas, florestais e pecuárias.

Normalmente, o valor de um poluente no solo a considerar deve ser um valor médio numa certa área. A persistência dos pesticidas é uma característica importante a ter em conta, uma vez que muitas das substâncias incluídas na Tabela 2.8 se enquadram na categoria dos POPs, nomeadamente os organoclorados. Interessa realçar que as fontes de contaminação pontual são aquelas que têm maior probabilidade de conduzir a níveis de contaminação do solo superiores aos valores guia, enquanto que as fontes de poluição difusa são essencialmente responsáveis por contaminação de grandes extensões a níveis mais baixos.

2.5 CONCLUSÕES

Em face das preocupações toxicológicas e ecotoxicológicas verdadeiramente alarmantes que o uso de pesticidas levanta, não só no presente como também a longo termo, e que podem por em perigo o equilíbrio de diversos ecossistemas terrestres, o tema dos pesticidas tem sido alvo de intensa discussão. O grande desconhecimento que ainda existe em relação ao comportamento dos pesticidas, níveis ambientais e suas consequências tem levado a uma panóplia de actos legislativos no sentido de minorar a contaminação na origem, e desta forma limitar os possíveis danos ambientais e para o Homem. Esta é a posição mais prudente, e economicamente mais favorável, considerando que a utilização de pesticidas permanecerá no futuro, e que contará com uma opinião pública cada vez mais consciente deste problema. Pretende-se, assim, disciplinar o uso de pesticidas em respeito pelo equilíbrio ecológico.

2.6 BIBLIOGRAFIA

(1) FAO. International Code of Conduct on the Distribution and Use of Pesticides, (Revised Version), Food and Agriculture Organization of the United Nations, Roma, Itália, p. 6.

(2) Ballantyne, B., Marrs, T.C. – Pesticides: an overview of fundamentals. In: T.C. Marrs, B. Ballantyne (Eds.) Pesticide Toxicology and International Regulation, John Wiley and Sons, Chichester, West Sussex, UK, 2004.

(3) Waxman, M.F. – The Agrochemical and Pesticides Safety Handbook, CRC Press LLC, Boca Raton, FL, USA, 1998.

(4) Hamilton, D., Crossley, S. – Introduction. In: D. Hamilton, S. Crossley (Eds.) Pesticides Residues in Food and Drinking Water: Human Exposure and Risks. John Wiley & Sons, Chichester, UK, 2004, pp. 1-25.

(5) Vieira, M. M. - Vendas de Produtos Fitofarmacêuticos em Portugal em 2003. Direcção Geral de Protecção das Culturas, Oeiras, Portugal, 2005, PPA(AB)-01/05. Edição em suporte digital

(6) Arthistory Club encyclopedia, http://www.arthistoryclub.com/art_history/Pesticide, página visualizada em 31 de Agosto 2005.

(7) Barceló, D., Hennion, M-C. - Trace determination of pesticides and their degradation products in water. Elsevier Science B. V, Amsterdão, Holanda, 1997.

(8) Smith, A.G. – Toxicology of organochlorine insecticides. In: T.C. Marrs, B. Ballantyne (Eds.) Pesticide Toxicology and International Regulation, John Wiley and Sons, Chichester, West Sussex, UK, 2004.

(9) Mörner, J., Bos, R., Fredrix, M. – Reducing and Eliminating the Use of Persistent Organic Pesticides. Guidance on alternative strategies for sustainable pest and vector management. WHO, UNEP, FAO, Genebra, 2002.

(10) Wilkinson, C.F. - Environmental toxicology: its role in crop protection. In: K. J. Brent, R. K. Atkin (Eds) Rational Pesticide Use. Cambridge University Press, Cambridge, UK, 1987, pp. 33-41.

(11) Stenersen, J. – Chemical Pesticides: Mode of Action and Toxicology. CRC Press, Boca Raton, FL, USA, 2004.

(12) Oliveira, A.B., Reis, C.J. (Eds.) – Guia dos produtos fitofarmacêuticos: lista dos produtos com venda autorizada. Direcção Geral de Protecção das Culturas, 2005. XXII, 171 p. (Guias e Catálogos, 0872-3230; 35). PPA (DSPF)-01/05.

(13) Davies, L., O'Connor, M., Logan, S. – Chronic intake. In: D. Hamilton, S. Crossley (Eds.) Pesticides Residues in Food and Drinking Water: Human Exposure and Risks. John Wiley & Sons, Chichester, UK, 2004, pp. 213-241.

(14) Van den Brink, N.W. – Directed transport of volatile organochlorine pollutants to polar regions: the effect on the contamination pattern of Antarctic seabirds. Sci. Total Environ., 198 (1997) 43-50.

(15) Blus, L.J. – Organochlorine pesticides. In: D.J. Hoffman, B.A. Rattner, G.A.Jr. Burton, J.Jr. Cairns (Eds.) Handbook of Ecotoxicology, 2nd Edition, CRC Press LLC, Boca Raton, FL, USA, 2003

(16) Ragnarsdottir, K.V. – Environmental fate and toxicology of organophosphate pesticides. J. Geol.

Soc., 157 (2000) 859-876.

(17) Ballantyne, B. – Toxicology of fungicides. In: T.C. Marrs, B. Ballantyne (Eds.) Pesticide Toxicology and International Regulation, John Wiley and Sons, Chichester, West Sussex, UK, 2004.

(18) Baldi, I., Mohammed-Brahim, B., Brochard, P., Dartigues, J.F., Salamon, R. – Long-term effects of pesticides on health: review of current epidemiologic knowledge. Rev. D'Epidemiologie Sante Publique, 46 (1998) 134-142.

(19) Sever, L.E., Arbuckle, T.E., Sweeney, A. – Reproductive and developmental effects of occupational pesticide exposure: the epidemiologic evidence. Occup. Med. State of the Art Rev., 12 (1997) 305-326.

(20) Kamrin, M.A. – Pesticides Profiles: Toxicity, Environmental Impact and Fate. CRC Press LLC, Boca Raton, FL, USA, 2000.

(21) Tarazona, J.V., Fresno, A., Aycard, S., Ramos, C., Vega, M.M., Carbonell, G. – Assessing the potential hazard of chemical substances for the terrestrial environment. Development of hazard classification criteria and quantitative environmental indicators. Sci. Total Environ., 247 (2000) 151-164.

(22) Maud, J., Edwards-Jones, G., Quin, F. – Comparative evaluation of pesticide risk indices for policy development and assessment in the United Kingdom. Agric. Ecosyst Environ. 86 (2001) 59-73

(23) Penrose, L.J., Thwaite, W.G., Bower, C.C. – Rating index as basis for decision making on pesticide use reduction and for accreditation of fruit produced under IPM. Crop Prot. 13 (1994) 146-152.

(24) WHO, UNEP, ILO – The WHO recommended classification of pesticides by hazard and guidelines to classification 2004. World Health Organization, Genebra, Suíça, 2005.

(25) Bates, J.A.R. – Health and environmental hazard classification of pesticides. Pesticide Outlook, 11(3) (2000) 109-115.

(26) Hussey, D.J., Bell, G.M. – Regulation of pesticides and biocides in the European Union. In: T.C. Marrs, B. Ballantyne (Eds.) Pesticide Toxicology and International Regulation, John Wiley and Sons, Chichester, West Sussex, UK, 2004.

(27) Greizerstein, H.B., Stison, C., Mendola, P., Buck, G.M., Kostyniak, P.J., Vena, J.E. – Comparison of PCB congeners and pesticide levels between serum and milk from lactating women. Environ. Res., 80 (1999) 280-286.

(28) Barr, D.B., Allen, R., Olsson, A.O., Bravo, R., Caltabiano, L.R., Montesano, A., Nguyen, J., Udunka, S., Walden, D., Walker, R.D., Weerasekera, G., Whitehead Jr., R.D., Schober, S.E., Needham, L.L. – Concentrations of selective metabolites of organophosphorous pesticides in the United States population. Environ. Res., 99 (2005) 314-326.

(29) Saieva, C., Aprea, C., Tumino, R., Masala, G., Salvini, S., Frasca, G., Giurdanella, M.C., Zanna, I., Decarli, A., Sciarra, G., Palli, D. – Twenty-four-hour urinary excretion of ten pesticide metabolites in healthy adults in two different areas of Italy (Florence and Ragusa). Sci. Total Environ., 332 (2004) 71-80.

(30) Blondell, J. – Epidemiology of pesticide poisonings in the United States, with special reference to occupational cases. Occup. Med., State of the Art Rev., 12 (1997) 209-220.

(31) Litovitz, T.A., Felberg, L., Soloway, R.A. – Annual reports of the American Association of Poison Control Centers. Toxic exposure surveillance system. Am.J. Emerg. Med. 13 (1994) 551-597.

(32) Sakellarides, T.M., Konstantinou, I.K., Hela, D.G., Lambropoulou, D., Dimou, A., Albanis, T.A.- Accumulation profiles of persistent organochlorines in liver and fat tissues of various waterbird species from Greece. Chemosphere, 63 (2006) 1392-1409.

(33) Veeramachaneni, D.N.R. – Deteriorating trends in male reproduction: idiopathic or environmental? Anim. Reprod. Sci. 60-61 (2000) 121-130.

(34) Saradha, B., Mathur, P.P. – Effect of environmental contaminants on male reproduction. Environ. Toxicol. Pharmacol. 21 (2006) 34-41.

(35) CEE - Directiva 67/548/CEE do Conselho, de 27 de Junho de 1967, relativa à aproximação das disposições legislativas, regulamentares e administrativas respeitantes à classificação, embalagem e rotulagem das substâncias perigosas. J. Ofic. Comun. Eur. L 196 de 16/08/1967, Bruxelas, Bélgica.

(36) CE - Directiva 2001/59/CE da Comissão, de 06 de Agosto de 2001, que adapta ao prgresso técnico pela vigésima oitava vez a Directiva 67/548/CEE do Conselho, relativa à aproximação das disposições legislativas, regulamentares e administrativas respeitantes à classificação, embalagem e rotulagem das substâncias perigosas. J. Ofic. Comun. Eur. L 255 de 28/08/2001, Bruxelas, Bélgica.

(37) UN, UNEP, FAO – Rotterdam Convention, on the prior informed consent procedure for certain hazardous chemicals and pesticides in international trade. Text and Annexes. United Nations Environment Programme, Genebra, Suíça, 2005.

(38) UNEP – Ridding the world of POPs: a guide to the Stockholm Convention on persistent organic pollutants, United Nations Environment Programme, Genebra, Suíça, 2005.

(39) CEE - Directiva 91/414/CEE do Conselho, de 15 de Julho de 1991, relativa à colocação dos produtos fitofarmacêuticos no mercado. J. Ofic. Comun. Eur. L 230 de 19/08/1991, Texto Consolidado CONSLEG: 1991L0414 de 01/01/2004, Bruxelas, Bélgica.

(40) CE - Directiva 98/8/CE do Conselho e do Parlamento Europeu, de 16 de Fevereiro de 1998, relativa à colocação dos produtos biocidas no mercado. J. Ofic. Comun. Eur. L 123 de 24/04/1998, Bruxelas, Bélgica.

(41) CE - Guidance Document on Persistence in Soil, Guidance Doc. No. 9188/VI/97-rev.8, Comissão Europeia, Direcção Geral para a Agricultura, DG VI B II-1, Bruxelas, Bélgica, 2000.

(42) Decreto-Lei nº 94/98, de 15 de Abril de 1998 – Adopta as normas técnicas de execução referentes à colocação dos produtos fitofarmacêuticos no mercado. Diário da República Série I-A nº 88/98, 1625-1689.

(43) van Eck, W.H. – International standards: the international harmonization of pesticide residue standards for food and drinking water. In: D. Hamilton, S. Crossley (Eds.) Pesticides Residues in Food and Drinking Water: Human Exposure and Risks. John Wiley & Sons, Chichester, UK, 2004, pp. 295-338.

(44) Travis, K.Z., Hamilton, D., Davies, L., O'Mullane, M., Mueller, U. – Acute Intake. In: D. Hamilton, S. Crossley (Eds.) Pesticides Residues in Food and Drinking Water: Human Exposure and Risks. John Wiley & Sons, Chichester, UK, 2004, pp. 244-268.

(45) Margni, M., Rossier, D., Crettaz, P., Jolliet, O. – Life cycle impact assessment of pesticides on human health and ecossystems. Agric. Ecosyst. Environ., 93 (2002) 379-392.

(46) OMS – Guidelines for Drinking Water Quality, Volume 1 – Recommendations, 2ª Edição, Genebra, Suíça, 1998.

(47) US EPA – Drinking water standards and health advisories. U.S. Environmental Protection Agency, Office of Water, Washington DC, USA, 2004, EPA 822-R-04-005, 20 p.

(48) Mendes, B., Oliveira, J.F.S. – Qualidade da Água para Consumo Humano, Lidel, Lisboa, 2004, p. 463.

(49) CE - Directiva 98/83/CE do Conselho, de 03 de Novembro de 1998, relativa à qualidade da água destinada ao consumo humano. J. Ofic. Comun. Eur. L 330 de 05/12/98, Bruxelas, Bélgica.

(50) Decreto-Lei nº 243/2001, de 5 de Setembro de 2001 – Aprovas as normas relativas à qualidade da água destinada ao consumo humano, transpondo para o direito interno a Directiva 98/83/CE, do Conselho, de 03 de Novembro de 1998, relativa à qualidade da água destinada ao consumo humano, Diário da República Série I-A nº 206 de 05/09/2001, 5754-5765.

(51) CE – Directiva 2000/60/CE do Parlamento Europeu e do Conselho, de 23 de Outubro de 2000, que estabelece um quadro de acção comunitária no domínio da política da água. J. Ofic. Comun. Eur. L 327/1 de 22/12/2000, Bruxelas, Bélgica.

(52) CE – Decisão 2455/2001/CE, do Parlamento Europeu e do Conselho, de 20 de Novembro de 2001, que estabelece a lista de substâncias prioritárias no domínio da política da água e altera a Directiva 2000/60/CE. J. Ofic. Comun. Eur. L 331/1 de 15/12/2001, Bruxelas, Bélgica.

(53) CE – Comunicação da Comissão ao Conselho, ao Parlamento Europeu, ao Comité Económico e Social e ao Comité das Regiões, "Para uma estratégia temática de protecção do solo", COM(2002) 179 final, Comissão das Comunidades Europeias, Bruxelas, Bélgica, 2002.

(54) CEE - Directiva 91/698/CEE do Conselho, de 12 de Dezembro de 1991, relativa aos resíduos perigosos. J. Ofic. Comun. Eur. L 377 de 31/12/1991, Bruxelas, Bélgica.

(55) Circular on target values and intervention values for soil remediation: DBO/1999226863. Netherlands Government Gazette n.º 39 de 04 de Fevereiro de 2000, Ministry of Housing, Spatial Planning and Environment, Directorate-General for Environmental Protection, Department of Soil Protection, The Hague, Holanda.

(56) Darmendrail D. - The French approach to contaminated-land management. BRGM/RP-51098-FR, França, 2001.

(57) Real Decreto 9/2005, de 14 de Janeiro de 2005, por el que se establece la relación de actividades potencialmente contaminantes del suelo e los criterios y estándares para la declaración de suelos contaminados, BOE n.º 15, 1/01/2005, Espanha.

Capítulo 3

PRESENÇA E COMPORTAMENTO AMBIENTAL DOS PESTICIDAS

3.1 EVOLUÇÃO DO MERCADO DE PESTICIDAS E PERSPECTIVAS FUTURAS

O mercado de pesticidas à escala global é um sector de extrema importância. Normalmente é feita a avaliação da sua relevância económica usando como indicadores as quantidades vendidas ou o valor monetário envolvido na comercialização dos produtos fitofarmacêuticos, que são os dados mais facilmente acessíveis. A importância deste assunto relaciona-se com o facto de os montantes crescentes de pesticidas que têm vindo a ser usados poderem ser um indicador dos riscos a que o Homem e o Ambiente ficam sujeitos.

A Tabela 3.1 apresenta os valores envolvidos no mercado de pesticidas desde as primeiras décadas de actividade desta indústria até aos tempos mais recentes, bem como a evolução das categorias mais importantes (1, 2). Comparando os valores desde 1960 até 1993, período de grande expansão no uso dos pesticidas, registou-se um crescimento médio anual de 12%. Neste período, o grupo de pesticidas com um crescimento mais notável foi o dos herbicidas, mais do que duplicando os valores envolvidos na transacção comercial, os fungicidas decresceram para cerca de metade, ao passo que os insecticidas diminuíram ligeiramente (1). No período de 1993-2000, o crescimento do mercado de pesticidas abrandou, fixando-se em cerca de 4%. As percentagens relativas de distribuição pelas principais classes de pesticidas mantiveram-se essencialmente iguais, com uma ligeira redução do valor dos insecticidas.

Tabela 3.1 – Evolução do mercado de pesticidas no período 1960-2001 e sua distribuição pelas principais categorias de pesticidas

	1960	1993	1995	1998	2000	2001
Total de vendas de pesticidas (milhões de dólares US)	580	25300	37696	34150	32769	31756
Herbicidas (%)	19	45	43		44	44
Insecticidas (%)	37	31	33		28	28
Fungicidas (%)	40	19	17		19	19
Outros pesticidas (%)	4	5	7		9	9

FACULDADE DE FARMÁCIA DO PORTO BIBLIOTECA

Em 1995, terão sido registados os valores absolutos mais elevados de sempre, atingindo cerca de 38 000 milhões de dólares americanos. Nos anos seguintes verificou-se um decréscimo no comércio global de pesticidas em cerca de 5,2% em 1999, relativamente ao ano anterior, e de 1,8% em 2000. O crescimento do mercado de pesticidas em valor económico e quantidades vendidas tem sofrido uma diferenciação de acordo com as regiões do mundo. Depois do crescimento generalizado verificado até finais da década de 90, é de supor que possa seguir-se uma rápida subida do consumo nos países em vias de desenvolvimento, enquanto que nos países desenvolvidos da Europa e América do Norte o mercado estabilize ou sofra mesmo um ligeiro decréscimo (1). Este efeito pode verificar-se já, em parte, na Tabela 3.2 (3, 4). Os consumos na América Latina têm vindo a subir, em que o principal contributo vem do Brasil e Argentina, onde se localiza grande parte da área arável por explorar. De notar que, os valores apresentados na Tabela 3.1 e na Tabela 3.2 poderão apresentar uma ligeira divergência em virtude do uso de fontes diferentes.

Se em vez do volume de vendas considerarmos o número de substâncias activas registadas, também se conclui que depois de um máximo na década de 80, com 1200 substâncias registadas nos EUA, esse valor diminuiu para 860 em 1993, e destas apenas 200 têm uma produção significativa (5). A regressão no consumo de pesticidas nas zonas mais desenvolvidas está relacionada com a escolha de substâncias activas mais potentes usadas em menores quantidades, o uso mais eficiente das mesmas e a crescente consciencialização dos agricultores e envolvimento das associações profissionais e ambientais no sentido de reduzir o consumo de pesticidas e os riscos a eles associados (1, 5, 6). Alguns factores imprevistos de ordem climática, zootécnica e valor económico das produções são também causas possíveis de flutuações extemporâneas nas tendências de consumo a nível regional.

Tabela 3.2 – Evolução da contribuição das diversas regiões do mundo para o valor anual de consumo de pesticidas, no período 1983-2000 e alteração da repartição percentual

Região	1983		1993		1998		2000	
	Dólares US	%	Dólares US	%	Dólares US	%	Dólares US	%
América do Norte	3991	19,5	7377	26,8	8980	26,3	8800	29,6
Europa Ocidental	5847	28,5	7173	26,1	9000	26,3	6530	21,9
Ásia/Oceânia	5572	27,2	6814	24,8	8370	24,5	7590	25,4
Europa de Leste	2898	14,1	2571	9,3	3190	9,3		
América Latina	1258	6,1	2307	8,4	3000	8,8	3800	12,8
África/Médio Oriente	942	4,6	1258	4,6	1610	4,7		
Resto do Mundo							3060	10,3
Total Mundial	20507	100	27500	100	34150	100	29780	100

Estima-se que o mercado global de pesticidas poderá crescer cerca de 1% por ano até 2005, atingindo nessa altura um volume comercial de 31,4 biliões de dólares americanos (3).

Actualmente, a redução da dependência dos pesticidas na agricultura é um tema que está na ordem do dia. Esse objectivo poderá passar por um uso mais eficiente dos produtos fitofarmacêuticos através da escolha correcta do tipo, quantidade e momento em que os tratamentos são efectuados. Os produtos microbiológicos de controlo das pragas vão sendo paulatinamente introduzidos no mercado embora as expectativas não excedessem 5% dos produtos fitofarmacêuticos no ano 2000. Da mesma forma, vão sendo produzidas espécies vegetais mais resistentes aos infestantes. Em ambos os casos, o custo supera o dos pesticidas convencionais e a rapidez e eficácia de acção ficam, em geral, aquém da daqueles (5).

No momento actual, o abandono completo do uso de pesticidas não é uma opção que possa ser considerada com sensatez. O uso de pesticidas deverá continuar, embora com padrões diferentes. A necessidade de alimentos é o principal factor que governa a intensidade da produção agrícola. Com a população mundial em crescimento, e ao mesmo tempo tentando fazer-se uma distribuição mais igualitária dos alimentos nas zonas do globo mais desfavorecidas, os pesticidas são necessários para o aumento da produtividade agrícola. O uso de pesticidas permitiu já duplicar ou triplicar a quantidade de alimentos produzida nos últimos 50 anos, que poderá ter que ser duplicada nas próximas décadas quando a população mundial passar dos 6 biliões actuais para cerca de 9 biliões de pessoas (7).

Alguns autores expressam o receio de que os elevados cuidados ambientais e a forte regulamentação exercida sobre os pesticidas, acarretando custos avultados para as empresas, possam levar a uma desincentivação da procura de novas substâncias com maior pendor de benefícios e menores riscos (5, 7). Efectivamente, grande parte das substâncias usadas na actualidade foi descoberta antes de 1976. Há necessidade de apostar no desenvolvimento de pesticidas cada vez mais selectivos, que actuem através de novos mecanismos de acção, para combater organismos resistentes sem ameaçar as espécies não visadas. No entanto, o seu sucesso estará dependente da utilidade que possam ter para o uso nas principais culturas à escala mundial, como são o milho, trigo, arroz, soja e algodão (5).

3.1.1 Consumo de pesticidas a nível mundial e na Europa

Actualmente, em todo o mundo, cerca de 890 substâncias estão autorizadas a ser comercializadas como pesticidas, estimando-se em cerca de 27000 as formulações

comerciais que os incluem. Na Europa, o número de pesticidas autorizados pode ir de inferior a uma dezena, em Malta, até superior a 500 (Espanha – 531, França – 525, Roménia – 530). Em Portugal são cerca de 250 (8). Na edição de 2000 do "The Pesticide Manual", Tomlin, citado por Stenersen, descreve 812 pesticidas actuais e 598 pesticidas obsoletos, o que completa cerca de 1400 moléculas com actividade pesticida usadas até aos nossos dias (9). Os OPPs continuam a ser o grupo de insecticidas mais representativo (67 s.a.) contudo, os piretróides começam já a ter uma presença significativa (41 s.a.). No grupo dos fungicidas, os azóis constituem a classe química mais importante (31 s.a.). No que concerne aos herbicidas, vários grupos importantes partilham essa função, entre eles: as triazinas (16 s.a.), as ureias (17 s.a.) e os ácidos fenoxiacéticos (20 s.a.) (9). Ultimamente, tem-se vindo a dar preferência a outros herbicidas extremamente potentes, como as sulfonilureias (20 s.a.) e o glifosato (6, 9).

Actualmente, os países em desenvolvimento situados em zonas quentes na Ásia, África e América Latina usam metade dos insecticidas enquanto que os países industrializados da América do Norte e Europa (zonas temperadas) usam grande parte dos herbicidas, e juntamente com o Japão reúnem cerca de ¾ do mercado mundial de pesticidas (5). O consumo de pesticidas na Europa representa, actualmente, cerca de ¼ do mercado global. A Tabela 3.3 apresenta estimativas do consumo de pesticidas a nível mundial e na Europa, nos últimos anos. De notar que, os valores da US EPA (2) para os consumos mundiais incluem todos os tipos de usos, enquanto que os fornecidos pela EUROSTAT (10) para a Europa incluem apenas aos usos na agricultura. Tanto nos EUA como na Europa, um pequeno número de pesticidas é responsável por grande parte das quantidades consumidas. Por exemplo, nos EUA em 1993, os herbicidas: atrazina, alacloro e metolacloro, juntos, constituíram 27-29% de todos os herbicidas, e os consumos acumulados de enxofre, clorotalonil e mancozebe, 49-60% de todos os fungicidas vendidos (11). Na Tabela 3.4 apresenta-se uma lista dos pesticidas mais usados a nível mundial (12) e europeu (1, 13).

Tabela 3.3 – Consumo de pesticidas (toneladas de substâncias activas) a nível mundial e na Europa em 2000 e 2001, distribuídos pelas principais categorias

	Consumo Mundial				Consumo na Europa				%	%
toneladas s.a.	2000	%	2001	%	2000	%	2001	%	2000	2001
Herbicidas	881798	36	848232	37	151275	39	134406	40	17	16
Insecticidas	614628	25	558835	24	34465	9	23630	7	6	4
Fungicidas	234058	10	215460	9	117929	30	102155	30	48	48
Outros pesticidas	696730	29	666338	29	83248	22	76410	23	12	11
Total	2427214	100	2288865	100	386917	100	336601	100	16	15

Tabela 3.4 – Pesticidas mais usados a nível mundial e na Europa

Pesticidas mais usados a nível mundial			Pesticidas mais utilizados na Europa	
Herbicidas	**Insecticidas**	**Fungicidas**	**1990**	**1999**
Glifosato	Clorpirifos	Mancozebe	Atrazina	Enxofre
Atrazina	Imidaclopride	Clorotalonil	1,3-dicloropropeno	1,3-dicloropropeno
Metolacloro	Cipermetrina	Propiconazole	Glifosato	Cobre
Imazetapir	Carbofurão	Metalaxil	Isoproturão	Glifosato
2,4-D	Metamidofos		Mancozebe	Mancozebe
Paraquato	Monocrotofos		Manebe	Isoproturão
Trifluralina	Endossulfão		Mecoprope	Clormequato
Pendimetalina			MCPA	Alacloro
Dicamba			Metame-sódio	Pendimetalina
Nicosulfurão			Alacloro	Metolacloro
Isoproturão			Clortolurão	
MCPA			Clormequato	
Bentazona			Clorotalonil	
			2,4-D	

Na Europa, cerca de 77% da sua área é coberta de vegetação sendo 44% destinada à agricultura, daí que se possa estabelecer uma clara relação entre a qualidade do ambiente e as práticas agrícolas (14). Sabendo-se que, cerca de 87% de todos os pesticidas consumidos se destinam à agricultura, mais se percebe o forte impacto potencial desta actividade em termos de contaminação ambiental. No início da década de 90, verificou-se na UE um decréscimo acentuado do volume de pesticidas consumidos causado por mudanças nas práticas de protecção das culturas, assentando num uso mais eficiente dos pesticidas (13). Como mostra a Figura 3.1, com base em valores da EUROSTAT (15), a partir de 1995 essa tendência foi revertida entrando-se numa fase de acentuado crescimento até 1997. Entre 1997 e 1999, o mercado estabilizou próximo das 350 000 toneladas de pesticidas vendidas, seguindo-se um novo período de decréscimo, a que não terá sido alheia a baixa histórica de preços verificada para a produção agrícola (3). A título comparativo mostra-se aqui também a evolução seguida pelo consumo de pesticidas em Portugal.

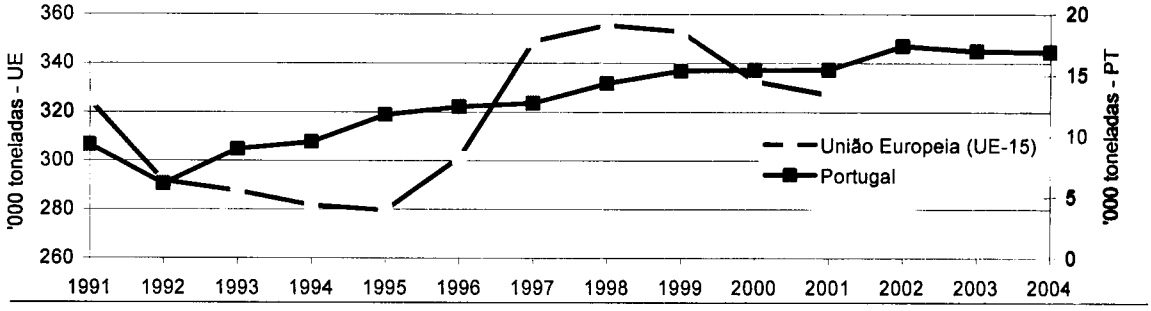


Figura 3.1 – Evolução do consumo de pesticidas, em toneladas de s.a., na União Europeia e em Portugal no período compreendido entre 1991 e 2004

Os valores mais recentes dos consumos de pesticidas nos países da UE são apresentados na Tabela 3.5 (15). Uma representação mais elucidativa da dimensão dos mercados de pesticidas nos Estados-membros, como a que se mostra na Figura 3.2, permite verificar que a França, a Itália, a Espanha e o Reino Unido recorrem ao uso de pesticidas em grande escala, abrangendo em conjunto cerca de 75% do mercado europeu. Contudo, uma indicação mais fiel da intensidade do seu uso é obtida considerando, em alternativa, a quantidade aplicada por unidade de área cultivada, como se ilustra na Figura 3.3, Figura 3.4 e Figura 3.5 (16).

Tabela 3.5 – Consumo de pesticidas, em toneladas de s.a., nos Estados-membros da UE, no período entre 1998 e 2003

Estado-membro	1998	1999	2000	2001	2002	2003
Bélgica	9861	9521	9953	8845	9204	-
Dinamarca	3619	2788	2747	2890	2722	-
Alemanha	33644	30231	30331	27885	29531	-
Grécia	11479	10153	11131	11111	-	-
Espanha	35070	33614	34597	35700	-	-
França	107753	114695	97490	99635	-	-
Irlanda	2534	2102	2133	2246	-	-
Itália	84526	82048	79831	76346	94711	-
Luxemburgo	430	421	-	-	-	-
Holanda	10722	10232	9653	7865	8072	-
Áustria	3340	3418	3563	3133	-	-
Portugal	14375	15396	15470	15491	17435	17030
Finlândia	1164	1141	1146	1424	1614,2	-
Suécia	1629	1698	1652	1738	1711	-
Reino Unido	35391	35481	33109	32971	31064	-
União Europeia (UE-15)	355537	352939	332806	327280	-	-

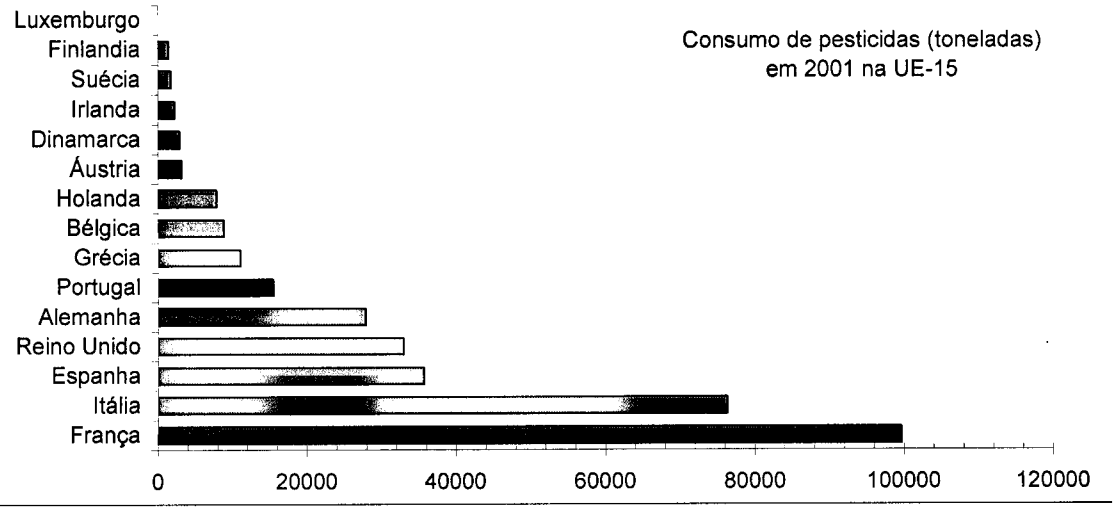


Figura 3.2 – Quantidades de pesticidas consumidas nos Estados-membros da UE durante o ano de 2001. O Luxemburgo não apresentou resultados

Em 2001, a distribuição dos pesticidas pelas principais classes, segundo os critérios da EUROSTAT, foi a seguinte: fungicidas - 45,6%, herbicidas - 34,1%, insecticidas - 10,2% e outros pesticidas - 10,1%. Na Europa, os fungicidas são usados numa proporção superior à média mundial. Este tipo de compostos é usado com grande intensidade nos países mediterrânicos que, devido ao seu clima, sentem maior necessidade de debelar as infestações por fungos, particularmente na vinha. Em oposição a estes, os países do centro da Europa recorrem preferencialmente aos herbicidas, como se pode verificar nas Figuras abaixo.

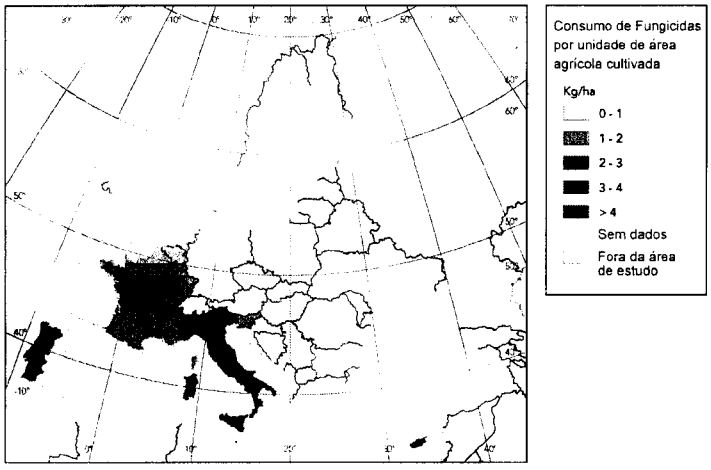


Figura 3.3 – Consumo de fungicidas por unidade de área agrícola cultivada, na Europa, em 1996

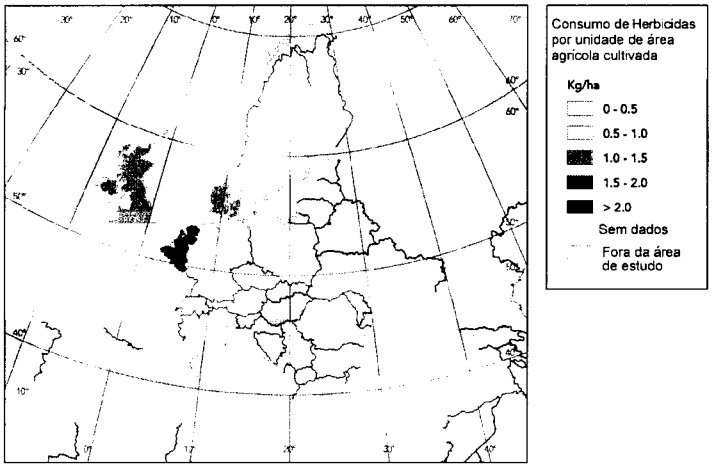


Figura 3.4 – Consumo de herbicidas por unidade de área agrícola cultivada, na Europa, em 1996

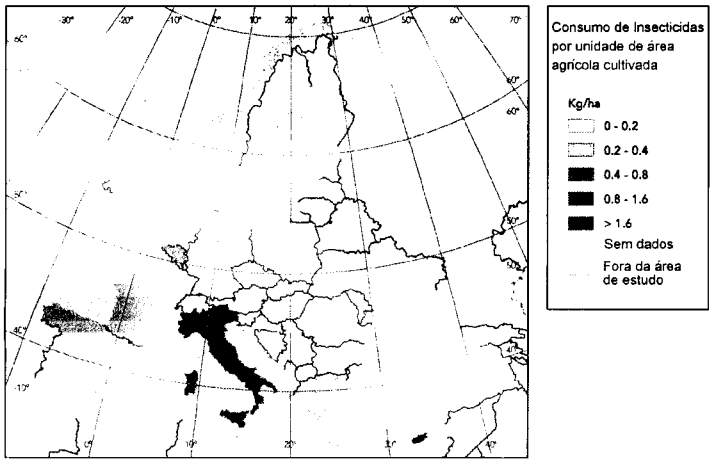


Figura 3.5 – Consumo de insecticidas por unidade de área agrícola cultivada, na Europa, em 1996

3.1.2 Consumo de pesticidas em Portugal

Em 01 de Janeiro de 2005, 800 produtos fitofarmacêuticos detinham autorização de comercialização em Portugal, abrangendo um espectro de 261 substâncias activas (17). Destas, 72 têm acção fungicida, 74 são insecticidas/acaricidas, 74 são herbicidas, e 18 são reguladores de crescimento, havendo algumas substâncias com funções diversas e múltiplas (18). Tal como se pôde verificar pela Figura 3.1, o consumo de pesticidas em Portugal tem seguido uma tendência crescente, não acompanhando um certo abrandamento verificado na Europa em meados da década de 90. Só em 2002-2004 se verificaram sinais ténues de regressão. A evolução sofrida por cada uma das principais classes de pesticidas encontra-se ilustrada na Figura 3.6. Um dos aspectos mais importantes que sobressai do perfil do consumo português é a predominância dos fungicidas, com percentagens consecutivamente superiores a 70%. Dentro dos fungicidas merece especial destaque o caso do enxofre que, por si só, tem sido responsável por mais de 50% das quantidades totais vendidas e 70% entre os fungicidas (19). A razão mais apontada para esta ocorrência relaciona-se com a grande implantação da cultura da vinha em Portugal, que é o principal destino do enxofre, onde é usado em grandes quantidades e taxas de aplicação que excedem os 20 kg/ha (13, 20).

Em 2003, a repartição percentual do consumo de pesticidas pelas categorias mais relevantes, origina a distribuição que se mostra na Figura 3.7 (21). Por seu lado, a Tabela 3.6 apresenta uma lista ordenada das substâncias activas mais requisitas em 2003, de acordo com o tipo de actividade pesticida que exibem (21). Excluindo os fungicidas inorgânicos que são, por si, os responsáveis pela maior quota de vendas de pesticidas, e focando a atenção nos pesticidas orgânicos de síntese, uma análise de Pareto como a que se representa na Figura 3.8, permite identificar os pesticidas com maior aplicação na agricultura nacional.

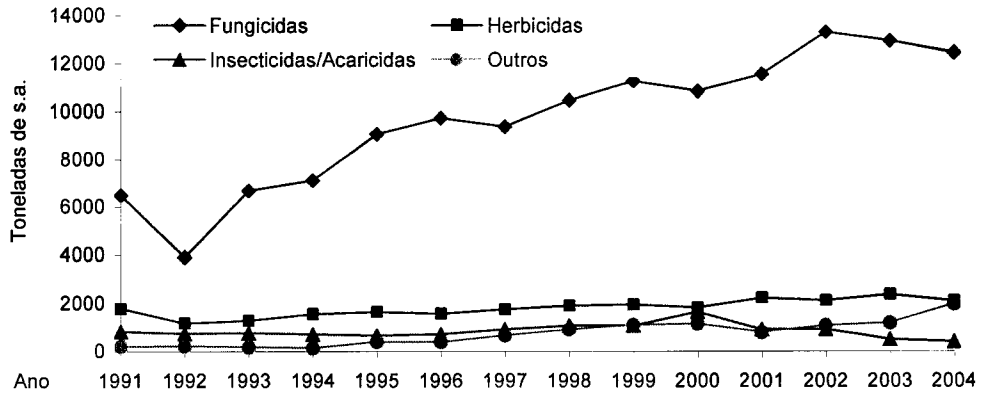


Figura 3.6 – Evolução do consumo de pesticidas em Portugal, no período 1991-2004, segundo as principais classes de actividade

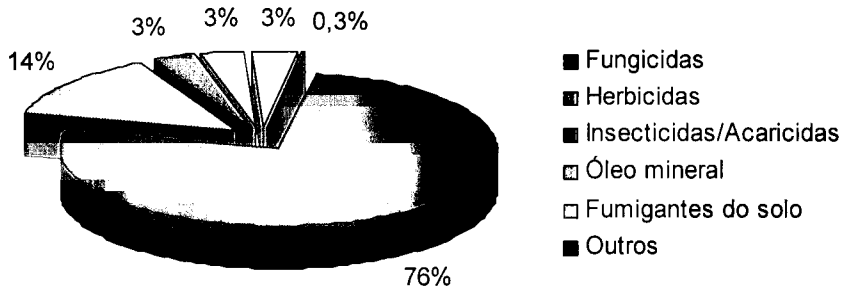


Figura 3.7 – Repartição percentual dos consumos de pesticidas pelas suas principais categorias, no ano de 2003

Tabela 3.6 – Substâncias activas mais vendidas em 2003 (kg), por classe de actividade

Fungicidas, kg		Herbicidas, kg		Insecticidas, kg	
Enxofre	10232782	Glifosato	1031905	Clorpirifos	96484
Mancozebe	601249	Alacloro	243527	Dimetoato	95882
Cobre (sulfato)	378573	Atrazina	180182	1,3-dicloropropeno	74328
Cobre (oxicloreto)	367053	Simazina	110905	Endossulfão	41070
Folpete	250913	Paraquato	109759	Fosmete	32043
Fosetil-alumínio	158039	Propanil	87284	Metidatião	13855
Captana	113648	Molinato	65861	Carbofurão	11348
Tirame	89570	EPTC	46244	Acefato	9105
Cimoxanil	60716	Amitrol	45060	Malatião	8771
Dinocape	17291	Diurão	44226	Carbaril	7397
Benomil	16088	MCPA	39905	Diazinão	7257
Dodina	7175	Linurão	31138	Metomil	5957
Clorotalonil	7169	Isoproturão	22073	Clorfenvinfos	5749
Carbendazime	6864	Clortolurão	13385	Dicofol	4240
Metalaxil	5536	Triclopir	13296	Cihexaestanho	3579
Propamocarbe	5498	2,4-D	10695	Amitraze	3473
Zirame	5016	Metribuzina	8353	Azinfos-metilo	3473
Benalaxil	1483	Metamitrão	7907	Cipermetrina	2820
Fenarimol	1450	Trifluralina	5171	Pirimicarbe	2715
Ofurace	620	Bromoxinil	3718	Tetradifão	1504
		Cloridazão	2159	Deltametrina	1308
				B. thuringiensis	1236
				α-cipermetrina	686

Considerando apenas os quantitativos de vendas, os pesticidas mais relevantes são os que se encontram na metade esquerda da Figura 3.8, dividida pela linha que assinala os 80% de peso de pesticidas orgânicos. Cabem neste grupo os pesticidas com vendas superiores a 89500 kg. A lista é encabeçada por conhecidos herbicidas como o glifosato, alacloro e atrazina e alguns fungicidas muito usados no tratamento da vinha, batateira e hortícolas.

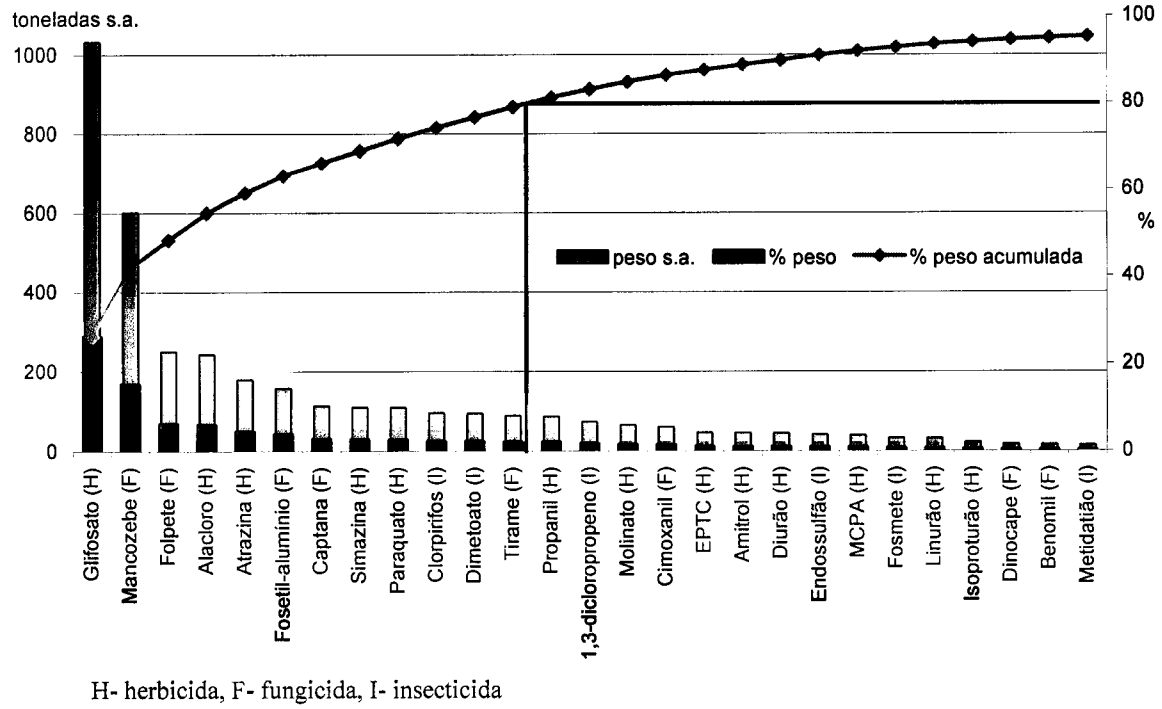


Figura 3.8 – Gráfico de Pareto com a identificação dos pesticidas mais importantes no panorama dos tratamentos fitofarmacêuticos em Portugal, em 2003

A análise da evolução dos consumos de produtos fitofarmacêuticos é uma prática usual para inferir sobre o avanço tecnológico e o desenvolvimento da agricultura de um país. Outras organizações mais sensíveis às questões ambientais usam-nos para averiguar o impacto ambiental dessas práticas. O uso de pesticidas em grandes quantidades origina pressões prejudiciais para o ambiente natural (22). Contudo, é sabido que os valores de consumo por si só não dão uma resposta esclarecedora a esta última questão (13). A apreciação que interessa fazer relaciona-se com a avaliação da intensidade do uso de pesticidas na área efectivamente dedicada à agricultura. A superfície agrícola utilizada (SAU) representa em Portugal cerca de 42% do território continental. A análise da Figura 3.2 mostrava que Portugal se encontra numa posição intermédia dos países que recorrem mais aos pesticidas. No entanto, dada a dimensão desproporcionada das áreas agrícolas dos vários Estados-membros da UE, a comparação deve ser feita tendo em conta a taxa de aplicação, tal como mostra a Figura 3.9. A intensidade de aplicação de pesticidas por SAU tem excedido nos últimos anos o registo equivalente da UE (22). Partindo do princípio que a SAU de 1999 se manteve inalterada e tendo em conta os valores de consumo de pesticidas de 2003, obtém-se uma razão de 4,4 kg/ha. Apesar disso, a situação nacional poderá não ser tão alarmante como este valor indica, se considerarmos que o consumo de pesticidas em

Portugal recebe um contributo determinante do enxofre, substância isenta de classificação toxicológica. O seu uso não constitui risco para o Homem sendo um fungicida apropriado para a agricultura biológica (19). Excluindo o enxofre, obtém-se uma taxa de aplicação de cerca de 2 kg/ha (SAU). Vieira considera que, em face deste valor, se pode afirmar que Portugal é um país com baixa taxa de aplicação de pesticidas (19). Por sua vez, os estudos da EUROSTAT, com base em valores fornecidos pela Associação Europeia de Protecção das Culturas (ECPA), indicam que a taxa média de aplicação na UE era de 4,5 kg/ha, em 1999, mencionando Portugal que nesse ano obtivera o registo mais elevado, com 9,5 kg/ha (13). A comparação com situações de outros países nem sempre é fácil. Interessa sublinhar que, o impacto ambiental depende também de outros factores além da taxa de aplicação, entre eles, as propriedades intrínsecas de cada pesticida e o método de aplicação (23). A este respeito, o lote de substâncias activas em uso tem sofrido uma evolução positiva em resultado das acções de reavaliação operadas no âmbito da Directiva 91/414/CEE. Nesse processo, 460 s.a. não foram incluídas na "lista positiva" da UE, e em Portugal foram já retiradas do mercado cerca de 50 s.a., consideradas de entre as mais perigosas (24). A exemplo disso, a atrazina e a simazina encontravam-se em esgotamento de existências até Setembro de 2005, prevendo-se o mesmo para o endossulfão até Junho de 2007.

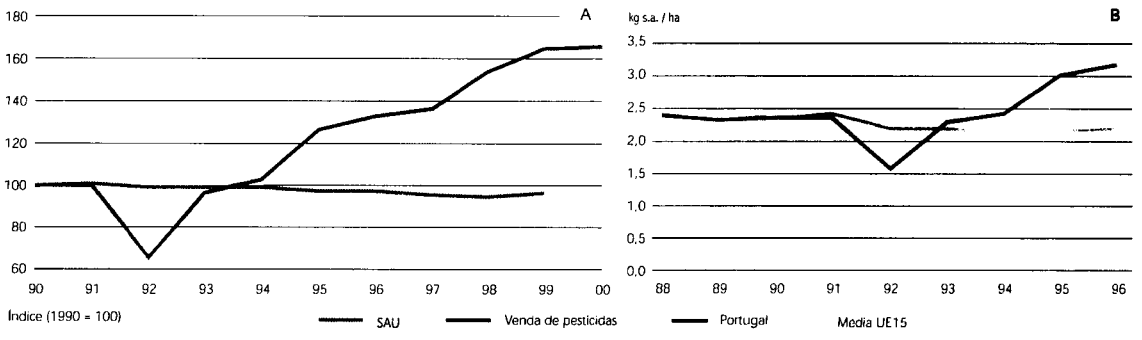


Figura 3.9 – Evolução do consumo de pesticidas e da SAU em Portugal (A) e correspondente estimativa da intensidade de aplicação de pesticidas (kg s.a./ha) em Portugal, em comparação com a média da UE-15 (B)

3.2 COMPORTAMENTO E DESTINO DOS PESTICIDAS NO AMBIENTE

O comportamento dos pesticidas no ambiente considerando a sua interacção com os elementos naturais da ecosfera é complexo. O entendimento destes mecanismos é importante para orientar todas as fases do uso dos pesticidas desde a sua selecção até à forma como são

aplicados. Actualmente este conhecimento é requerido antecipadamente, durante a fase de caracterização de um potencial pesticida, de forma a prevenir efeitos nefastos no ambiente.

A introdução de pesticidas de uso agrícola no ambiente pode ocorrer: de forma **intencional**, como meio de controlar espécies prejudiciais às culturas; de forma **não intencional**, em resultado da actuação de mecanismos ambientais não controlados; e de forma **inadvertida**, devido a descuidos ou falta de formação no seu correcto manuseamento. As concentrações de pesticidas mais elevadas podem, em geral, ser encontradas nas folhas das plantas, no solo ou na água, que tenham sido sujeitos à aplicação directa dos produtos fitofarmacêuticos (25). São extremamente escassos os casos em que os pesticidas são aplicados directa e exclusivamente sobre o organismo a combater. Pelo contrário, a estratégia passa normalmente por aplicar directamente no ambiente, habitat natural de um organismo alvo, uma quantidade tal que seja suficiente para provocar uma exposição letal a esse organismo. Algumas estimativas indicam que a quantidade efectiva do pesticida pode reduzir-se a menos de 0,1% da quantidade aplicada (25). Dependendo dessas doses eficazes, que estão intrinsecamente ligadas à actividade da substância activa, ao organismo a controlar e ao método de aplicação, quantidades muito expressivas permanecem como resíduos no ambiente e ficam sujeitas à acção de vários processos de dispersão e dissipação.

A contaminação não intencional dos ecossistemas ocorre em locais não directamente expostos, por acção de mecanismos de transporte e deposição de pesticidas durante ou no seguimento da aplicação destes produtos em locais contíguos. Não é raro, por exemplo, verificar-se o arrastamento aéreo dos aerossóis produzidos durante uma pulverização para áreas adjacentes (25). Também as correntes de água podem conduzir os pesticidas para locais distantes do seu ponto de aplicação, atingindo frequentemente as águas subterrâneas através de mecanismos de lixiviação, e as águas superficiais, por via do escorrimento das águas de rega e precipitação, entre outras. No uso de pesticidas devem ter-se em conta todos os cuidados para contrariar os mecanismos de transporte e restringir ao máximo a dispersão do pesticida a outros ambientes.

Por fim, os pesticidas podem ser introduzidos no ambiente de forma inadvertida aquando da ocorrência de derrames acidentais, em que são despejadas grandes quantidades no solo ou nas águas. Uma outra via de contaminação surge pelo manuseamento displicente destes produtos ou a incorrecta disposição de elementos contaminados (25). Sob a iniciativa da ONU e da OMS, por todo o mundo estão em curso programas de identificação de locais seriamente contaminados com poluentes persistentes, incluindo pesticidas, normalmente nas proximidades de instalações industriais e locais de armazenamento de pesticidas obsoletos,

com vista a efectuar o seu tratamento ou a disposição segura de tais resíduos (26).

Ao considerar a contaminação do solo e das águas com pesticidas, é importante distinguir as fontes de contaminação pontual ou localizada, das fontes de contaminação não pontual ou difusa (5, 27). Nas primeiras, o foco de contaminação é facilmente localizável enquanto nas segundas não é possível identificar uma origem única do poluente. O tratamento de vastas áreas com soluções diluídas de pesticidas é susceptível de provocar a contaminação dos solos e das águas inscritos na zona tratada ou na sua vizinhança. A agricultura constitui a fonte de poluição difusa por pesticidas mais importante e generalizada. Por seu lado, as origens de contaminação pontual incluem essencialmente a libertação de concentrações elevadas de pesticidas, quer a mesma ocorra por derrame acidental nos locais de fabrico, armazenamento ou transporte, quer ocorra durante as tarefas de preparação que antecedem e/ou se seguem à aplicação nas culturas agrícolas (5, 20).

A contaminação dos solos devido a derrames e incorrecta disposição de resíduos, em geral, caracteriza-se por concentrações bem superiores àquelas que resultam do uso para fins agrotécnicos. No primeiro caso, concentrações da ordem de 1000 mg kg^{-1} ou superiores podem ser encontradas, enquanto que no último as concentrações típicas serão inferiores a 1 mg kg^{-1} (25). Uma situação similar regista-se quanto à contaminação das águas. Nos casos de contaminação pontual, os mecanismos de atenuação ambiental revelam maior dificuldade em repor a situação pré-existente. Se considerarmos que a maior parte dos processos de dissipação (transporte e degradação) seguem uma cinética de aparente primeira ordem então, seremos levados a concluir que restarão sempre resíduos no ambiente, mesmo que indetectáveis (28).

Os pesticidas podem ocorrer no ambiente na forma volátil, dissolvidos em solução aquosa ou adsorvidos nas partículas ou colóides orgânicos do solo e dos sedimentos. A afinidade que os pesticidas revelam para cada um destes meios, que determina em última análise o seu comportamento e destino, depende em grande medida das propriedades físico-químicas da substância química, indicadores de partição e dos factores ambientais (1). Algumas das variáveis mais importantes são: solubilidade na água (mg L^{-1}), pressão de vapor (Pa), constante da lei de Henry (Pa m^3 mol^{-1}), constante de ionização ácido/base, coeficiente de partição octanol/água (K_{ow}), coeficiente de partição solo/água (K_d, L kg^{-1}) e coeficiente de partição carbono orgânico/água (K_{oc}) (1). O Anexo II contém algumas destas constantes. Entre os factores ambientais mais relevantes figuram: o tipo de solo, as características hidrogeológicas e o clima (temperatura, pluviosidade, vento e intensidade da luz) (20).

3.2.1 Mecanismos de transporte e de retenção

3.2.1.1 Distribuição no ar

No tempo que decorre entre a aplicação de um pesticida e o seu desaparecimento completo do ambiente têm lugar inúmeros fenómenos que determinam o trajecto e o local onde os resíduos do composto original ou os seus produtos de transformação poderão ser encontrados. Os principais mecanismos de distribuição e interacção dos pesticidas com o ambiente natural estão representados na Figura 3.10, adaptada de Batista (20).

O primeiro dos mecanismos de transporte é o arrastamento pelo vento dos aerossóis formados nos momentos imediatos à aplicação, vulgarmente designado "spray drift". Já depois da deposição dos aerossóis e dependendo da sua volatilidade, os vapores de pesticidas poderão ser transportados igualmente nas massas de ar. Da mesma forma, as moléculas que se tenham solubilizado na humidade atmosférica ou adsorvido ao material particulado poderão viajar longas distâncias através das massas de ar, antes de se depositaram no solo, nos corpos de água ou na vegetação (29). A medida em que o movimento nas massas de ar contribui para a dispersão dos pesticidas fora do local de aplicação está intimamente relacionada com uma série de factores, entre os quais: o tipo de formulação, as condições meteorológicas e certos detalhes técnicos da técnica e do modo de aplicação (5).

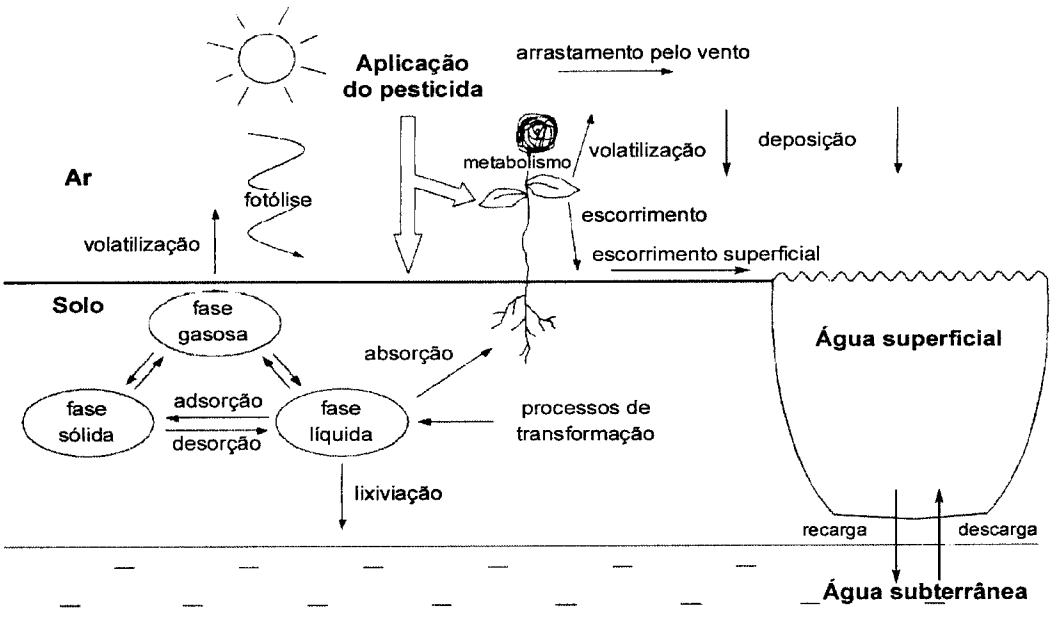


Figura 3.10 – Principais mecanismos de distribuição e interacção que influenciam o comportamento dos pesticidas no ambiente

Alguns estudos revelaram que a quantidade média passível de ser encontrada a 30, 60 e 120 metros de uma zona tratada por aplicação aérea poderá cifrar-se em cerca de 5, 2 e 0,8%, respectivamente, da quantidade aplicada (25). O endossulfão, e principalmente outros pesticidas organoclorados persistentes, são exemplos de substâncias capazes de serem transportadas a longas distâncias, por vez entre continentes, nas massas de ar. A resistência à degradação, um certo grau de volatilidade e a solubilidade nos lípidos, fazem dos POPs poluentes globais em que o transporte aéreo tem um papel decisivo (29, 30). O tempo de residência de um pesticida no ar depende da rapidez com que possa sofrer degradação ou deposição por via húmida ou seca, sob a acção dos factores climatéricos.

Charizopoulos e Papadopoulou-Mourkidou analisaram amostras de água da chuva em 8 locais na bacia do rio Axios, Norte da Grécia, onde a agricultura apresenta grande expansão. Foram detectados resíduos de alacloro (49% das amostras), lindano (44%), paratião-metilo (38%), atrazina (30%), quintozeno (28%), metolacloro (24%), prometrina (23%), molinato (22%), entre outros, num total de 47 pesticidas. A concentração individual mais alta foi de 6,82 $\mu g\ L^{-1}$ e a média foi de 0,72 $\mu g\ L^{-1}$ (31). Os autores citam diversos trabalhos publicados a partir de 1992 relatando a detecção de pesticidas na precipitação. Em alguns casos, as quantidades de pesticidas transportados na chuva podem contribuir numa percentagem muito significativa para a contaminação das águas superficiais, por exemplo os lagos. Deve salientar-se, no entanto, que em geral as baixas concentrações encontradas na água da chuva podem permanecer não detectadas devido a limitações nas metodologias analíticas (29).

3.2.1.2 Comportamento no solo

O solo constitui o maior depósito de todos os pesticidas depois de aplicados (32). São diversas as vias que concorrem para esse facto. Alguns herbicidas, insecticidas e nematodicidas são aplicados directamente no solo. Mesmo quando a aplicação é dirigida à vegetação, uma parte muito significativa atinge o solo, ainda durante a aplicação ou passado algum tempo, por deposição dos aerossóis ou lavagem das plantas tratadas (29). Noutras situações, o solo é acidentalmente o destino dos pesticidas por descuido no seu manuseamento. Uma fracção mais pequena de pesticidas pode provir da atmosfera por deposição após um período de tempo mais ou menos prolongado, por vezes a distâncias consideráveis do local de origem. Conforme está patente na Figura 3.10, o solo não é o destino definitivo para todos os pesticidas. Uma fracção destes poderá regressar à atmosfera

quer por volatilização quer agora adsorvidos em partículas de solo arrancadas por erosão. Se as condições de precipitação ou irrigação forem favoráveis, os pesticidas poderão ter uma passagem transitória no solo, sendo depois arrastados pelas correntes de água de escorrimento, na forma dissolvida ou adsorvidos a partículas sólidas e matéria orgânica, para os corpos de água superficial. Dependendo das propriedades físico-químicas dos pesticidas e das características do solo, estes compostos poderão deixar as camadas superficiais e fazer um trajecto na estrutura do solo até aos reservatórios de água subterrânea segundo um processo de lixiviação (29).

Não obstante, o solo não é apenas um mero compartimento de transição, bem pelo contrário. Em grande parte, é neste meio que os pesticidas e produtos de degradação perdem a sua actividade, e em muitos casos também a identidade química através de processos de degradação, adsorção, fixação, sequestração e ligação. Estes mecanismos influenciam o tempo de residência dos resíduos de pesticidas no solo, que depende igualmente da sua composição geoquímica e da ocorrência de condições climáticas favoráveis (25).

A adsorção de substâncias orgânicas nos componentes do solo é um processo determinante na partição que elas possam estabelecer com outros compartimentos (água e ar) limitando, desta forma, a sua mobilidade. Diversas ligações de intensidade e reversibilidade variável estão na base da adsorção, de que se podem referir: as forças de Van der Waals, ligações de hidrogénio, troca iónica, ligações de coordenação com metais, formação de complexos de transferência de carga e, por fim, as ligações covalentes (29). Como é fácil de entender, a extensão e intensidade com que essas ligações se estabelecem depende fundamentalmente das características físico-químicas do pesticida (algumas das quais foram referidas acima), da constituição do solo e de outras variáveis que condicionam o meio de reacção, como sejam a humidade e o pH (33, 34). Merecem especial relevo, pelo papel determinante que desempenham na capacidade de adsorção do solo, o tipo e proporção de argila que entra na sua constituição bem como a existência de colóides orgânicos. Na composição da matéria orgânica do solo são conhecidas as substâncias húmicas que dispõem de um elevado número de grupos funcionais carboxílicos, hidroxílicos e fenólicos possibilitando o estabelecimento de ligações com diversos compostos orgânicos (29). Dois indicadores são usualmente utilizados para descrever a propensão de determinado pesticida para adsorver num solo: o coeficiente de partição solo/água (K_d) e coeficiente de partição carbono orgânico/água (K_{oc}). Este último parâmetro indica a afinidade das moléculas orgânicas para o meio mais hidrofóbico representado pela matéria orgânica; no entanto, outras interacções, além desta, contribuem para a adsorção total expressa no K_d (29).

Em geral, a adsorção dos pesticidas no solo diminui a sua mobilidade mas aumenta a persistência dos mesmos. No entanto, o assunto é complexo e existem situações em que a matéria mineral é capaz de catalisar a degradação daquelas substâncias. As características do solo que afectam a persistência das substâncias tóxicas incluem: o tamanho das partículas, o conteúdo de matéria mineral e orgânica (35), o pH, a humidade, a temperatura e a actividade microbiológica. A persistência e formação de resíduos ligados aos componentes do solo são temas postos em evidência quando se procede à avaliação de novos pesticidas, conforme se encontra bem vincado nos critérios preconizados pela Directiva 91/414/CEE. Para além de influenciar a mobilidade e a persistência dos pesticidas, a adsorção no solo dá também um forte contributo para a diminuição da biodisponibilidade destes contaminantes para as plantas e microrganismos, reduzindo os efeitos tóxicos a esse nível (29, 32).

Diversos autores têm-se debruçado sobre a interacção dos pesticidas e os componentes do solo. Barraclough et al. apresentaram a sua perspectiva sobre as consequências futuras da formação de resíduos de xenobióticos fortemente ligados ou mesmo assimilados ("bound residues") na estrutura da matéria orgânica do solo, considerando inicialmente os pesticidas e metabolitos (36). A dúvida que colocaram era a de saber se estes resíduos ligados constituem uma solução ambiental aceitável ou apenas um adiamento do problema, em face da possibilidade da sua libertação lenta ao longo do tempo. Parecem haver evidências que apontam no sentido de uma libertação espontânea reduzida e bastante retardada. A forma inalterada ou metabolizada em que essas moléculas possam ser libertadas dependente do tipo de imobilização estabelecida: física ou química forte. Pelo contrário, Gevão et al. tinham demonstrado anteriormente que a mobilização de resíduos não extraíveis por acção de microrganismos e invertebrados conduz à sua incorporação nos tecidos, e igualmente a passagem à forma não ligada em quantidades significativas (37). Burauel e Baβmann atribuem ao solo a capacidade de armazenamento, filtro, tampão e degradação de pesticidas, em que a matéria orgânica desempenha um papel central (38). Citando trabalhos realizados em lisimetros concluem que, a camada superficial do solo, retendo em alguns casos mais de 80% da dose aplicada, contribui efectivamente para a protecção das camadas inferiores e das reservas de água subterrânea. Ensaios com o pesticida metabenztiazurão indicaram que o aumento da carga orgânica do solo reduziu grandemente a fracção remanescente do pesticida, essencialmente à custa da formação de resíduos ligados. Salientou-se assim a correlação do efeito de filtro e tampão com a dinâmica dos processos de regeneração da matéria orgânica e a sua diversidade estrutural. Spark e Swift investigaram o papel da matéria orgânica dissolvida (DOM) e da correspondente fracção sólida, juntamente com a

argila, na adsorção de vários herbicidas ao solo (33). Os resultados obtidos revelaram que a DOM tem uma influência reduzida na adsorção da atrazina, isoproturão e paraquato, que são essencialmente adsorvidos nos componentes sólidos. A adsorção do 2,4-D é influenciada pela DOM, mas de forma indirecta. De notar que, uma eventual interacção entre os pesticidas e a fracção solúvel da matéria orgânica pode ocasionar maior mobilidade (33, 39). Enquanto que a molécula do paraquato, carregada positivamente, é adsorvida quase na totalidade pelos solos, o 2,4-D sofre repulsão pela matéria orgânica e argila, com carga predominantemente negativa. Na sua adsorção intervêm interacções hidrofóbicas e o Ca^{2+} pela formação de uma ponte iónica (33).

Aproveitando as interacções que se estabelecem entre as moléculas orgânicas e os componentes do solo, diversas práticas agrícolas parecem contribuir para a retenção de resíduos de pesticidas, como sejam: adição de excrementos de animais, águas residuais e lamas (39), composto orgânico (40) e a carbonização dos restos das culturas (41).

3.2.1.3 Mobilização na água

Na medida em que a estrutura do solo o permita, os pesticidas depositados à superfície poderão penetrar nas camadas do subsolo acompanhando o trajecto da água da chuva ou da irrigação e desta forma lixiviar para as águas subterrâneas. O processo de lixiviação dos pesticidas é tido como sendo um processo lento, naturalmente dependente das características do pesticida em questão, da permeabilidade do solo e do regime pluviométrico e/ou intensidade da rega (29, 42). No decurso deste processo são vários os mecanismos que podem intervir limitando a viabilidade e o alcance do pesticida original mas, mesmo que a sua progressão seja travada, é frequente a formação de produtos de degradação que podem continuar o percurso. Uma vez que o pesticida original ou os seus produtos de degradação tenham atingido zonas do subsolo menos favoráveis à degradação, o seu tempo de vida sairá aumentado. Considerando as propriedades que mais influenciam a lixiviação, acima referidas, seríamos levados a pensar que apenas as substâncias que as possuem poderão ser encontradas como contaminantes das águas subterrâneas, mas na verdade também substâncias razoavelmente apolares são detectadas. Provavelmente seguirão vias alternativas de transporte no meio aquoso, nomeadamente, adsorvidas em partículas sólidas ou ligadas à matéria orgânica solúvel (29).

Sendo a propensão para a lixiviação e, por seu intermédio, a contaminação das águas subterrâneas, um importante parâmetro na avaliação de um pesticida, alguns autores

tentaram inferir essa capacidade com base em indicadores simples. São exemplo disso, as classes de mobilidade produzidas por McCall et al. (43), em cujos extremos se situam pesticidas como o dimetoato, diclorvos e 2,4-D, entre os extremamente móveis (K_{oc} 0-50), em contraposição ao DDT, dieldrina e paraquato, entre os praticamente imóveis (K_{oc} >5000). Outro indicador bastante útil na mesma avaliação é o índice GUS ("Groundwater Ubiquity Score") (44) expresso pela seguinte equação:

$$GUS=[\log_{10}(DT_{50\ solo})][4-\log_{10}(K_{oc})] \quad (3.1)$$

A equação traduz um modelo empírico que serve essencialmente para ordenar as substâncias em função do potencial de contaminação das águas subterrâneas e classificá-las. Se GUS >2,8, as substâncias são consideradas lixiviáveis; GUS <1,8, são consideradas não lixiviáveis e 1,8<GUS<2,8, consideram-se substâncias de transição, nesta avaliação. Outros índices mais complexos têm sido propostos com o mesmo fim.

Os pesticidas localizados à superfície do solo têm ainda a possibilidade de, em condições de pluviosidade ou irrigação intensa, serem transportados através da água de escorrimento, na forma dissolvida ou adsorvidos em partículas sólidas, para corpos de água superficial receptores (ex.: rios e lagos) (29). Ainda que, quantidades em média inferiores a 0,5% segundo Racke et al. (25), entre 0,4 - 2,3% segundo Wauchope et al., ou mesmo atingindo 10%, segundo Kookana et al., citados por Holland e Sinclair (29), possam sofrer transporte por via de escorrimento, a detecção de resíduos de pesticidas nas águas superficiais é uma ocorrência comum. Jergentz et al. detectaram concentrações tão elevadas quanto 318 $\mu g\ kg^{-1}$ de endossulfão em partículas suspensas e 0,7 $\mu g\ L^{-1}$ de cipermetrina na forma dissolvida em correntes de água (45). Dada a estreita relação entre o escorrimento superficial e as condições climáticas no momento da aplicação, a gestão deste conhecimento é de suma importância na prevenção da contaminação aquática (27, 42). A este aspecto, acresce a selecção de pesticidas menos problemáticos, em geral os menos hidrossolúveis, quando a aplicação vai ter lugar em locais com grandes declives ou situados próximo de cursos de água (27). A permanência dos pesticidas no solo por um tempo que permita a sua fixação, e eventual degradação, antes que ocorram condições favoráveis ao transporte é desejável para confinar a contaminação (42).

No sentido de minorar os impactos ambientais do uso de pesticidas têm-se assistido a uma busca de soluções que possam contribuir para a limitação dos fenómenos de transporte. A localização estratégica de zonas com vegetação intensa (zonas tampão) através das quais se conduzem os escorridos dos terrenos revelou-se eficiente na redução da concentração de pesticidas. A diminuição do conteúdo em pesticidas pode ser atribuída a: retenção do

material particulado contaminado, adsorção de pesticidas dissolvidos na matéria orgânica e inorgânica do solo, absorção pelas plantas e degradação biológica (46). Conseguiram-se reduções em média de 39, 71 e 63% para o glifosato, fenpropimorfe e propiconazole, respectivamente, com uma faixa de vegetação de 5 m (46). Outra alternativa é proposta por Moore et al., que avaliaram a eficiência de charcos artificiais providos de vegetação adequada na remoção de pesticidas das águas de escorrimento antes de estas entrarem nos cursos de água (47). Conseguiu-se uma taxa de remoção de clorpirifos entre 83 e 98%, havendo retenção essencialmente nos sedimentos (55%) e nas plantas (25%). Os mesmos autores tinham já proposto uma solução idêntica para a remoção de atrazina, conseguindo uma redução de 52% na concentração, em 35 dias. Contudo, quando se pretende tratar herbicidas é necessário ter em atenção a não destruição da vegetação da própria estação (48).

3.2.2 Mecanismos de degradação e metabolismo

O meio natural oferece um substrato aos pesticidas para que estes se transformem noutras espécies, mais ou menos tóxicas, ou sofram uma mineralização completa. Neste processo é determinante a reactividade química do pesticida, que depende essencialmente, e sempre, da sua estrutura química, da composição do meio e das condições de reacção. Apesar da grande variedade de condições ambientais em que um contaminante se pode encontrar, as suas transformações químicas deverão ocorrer fundamentalmente através de quatro tipos de reacções: bióticas, fotoquímicas, hidrólise e oxidação-redução. Estas quatro possíveis vias de transformação são devidas à existência no meio ambiente de três tipos de parâmetros: energéticos (reacções fotoquímicas), químicos (hidrólises e reacções de oxidação-redução) e organismos vivos (processos bióticos). Para um mesmo composto, as vias de degradação predominantes poderão ser bastante diferentes quer este se encontre em solução aquosa ou incluído no solo. As substâncias hidrofóbicas, e especialmente as halogenadas, tendem a ser mais resistentes à modificação química espontânea ou à variação metabólica e apresentam maior tendência a acumular-se no meio e nos organismos.

3.2.2.1 Hidrólise

A hidrólise contempla a rotura de uma ligação química na molécula original e a sua substituição pelo oxigénio da água, na forma de H_2O ou OH (29). Dado que a água tem uma presença ubíqua no ambiente, poderão ocorrer reacções de hidrólise, sendo esta uma via de

degradação importante de muitos pesticidas. Este processo ocorre de forma extensiva no meio hídrico e também nos sedimentos saturados de água. No solo a extensão das reacções de hidrólise é relativamente importante e depende do grau de humidade existente. Na atmosfera a hidrólise é pouco importante e ocorre na água das nuvens e água de precipitação. A hidrólise pode ocorrer por via biótica ou abiótica (ex.: fotohidrólise). Dependendo da substância, a hidrólise química pode sofrer uma influência acentuada das condições de pH, e depende da constante de dissociação ácido-base (pK_a) e da temperatura, distinguindo-se a hidrólise com catálise ácida, básica e aquela que decorre em condições neutras (29, 49). Uma vez que as condições de pH das águas naturais variam entre 5-9, é de esperar que as reacções que decorrem em condições próximas da neutralidade sejam as predominantes, abstraindo a hidrólise que tem lugar na superfície das partículas. Nas águas subterrâneas a hidrólise deverá ter uma importância relativa superior, uma vez que a fotólise tem um papel desprezável e a actividade microbiana é fraca (49). Em geral, a hidrólise pode ser uma via de alteração química relevante em compostos que possuam carbonos alquílicos, carbonílicos ou imínos ligados a átomos de halogéneo, oxigénio ou azoto por ligações σ, com produção de compostos normalmente mais polares, mais hidrossolúveis e menos acumuláveis (29).

Salvestrini et al. observaram que a velocidade de degradação do diurão por hidrólise espontânea é essencialmente independente do pH (entre 4 e 9) mas sofre catálise ácida e básica para valores extremos (50). Em condições ambientais o tempo de semi-vida devido unicamente a hidrólise é bastante prolongado (>4 meses). Pelo contrário, os OPPs possuem condições propícias ao ataque hidrolítico a uma das ligações éster fosfórica ou tiofosfórica (51). Embora essa reacção seja altamente dependente do pH, parecem existir outros factores que podem modular a sua velocidade através de adsorção ou catálise em água naturais (51, 52). São exemplos desses factores os iões metálicos (Cu^{2+}, Zn^{2+}, Co^{3+}, Mg^{2+}, Hg^{2+}) (49), a salinidade e a matéria orgânica dissolvida e particulada, os quais podem actuar inibindo ou activando a hidrólise. O estudo do comportamento do clorpirifos em águas de composição distinta revelou uma correlação positiva entre a velocidade de hidrólise e o teor da água em Cu^{2+} (modulador da hidrólise alcalina) levando à formação de 3,5,6-tricloropiridinol e o correspondente dietilfosforotioato (51). A degradação do diazinão e do malatião foi também estudada tendo-se concluído que, na água o diazinão sofre uma degradação quase completa por hidrólise enquanto que, no solo o mecanismo será provavelmente a fotohidrólise. Por seu turno, o principal produto de degradação do malatião surge por oxidação (52).

3.2.2.2 Fotodegradação

Os processos fotoquímicos resultam da absorção, pelas moléculas químicas, da energia contida na radiação solar que atinge a Terra. As alterações provocadas estão intrinsecamente ligadas às propriedades dessa radiação, as quais se medem em termos de: intensidade, distribuição espectral e duração do ciclo diurno (29). As condições que mais influenciam estes factores são, em absoluto: a latitude, estação do ano e hora do dia. A radiação recebida na superfície terrestre apresenta uma intensidade inferior à da alta atmosfera e limita-se a uma gama de comprimentos de onda mais curta. A ozono exerce um efeito de filtro para comprimentos de onda <290 nm (53). Condições variáveis da atmosfera terrestre, tais como as nuvens e as partículas, limitam também a possibilidade de penetração da radiação. Por sua vez, no meio aquático a radiação incidente sofre uma atenuação adicional ligada à reflexão superficial e absorção ou espalhamento por força da existência de substâncias dissolvidas e material particulado (1, 29). Por isso se pode afirmar que, a fotodegradação ocorre na atmosfera e numa extensão mais limitada, mas mesmo assim muito significativa, na hidrosfera e no solo, preferencialmente em zonas mais superficiais de ambos os meios.

Quando uma substância química absorve directamente energia radiante e em resultado disso sofre transformações químicas, diz-se que sofre fotólise directa. Se pelo contrário, a fotodegradação acontece por intervenção de um outro composto que absorve a energia e a transfere ao primeiro, originando uma alteração química, a fotólise é indirecta (53, 54). Na Figura 3.11 encontram-se esquematizados estes processos e acrescentam-se também as reacções que conduzem à formação de radicais livres de oxigénio e as que ocorrem em processos de fotocatálise (54). De notar que, por conveniência, os termos fotólise, fotodegradação e fototransformação têm sido usados de forma indistinta, embora eles não transmitam rigorosamente a mesma informação.

As alterações químicas que podem ter lugar num processo de fototransformação incluem: homólise ou heterólise de uma ligação química, rearranjo, isomerização, ciclização, fotoredução por ablação de hidrogénio de outras moléculas, dimerização, fotoionização e reacções de transferência de electrões (29, 54). Aceitando que muitas moléculas orgânicas absorvem a radiação UV-visível de forma mais intensa a comprimentos de onda curtos (ausentes na radiação solar), é de admitir que a maior parte dessas substâncias, particularmente os pesticidas, sofram fotólise directa numa extensão limitada (54). Por exemplo, os OPPs são susceptíveis a processos fotoquímicos directos, mas o mesmo não se aplica em igual extensão às triazinas e às cloroacetanilidas (1).

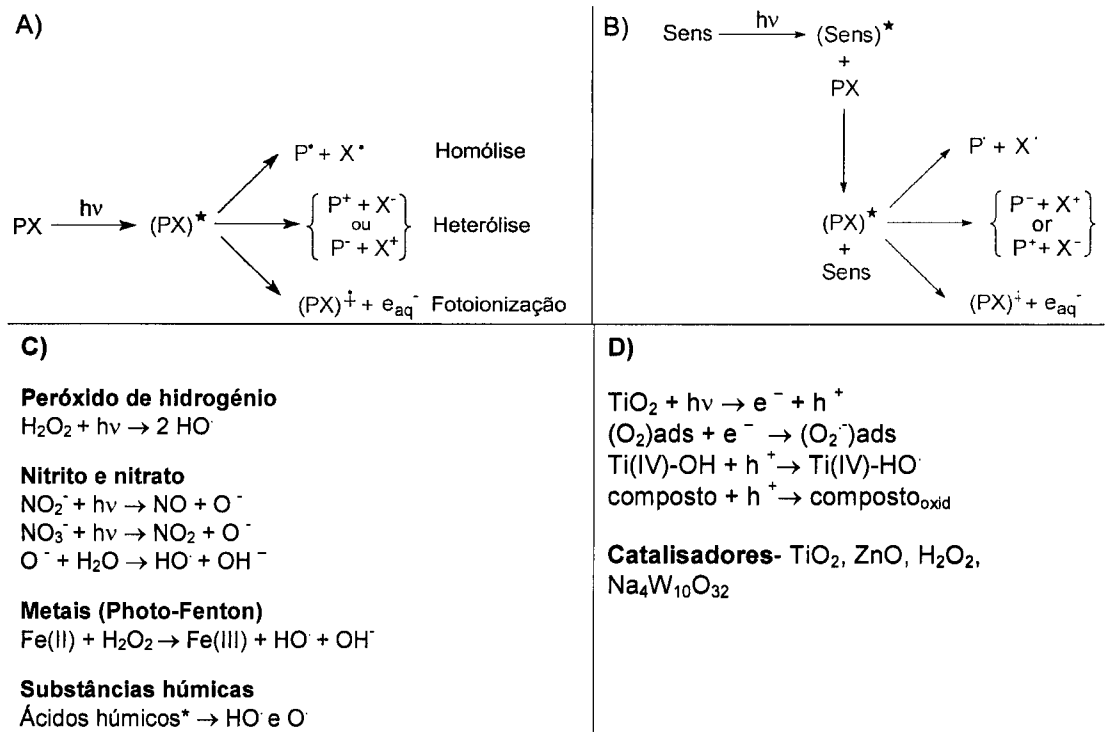


Figura 3.11 – Reacções envolvidas nos processos de: A) fotólise directa; B) fotólise indirecta; C) formação de radicais livres de oxigénio e D) fotocatálise heterogénea

No entanto, fazem parte da constituição das águas naturais certos compostos em quantidades abundantes, como as substâncias húmicas, nitratos e certos metais, que podem actuar como fotossensibilizantes, que vão então mediar o processo fotoquímico (29, 54).

Enquanto componentes da matéria orgânica dissolvida, as substâncias húmicas parecem ter um papel variável de acordo com a sua estrutura específica, ora actuando com geradores de radicais hidroxilo, ora capturando esses radicais existentes no meio. O comportamento é tanto mais complexo considerando que a DOM actua também como filtro da radiação solar, de que resulta um efeito que globalmente pode ser retardador ou promotor da fotodegradação (55, 56). A razão apontada acima contribui para a reduzida concentração e tempo de vida das espécies reactivas de oxigénio, que mesmo assim têm um papel preponderante no processo de fotólise (29). Conforme se pode constatar pela Figura 3.11, secção C), o radical hidroxilo é um mediador importante no processo fotoquímico indirecto, sendo produzido de múltiplas formas. Nos solos, o balanço entre fotólise directa e indirecta deverá ter uma repartição distinta do meio aquático, dada a dificuldade de penetração da radiação directa. Os estudos evidenciam que a fotólise directa não deverá ocorrer senão à superfície (29). Assim, no solo, a fotólise deverá ser um fenómeno com uma contribuição mais moderada no contexto dos processos de dissipação.

Relativamente aos processos de fotocatálise heterogénea, não sendo o alvo deste trabalho, importa referir apenas que têm sido bastante explorados no sentido da sua aplicação como processos avançados de oxidação (AOP) bastante económicos na remediação de locais contaminados com pesticidas (1, 54).

Nos últimos tempos tem-se verificado uma intensa actividade de investigação na área da fotodegradação de pesticidas, abrangendo estudos de cinética, identificação de produtos de degradação, elucidação dos mecanismos envolvidos e avaliação da toxicidade dos produtos finais, quer em matrizes aquosas ou sólidas, em condições ambientais ou de irradiação solar simulada (54). A revisão que Burrows et al. fizeram dos mecanismos e vias de degradação subjacentes à fototransformação de inúmeras classes de pesticidas é um bom exemplo disso (54). Ainda com base nesse trabalho, as classes mais estudadas são: os carbamatos, os organofosforados, as triazinas e as ureias. Em laboratório, os ensaios efectuados sob irradiação produzida por uma lâmpada de arco de xénon são os que mais fielmente reproduzem a efeito da luz solar, em detrimento da lâmpada de vapor de mercúrio (1).

Os trabalhos mais recentes nesta área revelam bastantes semelhanças com os abordados na revisão de Burrows et al. (54). Lányi e Dynia estudaram diversas triazinas e ureias concluindo que, em ambos os casos, ocorre perda de cadeias laterais alquílicas e hidroxilação por substituição do átomo de cloro (57). Já os tiocarbamatos sofrem oxidação dos grupos alquílicos ligados ao N ou N-desalquilação, enquanto que o grupo tioalquilo revela maior resistência. Na água, a velocidade de degradação por fotólise dos tiocarbamatos é muito superior à das triazinas e ureias, que se equivalem. No primeiro caso, há desaparecimento de mais de 90% do composto em 10 horas enquanto que os segundos necessitam de cerca de 90 horas. Farran e Ruiz estudaram a fotodegradação de ureias e ácidos clorofenoxiacéticos (58). Estes últimos não sofrem fotólise nem hidrólise por exposição solar directa, ao passo que o diurão e o monolinurão apresentaram um tempo de semi-vida por fotólise em água de 93 e 133 dias, respectivamente. Em condições de irradiação solar simulada, ambos os grupos sofreram fototransformação com tempos de semi-vida similares, que variaram entre 4 e 6 horas. Na fotodegradação dos herbicidas ácidos não foram encontrados os correspondentes clorofenóis largamente descritos na bibliografia, tendo sido avançada a possibilidade da sua degradação sucessiva sem acumulação no meio. Segundo os autores, deste processo resultam compostos quinónicos que apresentam uma toxicidade superior aos pesticidas originais, de forma similar ao que acontece na fotodegradação das ureias e formação de cloroanilinas tóxicas. Em regra, a fototransformação dá origem a compostos mais polares e mais solúveis em água mas nem

sempre acontece a destoxificação (56). Mesmo nos casos em que os produtos da reacção são mais tóxicos, este poderá ser um primeiro passo para tornar o pesticida mais susceptível a outros ataques até à sua completa mineralização (1, 29). Zamy et al. ensaiaram vários OPPs e verificaram que a velocidade de fotodegradação do isofenfos e do profenofos em águas naturais é retardada relativamente à água ultrapura, enquanto que a do isazofos e do dissulfotão é acelerada (56). Este efeito foi atribuído à presença de matéria orgânica que funciona como filtro para aqueles OPPs que absorvem radiação a λ >285 nm, caso do isofenfos e do profenofos, ou como sensibilizante para os restantes.

Sakellarides et al. salientam que, sendo o solo intensamente exposto à irradiação solar e onde se deposita grande parte dos pesticidas aplicados, não têm merecido a mesma atenção nos estudos de fotodegradação comparativamente às águas (59). Na verdade, o facto de ser uma matriz heterogénea e de composição complexa dificulta a transposição dos resultados obtidos para situações reais. O cálculo do tempo de semi-vida de quatro OPPs por fotólise em condições ambientais revelou valores entre 3 dias para o fentião a 21 dias para o paratião. Um maior conteúdo do solo em matéria orgânica contribuiu para a protecção desses pesticidas e consequente prolongamento do tempo de vida. No entanto, as diferenças não foram muito significativas (59). Os autores concluíram que a fotólise seguia uma cinética de aparente ordem um, enquanto que Scrano et al. (60) referem que a cinética de ordem dois se ajusta melhor à reacção do oxifluorfeno no solo, devido ao contributo conjunto da fotólise e da adsorção para a dissipação. Por sua vez, Frank et al. advogam que a cinética de reacção nos solos poderá ser de dupla ordem um devido ao efeito protector das camadas do solo (61).

A tendência recente dos estudos de fotodegradação tem sido no sentido da execução de ensaios que reproduzam, tanto quanto possível, as condições ambientais, já não em solvente orgânico mas em matrizes reais, e a clarificação da influência dos constituintes naturais nesse processo. As concentrações devem ser típicas dos níveis ambientais. Muitos dos trabalhos incluem também a determinação da toxicidade dos produtos de fotodegradação.

3.2.2.3 Oxidação-redução

Alguns pesticidas são susceptíveis de sofrer reacções de oxidação e de redução em meio aquoso ou no solo, por intervenção de iões ou espécies activas de oxigénio. É ainda possível a degradação catalítica quando se encontram adsorvidos às argilas, matéria orgânica ou óxidos metálicos (29). Em zonas profundas, a ausência de oxigénio facilita a ocorrência de

reacções anaeróbias, nas quais o pesticida se transforma mediante processos de redução. Com frequência, a redução e perda de cloro dos pesticidas organoclorados lindano, DDT e hexaclorobenzeno é a sua principal via degradativa. Por esta razão, estes pesticidas parecem degradar mais rapidamente em ambientes anaeróbios (62). Foi também relatada a redução do aldicarbe sulfóxido a aldicarbe, bem como a redução de compostos azo e nitro a aminas (49).

3.2.2.4 Degradação biológica

A degradação dos pesticidas no ambiente beneficia da existência de microrganismos, em maior ou menor densidade, capazes de introduzir alterações na sua estrutura química através de processos ditos bióticos. Estes processos são muito importantes no solo, pois este oferece um meio óptimo para o desenvolvimento de uma elevada quantidade e variedade de microrganismos. Os processos bióticos também são significativos nos sedimentos e em menor grau na hidrosfera. Particularmente no solo, poderão existir condições desfavoráveis à degradação por via abiótica (ex.: ausência de luz, pH inapropriado) mas que permitam uma degradação por via biológica (29). Por outro lado, em face da resistência química de alguns pesticidas a alterações abióticas, esta constitui uma das poucas oportunidades para efectuar a sua destoxificação.

Os microrganismos podem desempenhar a sua função na degradação de pesticidas por duas vias principais: co-metabolismo ou adaptação (9, 28, 29). Na primeira situação, o microrganismo dispõe no seu vasto arsenal catabólico de enzimas capazes de, casualmente, degradarem também um pesticida, sem que daí resulte nenhuma vantagem competitiva nem mesmo energia ou metabolitos úteis à célula. O mais usual é ocorrerem reacções de oxidação, adição ou conjugação, sem levar à mineralização total (29). Na eventualidade de não existirem microrganismos na flora autóctone capazes de fazer essa degradação, mais cedo ou mais tarde surgirá, de entre as inúmeras espécies, alguma que tenha adquirido essa capacidade através de uma mutação, ou activação de vias latentes e que lhe conceda vantagem competitiva. A enorme pressão selectiva encarregar-se-á de viabilizar um número de organismos que farão a degradação do pesticida por adaptação. A degradação biológica por co-metabolismo pode iniciar-se a seguir ao episódio de contaminação e segue uma cinética de ordem um, enquanto que a degradação por adaptação sofre um atraso até que os microrganismos tenham adquirido enzimas capazes de degradar o pesticida (9, 28).

Certas substâncias, pela sua estrutura química, são menos aptas à biodegradação. É o caso

das que apresentam algumas das seguintes características: alta lipofilia e adsorção ao solo, estrutura aromática ou alifática saturada, elementos halogenados e substâncias directamente tóxicas para os microrganismos. Os principais microrganismos do solo responsáveis pela biodegradação pertencem aos géneros *Alcaligenes*, *Arthrobacter*, *Aspergillus*, *Fusarium*, *Bacillus*, *Corynebacterium*, *Flavobacterium*, *Nocardia*, *Penicillium*, *Pseudomonas* e *Trichoderma* (9).

O aumento propositado da matéria orgânica do solo e consequente população de microrganismos tem sido uma via explorada no sentido de incrementar a biodegradação dos pesticidas em solos contaminados (63, 64). Aplicam-se também aqui, algumas das práticas agrícolas referidas no final da subsecção 3.2.1.2. Contudo, nem sempre é obtida uma biodegradação mais rápida. As lamas activadas parecem funcionar mais pelo seu conteúdo elevado em matéria orgânica do que pela população microbiana (65). Por vezes, a adaptação da microflora à degradação de um pesticida dá origem a uma biodegradação mais rápida em usos posteriores desse agroquímico. Esta apetência para degradar um certo pesticida pode permanecer no solo por mais de um ano e pode estender-se também a outros pesticidas da mesma classe, como acontece com alguns OPPs depois da adaptação ao clorpirifos (66).

3.2.3 Previsão do comportamento ambiental dos pesticidas

Em virtude da vasta panóplia de pesticidas que existem actualmente, e potenciais novas moléculas, surgiu a necessidade de produzir índices ou modelos, mais ou menos complexos, que fossem capazes de, a partir de um conjunto de propriedades físico-químicas dos pesticidas e/ou dados experimentais, produzir uma previsão tão realista quanto possível do seu comportamento no ambiente. Podem ser considerados três tipos de modelos: conceptuais, físicos e matemáticos (67).

A principal preocupação inerente à maior parte destes modelos é a avaliação da possibilidade de contaminação das águas subterrâneas por utilização de pesticidas à superfície, considerando a sua movimentação e degradação no solo e água subterrânea por alguns dos mecanismos referidos anteriormente (68). O trabalho de Batista apresenta um resumo de vários tipos de modelos, de base matemática (20). O modelo de fugacidade de MacKay considera uma "unidade mundo" hipotética e descreve a tendência de uma substância química "escapar" entre compartimentos ambientais: ar, água, solo, sedimentos, sólidos suspensos e biota aquático (69). De entre os índices de lixiviação, destacam-se o

índice GUS, já referido, o índice LI ("Leaching Index") de Laskowski et al. (70) e o índice de Bacci e Gaggi (71). Entretanto, foram sendo desenvolvidos modelos cada vez mais complexos com recurso a programas informáticos específicos e que fazem a análise integrada das propriedades dos pesticidas e parâmetros ambientais, com a possibilidade de serem usados em processos de decisão. A exemplo disso, no sistema de homologação de novas substâncias activas na UE (Directiva 91/414/CEE) foi adoptada uma estratégia mista, com base em dados experimentais e de simulação com modelos, depois de devidamente validados com casos reais da UE. Nesse processo, exige-se que seja determinada a concentração ambiental previsível (PEC) dos pesticidas na água subterrânea, a qual não deve exceder 0,1 $\mu g\ L^{-1}$. Os grupos de trabalho FOCUS (Forum for the Co-ordination of pesticide fate models and their use) foram encarregados da tarefa de produzir e harmonizar o uso de modelos (20). O grupo de trabalho das águas subterrâneas encontra-se mais avançado tendo preparado quatro modelos que permitem averiguar a possibilidade de lixiviação de um pesticida em certas condições ambientais: PELMO (Pesticide Leaching Model), PRZM (Pesticide Root Zone Model), PEARL (Pesticide Emission Assessment at Regional and Local Scales, ex-PESTLA) e MACRO (Mechanistic preferencial flow model) (72). Tem sido intensa a actividade no sentido de efectuar a calibração e validação desses modelos (73, 74). Vanclooster et al. fazem uma avaliação de diversos modelos relativamente a cenários da UE focando algumas especificidades e os cuidados gerais a ter no seu uso (75).

Embora os modelos referidos sejam muito úteis na simplificação do processo de obtenção de resultados de comportamento ambiental, não substituem de forma alguma os programas de monitorização em condições reais ou simuladas de utilização. Os lisímetros são sistemas de campo semi-reais ("semi-field") que podem originar informação importante sobre o transporte, degradação e biodisponibilidade dos pesticidas, mas têm a desvantagem do elevado custo de implementação e dificuldade de manutenção do sistema experimental (27, 32). Por sua vez, os programas de monitorização em condições reais originam resultados mais fiáveis devido às condições ambientais e às doses aplicadas para o uso proposto (68).

Os ensaios efectuados em laboratório têm a vantagem de permitirem um controlo rigoroso dos parâmetros que influenciam o comportamento dos poluentes e desse modo obter resultados mais reprodutíveis, enquanto que os ensaios de campo reflectem as complexas interacções dos factores bióticos e edáficos que têm lugar em condições reais (32, 64). Enquanto que os ensaios laboratoriais poderão fornecer muitas indicações qualitativas, os ensaios de campo são necessários para obter resultados quantitativos definitivos.

3.3 OCORRÊNCIA DE PESTICIDAS NO AMBIENTE

3.3.1 Contaminação das águas subterrâneas

As primeiras detecções de pesticidas em águas subterrâneas foram consideradas como episódios de contaminação pontual; contudo, com o avançar dos estudos percebeu-se que esta situação deveria ser o resultado da aplicação de pesticidas homologados na agricultura, nas condições recomendadas. Dada a grande vulnerabilidade das águas subterrâneas, e do meio aquático em geral, à contaminação por pesticidas, tem sido dedicada uma crescente atenção à monitorização destes micropoluentes com vista a avaliar a degradação da qualidade ambiental e o risco de contaminação das fontes de água potável para consumo humano. Acresce que, na Europa cerca de 75% da água para consumo humano tem origem nas reservas de água subterrânea (Portugal, 79,9%, em 1990) (76, 77). Uma vez que essa é uma das funções mais sensíveis das águas subterrâneas, com impacto na saúde humana, é usual estender-se a aplicação dos limites de pesticidas estabelecidos para as águas de consumo também às águas subterrâneas (78). A premissa em vários países da UE e em Portugal é de que a água subterrânea deve estar apta para esse fim sem necessidade de processos elaborados de purificação (79).

Pelas razões já apontadas, actualmente a monitorização de pesticidas em rotina deve incluir também os produtos de degradação mais importantes. Apesar do uso da maioria dos pesticidas persistentes, nomeadamente os OCPs, ter sido banido há algumas décadas atrás, continua a justificar-se a sua pesquisa bem como de produtos derivados. A monitorização fornece dados sobre a identidade e concentração dos pesticidas, a sua distribuição geográfica e evolução no tempo. Contudo, não se pode dizer que os pesticidas mais detectados são aqueles que estão presentes com maior frequência nas águas subterrâneas. Por razões técnicas ou de julgamento prioritário são excluídos da monitorização inúmeros pesticidas acerca dos quais não é possível afirmar a sua prevalência e níveis de concentração (20). A distribuição espacial e temporal da contaminação por pesticidas está intimamente ligada ao seu comportamento ambiental, o qual merece actualmente a maior atenção na escolha dos futuros pesticidas.

Nos EUA, o alerta para a contaminação das águas subterrâneas surgiu quando em 1979 foram detectados múltiplos casos de contaminação com aldicarbe e DBCP, e mais tarde de EDB. Em 1988 eram já 46 os pesticidas provisoriamente identificados (67). Surgiu assim a necessidade de efectuar estudos de monitorização mais sistemáticos nos EUA e na Europa,

onde se relata a presença de inúmeros pesticidas nas águas subterrâneas de acordo com o padrão de utilização dessas substâncias (77, 80). Nos EUA, Gilliom et al. detectaram pesticidas em cerca de 50% das amostras mas apenas um escasso número excedia os limites para essas águas. Dos 83 pesticidas pesquisados, foram detectados com maior frequência: a atrazina, desetilatrazina (DEA), metolacloro, alacloro, cianazina, bentazona e metribuzina (80). Na Europa, os primeiros estudos foram desenvolvidos na Holanda, onde foram detectados resíduos de atrazina, simazina, aldicarbe e oxamil (81). Um estudo elaborado por Notemboom et al. revela que 75% dos pesticidas detectados em águas pouco profundas apresentaram concentrações máximas superiores a 0,1 $\mu g\ L^{-1}$, enquanto que para 50% deles a concentração mediana foi também superior aquele valor (79). Alguns pesticidas atingiram mesmo concentrações >10 $\mu g\ L^{-1}$, devido ao seu emprego na agricultura desenvolvida em solos vulneráveis, de que se destacam: aldicarbe sulfona, aldicarbe sulfóxido, bentazona, 2,6-diclorobenzamida (produto de degradação do diclobenil), 1,3-dicloropropeno, 1,2-dicloropropano, etilenotioureia e metribuzina. A comparação dos pesticidas detectados em vários países europeus revelou que a atrazina e seus produtos de degradação constituem um problema ubíquo nas águas subterrâneas da UE (79).

Relativamente ao propósito de avaliar o impacto ecotoxicológico da presença de pesticidas na água subterrânea, Notemboom et al. concluem que o aldicarbe, aldicarbe sulfóxido, dinoseb, dinoterb, etoprofos, cipermetrina, heptacloro, metilisotiocianato, fenpropatrina, tirame, paratião-metilo, pirimicarbe e a trifluralina podem desencadear efeitos ecotoxicológicos mesmo que em níveis inferiores ao limite para águas de consumo humano na UE (0,1 $\mu g\ L^{-1}$). Nesta medida, vários dos pesticidas referidos acima ocorrem em concentrações que põe em risco os ecossistemas subterrâneos (79).

No 1° relatório sobre a "Qualidade e quantidade das águas subterrâneas na Europa", publicado em 1999 por Scheidleder et al., 14 países forneceram dados de monitorização de pesticidas enquanto que a Estónia, Islândia, Letónia e Suécia não os forneceram por não terem programas de monitorização. Portugal e Malta consideraram não ser um problema sério nas suas águas, ao contrário do Chipre (77). A Tabela 3.7 apresenta os pesticidas simultaneamente mais pesquisados e detectados. O número de substâncias pesquisadas varia entre 4 na Hungria e 122 no Reino Unido, entre os 170 pesticidas pesquisados a nível europeu. Os estudos incidiram preferencialmente na: aldrina, atrazina, dieldrina, simazina, lindano e heptacloro. Analisando os 5 pesticidas detectados com maior frequência em cada país (acima de 0,1 $\mu g\ L^{-1}$), reuniram-se 39 pesticidas que constituem os mais preocupantes.

Tabela 3.7 – Pesticidas pesquisados e efectivamente detectados nas águas subterrâneas em 9 países europeus com programas de monitorização (INFU 1995)

Pesticidas	nº países		Pesticidas	nº países	
	aprovado (de 15)	detectado/ monitorizado		aprovado (de 15)	detectado/ monitorizado
Herbicidas			Dicamba	15	2/2
Atrazina	10	7/7	Ioxinil	15	2/2
Simazina	13	7/7	Cianazina	12	2/3
MCPP	13	7/7	Pendimetalina	14	2/3
2,4-D	14	6/6	Terbutilazina	14	2/3
Diurão	13	5/5			
MCPA	15	5/6	**Insecticidas**		
Diclorprope	10	5	Dimetoato	15	6/6
Clortolurão	12	4/4	Hexaclorociclohexano		5/5
Isoproturão	14	4/4	Aldrina		4/4
Linurão	14	4/4	Lindano	12	4/6
Bentazona	15	4/4	DNOC	6	2/2
Propazina	0	4/5	Terbufos	9	2/2
Alacloro	5	4/5	DDT		2/3
Metolacloro	10	4/5	Vinclozolina		2/3
Prometrina	11	4/6	Fenitriotião	11	2/4
DEA	*	3/3	Malatião	12	2/5
DIA	*	3/3	Paratião	8	2/6
MCPB	5	3/3			
Bromacilo	10	3/3	**Fungicidas**		
Metobromurão	11	3/3	Carbendazima	14	2/2
2,4,5-T	2	3/4	Clorotalonil	14	2/2
Carbetamida	10	2/2	Iprodiona	15	2/2
Bromoxinil	14	2/2	Hexaclorobenzeno		2/5

* metabolitos: DEA – desetilatrazina; DIA - desisopropilatrazina

Destes, a lista de substâncias referida por mais do que um país inclui: atrazina, simazina, lindano, DEA, heptacloro, metolacloro, bentazona, DDT, diclorprope, MCPA e metoxicloro. Considerando o número total de pontos de análise em que os pesticidas foram detectados percebe-se que a atrazina, DEA e simazina são os pesticidas mais distribuídos nas águas subterrâneas (77). Nota-se ainda que, em geral, a desetilatrazina encontra-se com maior frequência do que o pesticida que lhe dá origem. Certos países, nomeadamente a Áustria, Chipre, Dinamarca, França, Hungria, República da Moldávia, Noruega, Roménia e República da Eslovénia, reconhecem a existência de problemas sérios devido à presença de pesticidas nas águas subterrâneas acima do limite previsto na UE (77).

Num folheto informativo de 2004, a Agência Europeia do Ambiente (EEA) indica que, os pesticidas com maior frequência de detecção em águas subterrâneas com concentrações superiores a 0,1 $\mu g\ L^{-1}$ são: bentazona (10%), DEA (9%), atrazina (5%) e diurão (1%). Neste

relatório, a Áustria, França, Dinamarca e UK revelam problemas com pesticidas que, no mínimo, em 10% das amostras ultrapassam os limites estabelecidos (8). Os herbicidas são os pesticidas mais detectados, mas também são os mais pesquisados. Algumas razões podem ser apontadas para isso: em geral, são aplicados em períodos mais sensíveis à sua lixiviação para as águas; uma maior fracção de produto atinge ou actua no solo, quando comparados com os insecticidas e fungicidas; e estão mais representados em listas internacionais de pesticidas prioritários para pesquisa (79). Em certos países (Áustria, Suíça, França, Alemanha e Letónia) parece notar-se uma certa tendência de diminuição dos níveis de contaminação com atrazina e metabolitos, possivelmente em resultado das restrições que têm vindo a ser impostas no seu uso (8, 82).

Em complemento aos estudos da EEA, a EUREAU, representante das entidades fornecedores de água de abastecimento público, compilou a informação recebida dos seus membros relativamente à contaminação com pesticidas das águas brutas, quer de fontes superficiais quer subterrâneas (83). Os dados indicam que as águas superficiais na Bélgica, Holanda, França e Reino Unido apresentam com grande frequência (Bélgica, 100%) níveis superiores a 0,1 $\mu g\ L^{-1}$, em alguns dos casos francamente elevados. A contaminação das águas subterrâneas é mais localizada. Conforme se indica na Tabela 3.8, nos países em que se regista uma situação mais grave (Bélgica, Dinamarca, França, Alemanha, Holanda e Reino Unido) entre 5 e 10% dos recursos de água subterrânea apresentam regularmente pesticidas em concentração superior àquele limite (83).

Tabela 3.8 – Ocorrência de pesticidas em captações de água subterrânea destinada ao abastecimento público, em países europeus, entre 1999-2000

País	Captações (%) com resíduos de pesticidas		
	<LOD ou <0,1 $\mu g\ L^{-1}$	ocasionalmente >0,1 μgL^{-1}	regularmente >0,1 $\mu g\ L^{-1}$
Alemanha	90,0	10,0	0,0
Áustria	97,0	3,0	0,0
Bélgica	83,0	11,8	5,2
Dinamarca	91,1	0,0	8,9
Holanda	90,0	5,0	5,0
Luxemburgo	91,0	7,0	2,0
Noruega	100,0	0,0	0,0
Reino Unido	89,0	5,0	6,0
Suíça	95,0	5,0	0,0

Nota: para a Espanha, Finlândia, França, Grécia, Irlanda, Itália, Portugal e Suécia os dados disponíveis são limitados ou não estão centralizados. LOD - limite de detecção do método analítico.

Apesar de em vários trabalhos se ter procurado fazer uma avaliação da exposição da água subterrânea a pesticidas, a nível europeu, em geral é referido que a informação disponível

não permite uma análise detalhada da situação, quer pela falta de dados de monitorização, quer pela sua apresentação em formatos diferentes, o que em parte resulta de terem sido obtidos para fins muito diversos (8, 77, 79, 82). Os estudos de monitorização encerram ainda a dificuldade inerente à inexistência de métodos suficientemente sensíveis para todos os pesticidas (83). Por razões diversas, ainda na actualidade os dados de monitorização de pesticidas em águas subterrâneas são escassos, mormente quando comparados com as águas superficiais onde a literatura é abundante (84). Guzzella et al. reconhecem que os dados existentes dizem respeito a monitorizações pouco sistemáticas, efectuadas em áreas restritas ao nível de cada país e contemplando um número reduzido de substâncias. Esta situação deverá ser alterada por via da aplicação da Directiva Quadro da Água (Directiva 2000/60/CE), que estabelece as linhas gerais para a avaliação, monitorização e gestão das águas superficiais e subterrâneas com vista ao seu bom estado ecológico e químico.

Em vez de uma análise exaustiva, apresentam-se de seguida apenas alguns resultados recentes que ilustram aspectos peculiares da contaminação das águas subterrâneas em alguns países europeus. Guzzella et al. pesquisaram 5 herbicidas (atrazina, terbutilazina, alacloro, metolacloro e linurão) e 17 produtos de degradação em águas subterrâneas pouco profundas, em áreas de agricultura intensiva no norte de Itália (84). Ao fim de 2 anos de monitorização foi possível verificar que a atrazina é o poluente mais ubíquo, estando presente em 100% das amostras e em 30% dos casos acima do limite da UE, mesmo tendo sido retirada do mercado em 1986. Uma situação semelhante ocorre na Alemanha, em que a atrazina foi retirado do mercado em 1991. A terbutilazina situou-se em segundo lugar tendo sido detectada em 85% das amostras. A contaminação com alacloro e metolacloro foi muito menos pronunciada, apesar dos níveis elevados de aplicação particularmente na cultura do milho, enquanto que o linurão esteve ausente. O produto de degradação desetilterbutilazina foi detectado com grande frequência em concentrações que em média excedem a do pesticida original, ao contrário da DEA que ocorreu em concentrações próximas ou ligeiramente inferiores à atrazina. Os restantes produtos de degradação ocorreram em níveis mais baixos, particularmente os derivados hidroxilados e os das cloroacetanilinas. As percentagens mais elevadas de incumprimento do limite da UE foram devidas aos produtos de degradação. Os autores alertam para o facto de, devido à degradação lenta dos pesticidas nas águas subterrâneas, a sua presença pode verificar-se durante vários anos. O aparecimento de produtos de degradação é não menos preocupante, uma vez que se desconhece em grande parte o seu comportamento e toxicidade (84).

Mourkidou et al. estudaram a incidência da contaminação das águas subterrâneas com

pesticidas na bacia do rio Axios, na Grécia, entre 1992 e 1994 (85, 86). Esta zona está sujeita a uma pressão de contaminação elevada devido à agricultura intensiva aí praticada. Os recursos hídricos subterrâneos dessa zona são usados para abastecimento das populações com água potável. Para além da grande quantidade e variedade de pesticidas aplicados devido à prática de culturas em rotação, uma outra particularidade concorre para o grande aporte de pesticidas: a sua introdução através da água de irrigação contaminada proveniente de canais de drenagem (particularmente no norte) e do próprio rio. Neste estudo foram pesquisados 130 pesticidas em água intersticial do solo, freática, dos canais de drenagem e do rio. Pesticidas como o carbofurão, atrazina, DEA, alacloro e prometrina foram detectados na zona norte por vezes em concentrações superiores a 1 $\mu g\ L^{-1}$ (mas frequentemente acima 0,1 $\mu g\ L^{-1}$) em água intersticial e freática, em resultado da sua aplicação nas culturas. Contudo, outros pesticidas marcaram presença sem que seja conhecida a sua aplicação nessa área (85). Encontram-se nesta situação o propanil, o terbufos e o paraoxão-metilo, produto de degradação do paratião-metilo. Poder-se-á dizer que, em geral, o gradiente de concentrações detectadas pode organizar-se em ordem decrescente da seguinte forma: água dos canais de drenagem $\approx$ água do rio Axios > água intersticial > água freática. Enquanto que a água de irrigação proveniente do rio é uma fonte de contaminação da água subterrânea com propanil, o paraoxão-metilo, terbufos e carbofurão poderão provir da reutilização da água dos canais de drenagem (85).

Na parte sul da bacia do rio Axios foram detectados resíduos de atrazina, alacloro e carbofurão em diversas zonas (86). Estes pesticidas aplicados na cultura de arroz apareceram uniformemente distribuídos em zonas onde a sua aplicação não teve lugar, uma situação atribuível à movimentação horizontal destes pesticidas nas águas freáticas, de forma análoga à verificada na bacia do rio Po, em Itália. Os pesticidas: carbofurão, atrazina, alacloro, prometrina e propanil excederam regularmente a concentração de 1 $\mu g\ L^{-1}$ em água intersticial e freática. A cipermetrina e a deltametrina foram também detectadas nas águas freáticas e a cipermetrina atingiu valores mensuráveis no rio. Concluiu-se que, o suprimento das elevadas necessidades hídricas da cultura de arroz a partir de água contaminada do rio contribuiu para a dispersão da contaminação com pesticidas em toda a zona (86).

Carabias-Martínez et al. estudaram a contaminação das águas subterrâneas e superficiais nas zonas de Salamanca e Zamora, Espanha, com 3 herbicidas e 7 produtos de degradação, no período de Outubro de 2000 a Janeiro de 2001 (87). Num dos poços foram detectadas sistematicamente quantidades similares de atrazina e DEA, por vezes superiores a 1,0 $\mu g\ L^{-1}$, enquanto que noutro foi detectado clortolurão acima de 0,1 $\mu g\ L^{-1}$. As mesmas substâncias

foram detectadas casualmente em águas de três rios e em quantidades ligeiramente mais baixas. Os autores argumentam que a contaminação das águas superficiais reflecte o uso daquelas substâncias na agricultura enquanto que a contaminação das águas subterrâneas não sofre grande afectação (87).

Belmonte-Vega et al. analisaram a presença de diversos pesticidas em matrizes de água (predominantemente subterrânea) e solos na região fortemente agrícola da Andaluzia, sul de Espanha (88). Na província de Huelva detectou-se simazina, carbendazima e diurão em baixas concentrações; na região de Sevilha e Cádiz detectou-se carbendazima com grande frequência e em menor grau também metomil, imidaclopride, acetamipride, simazina, atrazina e diurão; na região de Cordoba e Jaen detectou-se carbendazima, simazina, terbutilazina e diurão frequentemente acima de 0,1 $\mu g\ L^{-1}$; na região de Granada, Málaga e Almeria onde a cultura em estufas é marcante, detectaram-se carbendazima, imidaclopride, simazina, atrazina, diurão, espinosade e ciprodinil (88).

Em Portugal, os programas de monitorização de águas superficiais têm sido incumbência das autoridades nacionais em termos de ambiente enquanto que o estudo das águas subterrâneas, que se conheça, e até ao momento, tem sido tarefa predominantemente de investigadores do Instituto Superior de Agronomia, Lisboa, em colaboração com outras entidades. Resultados dos primeiros podem ser encontrados em publicações onde se faz uma análise descritiva (89) ou quimiométrica (90). Os estudos relativos à exposição da água subterrânea a pesticidas iniciaram-se, em Portugal, em 1993 por Cerejeira, citada por Batista (20), que avaliou o comportamento da atrazina quando usada na cultura do milho. Nesse estudo pioneiro observou-se que o herbicida estava presente, em concentrações superiores a 0,1 $\mu g\ L^{-1}$, em 40% das amostras colhidas em 110 furos de rega, e em 3 de 4 furos de água para abastecimento, por vezes excedendo aquele limite, no período de 1991-1992 (20). Num estudo subsequente efectuado em 1995 (desenvolvido por Moura, citada por Batista (20)), aquelas evidências foram confirmadas tendo-se, agora, alargado a lista de prováveis contaminantes para incluir não só a atrazina mas também a simazina, alacloro e metolacloro. Enquanto que estes estudos se centraram nos Concelhos da Chamusca e Golegã, um outro estudo que se seguiu teve como alvo os Concelhos de Salvaterra de Magos e Coruche. Também neste caso a atrazina marcou presença assídua em águas subterrâneas usadas para rega, com um máximo de 1,8 $\mu g\ L^{-1}$. No entanto, as captações de água para consumo humano em nenhum caso apresentaram contaminação por pesticidas. Nesse estudo, já o lindano e o paratião-etilo evidenciaram também possibilidade de atingir as águas subterrâneas. Os autores observaram uma variação sazonal dos resíduos de atrazina,

coincidindo com o período de rega da cultura do milho, onde as altas taxas de aplicação aliadas ao seu grande potencial de lixiviação resultam em extensa contaminação (20).

Na continuação dos estudos efectuados por este grupo de trabalho, Cerejeira et al. reportam os níveis de pesticidas encontrados em águas superficiais das bacias do rio Tejo, Sado e Guadiana, entre 1983 e 1999, e os níveis detectados em águas subterrâneas na região do Ribatejo e Oeste, entre 1991 e 1998 (91). Estes últimos dizem respeito à pesquisa de pesticidas em 156 poços destinados ao abastecimento público e 260 poços usados em irrigação de diversas culturas, tais como: milho, batata, tomate, arroz, vinha e pomares de macieira e pereira. Enquanto que numa primeira fase apenas foi pesquisada a presença de atrazina, após 1996 o estudo estendeu-se à simazina, alacloro, metolacloro e metribuzina, seleccionados segundo o seu uso na zona e o potencial de lixiviação. As concentrações de pesticidas mais elevadas foram detectadas na zona do Baixo Sorraia, onde se verificaram valores excepcionalmente altos de: alacloro – 13 $\mu g\ L^{-1}$; atrazina – 30 $\mu g\ L^{-1}$; metolacloro - 56 $\mu g\ L^{-1}$ e metribuzina – 1,4 $\mu g\ L^{-1}$, cuja origem será o seu uso nas culturas do milho, batata e tomate. Pelo contrário, o valor mais elevado de simazina (0,4 $\mu g\ L^{-1}$) foi detectado na zona de Alto Oeste, onde as culturas predominantes são a vinha e os pomares de fruta. Apesar do valor de concentração mais moderado, este herbicida foi o que registou maior dispersão territorial, tendo sido encontrado em 6 das 7 áreas agrícolas, contrariamente ao metolacloro (2 de 7) (91). Uma análise global da zona do Ribatejo e Oeste indicou que a atrazina (64%), simazina (45%) e alacloro (25%) foram os pesticidas com mais alta frequência de detecção nas águas subterrâneas. Interessa salientar que a simazina foi quantificada acima do limite de 0,1 $\mu g\ L^{-1}$ em 62% das captações destinadas a abastecimento público e a atrazina em 23%, o que configura uma contaminação acentuada dos recursos hídricos (91). Note-se que, o estudo das águas superficiais desta zona incluiu a pesquisa (e detecção) de insecticidas como o endossulfão, clorfenvinfos e lindano, enquanto que o estudo análogo das águas subterrâneas se restringiu aos herbicidas citados pelo que, segundo os autores, se justifica o alargamento do número de pesticidas pesquisados com recurso a métodos multiresíduo (91).

Os intentos dos autores foram efectivamente concretizados num estudo em 2000, que alargou a pesquisa a outros pesticidas, abrangendo também uma zona hidrogeologicamente vulnerável na Beira Litoral (92). A selecção dos compostos a incluir neste prolongamento foi feita segundo indicadores de comportamento ambiental, nomeadamente o modelo de fugacidade de MacKay e o índice de lixiviação. Além dos herbicidas discutidos acima, o estudo incluiu alguns produtos de degradação e certos insecticidas. A análise global dos resultados obtidos nas duas áreas de estudo (Ribatejo e Oeste, e Beira Litoral), em 2000,

indica que 72% das amostras apresentavam resíduos de pesticidas, destas 32% excediam o limite em vigor na UE para águas para consumo humano e 10% excediam mesmo o valor de 1 μg L^{-1} (92). Os resultados apresentados evidenciam uma contaminação menos acentuada das captações para consumo humano (3% acima de 0,1 μg L^{-1}) relativamente às de irrigação (48%). Os pesticidas mais frequentemente detectados acima de 0,1 μg L^{-1} foram os seguintes: atrazina (19%), metolacloro (10%), DEA (6%) e alacloro (6%), todos relacionados com a cultura do milho, com especial incidência no período de Março a Maio. Os autores constataram que, apesar da grande dispersão da contaminação com pesticidas, os valores que excedem o limite da UE são em muito menor percentagem.

Batista et al. efectuaram uma revisão dos resultados de monitorização de pesticidas nas duas zonas agrícolas citadas, no período de 1996-2000, de onde se adaptou a Tabela 3.9 (93). Este estudo evidencia bem o grau de degradação das águas subterrâneas quer em termos de frequência e número de pesticidas detectados quer nas suas concentrações. Na opinião dos autores, os casos de contaminação mais acentuada serão provavelmente o resultado de contaminação pontual devida às tarefas envolvidas na aplicação de pesticidas (92, 93).

Tabela 3.9 – Frequência de captações contaminadas e percentagem de detecção dos respectivos pesticidas de acordo com valor limite da UE

Zona	Nº de captações	% captações			
		< LOD	LOD-0,1 μg L^{-1}	0,1-1,0 μg L^{-1}	> 1,0 μg L^{-1}
Ribatejo e Oeste	179	48	37	10	5
Beira Litoral [a]	62	19	47	26	8
Pesticidas (%)		≤ 0,1 μg L^{-1}	> 0,1 μg L^{-1}	Valor máximo (μg L^{-1})	
Alacloro [b]	241	11	4	74	
Atrazina [b]	241	41	12	30	
Metolacloro [b]	241	8	4	56	
Metribuzina [b]	241	10	2	1,4	
Simazina [b]	241	25	6	2,4	
DEA [c]	103	49	11	0,31	
DIA [c]	103	52	0	0,09	
Prometrina [c]	103	4	0	0,07	
Clorpirifos [d]	79	1	0	<0,05	
3,4-DCA [d]	79	3	2	3,8	
Dimetoato [d]	79	0	4	1,2	
α-endossulfão [d]	79	1	5	1,4	
β-endossulfão [d]	79	5	1	0,7	
Lindano [d]	79	3	5	1,1	
Molinato [d]	79	1	4	16	
Propazina [d]	79	1	0	0,07	
Terbutilazina [d]	79	1	0	<0,05	

[a] - em 1999-2000, [b] - em 1996-2000, [c] - em 1999-2000, [d] - em 2000, 3,4-DCA – 3,4-dicloroanilina

A análise da Tabela 3.9 revela que os pesticidas ocorrem em níveis que excedem largamente os limites admissíveis, facto que causa grande preocupação quanto à qualidade das origens de água potável para consumo humano. Em face da extensa contaminação das águas subterrâneas em áreas intensamente agrícolas, os autores alertam para a necessidade de se adoptarem práticas mais racionais no uso de pesticidas, tendo em conta as suas propriedades e a vulnerabilidade hidrogeológica (92). Na sequência dos relatos da presença de triazinas no meio hídrico em Portugal e a nível europeu, a Comissão Europeia decidiu não incluir a atrazina e a simazina na "lista positiva" de substâncias activas. Em consequência disso, em Portugal, as respectivas autorizações de venda foram canceladas, encontrando-se a primeira restrita à cultura do milho e em esgotamento de existências até 2007, e a segunda já totalmente proibida (94).

3.3.2 Contaminação dos solos

O solo é um recurso vital e em grande medida não renovável. Realiza funções de armazenamento, filtragem, efeito de tampão e transformação desempenhando assim um papel fulcral na protecção das águas e na troca de gases com a atmosfera. É ainda o habitat de numerosas espécies e microrganismos. O solo é considerado o compartimento do agroecossistema mais complexo e cuja probabilidade de contaminação com pesticidas é a maior. Quando os pesticidas se acumulam no solo ameaçam não só as suas funções, mas também e de uma forma mais geral, a saúde dos animais e do Homem, através da lixiviação para a água e da bioacumulação nas plantas. Actualmente, entende-se a contaminação dos solos como um dos principais problemas ambientais, facto patente na estratégia temática de protecção do solo publicada pela UE (95). A monitorização da contaminação é um instrumento essencial que deve ser implementado de forma sistemática, como fonte de informação sobre a situação presente, reflectindo também os efeitos das políticas de preservação do ambiente. A informação recolhida será bastante mais útil se integrada com a de outros compartimentos ambientais. A monitorização dos solos deve revestir-se de um carácter preventivo, já que os sinais de contaminação podem ser tardios e, após instalada, é de difícil reversão (95, 96). A este respeito, não há melhor exemplo do que o caso dos pesticidas organoclorados.

Waliszeuski et al. efectuaram a pesquisa de OCPs em 50 amostras de solos e em centeio (caule e grão) colhidos no Outono de 2003, no México (97). Nenhum dos insecticidas,

lindano e DDT, foi usado na área de cultivo pelo menos há 10 anos, no entanto, o lindano poderá ter sido usado no tratamento das sementes. Além desta, as outras possíveis origens destes compostos são o uso em campanhas de sanitização e a utilização histórica na agricultura, com a consequente acumulação nos solos. Os resultados obtidos encontram-se na Tabela 3.10. O p,p'-DDE registou as menores concentrações e frequência de detecção. Apesar de ser o metabolito mais importante do DDT, os autores explicam o resultado como sendo devido à baixa actividade metabólica existente nos solos arenosos. Juntamente com o lindano, verificou-se a ocorrência de α-HCH que resulta da bioisomerização daquele. Em geral, as concentrações mais baixas de poluentes foram determinadas nos solos, em comparação com os tecidos vegetais, o que pode ser uma indicação de que as plantas têm a capacidade de bioconcentrar os poluentes. As vias sugeridas para a contaminação dos tecidos vegetais são a adsorção pela planta após volatilização a partir dos solos contaminados e, menos importante, a absorção radicular, mas nunca o uso daqueles pesticidas na agricultura (97).

A nível europeu, a informação disponível sobre a contaminação dos solos agrícolas é muito limitada, mas esta contaminação é tida como um dos principais factores de degradação ambiental. A Holanda, Dinamarca, Bélgica, Luxemburgo e França são os países onde se usam mais agroquímicos, que acabam por se depositar no solo (96).

Tabela 3.10 – Concentrações de pesticidas quantificadas em várias amostras de solo (nº), colhidas em diversas culturas no México e em Espanha

Ref. (97)	Cultura de centeio (50 amostras)				
Pesticidas (conc. média)	Resíduos ($\mu g\ kg^{-1}$)	Amostras positivas	Pesticidas	Resíduos ($\mu g\ kg^{-1}$)	Amostras positivas
HCB	0,7	60%	p,p'-DDE	1,0	12%
α-HCH	0,6	56%	o,p'-DDT	16,1	100%
β-HCH	1,8	74%	p,p'-DDT	38,0	100%

Ref. (100)	Campos florestados (8)		Cultura de tomate (16)		Cultura de milho (18)	
Pesticidas (gama conc.)	Resíduos ($\mu g\ kg^{-1}$)	Amostras positivas	Resíduos ($\mu g\ kg^{-1}$)	Amostras positivas	Resíduos ($\mu g\ kg^{-1}$)	Amostras positivas
Etalfluralina			17-228	43,8 %		
Simazina	225-2531	100 %				
Atrazina	6-23	50 %				
Alacloro					3-117	100 %
Fenitrotião					7-14	27,8 %
Metolacloro					17-22	16,7 %
Pendimetalina			5-38	43,8 %	5-20	16,7 %
β-endossulfão			16-76	50 %		
Endos. sulfato			9-99	100 %		

Oldal et al. levaram a cabo um estudo de monitorização de 10 pesticidas em solos na Hungria, no início de 2003, com o objectivo de identificar eventuais problemas de ecotoxicidade e verificar o cumprimento de níveis limite de resíduos (98). Apenas a atrazina foi detectada em duas amostras (70 $\mu g\ kg^{-1}$ e 110 $\mu g\ kg^{-1}$) de 24 pontos de amostragem, entre 8 a 9 meses após o período de aplicação. Os autores sugerem que a atrazina sofre uma degradação limitada nos meses secos e só nos meses húmidos é arrastada para as camadas inferiores do solo (98). Fenoll et al. determinaram as concentrações de pesticidas em 5 solos utilizados para a cultura intensiva de pimento em estufa (99). Tipicamente, estes solos são sujeitos a uma forte pressão de contaminação, quer devido ao elevado número de aplicações quer às diferentes substâncias activas usadas. Foram seleccionados 25 pesticidas, apelidados de modernos, onde se incluem alguns insecticidas organofosforados e piretróides, e fungicidas do tipo triazóis, entre outras substâncias activas. As concentrações detectadas variaram entre: pirifenox (80-100 $\mu g\ kg^{-1}$), triadimenol+triadimefão (90-420 $\mu g\ kg^{-1}$), buprofezina (10-30 $\mu g\ kg^{-1}$) e pirimicarbe (20 $\mu g\ kg^{-1}$). Sánchez-Brunete et al. efectuaram a análise conjunta de 50 pesticidas, entre insecticidas, fungicidas e herbicidas, em solos provenientes de culturas de tomate, milho e de pomares localizados nas regiões de Badajoz e Albacete, Espanha. Os resultados obtidos encontram-se na Tabela 3.10 (100). Para além das altas frequências de detecção de pesticidas, pode notar-se, por exemplo, que o endossulfão sulfato, ocorreu numa frequência e concentração superior à da molécula que lhe deu origem, o endossulfão.

Em Portugal, os estudos efectuados centraram-se na avaliação da dinâmica da atrazina no solo, mais do que estudos de monitorização de diferentes pesticidas em condições normais de utilização. Cerejeira et al., citados por Batista, encontraram uma distribuição da atrazina no solo predominantemente junto à linha do milho, em resultado das práticas agrícolas de sulcos na entrelinha. O tempo de semi-vida determinado para este herbicida na camada superficial do solo foi de 80 dias. Azevedo et al. procederam igualmente ao estudo do transporte da atrazina no perfil do solo, ensaiando dois tipos de solos onde se desenvolvia a cultura do milho (101). Estes autores observaram que, mesmo na ausência de precipitação e de irrigação, as concentrações de atrazina num solo franco-limoso diminuíram após a aplicação, possivelmente devido à volatilização e degradação. As concentrações nas camadas subjacentes aos 15-20 cm permaneceram inferiores a 40 $\mu g\ kg^{-1}$. Em 1997 observaram que, 19 dias após a aplicação de atrazina num solo arenoso cerca de 38% da quantidade aplicada permanecia no solo, mas passados 57 dias a quase totalidade tinha desaparecido do perfil do solo até 60 cm devido a degradação ou dissipação (101).

Vários autores convergem na opinião de que a estrutura da agricultura na zona mediterrânica assenta em áreas de cultivo mais pequenas, facto que tem como consequência uma maior variedade de substâncias usadas e variável distribuição ao longo do tempo, em função de estratégias individuais (102, 103). Igualmente, devido ao clima ameno e às culturas sensíveis praticadas nesta zona, a protecção química é imperativa, o que resulta numa extensa contaminação dos solos e das águas.

3.4 CONCLUSÕES

Os temas do comportamento e destino dos pesticidas no ambiente bem como a monitorização dos níveis de contaminação em matrizes ambientais (águas e solos) têm sido áreas de intensa investigação, tendo dela se ocupado as individualidades mais esclarecidas. Parafraseando Rachel Carson, "se vamos ter que conviver com estes compostos químicos de forma bastante íntima no nosso quotidiano, é de suprema conveniência que conheçamos bem a sua natureza e a forma como agem". O primeiro indicador da pressão poluente dos pesticidas é a sua intensidade de aplicação reflectida no volume de vendas, mas a complexidade do assunto aconselha que se tenham em consideração também os factores relativos ao comportamento e destino no ambiente. A relevância do assunto tem empenhado a comunidade científica no conhecimento exaustivo dos pesticidas desde as fases mais precoces da sua concepção e, por outro lado, tem conduzido a uma regulamentação muito apertada da sua presença no ambiente, para combater o elevado grau de contaminação já instalada.

3.5 BIBLIOGRAFIA

(1) Barceló, D., Hennion, M-C. - Trace determination of pesticides and their degradation products in water. Elsevier Science B. V, Amsterdão, Holanda, 1997.

(2) Kiely, T., Donaldson, D., Grube, A. – Pesticides Industry Sales and Usage: 2000 and 2001 Market Estimates. U.S. Environmental Protection Agency, Washington D.C., USA, 2004.

(3) PAN – Global Agrochemical Sales Down. Pesticide Action Network, 16 de Março de 2001, citando Agrow: World Crop Protection News, 2 de Março de 2000.

(4) Yudelman, M., Ratta, A., Nygaard, D. – Pest management and food production: looking to the future. Food, Agriculture and the Environment Discussion Paper No. 25. Washington DC, IFPRI, 1998.

(5) Waxman, M.F. – The Agrochemical and Pesticides Safety Handbook, CRC Press, Boca Raton,

FL, USA, 1998.

(6) Osteen, C.D., Padgitt, M. – Economic issues of agricultural pesticide use and policy in the United States. In: Willis B. Wheeler, Pesticides in Agriculture and the Environment, Marcel Dekker Inc. Nova Iorque, USA, 2002.

(7) Stephenson, G.R. – Pesticide use and world food production. In: J. R. Coats, H. Yamamoto (Eds.), Environmental Fate and Effects of Pesticides, ACS Symposium series 853, American Chemical Society, Washington DC, USA, 2003, pp. 261-270.

(8) Lindinger, H., Scheidleder, A. – Pesticides in groundwater: an indicator fact sheet. Agência Europeia do Ambiente, Copenhaga, 2004.

(9) Stenersen, J. – Chemical Pesticides: Mode of Action and Toxicology. CRC Press, Boca Raton, FL, USA, 2004.

(10) FAOSTAT - FAO Statistical Analysis Service, Statistics Division. Agricultural Data, Domain: Means of Production; Data collections: Pesticides Consumption, http://www.fao.org/waicent/portal/statistics_en.asp, última actualização em 02/07/2004, página visualizada em 28/12/2005.

(11) Kamrin, M.A. – Pesticides Profiles: Toxicity, Environmental Impact and Fate. CRC Press LLC, Boca Raton, FL, USA, 2000.

(12) Tombo, G.M.R., Blaser, H.U. – Chirality in agrochemistry: an established technology and its impact on the development of industrial stereoselective catalysis. In: G.T. Brooks, T.R. Roberts (Eds.), Pesticide chemistry and bioscience. The food-environmental challenge. Royal Society of Chemistry, Cambridge, UK, 1999, pp. 33-54

(13) CE, EUROSTAT – The use of plant protection products in the European Union. Data 1992-1999. Comissão Europeia, Comunidade Europeia, Luxemburgo, 2002.

(14) CE – Comunicação da Comissão ao Conselho, ao Parlamento Europeu, ao Comité Económico e Social e ao Comité das Regiões, "Directions towards sustainable agriculture", COM(1999) 22 final, Comissão das Comunidades Europeias, Bruxelas, Bélgica, 1999.

(15) EUROSTAT – General and regional statistics: environmental statistics, pesticide, sales. Statistical Office of the European Communities, http://epp.eurostat.cec.eu.int/, última actualização em 05/08/2005, página visualizada em 27/12/2005.

(16) Nixon, S., Trent, Z., Marcuello, C., Lallana, C. – Europe's water: An indicator-based assessment. European Environment Agency, Copenhaga, 2003, 99 p.

(17) Oliveira, A.B., Reis, C.J. (Eds.) – Guia dos produtos fitofarmacêuticos: lista dos produtos com venda autorizada. Direcção Geral de Protecção das culturas, 2005. XXII, 171 p. (Guias e Catálogos, 0872-3230; 35). PPA (DSPF)-01/05.

(18) Vieira, M.M. - Vendas de Produtos Fitofarmacêuticos em Portugal em 2004. Direcção Geral de Protecção das Culturas, Lisboa, 2006, PPA(AB)-03/05. Edição em suporte digital

(19) Vieira, M.M. – Evolução das vendas de produtos fitofarmacêuticos em Portugal (1996-2000), Revista das Ciências Agrárias, 28 (2/4) (2004) 229-235.

(20) Batista, S. – Exposição da água subterrânea a pesticidas e nitratos em ecossistemas agrícolas do

Ribatejo e Oeste e da Beira Litoral. Diss. dout., ISA, UTL, Lisboa, 2003, 464 p.

(21) Vieira, M.M. - Vendas de Produtos Fitofarmacêuticos em Portugal em 2003. Direcção Geral de Protecção das Culturas, Lisboa, 2005, PPA(AB)-01/05. Edição em suporte digital

(22) IA – Relatório do Estado do Ambiente 2002. Intituto do Ambiente, Ministério das Cidades, Ordenamento do Território e Ambiente, Lisboa, Portugal, 2003, (138 314/99).

(23) Lucas, S., Pau Vall, M. - Pesticides in the European Union. EUROSTAT, Statistical Office of the European Communities, Bruxelas, Bélgica, 2002.
http://europa.eu.int/comm/agriculture/envir/report/en/pest_en/report_en.htm, página visualizada em 22/12/2005.

(24) Carvalho, B. – Balanço da avaliação comunitária de substâncias activas – situação em 30/09/2005. Direcção Geral de Protecção das Culturas, Lisboa, 2005, PPA(H/D)-06/05.

(25) Racke, K.D. – Release of pesticides in the environment and initial concentrations in soil, water and plants. Pure Appl. Chem., 75(11-12) (2003) 1905-1916.

(26) Mörner, J., Bos, R., Fredrix, M. – Reducing and Eliminating the Use of Persistent Organic Pesticides. Guidance on alternative strategies for sustainable pest and vector management. WHO, UNEP, FAO, Genebra, 2002.

(27) Roberts, T.R. - Environmental fate of pesticides: a perspective. In: D. H. Hutson, T. R. Roberts (Eds.), Environmental Fate of Pesticides, Volume 7, Progress in Pesticide Biochemistry and Toxicology, John Wiley and Sons, Chichester, UK, 1990, pp. 1-12.

(28) Seiber, J.N. – Environmental fate of pesticides. In: W. B. Wheeler (Ed.), Pesticides in Agriculture and the Environment. Marcel Dekker, Nova Iorque, USA, 2002.

(29) Holland, J., Sinclair, P. – Environmental fate of pesticides and the consequences for residues in food and drinking water. In: D. Hamilton, S. Crossley (Eds.) Pesticides Residues in Food and Drinking Water: Human Exposure and Risks. John Wiley & Sons, Chichester, UK, 2004, pp. 27-62.

(30) Van den Brink, N.W. – Directed transport of volatile organochlorine pollutants to polar regions: the effect on the contamination pattern of Antarctic seabirds. Sci. Total Environ., 198 (1997) 43-50.

(31) Charizopoulos, E., Papadoupoulo-Mourkidou, E. – Occurence of pesticides in rain of the Axios river basin, Greece. Environ. Sci. Technol., 33 (1999) 2363-2368.

(32) Führ, F., Burauel, P., Mittelstaedt, W., Pütz, T., Wanner, U. – The lysimeter concept: a comprehensive approach to study the environmental behaviour of pesticides in agroecosystems. In: J. R. Coats, H. Yamamoto (Eds.), Environmental Fate and Effects of Pesticides, ACS Symposium series 853, American Chemical Society, Washington DC, USA, 2003, pp. 1-29.

(33) Spark, K.M., Swift, R.S. – Effect of soil composition and dissolved organic matter on pesticide sorption. Sci. Total Environ., 298 (2002) 147-161.

(34) Jonge, H., Jonge, L.W. – Influence of pH and solution composition on the sorption of glyphosate and prochloraz to a sandy loam soil. Chemosphere, 39 (1999) 753-763.

(35) Beck, A.J., Jones, K.C. – The effects of particle size, organic matter content, crop residues and dissolved organic matter on the sorption kinetics of atrazine and isoproturon by clay soil. Chemosphere, 32 (1996) 2345-2358.

(36) Barraclough, D., Kearney, T., Croxford, A. – Bound residues: environmental solution or future problem? Environ. Pollut., 133 (2005) 85-90.

(37) Gevão, B., Mordaunt, C., Semple, K.T., Piearce, T.G., Jones, K.C. – Bioavailability of nonextractable (bound) pesticide residues to earthworms. Environ. Sci. Technol., 35 (2001) 501-507.

(38) Burauel, P., Baβmann, F. – Soils as filter and buffer for pesticides – experimental concepts to understand soil functions. Environ. Pollut., 133 (2005) 11-16.

(39) Celis, R., Barriuso, E., Houot, S. – Effect of sewage sludge addition on atrazine sorption and desorption by soil. Chemosphere, 37 (1998) 1091-1107.

(40) Si, Y., Zhang, J., Wang, S., Zhang, L., Zhou, D. – Influence of organic amendment on the adsorption and leaching of ethamsulfuron-methyl in acidic soils in China. Geoderma, 130 (2006) 66-76.

(41) Sheng, G., Yang, Y., Huang, M., Yang, K. – Influence of pH on pesticide sorption by soil containing wheat residue-derived char. Environ. Pollut., 134 (2005) 457-463.

(42) Walker, A., Rodriguez-Cruz, M.S., Mitchell, M.J. – Influence of ageing of residues on the availability of pesticides for leaching. Environ. Pollut., 133 (2005) 43-51.

(43) McCall, P.J., Swann, R.L., Laskowski, D.A., Unger, S.M., Vrona, S.A., Dishburger, HJ. – Estimation of chemical mobility in soil from liquid chromatographic retention times. Bull. Environ. Contam. Toxicol., 24 (1980) 190-195.

(44) Gustafson, D.I. – Groundwater ubiquity score: a simple method for assessing pesticide leachability. Environ. Toxicol. Chem., 8 (1989) 339-357.

(45) Jergentz, S., Mugni, H., Bonetto, C., Schulz, R. – Assessment of insecticide contamination in runoff and stream water of small agricultural streams in the main soybean area of Argentina. Chemosphere, 61 (2005) 817-826.

(46) Syversen, N., Bechmann, M. – Vegetative buffer zones as pesticide filters for simulated surface runoff. Ecol. Eng. 22 (2004) 175-184.

(47) Moore, M.T., Schulz, R., Cooper, C.M., Smith Jr., S., Rodgers Jr., J.H – Mitigation of chlorpyrifos runoff using constructed wetlands. Chemosphere, 46 (2002) 827-835.

(48) Moore, M.T., Rodgers Jr., J.H., Cooper, C.M., Smith Jr., S. – Constructed wetlands for mitigation of atrazine-associated agricultural runoff. Environ. Pollut., 110 (2000) 393-399.

(49) Miyamoto, J., Mikami, N., Takimoto, Y. – The fate of pesticides in aquatic ecossystems. In: D. H. Hutson, T. R. Roberts (Eds.), Environmental Fate of Pesticides, Volume 7, Progress in Pesticide Biochemistry and Toxicology, John Wiley and Sons, Chichester, UK, 1990, pp. 123-147.

(50) Salvestrini, S., Di Cerbo, P., Capasso, S. – Kinetics of the chemical degradation of diuron. Chemosphere, 48 (2002) 69-73.

(51) Liu, B., McConnell, L.L., Torrents, A. – Hydrolysis of chlorpyrifos in natural waters of the Chesapeake Bay. Chemosphere, 44 (2001) 1315-1323.

(52) Bavcon, M., Trebše, P., Zupančič-Kralj, L. – Investigations of the determination and

transformations of diazinon and malathion under environmental conditions using gas chromatography coupled with a flame ionisation detector. Chemosphere, 50 (2003) 595-601.

(53) Tinsley, I.J. – Chemical Concepts in Pollutant Behaviour, 2ª Edição, John Wiley and Sons, New Jersey, USA, 2004.

(54) Burrows, H.D., Canle, L.M., Santaballa, J.A., Stenkeen, S. – Reaction pathways and mechanisms of photodegradation of pesticides. J. Photochem. Photobiol. B, 67 (2002) 71-108.

(55) Kamiya, M., Kameyama, K. – Photochemical effects of humic substances on the degradation of organophosphrous compounds. Chemosphere, 36 (1998) 2337-2344.

(56) Zamy, C., Mazellier, P., Legube, B. – Phototransformation of selected organophosphorous compounds in dilute aqueous solutions. Water Res., 38 (2004) 2305-2314.

(57) Lányi, K., Dynia, Z. – Photodegradation study for assessing the environmental fate of some triazine- urea- and thiolcarbamate-type herbicides. Microchem. J., 80 (2005) 79-87.

(58) Farran, A., Ruiz, S. – Application of solid-phase extraction and micellar electrokinetic capillary chromatography to the study of hydrolytic and photolytic degradation of phenoxy acid and phenylurea herbicides. J. Chromatogr. A, 1024 (2004) 267-274.

(59) Sakellarides, T.M., Siskos, M.G., Albanis, T.A. – Photodegradation of selected organophosphorous insecticides under sunlight in different natural waters and soils. Int. J. Environ. Anal. Chem. 38 (2002) 33-50.

(60) Scrano, L., Bufo, S.A., Cataldi, T.R.I., Albanis, T.A. – Surface sorption and reactivity of the diphenylether herbicide oxyfluorfen. J. Environ. Qual. 33 (2004) 605-611.

(61) Frank, M.P., Graebing, P., Chib, J.S. – Effect of soil moisture and sample depth on pesticide photolysis. J. Agric. Food Chem., 50 (2002) 2607-2614.

(62) Mansour, M., Freicht, E.A., Behechti, A., Schramm, K.-W., Kettrup, A. - Determination photostability of selected agrochemicals in water and soil. Chemosphere, 39 (1999) 575-585.

(63) Sanchéz, M.E., Estrada, I.B., Martínez, O., Martín-Villacorta, J., Aller, A., Morán, A. – Influence of the application of sewage sludge on the degradation of pesticides in the soil. Chemosphere, 57 (2004) 673-679.

(64) Arnold, D.J., Briggs, G.G. – Fate of pesticides in soil: predictive and practical aspects. In: D. H. Hutson, T. R. Roberts (Eds.), Environmental Fate of Pesticides, Volume 7, Progress in Pesticide Biochemistry and Toxicology, John Wiley and Sons, Chichester, UK, 1990, pp. 101-122.

(65) Perrin-Ganier, C., Schiavon, F., Morel, J.-L., Schiavon, M. – Effect of sludge amendment or nutrient addition on the biodegradation of the herbicide isoproturon in soil. Chemosphere, 44 (2001) 887-892.

(66) Singh, B.K., Walker, A., Wright, D.J. – Cross-enhancement of accelerated biodegradation of organophosphorous pesticides in soils: Dependence on structural similarity of compounds. Soil Biol. Biochem., 37 (2005) 1675-1682.

(67) Cohen, S.Z. – Pesticides in groundwater: an overview. In: D. H. Hutson, T. R. Roberts (Eds.), Environmental Fate of Pesticides, Volume 7, Progress in Pesticide Biochemistry and Toxicology, John Wiley and Sons, Chichester, UK, 1990, pp. 13-25.

(68) Jones, R.L. – Pesticides in ground water: conduct of field research studies. In: D. H. Hutson, T. R. Roberts (Eds.), Environmental Fate of Pesticides, Volume 7, Progress in Pesticide Biochemistry and Toxicology, John Wiley and Sons, Chichester, UK, 1990, pp. 27-46.

(69) MacKay, D. – Finding fugacity feasible. Environ. Sci. Technol., 13 (1979) 1218-1223.

(70) Laskowsky, D.A., Goring, C.A.I., MacCall, P.J., Swann, R.L. – Terrestrial environment. In : R.A. Conway (Ed.), Environmental Risk Analysis for Chemicals, Van Nostrand Reinhold Co. Nova Iorque, USA, 1982, pp. 198-240.

(71) Bacci, E., Gaggi, C. – Simple models for ranking pesticide mobility from soils. In: A.M. Del Re, E. Capri, S.P. Evans, P. Natalli, M. Trevisan (Eds.), Proceedings of the IX Symposium on Pesticide Chemistry. Mobility and degradation of xenobiotics. Piacenza, Itália, 12-13 Outubro de 1993, pp. 209-219.

(72) FOCUS – FOCUS groundwater scenarios in the EU review of active substances. Report of the FOCUS Groundwater Scenarios Workgroup. EC Document Reference Sanco/321/2000, rev. 2, Bruxelas, Bélgica, 2000, 202 p.

(73) Trevisan, M., Errera, G., Goerlitz, G., Remy, B., Sweeney, P. – Modelling ethoprophos and bentazone fate in a sandy humic soil with primary pesticide fate model PRZM-2. Agric. Water Manage., 44 (2000) 317-335.

(74) Boesten, J.J.T.I., Gottesbüren, B. – Testing PESTLA using two modellers for bentazone and ethoprophos in a sandy soil, Agric. Water Manage., 44 (2000) 283-305.

(75) Vanclooster, M., Boesten, J.J.T.I., Trevisan, M., Brown, C.D., Capri, E., Eklo, O.M., Gottesbüren, B., Gouy, V., van der Linden, A.M.A. – A European test of pesticide-leaching models: methodology and major recommendations. Agric. Water Manage., 44 (2000) 1-19.

(76) Danielopol, D.L., Griebler, C., Gunatilaka, A., Notemboom, J. – Present state and future propects for groundwater ecosystems. Environ. Conserv., 30 (2003) 104-130.

(77) Scheidleder, A., Grath, J., Winkler, G., Stärk, U., Koreimann, C., Gmeiner, C., Nixon S., Casillas, J., Gravesen, P., Leonard, J., Elvira, M. – Groundwater quality and quantity in Europe. European Environment Agency, Copenhaga, Dinamarca, 1999.

(78) Hamilton, D.J., Ambrus, A., Dieterle, R.M., Felsot, A.S., Harris, C.A., Holland, P.T., Katayama, A., Kurihara, N., Linders, J., Unsworth, J., Wong, S.-S. – Regulatory limits for pesticide residues in water. Pure Appl. Chem., 75 (2003) 1123-1155.

(79) Notenboom, J., Verschoor, A., van der Linden, A., van de Plassche, E., Reuther, C. – Pesticides in groundwater: occurrence and ecological impacts. RIVM report 601506002, Bilthoven, Holanda, 1999, 77 p.

(80) Gilliom, R.J., Barbash, J.., Kolpin, D.W., Larson, S.J. – Testing water quality for pesticide pollution. Environ. Sci. Technol., 33 (1999) 164A-169A.

(81) Aharonson, N.; Cohen, S.Z.; Drescher, N.; Gish, T. J.; Gorbach, S.; Kearney P. C.; Otto, S.; Roberts T. R.; and Vonk, J. W. - Potential contamination of groundwater by pesticides, Pure Appl. Chem., 59 (1987) 1419-1446.

(82) Bartram J., Thyssen, N., Gowers, A., Pond, K., Lack, T. (Eds) – Water and health in Europe. EEA & WHO, WHO regional publications, European Series nº 93, Copenhaga, Dinamarca, 2002, 240 p.

(83) EUREAU – Keeping raw drinking water resources safe from pesticides. EUREAU position paper EU1-01-A56, 2001, 38 p.

(84) Guzzella, L., Pozzoni, F., Giuliano, G. – Herbicide contamination of surficial groundwater in Northern Italy. Environ. Pollut., 142 (2006) 344-353.

(85) Papadopoulou-Mourkidou, E., Karpouzas, D.G., Patsias, J., Kotopoulou, A., Milothridou, A., Kintzikoglou, K., Vlachou, P. – The potential of pesticides to contaminate the groundwater resources of the Axios river basin in Macedónia, Northern Greece. Part I. Monitoring study in the north part of the basin. Sci. Total Environ., 321 (2004) 127-146.

(86) Papadopoulou-Mourkidou, E., Karpouzas, D.G., Patsias, J., Kotopoulou, A., Milothridou, A., Kintzikoglou, K., Vlachou, P. – The potential of pesticides to contaminate the groundwater resources of the Axios river basin. Part II. Monitoring study in the south part of the basin. Sci. Total Environ., 321 (2004) 147-164.

(87) Carabias-Martínez, R., Rodrigues-Gonzalo, E., Herrero-Hernández, E., Sánchez-San Román, F.J., Prado-Flores, M.J. – Determination of herbicides and metabolites by solid-phase extraction and liquid chromatography. Evaluation of pollution due to herbicides in surface and groundwaters. J. Chromatogr. A, 950 (2002) 157-166.

(88) Belmonte Vega, A., Garrido Frenich, A., Martínez Vidal, J.L. – Monitoring pesticides in agricultural water and soil samples from Andalusia by liquid chromatography coupled to mass spectrometry. Anal. Chim. Acta, 538 (2005) 117-127.

(89) Azevedo, D.A., Lacorte, S., Vinhas, T., Viana, P., Barceló, D. – Monitoring of priority pesticides and other organic pollutants in river water from Portugal by gas chromatography-mass spectrometry and liquid chromatography-atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry. J. Chromatogr. A, 879 (2000) 13-26.

(90) Tauler, R., Lacorte, S., Guillamon, M., Céspedes, R., Viana, P., Barceló, D. – Chemometric modeling of main contamination sources in surface waters in Portugal. Environ. Toxicol. Chem. 23 (2004) 565-575.

(91) Cerejeira, M.J., Viana, P., Batista, S., Pereira, P., Silva, E., Valério, M.J., Silva, A., Ferreira, M., Silva-Fernandes, A.M. – Pesticides in Portuguese surface and ground waters. Water Res., 37 (2003) 1055-1063.

(92) Batista, S., Silva, E., Galhardo, S., Viana, P., Cerejeira, M.J. – Evaluation of pesticide contamination of ground waters in two agricultural areas of Portugal. Int. J. Environ Anal. Chem., 82 (2002) 601-609.

(93) Batista, S., Cerejeira, M.J., Silva, E., Viana, P., Serôdio, L. - Avaliação de pesticidas e nitratos na água subterrânea de ecossistemas agrícolas de 1996 a 2000. Actas do 7º Congresso da Água, Lisboa, 8-12 de Março de 2004.

(94) DGPC – Substâncias activas não incluídas na Lista Positiva Comunitária. Revisão de 13-12-2005, Direcção Geral de Protecção das Culturas, Lisboa, 2005.

(95) CE, Comunicação da Comissão ao Conselho, ao Parlamento Europeu, ao Comité Económico e

Social e ao Comité das Regiões, "Para uma estratégia temática de protecção do solo", COM(2002) 179 final, Comissão das Comunidades Europeias, Bruxelas, Bélgica, 2002.

(96) Vegter, J., Huber, S., Gentile, A.R. – Strategic overview and status of contamination. In: L. Van-Camp, B. Bujarrabal, A.R. Gentile, R.J.A. Jones, L. Montanarella, C. Olazabal, S-K. Selvaradjou– Reports of the Technical Working Groups Stablished under the Thematic Strategy for Soil Protection. EUR 21319EN/4, Comunidade Europeia, Luxemburgo, 2004, 872 p.

(97) Waliszewski, S.M., Carvajal, O., Infanzon, R.M., Trujillo, P., Aguirre, A.A., Maxwell, M. – Levels of organochlorine pesticides in soils and rye plant tissues in a field study. J. Agric. Food Chem., 52 (2004) 7045-7050.

(98) Oldal, B., Maloschik, E., Uzinger, N., Anton, A., Széckás, A. – Pesticide residues in Hungarian soils. Geoderma (2005) em impressão.

(99) Fenoll, J., Hellín, P., Marín, C., Martínez, C.M., Flores, P. – Multiresidue analysis of pesticides in soil by gas chromatography with nitrogen-phosphorous detection and gas chromatography mass spectrometry. J. Agri. Food Chem., 53 (2005) 7661-7666.

(100) Sánchez-Brunete, C., Albero, B., Tadeo, J.L. – Multiresidue determination of pesticides in soil by gas chromatography mass spectrometry. J. Agric. Food Chem., 52 (2004) 1445-1451.

(101) Azevedo, A.S., Kanwar, R.S., Pereira, L.S. – Atrazine transport in irrigated heavy- and coarse-textured soils. Part I: field studies. J. Agric. Engng. Res., 76 (2000) 165-174.

(102) Ramos, C., Carbonell, G., García Baudin, J.M., Tarazona, J.V. – Ecological risk assessment of pesticides in the Mediterranean region. The need for crop-specific scenarios. Sci. Total Environ., 247 (2000) 269-278.

(103) Zalidis, G., Stamatiadis, S., Takavakoglou, V., Eskridge, K., Misopolinos, N. – Impacts of agricultural practices on soil and water quality in the Mediterranean region and proposed assessment methodology. Agric. Ecosyst. Environ., 88 (2002) 137-146.

Capítulo 4

ANÁLISE DE PESTICIDAS EM AMOSTRAS AMBIENTAIS

4.1 ANÁLISE DE MULTIRESÍDUOS DE PESTICIDAS

O número de substâncias activas de pesticidas ultrapassa as 1400, por todo o mundo, embora as que estão actualmente autorizadas nos diversos países sejam em número inferior e variável de país para país (1). Este número pode ir de inferior a uma dezena até superior a 500 em países como a Espanha, França e Roménia, ficando-se Portugal pela metade. Se é verdade que com o decorrer dos tempos muitas substâncias se tornaram obsoletas, existem inúmeras evidências actuais que aconselham igualmente a monitorização destes compostos. Recentemente, tem aumentado a preocupação relativa à presença de produtos de degradação de pesticidas nas águas e nos solos, que não raramente ocorrem em concentrações e com frequências superiores às dos compostos que lhes deram origem. O conhecimento dos produtos de degradação é ainda insuficiente mas não será difícil admitir que um número elevado destas substâncias ocorre no ambiente e necessita de ser monitorizada. Mais difícil é a selecção dos compostos mais relevantes no ambiente (2).

A Directiva 98/83/CE, respeitante à qualidade da água para consumo humano, e o correspondente Decreto-Lei n.º 243/2001, estipulam que a monitorização daquelas águas deve incluir todos os pesticidas relevantes numa dada região e eventuais produtos de degradação e de reacção. Por tudo isto se entende que existe uma forte necessidade de proceder à pesquisa de inúmeros pesticidas e derivados, potenciais contaminantes de várias matrizes ambientais (3). Tendo consciência do dispêndio de recursos e de tempo que esta tarefa envolve, os métodos analíticos desenvolvidos na actualidade devem ser capazes de determinar simultaneamente quantidades vestigiárias do maior número possível de compostos, permitindo ainda a redução do número de extracções e de limpezas dos extractos (1). Assim se definem os métodos multiresíduo ou multiclasse, em oposição aos métodos analíticos direccionados para uma classe única de poluentes ambientais, ou eventualmente específicos para um composto em particular. Os métodos multiresíduo constituem a resposta

para a necessidade de reduzir os custos da monitorização ambiental aumentando, ao mesmo tempo, a sua intensidade e abrangência (4).

Na procura de estratégias de simplificação do trabalho analítico, um dos principais critérios a lançar mão é também a escolha racional dos analitos a monitorizar, e que serão contemplados nos métodos multiresíduo. Nem todos os pesticidas conhecidos são susceptíveis de serem encontrados em matrizes ambientais ou a sua determinação se justifica, isto é, permite obter resultados com significado ambiental. Abstraindo o caso do transporte transfronteiriço de pesticidas, a selecção dos analitos de interesse sofre uma forte determinante do país ou da região em questão, dos pesticidas autorizados e da intensidade do seu uso (4). Seria naturalmente um desperdício de tempo e de recursos monitorizar a presença de pesticidas cuja probabilidade de ocorrer em matrizes reais fosse remota, por exemplo em função das culturas existentes.

As características dos métodos multiresíduo usados na análise de pesticidas diferem segundo o objectivo com que são empregados. Assim, um método que se destine a verificar o cumprimento de limites máximos de resíduo deve contemplar um conjunto de analitos para os quais esses requisitos estejam legalmente fixados, em determinadas matrizes, e apresentar características de funcionamento compatíveis com o previamente definido (4). De forma distinta, a aplicação de métodos multiresíduo pode ter como finalidade a descrição da extensão da contaminação em programas de monitorização ambiental ou mesmo o estudo do comportamento dos pesticidas. Uma das considerações importantes sobre os métodos multiresíduo refere-se aos limites de detecção (LODs): enquanto que os métodos do primeiro tipo têm um desempenho aceitável se permitirem determinar quantidades correspondentes a 25% do valor máximo recomendado, ou seja, 0,025 $\mu g\ L^{-1}$ em águas para consumo humano, os do segundo tipo devem permitir alcançar os LODs mais baixos possíveis, com vista a detectar quantidades ínfimas de composto (1). Qualquer que seja a finalidade da monitorização, a selecção dos compostos a analisar enfrenta numa importante limitação que advém do facto de não existirem métodos disponíveis suficientemente sensíveis para a análise ambiental de todos os pesticidas e produtos de degradação (4). Por outro lado, este conjunto de compostos é muito heterogéneo, quer na sua polaridade quer na sua volatilidade. A preparação de métodos de análise de múltiplos compostos tem que permitir ultrapassar as diferentes propriedades físico-químicas dos pesticidas, em função das variadas famílias existentes.

A IUPAC e a Directiva 91/414/CEE recomendam que, aquando da aprovação de um novo pesticida devem ser desenvolvidos métodos que permitam a sua monitorização em níveis

inferiores aos limites impostos por lei (no caso da água), para evitar a falta de métodos existente para alguns dos pesticidas actuais.

O entendimento global da problemática dos pesticidas levou a que diversas substâncias activas fossem incluídas em listas de poluentes prioritários, para os quais deve ser possível conhecer a distribuição e níveis de concentração. Referem-se como exemplos, a lista dos POPs, de que fazem parte 9 pesticidas em 12 poluentes persistentes, e a lista de substâncias prioritárias no domínio da política da água estabelecida pela Decisão 2455/2001/CE (anexo X à DQA) a qual é composta por um terço de pesticidas. Outros documentos legislativos que influenciam o tipo de pesticidas a pesquisar em matrizes ambientais foram abordados no Capítulo 2. A preparação de métodos analíticos multiresíduo obriga a ter em consideração as várias etapas do processo analítico. Assim, não só é necessário encontrar um sistema de separação e detecção que permita alcançar esse objectivo como também é preciso garantir que os diferentes analitos possam ser submetidos a um processamento prévio da amostra comum, por ex.: preservação e extracção da amostra (4).

4.2 EXTRACÇÃO E CONCENTRAÇÃO DE AMOSTRAS DE ÁGUA

Quer nos trabalhos de monitorização quer no estudo do transporte e destino dos pesticidas no ambiente, as concentrações em que estas substâncias se encontram são razoavelmente diluídas. Assim, a sua execução requer a utilização de instrumentação analítica de alta eficiência e a execução de uma adequada preparação da amostra (5). Particularmente as águas subterrâneas apresentam normalmente níveis baixos de resíduos de pesticidas, da ordem dos $\mu g\ L^{-1}$ ou sub-$\mu g\ L^{-1}$, quando comparadas com outras matrizes ambientais. Neste sentido, é indispensável o emprego de uma técnica de extracção e concentração dos analitos que permita ultrapassar as limitações dos sistemas de detecção. A etapa da preparação da amostra é reconhecidamente a mais trabalhosa e demorada em todo o processo analítico. Tipicamente, esta etapa consome cerca de 2/3 do tempo gasto no processo completo da análise. Além disso, sendo normalmente um passo menos automatizado, é também aquele onde se cometem mais erros, susceptíveis de originar um desvio na exactidão e na precisão das determinações que pode atingir os 30% (6). Todo o esforço de inovação e aperfeiçoamento nesta fase poderá resultar em grandes ganhos de produtividade e de qualidade dos resultados que, por sua vez, são cada vez mais necessários dadas as crescentes solicitações que recaem sobre os laboratórios de análise ambiental (6, 7). Um outro aspecto

reforça esta discussão: os erros cometidos na fase de preparação da amostra influenciam definitivamente a qualidade dos resultados finais, não sendo possível efectuar a sua posterior correcção, por mais sofisticada que seja a instrumentação analítica usada.

A preparação das amostras é um passo essencial na análise de micropoluentes ambientais cujo objectivo consiste na obtenção de uma extracto da amostra enriquecido nos analitos de interesse e, tanto quanto possível, isento de outros componentes da matriz. Este objectivo é cumprido através da execução de três etapas: i) extracção de quantidades vestigiárias de analitos da matriz da amostra; ii) concentração desses mesmos analitos e iii) remoção de outras substâncias extraídas simultaneamente e co-concentradas as quais poderão prejudicar a eficiência do método e criar dificuldades analíticas (5). As técnicas de preparação de amostras mais importantes na análise de pesticidas e mais relevantes para o presente trabalho serão discutidas nesta secção e na seguinte, segundo o tipo de matriz.

4.2.1 Extracção em fase sólida

4.2.1.1 Fundamento e aplicações

A extracção em fase sólida (SPE) é uma técnica de preparação de amostras que se baseia na partição dos analitos entre uma fase adsorvente sólida e a matriz líquida da amostra. A eficiência do processo é, portanto, tanto maior quanto maior a afinidade dos analitos para esse adsorvente sólido em detrimento da matriz da amostra (6). Os primeiros cartuchos de SPE apareceram em 1978-1979. Contudo, só no início da década de 90 é que a SPE passou a ser a técnica de eleição, usada em substituição da extracção líquido-líquido (LLE), devido a uma maior pressão sobre os laboratórios no sentido de reduzir o uso de solventes orgânicos nos métodos analíticos. A evolução da SPE sofreu também um impulso importante devido à inclusão de determinados produtos de degradação polares em listas de poluentes a monitorizar, os quais não são satisfatoriamente extraíveis por nenhum solvente orgânico (8).

Os adsorventes mais adequados para a extracção de compostos orgânicos são os de fase reversa, por exemplo: partículas de sílica revestidas por cadeias apolares de C_{18} e C_8, co-polímeros apolares com elevada superfície específica e ligações cruzadas (ex.: poli(estireno-divinilbenzeno) (PS-DVB)) e materiais carbonáceos (ex.: carvão activado grafitizado (GCB)) (9). Além da sua utilização predominante na extracção de compostos orgânicos, a SPE pode ainda ser usada na limpeza ("clean-up") de extractos obtidos por outras técnicas. Neste caso, os adsorventes preferidos são os de fase normal, como sejam a

sílica, alumina e Florisil, que retêm fortemente os elementos da matriz da amostra (5).

A preferência pela SPE em métodos multiresíduo para a extracção e concentração de poluentes orgânicos tem sido notória (3, 8, 10). Na literatura encontram-se referências abundantes à sua aplicação na análise de pesticidas em águas, São exemplo disso os trabalhos, para citar apenas alguns, de: Azevedo et al. (11), que aplicaram um método na pesquisa de 42 pesticidas prioritários e 33 outros poluentes em águas superficiais portuguesas; Kampioti et al. (12), que desenvolveram um método de SPE "on-line" inteiramente automático e de alta produtividade e, Albanis et al. (13) e Pichon et al. (14), que usaram adsorventes do tipo C_{18} e PS-DVB imobilizados em disco na análise de pesticidas, com o dobro da produtividade relativamente aos cartuchos. Um dos métodos mais extensos com base em SPE foi desenvolvido por Patsias e Papadopoulou-Mourkidou. Inclui 96 compostos distribuídos por 7 grupos de pesticidas para análise em águas superficiais e subterrâneas (15). Em 2000, Sabik et al. fizeram uma revisão alargada de métodos mutiresíduo especialmente para a determinação de triazinas e produtos de degradação (1). São citados inúmeros trabalhos em que estes compostos são analisados em águas superficiais e subterrâneas utilizando diversas estratégias, desde duplo SPE sequencial com cartuchos e discos até adsorventes de imunoafinidade, em procedimentos "on-line" e "off-line" (1).

A elevada eficiência de extracção e alta reprodutibilidade nos resultados obtida actualmente com SPE conduziram à sua aceitação generalizada pelas entidades reguladores em métodos padronizados (5). Na UE, o projecto SMT4-CT96-2142, intitulado "Optimization and evaluation of multiresidue methods for priority pesticides in drinking and related waters" teve como objectivo apoiar a implementação da Directiva 98/83/CE, no que diz respeito ao controlo de pesticidas. Nesse âmbito, 15 laboratórios foram convidados a implementar um método de SPE usando o PS-DVB como adsorvente, seguido de análise por cromatografia gasosa-espectrometria de massa (GC-MS), para a determinação de 22 pesticidas escolhidos como prioritários em 7 países (16). No estudo interlaboratorial foi avaliada a eficiência do método à luz dos requisitos da referida Directiva. Concluiu-se que o método proposto apresentava uma exactidão e precisão adequada para todos os compostos, à excepção do lindano, mas com ligeira deficiência no caso do dimetoato, trifluralina, pendimetalina e clorpirifos. Os limites de detecção foram sempre inferiores a 0,025 $\mu g\ L^{-1}$ (16). Quintana et al. aplicaram este método na análise de pesticidas em águas brutas e após tratamento para abastecimento público à região de Barcelona (17).

Os objectivos principais do uso da SPE são a extracção, concentração e eliminação de interferentes contudo, têm sido descobertas outras utilizações interessantes e vantajosas da

SPE: i) o armazenamento dos analitos na forma adsorvida, principalmente dos menos estáveis em meio aquoso ou dos voláteis; ii) o fraccionamento do extracto em diferentes grupos de compostos e iii) a derivatização dos analitos no próprio cartucho (6). A primeira destas utilizações tem suscitado um enorme interesse, em virtude de possibilitar o armazenamento do extracto no cartucho de SPE numa forma mais estável e ocupando um reduzido volume, se comparado com a amostra tal qual (1). Este facto é bem evidente nos trabalhos produzidos, que contemplam fases adsorventes de SPE do tipo C_{18}, poliméricas e GCB, imobilizadas na forma de cartucho ou disco, conforme são citados por Aguilar et al. (18). Os autores avaliaram a estabilidade de diversos pesticidas e metabolitos em cartuchos de SPE de reduzidas dimensões contendo PS-DVB, sujeitos a diferentes condições de armazenamento (-20 ºC, 4 ºC e temperatura ambiente) durante uma semana ou três meses. Não se registaram perdas significativas durante um período de armazenamento de 3 meses, se este tiver ocorrido a -20 ºC. A 4 ºC, apenas se obtêm resultados fiáveis durante uma semana. À temperatura ambiente, a maior parte dos pesticidas não revelou degradação acentuada durante a primeira semana, contudo as perdas de aldicarbe, carbaril e bentazona atingiram os 30%, enquanto que o carbofurão baixou em 40% (18). Corroborando os trabalhos de outros autores concluiu-se que, esta utilidade prática não prejudica os resultados finais da análise desde que o armazenamento seja feito a uma temperatura baixa. Esta vantagem da SPE foi explorada num programa de monitorização em Portugal que consistiu na extracção, por SPE, de diversos poluentes orgânicos no laboratório da ex-Direcção Geral do Ambiente e posterior envio dos cartuchos, por correio rápido, para análise cromatográfica em Barcelona (19).

Apesar das suas inúmeras vantagens, a SPE não é isenta de problemas: perda dos pesticidas mais polares durante a percolação da amostra; co-extracção de elementos da matriz; colmatação do filtro; extracção demorada de grandes volumes de água; impurezas no empacotamento; desorção incompleta dos analitos do adsorvente; perda de voláteis na evaporação do extracto e recuperação incompleta do extracto seco (3).

4.2.1.2 Tendências recentes em adsorventes

As tendências recentes no desenvolvimento de adsorventes de SPE contemplam a extracção de compostos cada vez mais polares e de gamas alargadas de polaridade, dando mais sentido ao termo multiresíduo. Os adsorventes modernos de SPE dispensam um

acondicionamento tão aprimorado, uma vez que usam fases funcionalizadas que contactam bem com a amostra, e mostram-se aptos a extrair compostos com alguma polaridade. O co-polímero de DVB-N-vinilpirrolidona usado nos cartuchos Oasis HLB da Waters, e o de metacrilato-DVB usado nos cartuchos Nexus da Varian são exemplos destes adsorventes (5, 8, 9). Os RAM ("restricted access materials") são adsorventes que combinam os mecanismos de exclusão de tamanho e interacção em fase reversa conseguindo-se assim um extracto isento de moléculas de elevado peso molecular (8). Para minimizar o problema da retenção de interferentes de matriz, típico dos adsorventes não selectivos, foram produzidos adsorventes baseados num mecanismo de interacção antigénio-anticorpo. Uma vez que os anticorpos produzidos para um pesticida revelam alguma reactividade cruzada para compostos da mesma família, foi possível produzir adsorventes de imunoafinidade para a extracção de triazinas e também de fenilureias (1, 3, 8). A selectividade que se obtém com estes adsorventes, relativamente aos baseados em interacções hidrofóbicas inespecíficas. é notável. Recentemente foram desenvolvidos adsorventes sintéticos que mimetizam o tipo de interacção dos anticorpos. A estratégia consiste em produzir um polímero contendo cavidades que reconhecem especificamente uma molécula usada como modelo. Estes polímeros são denominados de MIPs ("molecularly imprinted polymers") e apresentam a vantagem face aos imunoadsorventes de serem produzidos de forma mais rápida e fácil, para além de serem estáveis em condições extremas de pH e a solventes orgânicos (3, 5).

4.2.2 Microextracção em fase sólida

4.2.2.1 Fundamento e operação

A microextracção em fase sólida (SPME) é uma técnica de preparação de amostras que se baseia na extracção de micropoluentes orgânicos através do uso de uma fase adsorvente polimérica ("coating") imobilizada sobre um fino capilar de sílica fundida (20, 21). Na versão comercial as fibras de SPME estão alojadas num arranjo tipo seringa que permite a sua protecção no interior da agulha, aquando da punção de septos, seguindo-se a exposição à amostra para que ocorra a extracção (20). Na Figura 4.1 pode ver-se, em esquema, uma montagem de SPME e a constituição de uma destas fibras.

A SPME foi introduzida por Pawliszyn e colaboradores, em 1989, e representa um avanço significativo em termos de simplificação e miniaturização do processo analítico (20, 21). Esta técnica apresenta como principais vantagens a sua simplicidade de operação, baixo

custo, rapidez, selectividade e alta sensibilidade, se associada aos métodos de detecção mais adequados (22, 23). Estes factores aliados à não necessidade de solventes orgânicos tóxicos e à sua fácil automatização fazem dela a técnica de extracção do futuro, contando já no presente com uma presença assinalável em trabalhos científicos (4, 24). O facto de não necessitar de solventes orgânicos ("solventless") dá-lhe vantagem sobre a SPE e principalmente sobre a LLE, mormente quando a redução do uso destes solventes é um imperativo na mudança da face da química analítica, no sentido do uso de técnicas "amigas do ambiente" (21, 25). Através do uso de SPME pode integrar-se num só processo ininterrupto a amostragem, extracção, concentração e introdução dos analitos no sistema cromatográfico para separação e quantificação (24, 25).

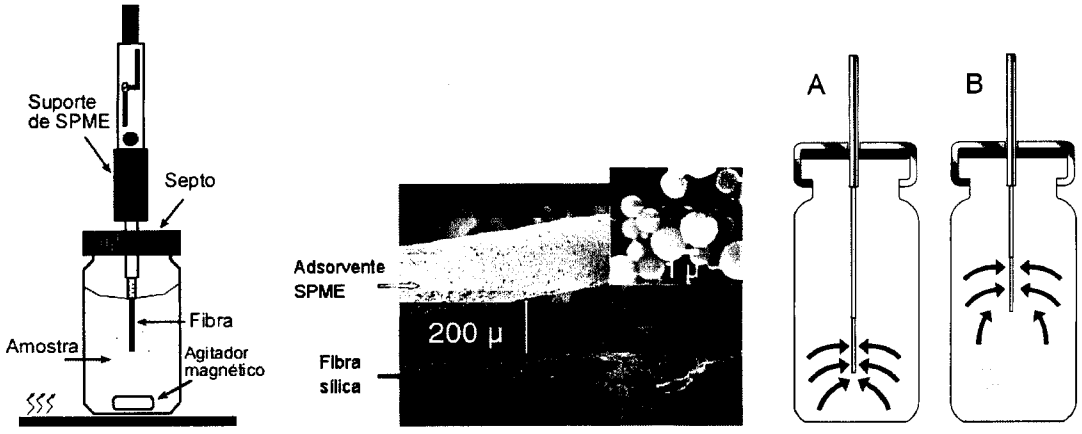


Figura 4.1 – Componentes de SPME: à esquerda – esquema de uma montagem de SPME; ao centro – pormenor de uma fibra de SPME; à direita – modos de operação de SPME: A - por imersão, B - no "headspace"

A SPME inclui dois processos distintos: primeiramente ocorre uma partição dos analitos entre a matriz da amostra e o revestimento adsorvente da fibra; seguidamente procede-se à desorção dos analitos concentrados num sistema analítico (7, 22, 25, 26). Este processo é conseguido expondo a fibra directamente à amostra ou no espaço gasoso em equilíbrio com aquela até que se dê uma transferência significativa de analito. De seguida, a fibra é transportada para um aparelho analítico onde ocorre a desorção térmica (cromatógrafo gasoso) ou a desorção pela fase móvel (cromatógrafo líquido) (23, 25). Podem assim ser considerados dois modos principais de operação da SPME: extracção directa em imersão e extracção no espaço gasoso superior à amostra, ou "headspace", conforme é ilustrado na Figura 4.1 (7, 26). No caso de amostras muito poluídas pode ser usada uma outra versão protegida por membrana, preservando assim a integridade do "coating" (7, 26).

Na extracção directa a fibra é imersa na amostra aquosa e o analitos são transportados directamente do seio da matriz para o adsorvente na fibra através de um mecanismo de difusão, a menos que seja aplicada alguma agitação mecânica. Na extracção em "headspace" todos os compostos orgânicos que apresentem algum grau de volatilidade tenderão a saturar o espaço gasoso acima da amostra onde a fibra de SPME é colocada para efectuar a extracção. Por difusão os analitos entram em contacto com a fibra e são extraídos, sendo secundariamente repostos na fase gasosa a partir da amostra aquosa (7, 26). Enquanto que a extracção de compostos não voláteis ou semivoláteis se processa de forma mais eficiente em imersão, a extracção de compostos voláteis deve ser efectuada no "headspace" devido à maior mobilidade dos analitos na fase gasosa. Os coeficientes de difusão dos analitos na fase gasosa são aproximadamente 4 ordens de magnitude superiores aos que se verificam no meio aquoso, explicando assim a maior rapidez no processo de extracção (26). Em geral, os pesticidas são compostos semivoláteis pelo que serão melhor extraídos por imersão da fibra de SPME na amostra, sendo esta a primeira opção. Em imersão, a fibra está, potencialmente, sujeita a maiores danos, uma vez que pode adsorver compostos de elevado peso molecular, sofrer o impacto de partículas e fica sujeita às condições de pH e salinidade da amostra.

A extracção pela fibra SPME tem início logo que seja posta em contacto com a amostra e é considerada como completa assim que se estabeleça um equilíbrio de distribuição do analito entre a matriz da amostra e o adsorvente. A partir desse momento não haverá incremento adicional na quantidade de analito extraído, por muito que se prolongue o tempo de extracção (26, 27). Aliás, a consequência mais directa será uma menor produtividade sem ganhos de eficiência. A equação que traduz a partição do analito no equilíbrio é a seguinte:

$$n = \frac{K_{fs} V_f V_s C_0}{K_{fs} V_f + V_s} \tag{4.1}$$

onde n é a quantidade de analito (em moles) extraída pelo adsorvente, K_{fs} é a constante de distribuição do analito entre o adsorvente e a matriz da amostra, V_f é o volume de adsorvente na fibra, V_s é o volume de amostra e C_0 é a concentração inicial do analito (21, 26). Esta equação assume que o frasco que contém a amostra se encontra cheio, sem espaço vazio. Duas outras equações podem ser derivadas da equação 4.1 para valores extremos de V_s e K_{fs}. Assim, quando o volume de amostra é muito superior ao volume de fase adsorvente na fibra ($V_s \rangle\rangle K_{fs} V_f$) pode fazer-se uma simplificação e obter a equação 4.2.

$$n = K_{fs} V_f C_0 \tag{4.2}$$

Esta equação indica que a quantidade de analito extraído é independente do volume de

amostra (21). Uma tal situação configura a possibilidade de efectuar extracções directamente no local de amostragem sem necessidade de controlo do volume de amostra. Para grandes volumes de amostra o equilíbrio é atingido sem que a quantidade de analito em solução sofra uma alteração significativa. Este volume é variável de acordo com o composto químico e o adsorvente, mas na generalidade para volumes de amostra superiores a 20 mL o volume deixa de ser um factor importante (26). Quando o valor de K_{fs} é muito elevado ($K_{fs}V_f \rangle\rangle V_s$) pode obter-se a seguinte equação simplificada:

$$n = V_s C_0 \tag{4.3}$$

Nesta condição limite, apesar da SPME ser uma técnica essencialmente de equilíbrio, é possível obter uma extracção praticamente exaustiva (28). Nas três equações apresentadas pode notar-se que a quantidade de analito extraída é proporcional à concentração existente na amostra, sendo este um pressuposto fundamental para que a técnica possa ser usada com fins quantitativos. Em geral, quanto maior a espessura da fase adsorvente mais analito pode ser extraído, ainda que o tempo necessário seja igualmente mais longo. É desejável que o coeficiente de partição do analito nas duas fases do sistema (K_{fs}) seja o mais elevado possível, de forma a garantir uma extracção eficiente (28). Apesar da extracção assentar num mecanismo de equilíbrio, a técnica comporta uma grande sensibilidade resultante da introdução da totalidade do analito extraído no sistema analítico, facto que a distingue da SPE e LLE, em que apenas uma alíquota do extracto é efectivamente analisada resultando numa menor eficiência global (7, 21, 27).

4.2.2.2 Factores que influenciam a extracção

Os fundamentos dos processos envolvidos num sistema de extracção por SPME são actualmente bem conhecidos. Contudo, a sua aplicação na determinação de um qualquer conjunto de analitos em amostras reais é condicionada pelas propriedades físico-químicas daqueles e, superiormente, pela sua presença conjunta, quando está em causa a implementação de métodos de análise multiresíduo. Esta técnica é particularmente sensível às condições experimentais e à composição da matriz pelo que a sua utilização com fins quantitativos tem de ser criteriosamente avaliada. As publicações nesta área incluem, normalmente, um estudo mais ou menos exaustivo de optimização das condições experimentais com o objectivo de garantir o bom desempenho do método (24). Vários autores abordaram os factores que afectam o funcionamento da técnica, os quais podem ser

divididos entre aqueles que influenciam a extracção e os que dizem respeito à desorção (23, 24, 28, 29). Aqui serão discutidos essencialmente os do primeiro grupo que inclui: polaridade e espessura da fase adsorvente, temperatura, pH, força iónica, agitação e tempo de extracção, entre os mais importantes. A influência destes parâmetros na extracção deve ser avaliada experimentalmente, com o necessário conhecimento dos processos envolvidos. Contudo, não é obrigatório o estudo de todos eles, por ex. na extracção em "headspace" (26).

Um dos primeiros factores a considerar é o **tipo de fibra adsorvente**, cujas características aparecem directamente traduzidas nos parâmetros da equação 4.1. A afinidade e selectividade que cada adsorvente revela face a um certo composto orgânico são expressas pelo K_{fs}. Já a capacidade de extracção é dada pela espessura (ou volume) desse adsorvente expresso como V_f. O tipo de fibra afecta definitivamente a eficiência do método e uma correcta selecção pode permitir ganhos de extracção superiores a uma ordem de magnitude (26, 28). Nessa selecção deve ter-se em mente o princípio de "igual dissolve igual", que para adsorventes apolares se pode relacionar com o K_{ow} do composto ou com a constante de Henry (23, 26, 29). A polaridade, solubilidade e volatilidade dos analitos são critérios orientadores para uma escolha acertada do adsorvente (26, 29). As primeiras fibras a serem desenvolvidas tinham por base o poli(dimetilsiloxano) (PDMS) e o poliacrilato (PA). Na actualidade a oferta é mais alargada para corresponder a diversos tipos de aplicações, conforme se mostra na Tabela 4.1 (7, 23, 24). As fibras mais espessas proporcionam maior capacidade de extracção mas têm como consequência um equilíbrio mais prolongado e uma desorção mais difícil, que pode levar ao aparecimento de efeito de memória (26).

Tabela 4.1 – Tipos de fibras de SPME comercializadas e suas aplicações

Tipo de adsorvente	Espessura	Carácter	Aplicação
Poli(dimetilsiloxano) (PDMS)	7, 30 100 μm	Apolar	Compostos orgânicos apolares VOCs, PAHs, PCBs, pesticidas
Poliacrilato (PA)	85 μm	Polar	Compostos orgânicos polares: fenóis e pesticidas de N e P
Poli(dimetilsiloxano-divinilbenzeno) (PDMS-DVB) *	60 μm 65 μm	Bipolar	Hidrocarbonetos aromáticos e analitos voláteis, ex.: aminas
Carbowax-divinilbenzeno (CW-DVB) *	65 μm 70 μm	Polar	Compostos orgânicos polares como os álcoois e cetonas
Carbowax-templated resin (CW-TPR)	50 μm	Polar	Surfactantes aniónicos e aminas aromáticas
Carboxen-poli(dimetilsiloxano) (CAR-PDMS) *	75 μm 85 μm	Bipolar	VOCs e hidrocarbonetos
Divinilbenzeno-carboxen-PDMS (DVB-CAR-PDMS) *	50/30 μm	Bipolar	

* Estas fibras também estão disponíveis na versão StableFlex

Para lá do carácter não polar, polar ou bipolar que define à interacção dos adsorventes de SPME com os analitos, existe uma diferença fundamental entre estas fibras que diz respeito ao mecanismo de extracção: absorção ou adsorção. Górecki et al. fazem notar que, enquanto as fibras de PDMS e PA funcionam por absorção dos analitos na sua estrutura, devido ao facto de serem líquidos viscosos, as restantes fibras funcionam por adsorção dos analitos na superfície porosa dos polímeros sólidos que as constituem (30). A consequência imediata desta observação é a impossibilidade de aplicar às fases adsorventes a teoria de equilíbrio desenvolvida por Louch et al. (31) para as fases que funcionam por absorção, sendo substituída pela proposta por Górecki et al. (30). Duas repercussões práticas importantes no processo de SPME devem ser tidas em conta. Assim, enquanto que a absorção é um processo não competitivo, na adsorção há competição dos analitos pelos locais activos, a qual pode ocasionar a deslocação de analitos previamente adsorvidos por outros com maior afinidade (32). Daqui deriva que, a presença de outros analitos em concentrações muito diferentes ou mesmo de interferentes de matriz, quase sempre presentes, pode gerar um comportamento distinto de uma solução pura do analito. Por outro lado, os adsorventes sólidos são saturáveis de analito, pelo que a linearidade entre a concentração e a quantidade extraída só pode ser garantida para soluções diluídas (30, 32). Não obstante, estas fibras revelam-se vantajosas para alguns analitos.

Certos compostos com coeficientes de partição para a fibra baixos, podem demorar a atingir o equilíbrio, daí que seja usual modificar as condições de extracção para acelerar o processo. Uma das vias mais simples e imediata é a **agitação da amostra**. Pawliszyn arrola as várias alternativas disponíveis a este nível, a saber: agitação magnética, vibração da fibra, vórtice no frasco, câmara de fluxo e aplicação de ultra-sons, mencionando também as suas vantagens e desvantagens (26). Sem dúvida que a agitação magnética merece uma preferência generalizada, principalmente pela facilidade de execução, enquanto que agitação por vibração da fibra é conseguida num amostrador automático da marca Varian. O benefício na extracção é obtido pelo transporte mais rápido do analito em direcção à fibra e pela redução da camada de matriz estática e esgotada de analito junto à fibra, onde o analito sofre apenas uma difusão lenta (27). Eisert e Pawliszyn compararam vários modos de agitação tendo verificado ligeiras diferenças entre eles (33). A agitação por vibração é automatizável mas a agitação por ultra-sons é porventura mais eficaz (7).

A **temperatura da amostra** influência o processo de extracção, e portanto deve ser optimizada, tanto que mais que podem considerar-se dois efeitos contrários daí resultantes. Por um lado, uma temperatura superior permite uma difusão mais rápida dos analitos no seio

da amostra, facilitando a extracção. Ao invés, uma temperatura mais alta acarreta uma diminuição do K_{fs}, devida ao carácter exotérmico da adsorção, que implica uma menor eficiência de extracção (7, 23). A temperatura afecta a cinética do processo de SPME onde tem um efeito positivo, mas baixa a quantidade de analito extraída no equilíbrio, o que pode prejudicar a sensibilidade do método. Para compostos algo voláteis o aquecimento da amostra tem também um efeito no aumento da pressão de vapor do composto, que representa um benefício quando a extracção é feita no "headspace". Não deve ser descuidada a eventual degradação de analitos termossensíveis, pelo aumento da temperatura na extracção. O efeito do aumento da temperatura da amostra na análise de múltiplos pesticidas é mais facilmente avaliado testando experimentalmente diversas condições de extracção e seleccionando aquela que se apresente mais vantajosa para o conjunto dos analitos.

Muito à semelhança do que acontece em LLE e SPE também o **pH da amostra** e a força iónica influenciam a partição de compostos orgânicos na fase adsorvente (28). Apesar da polaridade variável das fibras de SPME, a extracção de compostos orgânicos é controlada pelo estabelecimento de interacções hidrofóbicas com o analito. Interessa assim que estes se apresentem na sua forma não dissociada, que apresenta simultaneamente maior K_{ow} e K_{fs}. A estratégia passa pela modificação do pH da amostra, baixando ou elevando segundo os analitos possam ser ácidos fracos ou bases fracas, mas nenhuma alteração na extracção será de esperar para compostos neutros (23, 26, 28). Na extracção de herbicidas ácidos esta operação é aconselhada, no entanto, incrementa a manipulação da amostra e obriga a respeitar os limites de pH suportados pelas fibras de extracção (28).

O aumento da **força iónica da amostra** através da adição de um sal, usualmente cloreto ou sulfato de sódio, pode influenciar o equilíbrio de duas formas: por um lado, pode alterar as propriedades na interface fibra/amostra e; por outro, diminui a solubilidade dos compostos orgânicos na fase aquosa, especialmente os mais solúveis, fenómeno este conhecido como "salting out" (34). O resultado final da adição de sal é altamente dependente dos analitos e tem sido observada alguma discrepância na literatura (24). Uma elevada força iónica pode diminuir significativamente os coeficientes de actividade de alguns analitos, e assim conduzir à diminuição da eficiência de extracção, nomeadamente para compostos já de si pouco solúveis (26, 34, 35). Ocorrem situações em que a eficiência da extracção pode diminuir, aumentar ou apresentar um máximo para valores intermédios de percentagem de saturação, conforme explicaram Barceló e Hennion (4), suportados também por Krutz et al. (22). Na situação mais favorável, a adição de sal pode melhorar a extracção até uma ordem de magnitude (23). Além de aumentar a manipulação da amostra, a adição de sal pode

danificar a fibra de SPME. Isto mesmo foi constatado por Hernandez et al., que foram forçados a diminuir a concentração de NaCl devido à degradação rápida da fibra CW-DVB (15 extracções) usando 30% de NaCl (36).

A extracção por SPME evidencia uma evolução típica de um processo de equilíbrio. Inicialmente a quantidade de analito retida aumenta rapidamente, baixando depois o ritmo até estabilizar. Esta evolução é dependente da fibra usada, do composto em análise e das condições de extracção (28). É usual fazer-se a representação gráfica do perfil de extracção representando a quantidade extraída em função do tempo. A quantidade máxima de analito extraída pela fibra de SPME é obtida em condições de equilíbrio. Não obstante, e apesar da maior parte dos autores determinar esse tempo, o **tempo de extracção** seleccionado é normalmente inferior, sendo ditado por considerações de ordem prática como a sensibilidade e produtividade requeridas para a análise (23, 24). Em extracções distantes da situação de equilíbrio, o controlo rigoroso dos tempos de extracção é uma condição essencial, de forma a obter resultados consistentes (7, 20, 23). Para além destes factores, diversas publicações abordam ainda a influência do volume da amostra, adição de solvente, efeito de matriz, temperatura e tempo de desorção e derivatização do analito, entre outros (23, 26, 28).

A análise de pesticidas através de SPME coloca um desafio singular que advém da grande disparidade de características físico-químicas encontrada entre as várias famílias, obrigando a explorar toda a gama de fibras disponível e condições de extracção. Para misturas complexas as condições óptimas poderão corresponder a uma solução de compromisso entre as várias tendências.

4.2.2.3 Aplicações e dificuldades analíticas

A SPME é uma técnica que tem despertado o maior interesse, desde o seu uso na análise de poluentes ambientais até aplicações mais diferenciadas, como a monitorização de compostos intracelulares, feromonas de insectos ou compostos exalados de flores (26). Esta secção será dedicada ao uso de SPME na análise de pesticidas em amostras ambientais, embora a técnica encontre também aplicação alargada em análise clínica e forense, de bebidas, de alimentos (24), de produtos farmacêuticos e de perfis aromáticos (37). Para além dos pesticidas, outros poluentes tais como: PCBs, PAHs, BTEX, VOCs e fenóis, têm sido analisados com recurso à SPME, principalmente em conjunção com GC mas também com cromatografia líquida (HPLC ou LC) (21, 34, 38). Segundo Alpendurada, até 2000, 40% dos

artigos publicados versavam aplicações na área ambiental, enquanto que 20% eram dedicados à análise de alimentos e outros 20% dedicados à análise clínica e forense (7).

Num artigo de revisão de 1996, Eisert e Levsen focaram a atenção num dos trabalhos pioneiros na determinação de pesticidas por SPME, o qual permitia analisar triazinas, OPPs e 2,6-dinitroanilinas em águas abaixo do limite de 0,1 $\mu g\ L^{-1}$ (21). Desde cedo que Aguilar et al. (34) e Miège et al. (20) demonstraram também a possibilidade de obter limites de detecção, usando GC-MS, compatíveis com o limite na UE e até inferiores aos do método US EPA 507. Em 2000, Beltran et al. efectuaram uma revisão dos trabalhos publicados até então visando a aplicação de SPME na análise das seguintes famílias de pesticidas: OCPs, OPPs, triazinas, tiocarbamatos, uracilos, ureias e dinitroanilinas (24). Enquanto que Eisert e Levsen incluíam 10 referências bibliográficas sobre a análise de pesticidas, Beltran et al. referem a existência de 60 e dessas mais de 60% diziam respeito à análise de águas (24). Estes autores referem que as fibras de PDMS e PA foram as mais utilizadas e só mais recentemente a fibra CW-DVB passou a ser citada em publicações científicas para a análise de pesticidas polares. Nos trabalhos citados, a separação e detecção era feita principalmente por GC-MS, GC-ECD e GC-NPD, e em casos mais esporádicos por HPLC-UV e HPLC-MS (24). Na Tabela 4.2 apresentam-se alguns detalhes de grande parte das aplicações publicadas nesta área desde do ano 2000. Neste grupo de trabalhos, as fibras de PDMS e PA marcam presença maioritária contudo, as fibras de PDMS-DVB e CW-DVB rivalizam na análise de pesticidas polares ou em métodos multiresíduo (36, 39, 40). Krutz et al. fizeram uma extensa revisão das aplicações de SPME na análise de herbicidas incluindo 81 compostos de 14 famílias químicas, tendo concluído que a fibra de CW-DVB é a mais adequada para a análise de cloroacetamidas, amidas, tiocarbamatos, uracilos, triazinas e metabolitos, mas não é isenta de problemas (22). Vários autores indicam a fibra de DVB-CAR-PDMS para a análise de OCPs, em alternativa à PDMS, quer em "headspace" (41) quer em imersão (42, 43).

A associação da SPME a GC é esmagadora relativamente a HPLC (38, 44, 45), enquanto que a técnica de GC-MS parece ter conquistado larga aceitação. Relativamente à associação de SPME a HPLC, um dos factos mais evidentes é a dificuldade em obter LODs que se aproximem dos obtidos com GC e detectores selectivos ou MS, ficando aquém dos valores necessários para a monitorização de pesticidas, na UE (38, 44-46).

Apesar da maioria dos autores adoptar uma estratégia de optimização que privilegia o estudo faseado das variáveis (47, 48), outros usam métodos quimiométricos (24, 46, 49, 50). Nestes casos, apenas um número limitado de variáveis foi incluído no desenho experimental sendo as restantes optimizadas em ensaios preliminares ou obtidos da literatura.

Tabela 4.2 – Aplicações de SPME na análise de pesticidas em águas e solos desde 2000

Ref.	Matriz	Fibra	Condições	Análise	LOD (ngL^{-1})	% RSD	Grupos de pesticidas
(51)	ASup.	PDMS 100 µm, Im.	5 mL, 25 °C, 45 min, 15% NaCl, Ag.	GC-FTD GC-MS	3-80 10-90	3-12 6-14	Triazinas, cloroacetanilidas, OPPs, dinitroanilinas, carbamatos (23)
(39)	ASup.	PDMS-DVB 65µm, Im.	5 mL, 25 °C, 50 min, 15% NaCl, Ag.	GC-MS	1-56	5-15	Triazinas, OPPs, OCPs, carbamatos cloroacetanil., dinitroanilinas (31)
(47)	ASup., ASub.	PA 85 µm, Im.	5 mL, 25 °C, 75 min, y% NaCl, Ag.	GC-MS	10-110	12-24	Triazinas, fenilureias, dinitroanilin., cloroacetanilidas, outros (10)
(40)	ASup.	PDMS-DVB 65µm, Im.	1,2 mL, TA, 60 min, 10% NaCl, Ag.	GC-MS	2-17	5-10	Triazinas (10)
(41)	MRC	DVB-CAR-PDMS, Hs.	20 mL, 10 min. 80% microondas	GC-ECD	2-70	4-16	OCPs e dinitroanilina (16)
(52)	Pura	PA 85 µm, Hs.	10 mL, 60-100 °C, 40 min. 4g Na_2SO_4, Ag.	GC-MS	$10\text{-}10^4$ [a]	2-18 [a]	Piretróides, OCPs, dinitroanilinas, carbamatos, cloroacetanilidas, OPPs, azóis e outros (174)
(44)	ASup.	PDMS-DVB 60µm, Im.	3 mL, TA, 60 min, 15% Na_2SO_4, Ag.	LC-UV--DCAD	$1\text{-}12x10^3$	5-12	Fenitrotião e produtos de degradação (3)
(42)	ASup.	DVB-CAR-PDMS	40 mL, TA, 30 min.	GC-ECD	60, 50	2-8	α-endossulfão, β-endossulfão (2)
(53)	Chuva	PA 85 µm, Im.	3 mL, 50 °C, 40 min, 70% sat. NaCl, pH 6, Ag.	GC-MS--MS	10-50	8-14	Cloroacetanilidas, triazinas e produtos de degradação, outros (11)
(48)	ASup., ASub., Mar	PDMS 100 µm, Hs.	5 mL, 75 °C, 45 min, 15% Na_2SO_4, Ag.	GC-FTD GC-MS	10-25 20-40	4-13 8-15	OPPs (7)
(48)	ASup., ASub., Mar	PA 85 µm, Hs.	5 mL, 75 °C, 45 min, 15% Na_2SO_4, Ag.	GC-FTD GC-MS	20-30 30-40	6-15 8-17	OPPs (7)
(45)	Irrigação	CW-TPR 50 µm, Im.	15 mL, TA, 30 min, 10% NaCl, Ag.	LC-UV	$3x10^3$	3	Profoxidim (1) Nota: análise "in situ"
(38)	Pura	PA 85 µm, Im.	20 mL, 60 °C, 180 min, 10% NaCl, Ag., des. SFE	SFE-LC--DAD	$7\text{-}22x10^4$	7-12	Triazina, carbamato, OPPs, OCP (5)
(35)	ASup, ASub, Mar	PDMS 100 µm (PA, PDMS-DVB, CW-DVB), Im.	3 mL, 25 °C, 30 min, 25% NaCl, pH 4, Ag.	GC-ECD GC-MS	1-15 10-40	3-9 6-11	Cloroanilinas, sulfamidas, ftalimidas, oxazolidinas (7)
(54)	ASup.	PDMS 100 µm, Im.	10 mL, TA, 15 min, Ag.	GC-NPD GC-ECD	$0{,}1\text{-}3{,}0x10^3$ 2-237	2-28 3-28	Triazinas e outros (5)
(54)	ASup.	PA 85 µm, Im.	10 mL, TA, 15 min, Ag.	GC-NPD GC-ECD	$0{,}4\text{-}1{,}2x10^3$ 7-479	4-16 3-28	Triazinas e outros (5)
(46)	Pura	PDMS-DVB 60 µm Im.	100 mL, TA, 120 min, pH 4, Ag.	LC-DAD	270	16	Alacloro (1)
(55)	AConsumo, ASup., Mar	PA 85 µm, Im.	3 mL, 50 °C, 50 min, 5 M NaCl, 0,5 M fosfatos, Ag., após derivatização	SPE--SPME--GC-MS	0,3-4,2	<10%	Fenilureias e produtos de degradação (6)
(56)	ASup.	PDMS 100 µm, Im.	10 mL, 40 °C, 30 min, 3% NaCl, Ag.	GC-FPD	49-301	2-7	OPPs (6)
(49)	Pura	PDMS 100 µm, Im.	3 mL TA, 30 min, 10% NaCl, Ag.	GC-ECD	10-40	-	Atrazina e OPPs (5)
(57)	ASub.	PDMS-DVB 60 µm	10 mL, TA, 20 min, Ag.	GC-MS	$2\text{-}6x10^3$	-	Atrazina e OPPs (6)
(50)	ASub.	PDMS 100 µm, Hs.	7 mL, 100 °C, 25 min, 2,5g NaCl, Ag.	GC-MS	10	6-11	Oxadiazão (1)
(43)	ASub.	CAR-PDMS 75 µm DVB-CAR-PDMS CW-DVB 65 µm	1,2 mL, TA, 30 min, Ag. 1,2 mL, TA, 30 min, Ag. 1,2 mL, TA, 15 min, Ag.	GC-ECD	0,5-12 0,4-7,4 0,6-10	2-12 3-9 2-7	OCPs (12)
(58)	ASub.	PDMS 100 µm, Im.	Derivat., 1,2 mL, 300 mg NaCl, 20 min, Ag.	GC-MS	$0{,}16\text{-}2{,}3x10^3$	6-53	Ácidos clorofenoxiacéticos e produtos de degradação (6)
(37)	Pura	PDMS 100 µm, Im.	1 mL, 50 °C, 20 min, Ag. em ultra-sons	GC-ECD	5-15	8-19	OCPs (8)
(36)	ASup., ASub.	CW-DVB 65 µm, Im.	3 ml, TA, 30 min, 10% NaCl, Ag.	GC-MS	10-60	8-16	Triazinas e outros (7)
(59)	Pura	CW-DVB 65 µm, Im.	4 mL, TA, 60 min, 35% NaCl, Ag.	GC-MS	5,4-34	3-44	Triazinas, metabolitos, amidas (16)
(60)	Solo	PA 85 µm, Im.	5 g, 5 mL acetona USE, 10 mL dil., 45 min, 25% NaCl, Ag.	GC-MS	2, 3 µg kg^{-1}	7, 6	Vinclozolina e dicloran, respectivamente (2)
(49)	Solo	PDMS 100 µm, Im.	0,5g, 5 mL,MeOH USE, 3 mL dil.10x, TA, 30 min, 10% NaCl, Ag.	GC-ECD	0,6-30 µg kg^{-1}	<16%	Atrazina e OPPs (5)
(36)	Solo	CW-DVB 65 µm, Im.	5g, 5 mL MeOH, microondas, dil. 10x, TA, 30 min, 10% NaCl, Ag,	GC-MS	1-60 µg kg^{-1}	3-26	Triazinas e outros (7)

Tabela 4.2 (Continuação)

(61)	Solo	PDMS 100 µm, Hs.	0,5 g, 5 mL H_2O, 70 °C, 60 min,	GC-ECD	0,06-0,65 µg kg^{-1}	3-26	OCPs (18)
(50)	Solo	PDMS 100 µm, Hs.	0,75g + 1 mL H_2O, 100 °C, 25 min, Ag.	GC-MS	1 µg kg^{-1}	9-12	Oxadiazão (1)

[a]- não inclui todos os pesticidas, TA - temperatura ambiente, ASup./Sub. – Água superficial/subterrânea, MRC -material de referência certificado, Im. - imersão, Hs.- "headspace", Ag. - agitação, USE – extracção por ultra-sons, ( ) - número de compostos

Nestes trabalhos, verifica-se uma tendência generalizada em não usar um tempo de extracção correspondente ao equilíbrio mas sim um tempo próximo do necessário para efectuar a análise cromatográfica, permitindo um maior rendimento em termos de amostras analisadas (50, 56, 57). O mesmo foi sublinhado no trabalho de revisão de Krutz et al. (22).

Na tentativa de estabelecer a SPME como uma técnica credível e robusta na análise de pesticidas em águas, foi organizado um estudo interlaboratorial com 11 participantes para a determinação de triazinas e produtos de degradação em concentrações realistas (≈0,1 µg L^{-1}) (62). Os resultados obtidos foram promissores – LODs: 4,1-40 µg L^{-1}, repetibilidade: 6-14%, reprodutibilidade: 10-17%, e uma boa exactidão. Alguns autores usaram métodos de SPME em estudos de monitorização ambiental de águas de diferentes origens (39, 51). A SPME já está presente em métodos oficiais (ex.: Standard Methods 6040D, para compostos com paladar e odor; e ASTM E2154-01, para compostos inflamáveis) contudo, tais métodos não existem para pesticidas. A análise de pesticidas em solos através de SPME parece ter, igualmente, bastante potencial no futuro (36, 49, 60). A estratégia preferida nestas análises consiste em efectuar uma extracção líquido-sólido convencional, nomeadamente por ultra-sons, sendo o extracto obtido submetido a SPME, após diluição com água (22, 36).

Uma variante recente de SPME, designada "in-tube SPME", foi usada com relativo sucesso na análise de fenilureias, carbamatos e ácidos clorofenoxiacéticos (22, 63, 64). A "in-tube SPME" obvia algumas dificuldades que surgem na análise destas classes de herbicidas por SPME com fibras. Além disso, aquela metodologia pode ser usada em associação com HPLC, o que constitui uma vantagem na análise de compostos termolábeis e pouco voláteis. Outra aplicação interessante e recente da SPME consiste na sua utilização em estudos de fotodegradação. Enquanto que Sakkas et al. (65) tinham já demonstrado a utilidade da SPME no estudo de cinéticas de fotocatálise e na identificação de produtos de degradação, Llompart et al. (66) estenderam a aplicação a estudos de fotólise na própria fibra (foto-SPME) evitando, assim, a necessidade de extrair o composto original e seus derivados.

Apesar das grandes vantagens inerentes à SPME, esta padece de algumas dificuldades na análise de compostos polares e não voláteis, as quais deverão ser ultrapassadas no futuro, nomeadamente com a preparação de novas fases adsorventes (67, 68). Outras deficiências de

realçar são: diferenças de extracção entre fibras do mesmo lote e de lotes diferentes, tempo de vida de cada fibra algo incerto (37), dano na fibra em condições extremas de pH e salinidade, efeito de memória e fragilidade (7, 28, 69).

4.2.2.4 Novos adsorventes de SPME

Em resposta às dificuldades referidas acima várias propostas de novos adsorventes de SPME têm surgido nos últimos 5 anos. A estratégia mais usada na preparação destes adsorventes consiste no recurso a processos químicos sol-gel, em que um polímero é fixado num substrato em forma de fibra, por imersão desta na solução do polímero já formado ("dip-coating") (67). A química de sol-gel permite a incorporação de uma matriz orgânica numa estrutura inorgânica de uma forma prática e em condições experimentais suaves e facilmente acessíveis (69, 70). As vantagens atribuídas aos revestimentos sol-gel são: forte adesão ao suporte de sílica, alta estabilidade térmica e mecânica, estrutura porosa e elevada superfície extractora (69, 71). A tecnologia sol-gel parece permitir ultrapassar a deficiente estabilidade mecânica das fibras actuais com adsorventes sólidos, as quais perdem o revestimento devido aos ciclos de aquecimento/arrefecimento e a exposição a solventes, durante a desorção. Os autores são unânimes em considerar as fibras de sol-gel altamente estáveis naquelas condições (72, 73). Azenha et al. produziram fibras de SPME com um desempenho comparável às actualmente comercializadas, depositando o polímero sol-gel num fio de titânio que aumenta significativamente a robustez da fibra (74).

Outros autores exploraram a possibilidade de produzir um filme adsorvente de polipirrole (PPY) sobre capilares de platina, através de electrodeposição (68). A variação da diferença de potencial nestas fibras condutoras pode ser usada como força motriz para a extracção e desorção (68). Outro método bastante prático de preparar fibras de SPME consiste na simples imobilização física do adsorvente, por exemplo um MIP, seguida de algum tratamento térmico; contudo, as fibras podem sofrer de instabilidade mecânica (67).

Baseado na revisão que Dietz et al. fizeram de todas as aplicações dos novos adsorventes, e a forma como são obtidos, é possível referir que a determinação de poluentes ambientais e de fármacos em amostras biológicas reúnem grande parte dos esforços de inovação (67). Apesar disso, ressalta a ideia de que a análise ambiental tem uma boa base de suporte nas fibras de SPME comerciais, relativamente às demais áreas onde se aposta mais em soluções alternativas. A justificação pode advir do facto das fibras actuais já darem uma resposta

muito satisfatória, tendo a SPME larga aceitação. Dietz et al. expressaram a opinião de que, apesar de poderem persistir alguns problemas de estabilidade química e mecânica em muitos dos novos adsorventes, parece haver uma gama alargada de soluções para alguns problemas restritos identificados em SPME, tal como a conhecemos hoje (67).

Na Tabela 4.3 apresentam-se aplicações de adsorventes alternativos apenas para a análise de pesticidas em meio aquoso, de um total de referências bibliográficas que supera as 30, incluindo ainda outros analitos (fenóis, VOCs, fármacos) e outras matrizes. O oligómero anfifílico preparado por Basheer et al. permitiu extracções comparáveis ou até melhores que as fibras de PA e PDMS-DVB para a análise de OCPs e triazinas. As triazinas foram determinadas com RSDs e LODs também melhorados (69). Uma conclusão semelhante foi expressa por Dong et al. na análise de OCPs com a fibra PMPVS, relativamente às de PDMS e PA (75). Dong et al. demonstraram ainda que um novo adsorvente de calix[4]areno tem uma capacidade de extracção de OCPs aumentada relativamente à de PDMS, com excepção de alguns DDTs, embora tenha uma espessura de adsorvente inferior (76). Cai et al. enveredaram pela produção de éteres coroa como adsorventes de SPME (70). O éter benzo-15-coroa-5 foi o que mostrou melhores características, no entanto todos eles apresentaram uma extracção de OPPs no "headspace" de uma solução aquosa superior às fibras de PA e PDMS-DVB. Os éteres coroa formam uma estrutura tridimensional porosa com elevada superfície de adsorção (70). Zuin et al. interpretaram, de forma curiosa, o aparecimento de inúmeros compostos nos cromatogramas de uma nova fibra como uma prova da sua capacidade de extrair, para além de OPPs e OCPs, outros analitos possivelmente mais polares e mais voláteis que aqueles pesticidas, e não como um sinal de reduzida selectividade (71). Apesar da necessidade mais premente ser a produção de adsorventes capazes de extraír compostos polares, verifica-se que muitos autores usam compostos apolares como modelos.

Tabela 4.3 – Aplicações de novos adsorventes de SPME na determinação de pesticidas em águas ou amostras aquosas

Ref.	Tipo de adsorvente	Processo	Compostos analisados	Matriz	RSD (%)	LOD (ng L^{-1})
(69)	Oligómeros anfifílicos e hidrofílicos	Sol-gel	OCPs, triazinas (14) e outros	Água	5-11	1-5
(75)	Poli(metilfenilvinilsiloxano) (PMPVS/OH-TSO)	Sol-gel	OCPs (11)	Água	3,9-12	0,9-13
(73)	Poli(dimetilsiloxano) + 3% vinilo	Sol-gel	OPPs (12)	Água	1-27	0,4-20
(71)	Polidimetilsiloxano - álcool polivinílico (PDMS/PVA)	Sol-gel	OCPs e OPPs (5)	Infusão	1,2-12	10-1,5x10^3
(76)	Calix[4]areno (C[4]/OH-TSO)	Sol-gel	OCPs e metabolitos (12)	Extracto	6,8-13	0,16-22
(72)	Éter dibenzo-16-coroa-5/OH-TSO	Sol-gel	OPPs (15)	Extracto	2-15	-
(70)	Éter benzo-15-coroa-5 (B15C6) Éter dibenzo-18-coroa-6 (DB18C6) Éter etoximetilo-18-coroa-6 (PSO18C6)	Sol-gel	OPPs (8)	Água Extracto	1,8-5,3 1,4-11	1,5-81 * 3,2-90 * * ng kg^{-1}

4.2.3 Outras técnicas

Além da SPE, que é a técnica mais usada na análise de pesticidas, e da SPME, que tem conquistado grande reconhecimento e apresenta um enorme potencial de crescimento futuro, outras técnicas têm sido exploradas, ao contrário da LLE que tem vindo a cair em desuso. A técnica de extracção com solvente em suporte de membrana porosa (SLM) tem aplicação na determinação de herbicidas ácidos. Nesta técnica é usada uma membrana de PTFE com um solvente orgânico embebido, a qual é interposta entre a amostra a extrair (dador) e uma solução receptora (aceitador). Alternando apenas o estado de ionização, os analitos são extraídos e cedidos ao aceitador onde aumentam de concentração (4, 5). A técnica de extracção por fluidos supercríticos foi testada para a extracção de amostras aquosas sem grande sucesso. A sua utilidade parece ser como técnica de desorção (eluição) de analitos retidos previamente em suportes de SPE (4). A microextracção em gota (SDME) consiste na extracção de compostos orgânicos por uma gota de solvente suspensa da agulha de uma seringa e imersa na amostra aquosa ou colocada no espaço gasoso (67). Tem como inconvenientes a pouca estabilidade da gota e a fraca reprodutibilidade dos resultados. A microextracção líquida (LPME) usa uma membrana tubular oca impregnada de um solvente extractor, por exemplo o tolueno. A desvantagem da LPME advém do facto da preparação e manuseamento das porções de solvente ser manual, tendo como resultado a baixa precisão verificada (67). A extracção em barras agitadoras adsorventes (SBSE) baseia-se nos mesmos princípios da SPME, com a diferença de que o adsorvente de PDMS está imobilizado numa barra magnética. A SBSE tem a vantagem, em relação à SPME, de possuir maior volume de PDMS, logo pode ser extraída maior quantidade de analito e a sensibilidade obtida é maior (77). Requer, contudo, um passo adicional de manuseamento para desorver os analitos num solvente ou então numa unidade de desorção térmica que, em todo o caso, não constitui um método totalmente automatizado. O tempo para atingir o equilíbrio é muito elevado (67).

4.3 EXTRACÇÃO E CONCENTRAÇÃO DE AMOSTRAS DE SOLO

O desenvolvimento e aplicação de metodologias para a análise de pesticidas em solos, seja o caso de monitorização ou o estudo do comportamento, enfrenta alguns desafios particulares inerentes a estas matrizes: i) os pesticidas podem ocorrer em concentrações extremamente baixas que exigem elevada sensibilidade dos métodos analíticos; ii) impõe-se a determinação de um grande número de pesticidas, desde os muito apolares até outros muito

hidrossolúveis; iii) a matriz é complexa, quer contribuindo com inúmeras substâncias interferentes por vezes em quantidades superiores aos analitos, quer retendo ou protegendo fortemente os pesticidas, tornando a sua análise mais difícil (78).

A evolução das técnicas de preparação de amostras de solo não foi paralela à da instrumentação analítica, que é actualmente muito sofisticada. Só na última década se começou a dedicar maior atenção a esta fase do processo analítico. As exigências recentes de redução do uso de solventes orgânicos tóxicos, típicos dos métodos convencionais, representam uma excelente oportunidade para o aperfeiçoamento dos métodos analíticos tornando-os mais simples e "limpos". A disponibilidade de métodos avançados de extracção, separação e detecção revela-se crucial para interpretar os perigos decorrentes da presença de pesticidas nos solos (79). Andreu e Picó efectuaram uma excelente revisão crítica das estratégias analíticas mais usadas neste âmbito (78). Os autores são da opinião que a fase de extracção é a mais crítica em todo o processo e da qual depende em muito a precisão e exactidão dos resultados. A escolha criteriosa da técnica mais adequada e a sua optimização são aspectos de extrema importância. Nesta secção serão abordadas em detalhe as técnicas analíticas mais relevantes para o presente estudo, em comparação com outras metodologias.

4.3.1 Extracção assistida por ultra-sons

A extracção assistida por ultra-sons enquadra-se entre as técnicas de extracção líquido-sólido (LSE). Nestas, um solvente orgânico apropriado é colocado em contacto com a amostra para que tenha lugar a transferência dos analitos da fase sólida para o solvente, onde os analitos devem ser muito solúveis (6). Para acelerar o processo é usual aplicar algum tipo de agitação ou temperatura, facto este conseguido de forma bastante eficiente através dos ultra-sons. A extracção de solos por ultra-sons (USE) envolve a colocação da amostra juntamente com o solvente extractor num aparelho capaz de provocar o aparecimento de cavitação no líquido. Formam-se microbolhas de gás no solvente que implodem de seguida causando ondas de agitação mecânica muito intensas (80). Simultaneamente, um ligeiro aquecimento que se gera no processo pode favorecer a extracção dos analitos (6).

Uma das principais vantagens da USE reside no facto de não necessitar de aparelhagem sofisticada e dispendiosa, mas apenas um banho de ultra-sons que é um elemento comum num laboratório. È também uma técnica extremamente simples e de fácil execução. A estas vantagens acresce o facto de permitir processar várias amostras de solo simultaneamente,

que se sujeitam, em geral, a três ciclos de extracção por um período de 3 a 15 minutos, resultando numa boa produtividade. Tipicamente, o tempo dedicado ao acerto das condições de funcionamento do método é reduzido (81). Para além do tempo de extracção e do volume de solvente/massa de amostra, um dos parâmetros mais importantes é a escolha do solvente a usar, do qual depende a eficiência e selectividade do método. Esta selecção segue as regras e sofre as contingências dos processos de LSE. No entanto, dada a gama alargada de solventes orgânicos disponíveis e suas misturas, em geral é possível encontrar um solvente adequado, dependente da exigência posta pela mistura de pesticidas a analisar. A USE encerra a vantagem de permitir a análise de pesticidas termolábeis, pelo facto de decorrer à temperatura ambiente ou em condições suaves (78). Actualmente, é uma das técnicas mais usadas, principalmente pelo seu alto rendimento. Em qualquer caso, como a amostra é tratada em circuito aberto tem aplicação preferencial a compostos semivoláteis ou não voláteis. As suas principais desvantagens relacionam-se com o facto de ser um processo não automático, não selectivo e de requerer extracções repetidas. No entanto, o reconhecimento da sua eficiência levou a que fosse preconizado em métodos oficiais, por exemplo, o método EPA 3550C que se destina à análise de compostos semivoláteis e não voláteis em solos e sedimentos.

Da revisão da literatura efectuada, Andreu e Picó concluíram que, apesar de terem surgido técnicas avançadas para a determinação de pesticidas em solos, a realidade das aplicações nesta área é contrária ao estado da arte. Continuam a ser usadas técnicas baseadas nos conceitos convencionais, se bem que sujeitas a aperfeiçoamentos que as tornam bastante reprodutíveis e de alto rendimento (78). Um desses desenvolvimentos foi avançado por Sánchez-Brunete et al. que propõem a utilização de colunas de polipropileno de 20 mL onde uma alíquota da amostra de solo é colocada juntamente com o solvente de extracção e submetida a ultra-sons, em dois ciclos de 15 minutos. Este melhoramento da técnica denominado SAESC (extracção assistida por ultra-sons em colunas) permite a obtenção de um extracto já filtrado através do uso de uma câmara de vácuo convencional (82, 83). Estes autores obtiveram cromatogramas livres de interferências na análise de herbicidas e fungicidas, quer usando detectores ECD e NPD quer MS, em cromatografia gasosa. Por fim, a adequação da extracção por ultra-sons, executada com base no procedimento acima referido, foi posta à prova num método multiresíduo incluindo herbicidas, insecticidas e fungicidas das mais variadas famílias químicas, num total de 50 compostos (84). O desempenho do método de USE-GC-MS foi excelente, quer em termos de sensibilidade (LODs: 0,02-1,6 $\mu g\ kg^{-1}$), precisão (RSDs: 2,4-10,6%) e percentagens de recuperação (87,0-

106,2%) revelando-se, assim, apropriado ao estudo de pesticidas em solos. A extracção com um pequeno volume de acetato de etilo permitiu em todos os trabalhos a análise imediata do extracto sem qualquer procedimento de "clean-up" (82-84).

Pelo contrário, Belmonte Vega et al. efectuaram a extracção de 30 g de solo por USE com uma mistura metanol/água (4:1) obtendo um extracto inapropriado para a análise directa por LC-MS devido a interferências. A solução consistiu em diluir o extracto em água e submeter a um "clean-up" por SPE, obtendo desta forma um extracto mais limpo e limites de detecção melhorados. Este método apresentou LODs entre 0,5-2,5 $\mu g\ kg^{-1}$, precisão entre 5-11% e recuperações entre 70-98%, na análise de 32 pesticidas, sendo posteriormente aplicado na monitorização de solos (85). Tor et al. optimizaram um método de USE para a análise de 12 OCPs obtendo uma excelente precisão (RSD <6%), exactidão (recuperações de 92-103%) e sensibilidade (LODs: 1,6-3,4 $\mu g\ kg^{-1}$), após "clean-up" e análise por GC-ECD (86). Navarro et al. (87) reclamam ter preparado um método de microextracção em ultra-sons e aplicado em estudos de degradação de triazinas em solos; contudo, apesar de apresentar a mesma sensibilidade e precisão dos resultados acima, o volume de solventes usado não é tão reduzido quanto o dos trabalhos de Sánchez-Brunete et al. (82-84). Fenoll et al. usou uma adaptação do trabalho de Navarro et al. para a análise de 25 fungicidas e insecticidas em solos, sendo a análise cromatográfica efectuada por GC-NPD e GC-MS (88). Os parâmetros de validação para GC-NPD e GC-MS foram, respectivamente: precisão – 1,6-4,1% e 2,1-6,3%; LODs ($\mu g\ kg^{-1}$) – 0,1-10,4 e 0,2-15,6; e recuperações – 68,5-112% (GC-NPD), sem recurso a "clean-up".

Quando o critério de selecção da técnica de extracção é a facilidade de implementação, normalmente a escolha recai sobre a USE que, aliás, está também demonstrado ser uma técnica bastante eficiente e precisa (81). Embora tenham surgido algumas dúvidas académicas quanto à exactidão, estas foram posteriormente dissipadas pelos trabalhos publicados mais recentemente (84, 86). Conforme mostra a Tabela 4.2, a USE é também útil, como primeiro passo, quando se pretende analisar pesticidas em solos por SPME (49, 60).

4.3.2 Extracção por fluidos supercríticos

4.3.2.1 Fundamentos e condições de funcionamento

A extracção por fluidos supercríticos (SFE) foi descrita inicialmente por Zosel, em 1978, e baseia-se nas propriedades extractivas daqueles fluidos. A SFE difere radicalmente das

outras técnicas de extracção na medida em que, após a extracção, o elemento extractor vaporiza e abandona os analitos na forma concentrada (79).

O estado de fluido supercrítico corresponde a uma condição da matéria em que esta apresenta características híbridas de líquido e gás ou, por outras palavras, corresponde a um estado de gás denso com poder dissolvente controlável em que as fases líquida e gasosa são indistintas (6, 89). A caracterização de um fluido supercrítico torna-se mais evidente com o apoio de um diagrama de fases como o que se mostra na Figura 4.2. À medida que se caminha sobre a linha de equilíbrio líquido-gás vão sendo necessárias pressões superiores para temperaturas superiores. Neste seguimento, as densidades das fases líquida e gasosa tornam-se progressivamente mais próximas. Chega-se por fim a um ponto, denominado ponto crítico (PC), em que essas densidades se igualam e, por conseguinte, a curva que representa a coexistência das fases líquida e gasosa é interrompida abruptamente (89). A partir desse ponto, caracterizado por uma temperatura crítica (T_c) e uma pressão crítica (P_c), passa a existir apenas uma única fase com propriedades de fluido supercrítico (89, 90). Na prática, um fluido supercrítico é obtido comprimindo um gás a uma pressão superior à P_c, mantendo a temperatura acima da T_c. As propriedades físicas e termodinâmicas peculiares dos fluidos supercríticos suscitaram enorme curiosidade e levaram à criação de diversas aplicações industriais e analíticas (91). Mencionam-se abaixo algumas dessas propriedades e as consequências práticas a elas associadas (4, 89):

1) Compressibilidade – densidade e poder dissolvente variáveis
2) Baixa viscosidade – boas características dinâmicas
3) Baixíssima tensão superficial – boa capacidade de penetração
4) Alta difusividade – favorece a transferência de massa

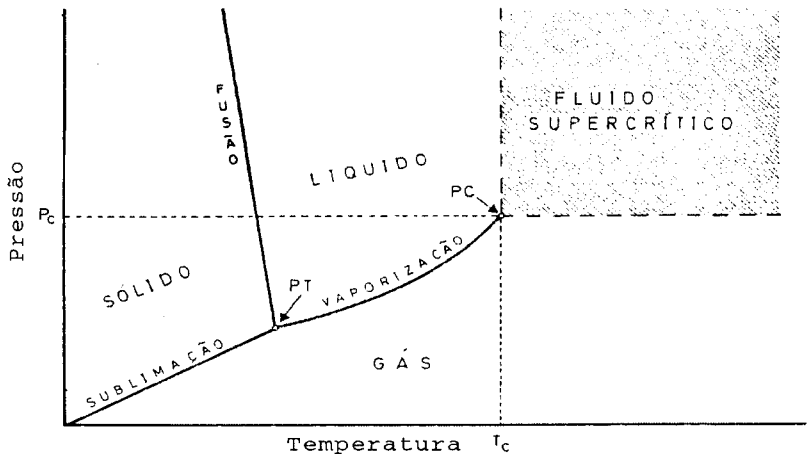


Figura 4.2 – Diagrama de fases evidenciando as condições de fluido supercrítico

Em resumo, poder-se-á dizer que um fluido supercrítico apresenta certas propriedades semelhantes aos líquidos – densidade e poder solubilizante – e outras similares aos gases – baixa viscosidade e alta difusividade, que os tornam bastante interessantes como solventes extractores de matrizes sólidas (89). Uma vez que a variação da pressão e temperatura a que o fluido se encontra altera grandemente as suas propriedades, este facto é aproveitado para ajustar a capacidade de extracção de compostos orgânicos, permitindo assim explorar a máxima eficiência, selectividade e rapidez do processo (4).

Aquando da sua descoberta, a SFE foi recebida com grande entusiasmo uma vez que, a par das suas potencialidades como técnica de extracção apresentava também qualidades que permitiriam contribuir para o avanço das técnicas preparativas modernas, por exemplo: uso de menores volumes de solventes, com menores custos, em menos tempo e com redução de riscos (89). Os elementos principais de um sistema de SFE são: uma bomba de alta pressão, uma câmara de extracção aquecida e um restritor de descompressão (92). Diversas substâncias com pesos moleculares e polaridades diversas podem ser transformadas em fluidos supercríticos, por ex.: CO_2, NH_3, N_2O, SF_6, "fréons", H_2O, etc. No entanto, sem dúvida que o CO_2 é aquele que apresenta as características mais favoráveis e que, de resto, tem dominado (90%) as aplicações dirigidas à extracção de compostos orgânicos de matrizes sólidas (4, 92). O CO_2 detém diversas propriedades que fazem dele um fluido supercrítico de eleição, como sejam: P_c (72,8 atm) e T_c (31,1 °C) moderadas e facilmente atingíveis, ideais para a extracção de compostos termolábeis; gama de utilização alargada; toxicidade nula para o Homem e não agressivo para o meio ambiente; não inflamável; gás à pressão normal, que permite a sua descompressão directamente para a atmosfera; gás inerte e de baixo custo (4, 6, 89, 92, 93). No entanto, a maior deficiência do CO_2 supercrítico é a sua reduzida polaridade, equivalente ao pentano (4) ou hexano (93), o que constitui uma limitação importante na extracção de compostos orgânicos polares, como são alguns pesticidas (81, 90, 92). Os "fréons" beneficiam de um maior momento dipolar nas suas moléculas e rivalizam com o CO_2 em demais propriedades vantajosas. No entanto, são penalizados por contribuírem para a destruição da camada do ozono, facto que inviabiliza o seu uso em técnicas alternativas não agressivas para o ambiente (89). O N_2O permitiria ultrapassar a referida limitação do CO_2 contudo, padece do facto de ser um oxidante a altas temperaturas pelo que, o seu uso em matrizes orgânicas envolve riscos acrescidos (4, 92). A água supercrítica exige condições de ponto crítico muito elevadas e, além disso, é um fluido corrosivo (4, 93). Para obviar a referida dificuldade associada à extracção com CO_2 supercrítico, a melhor solução parece ser a adição de uma pequena percentagem de solvente

orgânico que vai funcionar como modificador das suas propriedades (4, 89, 92-94). Entre esses modificadores, dos quais o metanol é provavelmente o mais usado, encontram-se o(a): acetonitrilo, acetona, acetato de etilo, diclorometano, tolueno, *n*-isopropanol, *n*-propilamina, ácido fórmico, etc. (89, 92, 94).

A obtenção da máxima eficiência da SFE depende de um conhecimento profundo das propriedades dos analitos e das interacções que se estabelecem entre eles e a matriz (efeito de matriz). Especialmente este último é ainda insuficiente nos dias de hoje e está a limitar a aplicação mais ampla da SFE em rotina (82). É essencial um controlo adequado das condições que influenciam a eficiência da técnica para a obtenção de resultados que possam rivalizar com os de outras técnicas. Ainda assim, aquilo que constitui um grau acrescido de liberdade na adequação do método extractivo poderá também significar um trabalho adicional em termos de optimização (81, 95).

A extracção por fluidos supercríticos decorre em quatro etapas principais: i) desorção dos analitos da matriz, ii) solubilização no fluido supercrítico, iii) arrastamento dos analitos para fora da câmara de extracção e iv) recolha do extracto (92). Todas estas etapas devem ser cuidadosamente optimizadas, apesar de a primeira ser, normalmente, a limitante do processo de extracção. Os factores individuais que influenciam o processo de SFE são referidos na Tabela 4.4 (89). As condições experimentais que condicionam as propriedades do fluido supercrítico podem ser ajustadas de forma a obter a máxima eficiência e/ou selectividade da extracção. Os objectivos a prosseguir nesta optimização devem ser uma extracção rápida e quantitativa dos analitos. A densidade e a polaridade do fluido são dois aspectos determinantes para a eficiência de extracção. Enquanto que a primeira é essencialmente regulada pela variação da temperatura e da pressão, a segunda é controlada pelo tipo de fluido ou pela adição de um modificador (89).

Tabela 4.4 – Variáveis que influenciam um sistema de extracção por fluidos supercríticos

Características do fluido	Características do soluto	Características da matriz
- Natureza do fluido	- Propriedades do analito	- Quantidade de amostra
- Pressão	(volatilidade, polaridade,	- Tamanho das partículas
- Temperatura	peso molecular)	- Natureza da matriz
- Natureza do modificador	- Concentração	- Constituição da amostra
- Concentração do modificador		- Grau de retenção do analito
- Volume de fluido		
- Tempo de extracção		
- Fluxo do fluido extractor		
- Dimensões da câmara		

Um aumento de **pressão** gera um aumento da densidade do fluido supercrítico, especialmente em torno do ponto crítico, logo, um aumento do seu poder dissolvente (4, 90, 95, 96). Já o efeito da **temperatura** é complexo e pode aumentar a solubilidade do analito, diminuí-la ou não afectá-la. Se é verdade que uma temperatura superior incrementa a pressão de vapor do soluto e a sua solubilidade, por outro lado, também diminui a densidade do fluido supercrítico (4, 96). O efeito final vai depender daquela que for a acção predominante. Alguns autores verificaram que uma temperatura elevada (200 °C) pode ser uma alternativa ao uso de modificadores, com a limitação imposta pelos aparelhos usados e pelos compostos termolábeis (4, 92). O fornecimento da energia necessária para quebrar as ligações dos analitos à matriz é uma explicação possível para este ganho de eficiência (95, 97)

O aumento da polaridade do fluido supercrítico, por forma a torná-lo mais apto a solubilizar o analito e a desfazer as suas ligações com a matriz, pode ser conseguido escolhendo **fluidos** com momentos dipolares permanentes, como o NO_2, ou então adicionando um modificador. O mecanismo de acção depende do **modificador** em causa, no entanto, este pode actuar a dois níveis: por alteração da capacidade dissolvente do fluido supercrítico de forma a proporcionar uma partição mais favorável dos analitos - através da formação de agregados modificador-soluto (90); ou actuando sobre a matriz, ora por competição com os analitos que se pretendem extrair, ora provocando a expansão da matriz da amostra com a consequente exposição dos analitos alojados em cavidades internas anteriormente inacessíveis (92). A adição de um modificador aumenta a densidade do fluido supercrítico no entanto, para pressões elevadas a interacção química deste com o analito (ex.: por forças de van der Waals ou pontes de hidrogénio) exerce um papel mais importante (89). A acção do modificador é, por si, um fenómeno químico, uma vez que a solubilidade verificada dos analitos no fluido excede a prevista com base na densidade bruta. Conforme explica Bunker, é necessário considerar os efeitos de densidade local superior à bruta (90).

O modificador pode ser adicionado à amostra de diferentes formas: directamente na câmara, pré-misturado no reservatório de gás supercrítico ou através de uma bomba auxiliar (4, 81, 96). A adição de modificadores é uma estratégia usada de forma recorrente para melhorar as recuperações dos compostos mais refractários ao CO_2 supercrítico (81, 92). A sua selecção relaciona-se com a natureza dos analitos a extrair. A adição de um modificador inadequado (ou numa concentração inadequada) pode inclusivamente fazer baixar a eficiência de extracção (96, 98). Apesar da proporção de modificador raramente ultrapassar os 20%, é de esperar uma certa perda de selectividade, a qual se traduz na obtenção de extractos com maior quantidade de matérias polares provenientes da matriz da amostra (95).

Alguns autores sugerem a derivatização na câmara de extracção ou a adição de um reagente capaz de formar um par iónico com o analito para melhorar a extracção (92). Na optimização de um processo de SFE é ainda possível explorar as vantagens da realização de uma prévia **extracção estática** seguida da **extracção dinâmica** (4).

O sucesso da implementação de um método de SFE exige que se tenha sempre em mente a maior dificuldade na extracção de amostras reais, uma vez que os analitos terão tido a oportunidade de estabelecer fortes ligações com a matriz durante um período longo de contacto em condições ambientais (4, 89-96). Nestes casos, as recuperações obtidas poderão ser inferiores às determinadas em amostras fortificadas, exigindo por isso condições mais drásticas de extracção (94).

Enquanto que até aqui se discutiram as variáveis relativas ao processo de extracção, o sistema de **recolha do extracto** é igualmente importante para garantir uma recuperação quantitativa (96). Poderá seleccionar-se uma recolha por descompressão do fluido supercrítico num solvente, recolha em adsorvente sólido (sílica, Tenax, Forisil, C_{18}) ou recolha criogénica em material inerte (4, 89, 93, 94). Embora a eficiência destes métodos seja relativa, o primeiro permite a utilização de modificadores sem qualquer risco de perda dos analitos, a qual se verifica por eluição aquando do uso de adsorventes (92, 99). Alguma atenção deverá ser dedicada ao tipo de solvente para recolha, ao seu volume ou ao tipo de adsorvente, sem esquecer a temperatura a aplicar no restritor para evitar o bloqueio (92).

O processo de SFE é, em geral, caracterizado por uma extracção inicial rápida de grande parte do analito, seguida de uma libertação mais lenta até se atingir uma recuperação quantitativa. A razão deste perfil de extracção pode residir na existência de analitos ligados aos locais activos da matriz por forças mais ou menos fortes, ou ainda, pela localização dos analitos na matriz em locais de maior ou menor acessibilidade ao fluido extractor (89, 97). O **tempo extracção** será determinante para o rendimento do processo se a remoção do analito for controlada pela sua cinética de desorção a partir da matriz. Nestes casos, que são os mais usuais na extracção de pesticidas de matrizes ambientais, o rendimento depende sobretudo do tempo de extracção e pouco do fluxo de fluido (4, 92, 97). Enquanto que nos primeiros trabalhos se efectuava a optimização das condições de SFE com materiais adsorventes, ex.: Celite (81, 100), depois passou a usar-se matrizes reais fortificadas (94, 99). Actualmente considera-se que, apesar deste método ser útil como ponto de partida, as condições finais devem testadas e ajustadas com matrizes reais contaminadas, ou envelhecidas, e de preferência com MRCs (6, 79). A revisão de Motohashi et al. é uma óptima referência para os estudos recentes que abordam os factores que influenciam a eficiência da SFE (93).

4.3.2.2 Aplicações de SFE na análise de pesticidas

A SFE foi testada para a extracção das famílias mais importantes de pesticidas: OCPs, OPPs, triazinas, fenilureias, carbamatos e organoestanhados, em diversas matrizes sólidas: solos, sedimentos, plantas e alimentos, com resultados aparentemente promissores em muitas situações (92). No entanto, os trabalhos relativos à análise de pesticidas em solos são, estranhamente, em número reduzido. A revisão produzida por Camel a este respeito continua a ser uma das mais extensas (92). Aí se refere grande parte dos trabalhos publicados no início da década de 90, fase em que a SFE registou grande desenvolvimento. A revisão de Motohashi et al. inclui 9 referências sobre solos, para além de outro tipo de matrizes (93). Nos últimos anos tem-se verificado um certo desencanto com esta técnica e a procura de novas alternativas (81). No artigo de Dean e Xiong apenas são referidos 4 trabalhos e alguns deles já tinham sido revistos por Camel (81). Numa revisão posterior de Andreu e Picó apenas dois trabalhos são citados relativamente à análise de pesticidas em solos por SFE (78), facto que está em concordância com a secção dedicada a esta área na revisão de Hauthal (91). Não obstante a menor actividade actual nesta área, alguns estudos anteriores demonstraram que é possível obter recuperações com SFE equivalentes ou até superiores às das técnicas líquido-sólido convencionais, sugerindo a SFE como uma alternativa válida (4). Dean e Xiong concluíram que, diversas técnicas, incluindo SFE, são capazes de efectuar extracções quantitativas de poluentes ambientais, não permitindo o erro experimental identificar grandes diferenças entre elas (81). Kreuzig et al. referem os trabalhos de Snyder et al. nos quais os autores compararam SFE e USE para a análise de OPPs e OCPs obtendo sempre elevada exactidão e repetibilidade nos resultados de SFE (99).

As aplicações dedicadas à análise de OCPs usam CO_2 puro como fluido supercrítico ou então modificado com um solvente apolar (ex.: tolueno), a uma pressão de 150-250 bar e a uma temperatura entre 50 e 70 °C (92). Já para a extracção de OPPs e triazinas revelou-se necessária a adição de metanol como modificador numa proporção de 2-10%, devido à maior polaridade dos analitos. Em geral, quando se usa um modificador as temperaturas requeridas são mais baixas (40-80 °C) do que usando apenas CO_2 (200 °C). As pressões exigidas oscilam entre 100-400 bar. Para a extracção de resíduos de triazinas fortemente ligados à matriz é aconselhado o uso de condições mais drásticas (350 bar, 125 °C e 30% de metanol) (92). A análise de fenilureias nas mesmas condições revelou-se difícil, possivelmente devido a uma insuficiente solubilidade no fluido supercrítico e uma forte ligação à matriz real (92).

A análise de pesticidas ionizáveis, por exemplo os ácidos clorofenoxiacéticos, pode ser

conseguida por SFE seguindo três estratégias distintas: adição de um modificador, derivatização "in situ" (na câmara) ou adição de um reagente formador de par iónico. Em qualquer destas estratégias, para além da interacção directa com o analito não será de desprezar a competição pelos mesmos locais activos da matriz (92). Os objectivos passam por melhorar a solubilidade dos analitos no CO_2 supercrítico e ao mesmo tempo vencer as fortes ligações que os compostos iónicos mantêm com o solo (92). O 2,4-D tem sido alvo da maior parte das aplicações dado ser um dos herbicidas mais usados da sua classe. Diversas experiências foram efectuadas para melhorar a extracção do 2,4-D: derivatização por sililação, metilesterificação, par iónico e substituição iónica pela adição de tampões (fosfatos), ácidos (HCl) ou sais ($CaCl_2$) (92).

Steinheimer et al., citados por Camel, observaram uma correlação negativa entre o conteúdo do solo em matéria orgânica e as recuperações de triazinas, efeito este mais pronunciado quanto maior for a sua polaridade, por exemplo o caso dos metabolitos (92). A humidade residual do solo pode também dificultar a extracção ao solubilizar parte dos analitos mais hidrofílicos (ex.: molinato), impedindo também o acesso do CO_2 supercrítico a todos os poros do solo, além de outras dificuldades operacionais (92, 93). È aconselhado secar as amostras ou adicionar um material higroscópico (93).

A revisão de Motohashi et al. abrange os trabalhos subsequentes aos revistos por Camel e até Julho de 1999 (93). É de assinalar uma evolução no tipo de pesticidas pesquisados abrangendo substâncias mais recentes, em que se incluem alguns carbamatos, morfolinas, piretróides, triazinas e metabolitos, sulfonilureias e diversos herbicidas ácidos. Nos trabalhos discutidos, as recuperações foram superiores a 90%, com a excepção das sulfonilureias, de alguns herbicidas ácidos e dos metabolitos da cianazina. Dada a maior polaridade de algumas destas substâncias, a água subcrítica demonstrou boa aplicabilidade para efectuar a sua extracção. Sempre que houve necessidade de adicionar um modificador, o metanol foi o preferido contudo, também foram propostas misturas binárias e ternárias de solventes bem como um solvente menos usual, o dimetilsulfóxido (93). As temperaturas empregadas foram em geral baixas (40-70 °C), o que é perceptível uma vez que alguns destes pesticidas poderão evidenciar alguma instabilidade térmica. Em 70% dos casos, o sistema de recolha usado consistiu em materiais adsorventes ou inertes de vários tipos, quer essa escolha tenha sido ditada por contingências dos aparelhos utilizados ou pelo seu melhor desempenho relativamente aos solventes (93). O tempo de extracção nunca excedeu os 40 minutos, incluindo já os passos de extracção estática e dinâmica, o que permite antever uma boa rentabilidade dos métodos analíticos (93). Uma grande parte dos estudos revistos por

Motohashi et al. foi desenvolvida sobre solos fortificados que, embora não simulem exactamente as amostras reais, constitui um processo mais adaptável.

Koinecke et al. optimizaram um método de SFE para a determinação dos pesticidas: fenpropimorfe, pirimicarbe, paratião-etilo, trialato e fenvalerato (94). As condições óptimas determinadas foram: extracção com CO_2 + 5% de metanol à pressão de 38 MPa e a 60 °C, fazendo uma primeira extracção estática de 12 minutos, seguida de uma extracção dinâmica durante 30 minutos, e novo ciclo mais curto. As recuperações obtidas nestas condições foram de 93-104%. Os mesmos autores compararam, mais tarde, a extracção de pesticidas em solos após 3 e 31 dias da sua aplicação usando para tal SFE, Soxhlet e agitação mecânica (99). Não foram detectadas diferenças significativas nas recuperações de SFE relativamente ao Soxhlet e agitação mecânica, mesmo após um mês de envelhecimento em condições ambientais. Ainda assim, não se demonstrou que a SFE consiga extrair do solo a parte do analito não extraível por outras técnicas, como tinha sido adiantado (99). Uma das vantagens mais salientada da SFE foi a não necessidade de "clean-up" para a análise por GC-ECD e GC-NPD (94, 99). Koinecke et al. realçaram que a reduzida quantidade de amostra passível de ser extraída nos aparelhos de SFE disponíveis foi uma das principais limitações para a obtenção de LODs mais baixos (94). Kreuzig et al. ultrapassaram esta dificuldade juntando 4 extractos para baixar os LODs na análise de morfolinas, OPPs e um carbamato, facto facilitado pela selectividade que a técnica aporta (99).

Sun e Lee desenvolveram um método de SFE para a análise de 4 carbamatos em solos: propoxur, profame, metiocarbe e clorprofame, usando para tal uma estratégia de optimização baseada num desenho experimental (101). O tratamento estatístico indicou que as variáveis com um impacto mais significativo no desempenho do método foram, por esta ordem: composição do fluido supercrítico, temperatura e pressão. À luz desta evidência foram adoptadas as seguintes condições óptimas: CO_2 + 10% de metanol, 300 kg cm^{-2} e 60 °C durante 30 minutos. Os autores compararam este método com um outro baseado na extracção assistida por microondas (MAE) tendo concluído que, à excepção do clorprofame, a MAE origina extracções ligeiramente mais eficientes. O envelhecimento dos resíduos de pesticidas no solo durante 60 dias fez baixar as recuperações em ambos os métodos, que passou de 95 para 87% em MAE e de 86 para 65% em SFE (101).

Rissato et al. efectuaram a optimização completa de um método multiresíduo com base em SFE seguido de GC-ECD para a determinação simultânea de pesticidas organoclorados, organofosforados, organonitrogenados e piretróides (total de 32 pesticidas) testando uma variável de cada vez (102). As condições óptimas encontradas foram: extracção com CO_2 +

10% de metanol, a 400 bar e 60 °C durante 20 minutos. Nestas condições, os LODs obtidos foram inferiores a 7 $\mu g\ kg^{-1}$, as recuperações de 88-96% e uma precisão entre 3,9-6,1%. Os autores compararam as recuperações obtidas em solos sujeitos a um envelhecimento de 40 dias usando o método de SFE desenvolvido, face a um método convencional baseado na agitação da amostra com solvente (102). Enquanto que o método convencional registou uma redução nas recuperações em solos envelhecidos, o mesmo efeito não foi se verificou com SFE. Este aspecto foi depois reforçado aquando da análise de solos contaminados, tendo-se verificado que a SFE originou valores de concentração mais elevados de alguns pesticidas possibilitando igualmente a detecção de outros não detectáveis pelo método convencional.

A aplicação da SFE à extracção de amostras de água é possível, embora nem sempre muito prática (92). Para tal é necessário dispor de uma célula modificada (103) ou efectuar uma extracção prévia por SPE seguida de SFE (92). A SFE foi adoptada em métodos oficiais da EPA para a análise de hidrocarbonetos totais do petróleo (EPA 3560), PAHs (EPA 3561) e, PCBs e pesticidas organoclorados (EPA 3562) (4, 95, 104).

Apesar das enormes vantagens que são reconhecidas à SFE, a sua aplicação mais generalizada parece ser condicionada por um conjunto de factores que inclui: custo elevado dos equipamentos, necessidade de uma optimização apurada e a dificuldade em extrair compostos polares, aumentada na análise de amostras reais (92).

4.3.3 Outras técnicas instrumentais

As técnicas instrumentais para a extracção de solos tiveram a sua emergência na década de 90. Com elas pretendeu-se reduzir o tempo de extracção, o uso de solventes e aumentar a automatização. Apesar das técnicas convencionais apresentarem grandes inconvenientes nestes aspectos, dada a sua elevada eficiência, são usadas como técnicas de referência pelas entidades reguladoras e na avaliação das técnicas alternativas (104). Camel efectuou uma avaliação crítica dos benefícios e deficiências destas novas técnicas: SFE, MAE e extracção por fluido pressurizado (PFE) (95).

A extracção por microondas, testada inicialmente em 1986, utiliza a energia contida nas microondas (2450 MHz) como fonte de calor fornecido ao sistema solvente/amostra, de modo a facilitar a transferência dos analitos para o solvente extractor (95). O aquecimento rápido gerado no seio deste sistema deve-se aos fenómenos de rotação de dipolos e condutância iónica que têm lugar na presença de um campo eléctrico (95, 104).

Normalmente, seleccionam-se solventes que absorvam radiação para obter uma extracção rápida contudo, para compostos termolábeis, poderá pretender-se a produção de calor apenas na matriz mantendo o solvente frio (105). Uma mistura de solventes usual é hexano-acetona, (1:1). Contrariamente à SFE, as extracções por MAE são menos dependentes da matriz da amostra mas a selectividade também é menor. Apesar de exigir um maior manuseamento do que as outras técnicas, é possível efectuar até 14 extracções simultâneas, o que não acontece nas restantes (81, 95). Lopez-Avila reuniu uma colecção deveras extensa de aplicações da MAE na análise dos micropoluentes ambientais mais importantes (104). Camel coligiu um número apreciável de aplicações dirigidas à análise de diversos poluentes, incluindo pesticidas: OCPs, OPPs, triazinas, sulfonilureias e imidazolinonas (105). Dean e Xiong dão igualmente nota de várias aplicações da MAE na análise de pesticidas em matrizes ambientais (81). São também exemplo disso os trabalhos de Sun e Lee (101), Papadakis e Papadopoulou-Mourkidou (106), Patsias et al. (107) e Vryzas e Papadopoulou-Mourkidou (108). A MAE tem vindo a acolher uma vasta preferência nos últimos anos (78).

A PFE (também conhecida como ASE, PLE ou ESE) é a técnica mais recente, tendo surgido em 1995 na tentativa de minorar as dificuldades sentidas na aplicação da SFE, mas mantendo as suas vantagens. Esta técnica explora a maior capacidade de extracção obtida com solventes comuns a temperaturas elevadas (100-200 °C). A extracção tem lugar a uma temperatura superior ao ponto de ebulição do solvente, o qual é mantido no estado líquido à custa de uma pressão bastante elevada (78, 81, 95). Na realidade, o solvente é mantido num estado subcrítico. As capacidades extractivas melhoradas derivam, em conjunto, do maior poder dissolvente e de remoção do analito da matriz do solvente a uma pressão e temperatura elevadas (95). Após um período inicial de extracção estática, o solvente é lixiviado e recolhido. Nesta técnica, o efeito de matriz é menos notado mas pode perder-se alguma selectividade. Apesar das grandes potencialidades e elevado nível de automatização da PFE, as aplicações publicadas são em pequeno número, em resultado da sua introdução recente. Dean e Xiong dão conta de algumas aplicações (81). Outras aplicações encontradas na literatura incluem: a análise de herbicidas relatada por David et al. (109) e a análise de POPs descrita por Hubert et al. (110).

Camel comparou o desempenho da SFE, MAE e PFE relativamente à: eficiência de extracção e efeitos de matriz, selectividade, grau de automatização, simplicidade de operação e tempo necessário (95), no seguimento de outros trabalhos que igualmente abordavam as vantagens e limitações daquelas técnicas (81, 105). Mediante uma optimização adequada, tendo em conta os analitos e as matrizes em análise, em geral, as três técnicas instrumentais

apresentam eficiências comparáveis e parecidas com as das técnicas convencionais (81, 95). Uma hora é um tempo suficiente para o processamento de uma amostra, qualquer que seja a técnica usada (95). Note-se, no entanto, que o esforço e tempo de optimização é menor em PFE e MAE face à SFE, mas os dois primeiros requerem frequentemente um "clean-up" do extracto, enquanto a SFE o dispensa (81, 104). Andreu e Picó abordaram diversas outras vantagens e desvantagens operacionais das técnicas recentes face às clássicas (78).

A extracção com água subcrítica foi testada com sucesso para extrair herbicidas ácidos e triazinas mas não é compatível com compostos muito hidrofóbicos, termolábeis e hidrolisáveis (78). Conforme se referiu na Tabela 4.2, a SPME tem sido usada na análise de pesticidas em solos mas a sua função deve ser encarada mais como um passo de "clean-up" ou de concentração adicional, após uma extracção com solvente (36, 49, 61). Andreu e Picó acrescentam as técnicas de LPME e MSPD (dispersão da matriz em adsorvente de fase sólida) como viáveis para a análise de solos mas não suficientemente demonstradas (78).

4.4 SEPARAÇÃO E DETECÇÃO DOS PESTICIDAS

Em estudos ambientais, frequentemente é exigida a análise de pesticidas em matrizes complexas a níveis de concentração extremamente baixos, o que obriga a uma preparação prévia da amostra (tal como se tratou nas secções anteriores) seguida da separação, detecção, quantificação e confirmação dos analitos (4). A determinação de compostos orgânicos é, geralmente, efectuada por cromatografia gasosa ou cromatografia líquida, dependendo da polaridade dos analitos, volatilidade e risco de decomposição a temperaturas elevadas. Os compostos orgânicos voláteis ou semivoláteis podem ser analisados por GC. Por seu lado, os compostos polares ou não polares termossensíveis podem ser analisados por LC, sem necessidade de derivatização. Em princípio todos os compostos são susceptíveis de serem analisados por LC, apesar de nem todos serem directa e facilmente detectados pelos actuais detectores (4). Como regra geral, todos os compostos que possam ser analisados por GC, devem sê-lo dessa forma, devido ao elevado poder de resolução da técnica e selectividade dos detectores disponíveis, situação bem patente no artigo de revisão de Geerdink et al. (111). A electroforese capilar (CE) é uma técnica emergente e contém potencial para ser usada em complementaridade à GC e LC. A sua principal vantagem assenta na possibilidade de serem usados diferentes mecanismos de separação para compostos iónicos, ionizáveis e neutros, oferecendo separações rápidas e altamente eficientes (112).

Picó et al. abordaram, numa perspectiva comparativa, as vantagens e desvantagens

associadas ao uso das três técnicas na análise de pesticidas (112). Enquanto que muitos pesticidas são susceptíveis de serem analisados por GC, particularmente os mais recentes requerem a utilização de LC, o mesmo acontecendo à maior parte dos produtos de degradação (111). Assim, se alguns pesticidas apresentam um requisito absoluto quanto à técnica cromatográfica, a generalidade pode ser analisada por ambas, sujeitos, ou não, a um passo de derivatização. As indicações enunciados acima e a experiência pessoal são determinantes nesta escolha (4).

A preparação prévia a efectuar nas amostras depende em grande parte da técnica cromatográfica escolhida. Tem sido dada grande preferência à SPE em associação a LC e GC na análise de amostras aquosas. Já a SPME encontra maior aplicabilidade em conexão com GC, sendo a associação a LC mais difícil. Qualquer das técnicas de preparação de amostras sólidas discutidas anteriormente se adequa quer a GC quer a LC.

A cromatografia gasosa foi uma das primeiras técnicas de separação a ser desenvolvida e desde sempre tem gozado de imensa popularidade. Para tal concorre a combinação favorável de uma elevada selectividade e resolução, boa precisão e exactidão, alta sensibilidade e uma gama de trabalho alargada (4, 113). A cromatografia gasosa é uma ferramenta imprescindível na análise de contaminantes ambientais e tem sido aplicada a uma vasta gama de compostos orgânicos que inclui, além dos pesticidas: VOCs, PAHs, PCBs, PCDD/Fs, éteres difenílicos polibromados (PBDEs), etc. As matrizes analisadas abrangem as águas, solos, sedimentos, vegetais, alimentos, entre outros (113). Um resultado da grande aceitação de que a GC beneficia é a sua indicação em inúmeros métodos oficiais. Veja-se, igualmente, o número de aplicações em que a GC é indicada na análise de solos, comparativamente à LC, na revisão que Andreu e Picó efectuaram sobre o assunto (78). A GC é considerada a técnica de escolha na análise dos pesticidas de primeira geração (OCPs e OPPs), uma vez que eles evidenciam elevada apolaridade, uma volatilidade suficiente a temperaturas altas e estabilidade térmica nessas condições. Simultaneamente, reúnem nas suas moléculas heteroátomos que os tornam aptos à detecção por captura electrónica e detecção de azoto e fósforo. Na categoria dos pesticidas compatíveis com GC incluem-se, ainda, as triazinas, as cloroacetanilidas, as acilalaninas, as dinitroanilinas e os piretróides, entre outros. Excluem-se, no entanto, os herbicidas ácidos, outros herbicidas polares como o glifosato, paraquato e diquato, algumas fenilureias e sulfonilureias, a maior parte dos carbamatos e os benzimidazóis que, no conjunto, se estima representarem cerca de 15-20% de todos os pesticidas e produtos de degradação a analisar (4, 111).

As colunas cromatográficas capilares mais utilizadas são as DB-1, DB-5 e DB-1701

(J&W Scientific, Folsom, USA) ou equivalentes. As colunas DB-5 e equivalentes são, porventura, as mais usadas, uma vez que a fase estacionária apresenta alguma polaridade que as torna ideais para a análise de pesticidas numa gama alargada de polaridades. A coluna DB-1701 tem sido usada como coluna de confirmação, quando a utilização de MS não é possível (4). Entre os detectores selectivos usados em GC, o detector de captura electrónica (ECD) tem-se destacado uma vez que permite a análise de compostos organohalogenados, particularmente os organoclorados, com excelente selectividade e sensibilidade (113). Por seu lado, o detector de azoto e fósforo, no formato de NPD ou TSD, cobre as necessidades de detecção dos grupos de pesticidas contendo átomos de N (ex.: triazinas) e P (ex.: OPPs), igualmente com alta sensibilidade e selectividade (4, 111). O detector fotométrico em chama (FPD) é selectivo para o P e o S mas é menos usado na análise de pesticidas. Recentemente, foi demonstrada a óptima selectividade do detector de emissão atómica (AED) que permite registar individualmente as bandas de emissão de vários elementos (C, H, S, P, F, Cl, Br, O, N, Sn) presentes nas moléculas de pesticidas, mas a sua sensibilidade é, para alguns deles, inferior à dos outros detectores (4, 113). Os detectores selectivos apresentam excelentes qualidades de detecção e têm sido um recurso imprescindível em GC, mas essa selectividade condiciona o seu uso em métodos multiresíduo (4, 111). O espectrómetro de massa acoplado à cromatografia gasosa (GC-MS) apresenta-se como um sistema capaz de efectuar a identificação, quantificação e confirmação inequívoca dos pesticidas numa única análise, funcionando simultaneamente como um detector universal e selectivo.

Uma das tendências mais notada na actualidade é a necessidade de analisar compostos bastante polares ou mesmo iónicos, na sua maioria constituindo os pesticidas recentes, mais biodegradáveis, e também os produtos de degradação (4, 111). Aqui, a LC comporta-se como uma técnica complementar à GC uma vez que permite a análise de pesticidas termolábeis, não voláteis e bastante polares, fazendo a sua separação e detecção à temperatura ambiente. A SPE "on-line" com LC é particularmente apropriada para a análise de multiresíduos de pesticidas (4, 111).

A LC tem sido preferida na análise de carbamatos, triazinas, fenilureias, fenoxiácidos, bipiridilos e glifosato (4). Mais de 80% das publicações encontradas na literatura referem a utilização de colunas de fase reversa (RP), principalmente a C_{18} (4). Os detectores mais usados em LC são: detector de ultravioleta-visível (UV-Vis) de comprimento de onda fixo ou de varrimento (detector de fotodíodos - DAD), detector de fluorescência, detector electroquímico e detector de massa (4). O primeiro e o último aliam à boa sensibilidade (embora inferior à dos restantes) a abundância de informação qualitativa. No entanto, por

vezes a selectividade do detector UV (DAD) é insuficiente na análise de amostras complexas e obriga a tratamentos de limpeza dos extractos. Quando usada na análise de pesticidas, a detecção por fluorescência é feita após derivatização. É isso que acontece no caso dos N-metilcarbamatos e do glifosato (4). Actualmente, tem-se verificado um enorme crescimento da utilização do detector de massa em cromatografia líquida (LC-MS), para o qual terá contribuído a facilidade de uso que caracteriza os actuais equipamentos e a incorporação de interfaces de ionização à pressão atmosférica (API), quer ionização química (APCI) quer "electrospray" (ESI) (111).

A electroforese capilar baseia-se num processo de separação que depende da razão carga/massa das moléculas, distinto portanto da LC e da GC (112). A sua aplicabilidade na análise de pesticidas em amostras reais ainda não está suficientemente demonstrada. Os trabalhos publicados incidem sobretudo na demonstração da sua excelente capacidade de separação (112). Uma das maiores limitações relaciona-se com a baixa sensibilidade obtida, que deriva da injecção de volumes diminutos de amostra e do uso de detectores UV-Vis (112, 114). A introdução da detecção de massa (CE-MS) abriu novas perspectivas para a utilização da técnica. Apesar de tudo, a CE já foi testada na análise de pesticidas em águas, por ex.: OPPs, bipiridilos, fenilureias, sulfonilureias e triazinas, mas exige uma pré-concentração por SPE seguida de uma técnica de introdução da amostra com efeito de concentração ("stacking") (4, 112, 114, 115). Serão de esperar evoluções importantes nesta técnica uma vez que o seu uso em análise ambiental é bastante recente.

Em análise ambiental é obrigatória a confirmação de todos e de cada um dos compostos provisoriamente identificados, com o objectivo de minimizar os resultados falsamente positivos. Um das estratégias possíveis é o recurso a uma segunda análise num sistema com características diferentes (coluna e/ou detector). No entanto esta solução não é completamente fiável. A espectrometria de massa é a técnica mais apropriada, uma vez que permite efectuar a confirmação inequívoca dos analitos (116). Actualmente, a GC-MS é usada não só como técnica confirmatória mas logo como técnica de primeira linha na identificação e quantificação. A técnica de GC-MS em modo de impacto electrónico (EI) com uma energia de 70 eV é a mais utilizada para a confirmação de pesticidas, usualmente com o auxílio de bibliotecas de espectros (4, 84, 116). Em modo de varrimento de massas ("scan") obtém-se grande abundância de informação qualitativa, enquanto que em modo de monitorização selectiva de iões (SIM) perde em informação qualitativa mas vê a sensibilidade melhorada, razão pela qual é mais apropriada para análise quantitativa (4). Os espectrómetros de massa podem ainda trabalhar em modo de ionização química positiva

(PCI) ou negativa (NCI), quando se impõe aumentar a selectividade e obter informação da massa molecular, por vezes não visível em espectros de EI devido à excessiva fragmentação (4, 116). O modo de operação mais interessante em termos de selectividade é em MS-MS, eliminando da segunda fragmentação todos os iões que possam advir da matriz. Seleccionando apenas um ião percursor característico de um pesticida, é possível obter um espectro secundário altamente específico que permite efectuar a "ultraconfirmação". Acresce que, nestas condições, a sensibilidade do sistema sofre um incremento considerável, A informação obtida facilita, ainda, a elucidação estrutural de moléculas desconhecidas (4, 113). A análise por GC-MS-MS num espectrómetro de massa "ion trap" permitiu a obtenção de LODs inferiores a 1 ng L^{-1}. No entanto, a MS-MS impõe uma certa limitação quanto ao número de pesticidas a incluir numa mesma análise (111).

Em LC-MS, devido à fraca fragmentação ocorrida nas interfaces API e obtenção de informação essencialmente sobre a massa molecular, a confirmação não é definitiva. Para colmatar esta dificuldade e aumentar a selectividade e a sensibilidade, actualmente recorre-se cada vez mais ao uso de MS-MS, que inclui uma fragmentação por colisão com moléculas de árgon (111). Em MS-MS, é possível a construção de bibliotecas de espectros criados em determinadas condições instrumentais para substâncias autênticas e que irão servir de referência na confirmação de pesticidas em amostras reais. Nos últimos anos a espectrometria de massa alcançou um papel sem precedentes em análise ambiental, facto bem evidente no elevado número de aplicações publicadas e na diversidade de arranjos instrumentais, uns e outros bem expressos nas revisões de Geerdink et al. (111), Santos e Galceran (116) e Richardson (117). A possibilidade de confirmação e a análise conjunta de múltiplos pesticidas são duas vantagens muito valorizadas.

Diversos desenvolvimentos recentes na área da cromatografia têm mantido um permanente interesse nesta técnica, entre eles: GC rápida (separações <1 minuto), GC multidimensional (GCxGC) e análise de campo (116). A procura de separações extremamente rápidas tem levado à utilização de colunas cromatográficas mais curtas e de menor diâmetro interno, quer em GC quer em LC (116, 118, 119). Os termos "fast-GC" e "ultra fast GC" são referidos na literatura para designar separações cromatográficas que se processam em escassos minutos ou fracções de minuto, respectivamente. Para tal, usam-se colunas com comprimentos de 15 m a 1 m e diâmetros internos de 0,15 mm até 0,05 mm, por vezes com fluxos de gás de arraste aumentados. No entanto, estas técnicas têm requisitos ao nível da detecção que tem que ser extremamente rápida, o que se consegue com detectores de massa por tempo de voo (TOF) (116). Os detectores TOF são ideais para GC

rápida e GCxGC devido à velocidade de varrimento que permite obter até 500 espectros por segundo, acrescida da possibilidade de medir massas exactas (116). Os aparelhos de GC-MS portáteis têm despertado bastante interesse, uma vez que permitem analises "in situ" bastante rápidas obviando os problemas de transporte e conservação das amostras. Têm sido usados em missões espaciais, em monitorização contínua de poluentes no ar, em identificação de poluentes em incêndios e acidentes, etc. (116). Em LC, a utilização de colunas de 100 mm x 2,1 mm I.D. e diâmetro de partícula de 1,7 μm foi designada UPLC (ultra performance liquid chromatography) permitindo separações muito rápidas (119).

Uma das tendências recentes, aproveitando a cada vez maior sofisticação dos métodos analíticos é a redução do volume de amostra, passando dos comuns 1000 mL para 30-50 mL. Em análise ambiental, a identificação e quantificação de pesticidas na ausência de falsos positivos e com a necessária sensibilidade, precisão e exactidão requer todo o empenhamento e recursos técnicos. O trabalho actual na determinação de pesticidas centra-se na sua miniaturização e automatização, através do acoplamento "on-line" da preparação da amostra e da análise cromatográfica, bem como na integração de um grande número de substâncias em métodos multiresíduo para agilizar o trabalho analítico (111). No entanto, existem certos pesticidas (ex.: glifosato, paraquato, amitrole) com propriedades especiais (alta polaridade, alta solubilidade em água e reduzida resposta nos detectores) que dificultam grandemente a sua análise, requerendo um tratamento diferenciado (4). Outro desafio é a análise de produtos de degradação que têm sido detectados em amostras reais com cada vez maior frequência, evidenciando uma toxicidade acrescida (4, 44, 61, 78).

4.5 BIOENSAIOS

Em geral, as técnicas cromatográficas são o primeiro recurso para a análise de pesticidas em amostras ambientais. Na verdade, elas são tidas como as técnicas mais rigorosas e fiáveis. No entanto, requerem equipamentos altamente dispendiosos e pessoal muito especializado para a sua operação. Para além disso, requerem uma preparação prévia da amostra, que no conjunto resulta num tempo longo de análise (120, 121). Os custos dos estudos de monitorização ambiental são, na actualidade, bastante avultados e tenderão a aumentar com a necessidade de um controlo mais exaustivo. Consequentemente, existe uma oportunidade para o desenvolvimento e implementação de ensaios mais versáteis, rápidos, económicos e, de preferência, portáteis para a análise de campo (122). Alguns desses objectivos podem ser alcançados com os bioensaios.

4.5.1 Imunoensaios

Os imunoensaios são testes que usam os anticorpos como agentes que reconhecem selectivamente o analito (antigénio) estabelecendo com este uma ligação reversível. Existem inúmeras estratégias baseadas nesta afinidade para detectar micropoluentes, tal como são diversos os suportes disponíveis, daí que as possibilidades de uso dos imunoensaios com sucesso são alargadas. Nesta breve síntese dar-se-á maior relevo à aplicação destes ensaios do que propriamente aos aspectos relacionados com o modo de funcionamento, que são do domínio da Bioquímica e podem ser encontrados em várias referências (121, 123). A aceitação destes ensaios pela comunidade científica e pelas entidades reguladoras para análise ambiental foi lenta e só na década de 90 foi obtido algum reconhecimento (123). Algumas das vantagens dos imunoensaios são a sua rapidez de execução, os baixos custos, a possibilidade de efectuar análise de campo e o uso como testes de despistagem, reduzindo o número de amostras a analisar pelas técnicas convencionais (121, 124). Em países em vias de desenvolvimento, que não disponham de recursos técnicos e pessoal especializado, estes ensaios podem responder à necessidade de controlo de pesticidas. No entanto, também os países que detêm tais condições podem beneficiar com o uso de imunoensaios, alargando o âmbito das monitorizações com custos controlados (120, 124). Contudo, Dalvie et al. são contrários a esta ideia (125). Considerando um cenário hipotético na Africa do Sul, estes autores concluem que a técnica de SPME-GC é a mais económica, particularmente quando se pretende analisar um número muito elevado de amostras. Quando o estudo inclui muitos pesticidas, o uso de imunoensaios em rotina torna-se quase impraticável, devido ao elevado custo dos "Kits", pelo menos naquele cenário (125).

Os imunoensaios actuais destinados à aplicação na análise de água dispõem de uma sensibilidade suficiente para o seu uso directo sem qualquer passo de concentração e limpeza da amostra, bem como uma precisão e exactidão adequadas (120, 123). Muitos destes ensaios são imunoenzimáticos, dos quais se destacam os ensaios de ELISA ("enzyme-linked immunosorbent assay") entre os mais extensamente usados em análise ambiental. Estes ensaios são do tipo competitivo e desenvolvem-se em meio heterogéneo, em que um dos agentes reactivos se encontra imobilizado sobre um suporte sólido, por ex.: tubos de ensaio, microplacas de 96 poços, partículas magnéticas, etc. Esta característica permite a sua aplicação rápida a inúmeras amostras, permitindo uma resposta de alerta rápida, cada vez mais necessária (121). Existe já actualmente uma grande variedade deste tipo de ensaios para quase todos os grupos de pesticidas, quer estejam disponíveis comercialmente ou apenas em

trabalhos de investigação: carbamatos, cloroacetanilidas, fenilureias, sulfonilureias, OCPs, OPPs, piretróides e triazinas, de onde se destacam as inúmeras aplicações dirigidas à atrazina (123). Meulenberg et al. comprovaram a elevada eficiência dos testes ELISA para discriminar a presença do analito em amostras de água (ausência de falsos negativos) (120). No entanto, alguns testes apresentaram melhores características como ensaios qualitativos do que quantitativos. Por vezes, os valores de concentração foram superiores aos esperados devido a reactividade cruzada do ensaio, resultante da presença de pesticidas similares ou mesmo de outras substâncias de matriz. O facto de alguns ensaios não apresentarem selectividade para um composto, mas antes para uma família, não favorece a sua aplicação quantitativa (120). Para obviar esta limitação, Casino et al. desenvolveram ensaios de ELISA específicos para o metolacloro, alacloro e acetocloro com uma reactividade cruzada negligenciável para compostos relacionados e produtos de degradação (121). Ainda assim, é assumido por vários autores que os ensaios ELISA poderão produzir resultados menos precisos que as técnicas cromatográficas, sendo a sua principal utilidade como ensaios de discriminação das amostras positivas (124). No trabalho de Casino et al., só o ensaio para o metolacloro permitiu um LOD compatível com o limite de pesticidas na UE, por análise directa da amostra. Em certas situações, os testes ELISA revelam algumas limitações para detectar níveis tão baixos mas mostram-se perfeitamente aplicáveis quando os requisitos são menos exigentes (ex.: USEPA) (124).

A utilização de imunossensores tem criado grande expectativa na automatização dos imunoensaios. Um imunossensor é um instrumento analítico composto por anticorpos ou antigénios imobilizados em directo contacto com um transdutor que converte um evento imunológico num sinal eléctrico quantificável. Mallat et al. expuseram os fundamentos destes ensaios e testaram o protótipo RIANA ("River Analyzer") (126).

4.5.2 Biossensores

Com o crescente alerta público relativamente ao efeito a longo prazo de um número cada vez maior de xenobióticos introduzidos no meio ambiente, existe uma necessidade acrescida de desenvolvimento de testes simples capazes de fornecer informação em tempo útil (127). Os testes físico-químicos usados correntemente na determinação de contaminantes ambientais detectam um número limitado de compostos. Além disso, não permitem evidenciar fenómenos de sinergismo ou antagonismo entre eles e podem não dar uma indicação biológica real do potencial dano ambiental.

Segundo Marco e Barceló, um biossensor define-se como sendo um sistema analítico miniaturizado, constituído por um componente biológico imobilizado (anticorpo, enzima, receptor, DNA, células, etc.) em íntimo contacto com um transdutor (óptico, electroquímico, piezoeléctrico ou termométrico) capaz de detectar a ocorrência de uma interacção biológica originando um sinal que é tratado electronicamente (127, 128). A este conceito está subjacente a ideia de um sensor que responde de forma directa, selectiva e contínua à presença do analito alvo. A dimensão do trabalho analítico necessário em monitorização ambiental tem dificultado a tarefa de concepção de biossensores que dêem uma resposta cabal a várias solicitações. Inclui-se aqui a diversidade de compostos químicos a analisar, a complexidade das matrizes, os requisitos de desempenho e a variedade de aplicações necessárias (122). Na tentativa de dar resposta a estes desafios têm-se testado inúmeras configurações analíticas. A classificação dos biossensores pode ser feita segundo o elemento transdutor ou com base no mecanismo de reconhecimento biológico, que pode ser:
a) medição dos produtos, inibidores ou moduladores num processo biocatalítico (enzimas); b) medição da intensidade das ligações de bioafinidade (anticorpos, DNA, receptores) quer por via directa ou amplificada biocataliticamente; c) uso de tecidos isolados, órgãos ou microrganismos que respondem a um evento inicial através de uma série de acções com possibilidade de medida (ex.: bioluminescência) (122, 127, 128).

Grande parte dos elementos biológicos usados nos biossensores para aplicações ambientais foi já largamente testada em ensaios de laboratório não instrumentais (ensaios enzimáticos, imunoensaios). Os biossensores fazem o acoplamento dos bioensaios com transdutores apropriados, de forma a tornar o sistema mais versátil e económico (122, 129). Apesar disso, a área de investigação mais intensa no que concerne à construção de biossensores centra-se sobretudo nos elementos biológicos de reconhecimento (aplicação de técnicas de biologia molecular e engenharia genética, produção de novos anticorpos e construção de materiais biomiméticos) e nas interfaces com as amostras (membranas ou revestimentos que preservam a actividade biológica e removem as interferências) (122).

Em muitos casos, pretende-se usar os biossensores como alternativa às técnicas analíticas convencionais na análise de poluentes, funcionando como testes de despiste no próprio local e reservando para uma análise mais rigorosa de validação apenas as amostras contaminadas acima de determinado nível. No entanto, existem outros biossensores que fazem a medição de parâmetros tipicamente biológicos (por exemplo, toxicidade e carência bioquímica de oxigénio) e portanto funcionam em complementaridade com as técnicas convencionais. São estes que mais interessam neste trabalho, nomeadamente aqueles que permitem avaliar os

efeitos ecotoxicológicos decorrentes da presença de pesticidas no ambiente.

Os biossensores que utilizam células vivas têm sido usados para avaliar a toxicidade ou detectar certos grupos de substâncias. Estes elementos biológicos têm a particularidade de poderem expressar o dano produzido por certas substâncias químicas em sistemas vitais, reflectindo bem uma das preocupações mais iminentes em termos ambientais (129). Contrariamente aos sensores que usam enzimas ou anticorpos, os quais exploram a selectividade do elemento biológico, os biossensores que utilizam células respondem a uma vasta gama de estímulos vindos do seu meio circundante, pelo que se mostram particularmente aptos para avaliar a ecotoxicidade quando a natureza dos tóxicos/poluentes ambientais é desconhecida e múltipla (128, 129).

Os testes de toxicidade existentes contemplam organismos de vários grupos taxonómicos: invertebrados, peixes, plantas, algas, protozoários e bactérias. Muitos destes testes são dispendiosos, requerem preparações laboriosas, grandes volumes de amostra e, normalmente, decorrem durante dias. Os ensaios de toxicidade com bactérias apresentam numerosas vantagens, uma vez que são testes rápidos, reprodutíveis, simples de usar e interpretar e não levantam questões éticas (130, 131). Apesar de não ser legítimo esperar que todos os organismos tenham a mesma sensibilidade aos tóxicos, pode ser estabelecida uma relação entre os efeitos destes nas bactérias e nos organismos superiores. Os agentes tóxicos exercem a sua acção interferindo com estruturas e funções celulares (membranas, enzimas, transporte de energia, etc.), muitas das quais são vitais para todos os organismos vivos. As bactérias são particularmente úteis neste tipo de testes devido ao seu rápido crescimento e distribuição ubíqua nos ambientes aquáticos.

Tradicionalmente, a selecção do elemento biológico é feita segundo a sua maior sensibilidade aos tóxicos. No entanto, tem-se cada vez mais em conta a sua relevância ambiental, de forma a traduzir bem uma situação real (129, 130). Normalmente, diferentes ensaios originam diferentes avaliações de toxicidade, razão pela qual a escolha deve reger-se pela opção que melhor reproduza cada cenário. Os mecanismos celulares susceptíveis de serem quantificados incluem, por ex.: consumo de carbono, consumo de oxigénio, actividade enzimática, crescimento, mortalidade e luminescência (128). Os transdutores mais comuns usados com bactérias são do tipo electroquímico ou óptico. No primeiro caso, as bactérias estão usualmente imobilizadas por meio de uma membrana estabelecendo um contacto directo com um sensor electroquímico, que pode medir: variações no potencial redox, o aparecimento/desaparecimento de um metabolito electroquimicamente activo ou o consumo de oxigénio. Bentley et al. propuseram um sistema amperométrico para monitorizar a

respiração bacteriana, que usa um mediador sensível aos fenómenos de oxidação-redução que têm lugar na célula (129). Os autores sugerem a utilização de diferentes bactérias e algas: *Escherichia coli*, *Pseudomonas putida*, bactérias nitrificantes, biomassa de lamas activadas, etc. Os microrganismos podem ser depositados em eléctrodos descartáveis e de utilização única como o da Figura 4.3, e que faz parte do biossensor CellCense® (129). O fluxo de electrões é desviado da cadeia de transporte de electrões mitocondrial e medido. Este biossensor tem a vantagem de trabalhar com bactérias representativas de ambientes terrestres e permite monitorizar em contínuo o efeito tóxico nas bactérias (132).

Os biossensores ópticos servem-se de bactérias luminescentes, naturais ou alteradas geneticamente, ou ainda, linhas celulares de vertebrados nas quais foi implantado o gene que codifica a luciférase (129, 131). A capacidade de produzir luz resulta de um mecanismo celular catalisado pela luciférase bacteriana segundo a seguinte reacção:

$FMNH_2 + O_2 + R\text{-}CO\text{-}H \rightarrow FMN + R\text{-}COOH + H_2O + Luz$

A bioluminescência está directamente relacionada com a vitalidade e o estado metabólico das células. Uma substância tóxica produz alterações na homeostase celular, ao nível da membrana celular, sistema de transporte de electrões, enzimas ou elementos citoplasmáticos, o que se reflecte num decréscimo da bioluminescência registado num luminómetro (133). Os biossensores comerciais Microtox® e ToxAlert® baseiam-se neste tipo de funcionamento utilizando a bactéria marinha *Vibrio fischeri* NRRL B-11177 (128). Apesar das inúmeras vantagens reconhecidas a estes testes, uma das limitações mais importantes deriva do facto de as bactérias usadas não serem representativas de ecossistemas de água doce. Tal facto levou a que o gene responsável pela luminescência fosse artificialmente inserido em várias bactérias terrestres (130). Foi assim possível obter biossensores metabólicos, nos quais as bactérias expressam constitutivamente luminescência, ou catabólicos, quando é apenas produzida por indução na presença de um composto tóxico (131).

Os testes de ecotoxicidade que usam bactérias luminescentes apresentam alguns requisitos a observar para o seu bom funcionamento. Assim, as amostras coradas ou turvas devem ser sujeitas a uma filtração para a evitar a absorção da luz emitida pelas bactérias.

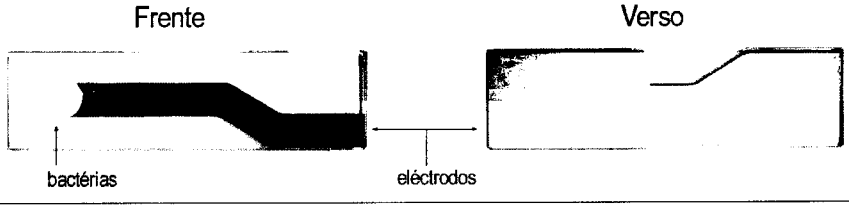


Figura 4.3 – Eléctrodo descartável fornecido para o uso com o biossensor Cellsense®

O pH da solução é também um parâmetro crítico e deve ser controlado entre 6 e 8. É aconselhável incluir sempre uma amostra controlo para minimizar a influência da idade do concentrado bacteriano, assim como de outros tipos de interferências ocasionais ou desconhecidas. Deve ter-se também em conta a variação de luz emitida pela bactéria ao longo do tempo de ensaio na ausência do agente tóxico. A osmolaridade da amostra deve ser ajustada com uma solução salina de NaCl para que as bactérias encontrem condições de sobrevivência. Estes ensaios são, geralmente, conduzidos a uma temperatura controlada de 15 °C para que os resultados em diferentes dias e diferentes sistemas sejam comparáveis, já que a actividade das bactérias depende da temperatura.

Os testes executados com bactérias dão uma indicação de toxicidade aguda e pouco ou nada de toxicidade crónica. A toxicidade de um composto ou amostra é normalmente expressa pela concentração efectiva que provoca 50% de inibição nas bactérias (EC_{50}) ao fim de determinado tempo de incubação (15 ou 30 minutos). Uma das aplicações mais interessantes dos biossensores decorre do seu uso como alerta precoce de ecotoxicidade. A medida de toxicidade obtida dá uma ideia real da exposição dos seres vivos, não possível através de análises físico-químicas, uma vez que nem sempre a totalidade do poluente se encontra biodisponível, para além de traduzir os efeitos interactivos entre os poluentes. São também uma ferramenta preciosa de apoio aos processos de remediação de locais contaminados permitindo averiguar a eficiência do processo (131). Bhattacharyya et al. testaram a validade do uso de biossensores na avaliação de várias estratégias de remediação de solos, apoiando-se nos resultados obtidos nas análises físico-químicas (131).

Os biossensores baseados em bactérias têm sido largamente usados na avaliação da toxicidade e ecotoxicidade em águas (130, 134), solos e águas residuais (132, 133). As misturas de pesticidas são frequentemente encontradas no ambiente, daí que os efeitos aditivos, sinérgicos ou antagónicos devam ser considerados na sua acção tóxica (130). Isso mesmo foi avaliado por Strachan et al. seleccionando herbicidas de grande uso. Apesar de as bactérias usadas não serem tão sensíveis (EC_{50} – 10 a 400 mg L^{-1}) como os testes baseados em algas - nos quais a diminuição da actividade fotossintética devida à presença de herbicidas é medida - foram verificados diversos fenómenos de antagonismo e sinergismo (130). Observaram-se efeitos sinérgicos entre a atrazina, herbicida muito frequente nas águas subterrâneas, e a simazina, MCPA, diurão e paraquato (130). Boluda et al. investigaram uma eventual relação entre os valores de toxicidade de águas naturais superficiais e a sua composição físico-química agrupada por tipo de contaminantes (134). Os pesticidas presentes nessas amostras não lhes conferiram uma toxicidade notória. Fernández-Alba et al.

avaliaram a toxicidade resultante de várias misturas de pesticidas largamente usados em cultura intensiva em estufas, com vista a estimar a interacção entre esses diferentes tóxicos (135). Simultaneamente, avaliaram a sensibilidade relativa de dois organismos: *Vibrio fischeri* e *Daphnia magna*, e fragmentos mitocondriais. Foram reportados efeitos sinérgicos e antagónicos em misturas binárias, ternárias e quaternárias de pesticidas. Os autores assinalam a maior sensibilidade do teste com *Daphnia magna* devido à sua maior complexidade bioquímica (135). Lin et al. e Dimou et al. demonstraram ainda a utilidade dos biossensores no estudo da evolução da toxicidade dos pesticidas metolacloro e atrazina ao longo do seu processo de degradação, através de fotólise (136, 137).

Os ensaios com bactérias luminescentes adquiriram já um elevado grau de maturidade e aceitação, bem patente na publicação de uma norma ISO para a análise de toxicidade em águas - ISO 11348 (138). Vários ensaios de comparação interlaboratorial têm permitido evidenciar as potencialidades destes biossensores (139, 140).

4.6 CONCLUSÕES

Os desafios colocados na análise de pesticidas em amostras ambientais são de diversa índole, alguns ainda por resolver. Torna-se necessário o recurso a várias técnicas de forma a obter informações para um melhor conhecimento dos níveis de contaminação e dos seus efeitos no ambiente, sejam elas físico-químicas (SPME, SFE, GC, HPLC, MS) ou biológicas (ELISA, biossensores). Os pesticidas são um grupo de analitos que provoca e beneficia dos avanços na ciência analítica. A qualidade dos resultados depende tanto da preparação das amostras como da análise instrumental. As tendências de evolução destas técnicas vão no sentido de uma maior selectividade, miniaturização, automatização e redução dos resíduos de solventes. Várias técnicas aportam informação útil e podem ser conjugadas com vista a obter resultados com significado ambiental, exigindo um menor dispêndio de recursos.

4.7 BIBLIOGRAFIA

(1) Sabik, H., Jeannot, R., Rondeau, B. – Multiresidue methods using solid-phase extraction techniques for monitoring priority pesticides, including triazines and degradation products, in ground and surface waters. J. Chromatogr. A, 885 (2000) 217-236.

(2) Fava, L., Orrú, M.A., Crobe, A, Caracciolo, A.B., Bottoni, P., Funari, E. – Pesticide metabolites as contaminants of groundwater resources: assessment of the leaching potential of endosulfan sulphate, 2,6-dichlorobenzoic acid, 3,4-dichloroaniline, 2,4-dichlorophenol, and 4-chloro-2-

methylphenol. Microchem. J., 79 (2005) 207-211.

(3) Pichon, V. – Solid-phase extraction for multiresidue analysis of organic contaminants in water. J. Chromatogr. A, 885 (2000) 195-215.

(4) Barceló, D., Hennion, M-C. - Trace determination of pesticides and their degradation products in water. Elsevier Science B.V, Amsterdão, Holanda, 1997.

(5) Hennion, M-C. – Sample handling strategies for the analysis of organic compounds in environmental water samples. In: D. Barceló (Ed.) Sample Handling and Trace Analysis of Pollutants: Techniques, Applications and Quality Assurance. Elsevier Science B.V, Amesterdão, Holanda, 2000, pp. 4-72.

(6) Papadoyannis, I.N., Samanidou, V.F. – Sample preparation prior to HPLC. In: J. Cazes (Ed.) Encyclopedia of Chromatography, Marcel Dekker, Nova Iorque, 2003.

(7) Alpendurada, M.F. – Solid-phase microextraction: a promising technique for sample preparation in environmental analysis. J. Chromatogr. A, 889 (2000) 3-14.

(8) Hennion, M-C. – Solid-phase extraction: method development, sorbents and coupling with liquid chromatography. J. Chromatogr. A, 856 (1999) 3-54.

(9) Fontanals, N., Marcé, R.M., Borrull, F. – New hydrophilic materials for solid-phase extraction. Trends Anal. Chem., 24 (2005) 394-406.

(10) Sherma, J. – Pesticide residue analysis (1999-2000): a review. J. AOAC Int., 84 (2001) 1303-1312.

(11) Azevedo, D.A., Lacorte, S., Vinhas, T., Viana, P., Barceló, D. – Monitoring of priority pesticides and other organic pollutants in river water from Portugal by gas chromatography-mass spectrometry and liquid chromatography-atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry. J. Chromatogr. A, 879 (2000) 13-26.

(12) Kampioti, A.A., Borba da Cunha, A.C., Lopéz de Alda, M., Barceló, D. – Fully automated multianalyte determination of different classes of pesticides, at pg per liter levels in water, by on-line solid-phase extraction-liquid chromatography-electrospay-tandem mass spectrometry. Anal. Bioanal. Chem. 382 (2005) 1815-1825.

(13) Albanis, T.A., Hela, D.G., Sakellarides, T.M., Konstantinou, I.K. – Monitoring of pesticide residues and their metabolites in surface and underground waters of Imathia (N. Greece) by means of solid-phase extraction disks and gas chromatography. J. Chromatogr. A, 823 (1998) 59-71.

(14) Pichon, V., Charpak, M., Hennion, M.-C. – Multiresidue analysis of pesticides using new laminar extraction disks and liquid chromatography and application to the French priority list. J. Chromatogr. A, 795 (1998) 83-92.

(15) Patsias, J., Papadopoulou-Mourkidou, E. – Rapid method for the analysis of a variety of chemical classes of pesticides in surface and groundwaters by off-line solid-phase extraction and gas chromatography-mass spectrometry. J. Chromatogr. A, 740 (1996) 83-98.

(16) Van Hoof, F., Van Wiele, P., Bruchet, A., Schmitz, I., Bobediji, I, Sacher, F., Ventura, F., Martí, I., Marecos do Monte, M.H., Sá da Costa, M. – Multiresidue determination of pesticides in drinking and related waters by gas chromatography-mass spectrometry after solid-phase extraction: interlaboratory study. J. AOAC Int, 84 (2001) 1420-1429.

(17) Quintana, J., Martí, I., Ventura, F. – Montoring of pesticides in drinking and related waters in NE Spain, with a multiresidue SPE-GC-MS method including an estimation of the uncertainty of the analytical results. J. Chromatogr. A, 938 (2001) 3-13.

(18) Aguilar, C., Ferrer, I., Borrull, F., Marcé, R.M., Barceló, D. – Monitoring of pesticides in river water based on samples previously stored in polymeric cartridges followed by on-line solid-phase extraction-liquid chromatography-diode array detection and confirmation by atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry. Anal. Chim. Acta, 386 (1999) 237-248.

(19) Lacorte, S., Viana, P., Guillamon, M., Tauler, R., Vinhas, T., Barceló, D. – Main findings and conlusions of the implementation of Directive 76/464/CEE concerning the monitoring of organic pollutants in surface waters (Portugal, April 1999-May 2000). J. Environ. Monit., 3 (2001) 475-482.

(20) Miège, C., Dugay, J. – Solid-phase microextraction and gas chromatography for rapid analysis of pesticides. Analusis Mag., 26 (1998) M137-M143.

(21) Eisert, R.., Levsen, K. – Solid-phase microextraction coupled to gas chromatography: a new method for the analysis of organics in water. J. Chromatogr. A, 733 (1996) 143-157.

(22) Krutz, L.J., Senseman, S.A., Sciumbato, A.S. – Solid-phase microextraction for herbicide determination in environmental samples. J. Chromatogr. A, 999 (2003) 103-121.

(23) Penãlver, A., Pocurull, E., Borrull, F., Marcé, R.M. – Trends in solid-phase microextraction for determining organic pollutants in environmental samples. Trends Anal. Chem., (1999) 557-568.

(24) Beltran, J., López, F.J., Hernández, F. – Solid-phase microextraction in pesticide residue analysis. J. Chromatogr. A, 885 (2000) 389-404.

(25) Zhang, Z., Yang, M.J., Pawliszyn, J. – Solid-phase microextraction. Anal. Chem., 66 (1994) 844A-852A.

(26) Pawliszyn, J. – Solid-phase microextraction - Theory and practice. Wiley-VCH, Nova Iorque, 1997.

(27) Lord, H., Pawliszyn, J. – Evolution of solid-phase microextraction technology. J. Chromatogr. A, 885 (2000) 153-193.

(28) Prosen, H., Zupančič-Kralj, L. – Solid-phase microextraction. Trends Anal. Chem., 18 (1999) 272-282.

(29) Dugay, J., Miège, C., Hennion, M.-C. – Effect of the various parameters governing solid-phase microextraction for the trace determination of pesticides in water. J. Chromatogr. A, 795 (1998) 27-42.

(30) Górecki, T., Yu, X., Pawliszyn, J. – Theory of analyte extraction by selected porous polymer SPME fibres. Analyst, 124 (1999) 643-649.

(31) Louch, D., Motlagh, S., Pawliszyn, J. – Dynamics of organic compound extraction from water using liquid-coated fused silica fibers. Anal. Chem., 64 (1992) 1187-1199.

(32) Shirey, R.E., Mindrup, R.F – A systematic approach for selecting the appropriate SPME fiber, Supelco, Bellefonte, PA, USA, 1999, documento digital T400156 DKF.

(33) Eisert, R., Pawliszyn, J. – Design of automated solid-phase microextraction for trace analysis of organic compounds in aqueous samples. J. Chromatogr. A, 776 (1997) 293-303.

(34) Aguilar, C., Penãlver, A., Pocurull, E., Borrull, F., Marcé, R.M. – Solid-phase microextraction and gas chromatography with mass spectrometric detection for the determination of pesticides in aqueous samples, J. Chromatogr. A, 795 (1998) 105-115.

(35) Lambropoulou, D.A., Konstantinou, I.K., Albanis, T.A. – Determination of fungicides in natural waters using solid-phase microextraction and gas chromatography coupled with electron-capture and mass spectrometric detection. J. Chromatogr. A, 893 (2000) 143-156.

(36) Hernandez, F., Beltran, J., Lopez, F.J., Gaspar, J.V. – Use of solid-phase microextraction for the quantitative determination of herbicides in soil and water samples. Anal. Chem., 72 (2000) 2313-2322.

(37) Boussahel, R., Bouland, S., Moussaoui, K.M., Baudu, M., Montiel, A. – Determination of chlorinated pesticides in water by SPME/GC. Water Res., 36 (2002) 1909-1911.

(38) Salleh, S.H., Saito, Y., Jinno, K. – An approach to solventless sample preparation procedure for pesticides analysis using solid-phase microextraction/supercritical fluid extraction technique. Anal. Chim. Acta, 418 (2000) 69-77.

(39) Albanis, T.A., Hela, D.G., Lambropoulou, D.A., Sakkas, V.A. – Gas chromatographic-mass spectrometric methodology using solid-phase microextraction for the multiresidue determination of pesticides in surface waters. Int. J. Environ. Anal. Chem., 84 (2004) 1079-1092.

(40) Frías, S., Rodríguez, M.A., Conde, J.A., Pérez-Trujillo, J.P. – Optimisation of a solid-phase microextraction procedure for the determination of triazines in water with gas chromatography mass spectrometry detection. J. Chromatogr. A, 1007 (2003) 127-135.

(41) Pi, H.-P., Li, G.-C., Jen, J.-F. – Determination of organochlorine pesticides in water using microwave assisted headspace solid-phase microextraction and gas chromatography. J. Chromatogr. A, 1012 (2003) 129-137.

(42) López-Blanco, M.C., Reboreda-Rodríguez, B., Cancho-Grande, B., Simal-Gándara, J. – Optimization of solid-phase extraction and solid-phase microextraction for the determination of α- and β-endosulfan in water by gas chromatography-electron capture detection. J. Chromatogr. A, 976 (2002) 293-299.

(43) Pérez-Trujillo, J.P., Frías, S., Conde, J.E., Rodríguez-Delgado, M.A. – Comparison of different coatings in solid-phase microextraction for the determination of organochlorine pesticides in ground water. J. Chromatogr. A, 963 (2002) 95-105.

(44) Sánchez-Ortega, A., Sampedro, M.C., Unceta, N., Goicolea, M.A., Barrio, R.J. – Solid-phase microextraction coupled with high performance liquid chromatography using on-line diode-array and electrochemical detection for the determination of fenitrothion and its main metabolites in environmental water samples. J. Chromatogr. A, 1094 (2005) 70-76.

(45) Eisert, R., Jackson, S., Krotzky, A. – Application of on-site solid-phase microextraction in aquatic dissipation studies of profoxydim in rice. J. Chromatogr. A, 909 (2001) 29-36.

(46) González-Barreiro, C., Lores, M., Casais, M.C., Cela, R. – Optimisation of alachlor microextraction from water samples using experimental design. J. Chromatogr. A, 896 (2000) 373-379.

(47) Carabias-Martínez, R., García-Hermida, C., Rodríguez-Gonzalo, E., Soriano-Bravo, F.E., Hernández-Méndez, J. – Determination of herbicides, including thermally labile phenylureas by solid-phase microextraction and gas chromatography-mass spectrometry. J. Chromatogr. A, 1002 (2003) 1-12.

(48) Lambropoulou, D.A., Albanis, T.A. – Optimization of headspace solid-phase microextraction conditions for the determination of organophosphorus insecticides in natural waters. J. Chromatogr. A, 922 (2001) 243-255.

(49) Bouaid, A., Ramos, L., Gonzalez, M.J., Fernández, P., Cámara, C. – Solid-phase microextraction method for the determination of atrazine and four organophosphorus pesticides in soil samples by gas chromatography. J. Chromatogr. A, 939 (2001) 13-21.

(50) Navalón, A., Prieto, A., Araujo, L., Vílchez J.L. – Determination of oxadiazon residues by headspace solid-phase microextraction and gas chromatography-mass spectrometry. J. Chromatogr. A, 946 (2002) 239-245.

(51) Lambropoulou, D.A., Sakkas, V.A., Hela, D.G., Albanis, T.A. – Application of solid-phase microextraction in the monitoring of priority pesticides in the Kalamas River (N.W. Greece). J. Chromatogr. A, 963 (2002) 107-116.

(52) Sakamoto, M., Tsutsumi, T. – Applicability of headspace solid-phase microextraction to the determination of multi-class pesticides in waters. J. Chromatogr. A, 1024 (2004) 63-74.

(53) Sauret-Szczepanski, N., Mirabel, P., Wortham, W. – Development of an SPME-GC-MS/MS method for the determination of pesticides in rainwater: laboratory and field experiments. Environ. Pollut., 139 (2006) 133-142.

(54) Sampedro, M.C., Martín, O., López de Armentia, C., Goicolea, M.A., Rodríguez, E., Gómez de Baluguera, Z., Costa-Moreira, J., Barrio, R.J. – Solid-phase microextraction for the determination of systemic and non-volatile pesticides in river water using gas chromatography with nitrogen-phosphorous and electron-capture detection. J. Chromatogr. A, 893 (2000) 347-358.

(55) Gerecke, A.C., Tixier, C., Bartels, T., Schwarzenbach, R.P., Müller, S.R. - Determination of phenylurea herbicides in natural waters at concentrations below 1 ng L^{-1} using solid-phase extraction, derivatization and solid-phase microextraction-gas chromatography-mass spectrometry. J. Chromatogr. A, 930 (2001) 9-19.

(56) Yao, Z., Jiang, G., Liu, J., Cheng, W. – Application of solid-phase microextraction for the determination of organophosphorous pesticides in aqueous samples by gas chromatography with flame phtotometric detector. Talanta, 55 (2001) 807-814.

(57) Tomkins, B.A., Ilgner, R.H. – Determination of atrazine and four organophosphorus pesticides in ground water using solid-phase microextraction (SPME) followed by gas chromatography with selected-ion monitoring. J. Chromatogr. A, 972 (2002) 183-194.

(58) Henriksen, T., Svensmark, T., Lindhardt, B., Juhler, R.K. – Analysis of acidic pesticides using in situ derivatization with alkylchloroformate and solid-phase microextraction (SPME) for GC-MS. Chemosphere, 44 (2001) 1531-1539.

(59) Hu, R., Elia, D., Berthion, J.-M., Poliak, S. – Determination of triazines and amides in water using solid-phase microextraction coupled with GC-MS. Chromatographia, 53 (2001) 306-310.

(60) Lambropoulou, D.A., Albanis, T.A. – Determination of the fungicides vinclozolin and dicloran in soils using ultrasonic extraction coupled with solid-phase microextraction. Anal. Chim. Acta, 514 (2004) 125-130.

(61) Doong, R.-A., Liao, P.-L. – Determination of organochlorine pesticides and their metabolites in soil samples using headspace solid-phase microextraction. J. Chromatogr. A, 918 (2001) 177-188.

(62) Ferrari, R., Nilsson, T., Arena, R., Arlati, P., Bartolucci, G., Basla, R., Cioni, F., Del Carlo, G., Dellavedova, P., Fattore, E., Fungi, M., Grote, C., Guidotte, M., Morgillo, S., Müller, L., Volante, L. – Inter-laboratory validation of solid-phase microextraction for the determination of triazine herbicides and their degradation products at ng/l level in water samples. J. Chromatogr. A, 795 (1998) 371-376.

(63) Gou, Y., Eisert, R., Pawliszyn, J. - Automated in-tube solid-phase microextraction-high-performance liquid chromatography for carbamate pesticide analysis. J. Chromatogr. A, 873 (2000) 137-147.

(64) Wu, J., Tragas, C., Lord, H., Pawliszyn, J. – Analysis of polar pesticides in water and wine samples by automated in-tube solid-phase microextraction coupled with high-performance liquid chromatography-mass spectrometry. J. Chromatogr. A, 976 (2002) 357-367.

(65) Sakkas, V.A., Lambropoulou, D.A., Sakellarides, T.M., Albanis, T.A. – Application of solid-phase microextraction for monitoring the photocatalytic decomposition of fenthion and parathion in aqueous TiO_2 suspensions. Anal. Chim. Acta, 467 (2002) 233-243.

(66) Llompart, M., Lores, M., Lourido, M., Sánchez-Prado, L., Cela, R. – On-fiber photodegradation after solid-phase microextraction of p,p'-DDT and two of its major photoproducts, p,p'-DDE and p,p'-DDD. J. Chromatogr. A, 985 (2003) 175-183.

(67) Dietz, C., Sanz, J., Cámara, C. – Recent developments in solid-phase microextraction coatings and related techniques. J. Chromatogr. A, 1103 (2006) 183-192.

(68) Wu, J., Pawliszyn, J. – Solid-phase microextraction based on polypirrole films with different counterions. Anal. Chim. Acta, 520 (2004) 257-264.

(69) Basheer, C., Jegadesan, S., Valiyaveettil, S., Lee, H.K. – Sol-gel-coated oligomers as novel stationary phases for solid-phase microextraction. J. Chromatogr. A, 1087 (2005) 252-258.

(70) Cai, L., Gong, S., Chen, M., Wu, C. – Vinyl crown ether as a novel radical crosslinked sol-gel SPME fiber for determination of organophosphorus pesticides in food samples. Anal. Chim. Acta, 559 (2006) 89-96.

(71) Zuin, V.G., Lopes, A.L., Yariwake, J.H., Augusto, F. – Application of a novel sol-gel polydimethylsiloxane-poly(vinyl alcohol) solid-phase microextraction fibre for gas chromatographic determination of pesticide residues in herbal infusions. J. Chromatogr. A, 1056 (2004) 21-26.

(72) Yu, J., Wu, C., Xing, J. – Development of new solid-phase microextraction fibers by sol-gel technology for the determination of organophosphorus pesticide multiresidue in foods, J. Chromatogr. A, 1036 (2004) 101-111.

(73) Liu, W., Hu, Y., Zhao, J., Xu, Y., Guan, Y. – Physically incorporated extraction phase of solid-phase microextraction by sol-gel technology. J. Chromatogr. A, 1102 (2006) 37-43.

(74) Azenha, M.A., Nogueira, P.J., Silva, A.F. – Umbreakable solid-phase microextraction fibers

obtained by sol-gel deposition on titanium wire. Anal. Chem., 78 (2006) 2071-2074.

(75) Dong, C., Zeng, Z., Yang, M. – Determination of organochlorine pesticides and their derivations in water after HS-SPME using polymethylphenylvinylsiloxane-coated fibre by GC-ECD. Water Res., 39 (2005) 4204-4210.

(76) Dong, C., Zeng, Z., Li, X. – Determination of organochlorine pesticides and their metabolites in radish after headspace solid-phase microextraction using calyx[4]arene fibre. Talanta, 66 (2005) 721-727.

(77) Léon, V.M., Álvarez, B., Cobollo, M.A., Muñoz, S., Valor, I. – Analysis of 35 priority semivoltile compounds in water by stir bar sorptive extraction-thermal desorption-gas chromatography mass spectrometry. I - Method optimisation. J. Chromatogr. A, 999 (2003) 91-101.

(78) Andreu, V., Picó, Y. – Determination of pesticides and their degradation products in soil: critical review and comparison of methods. Trends Anal. Chem., 23 (2004) 772-789.

(79) Wells, D.E., Hess, P. – Separation, clean-up and persistence of trace organic contaminants from soils, sediment and biological matrices. In: D. Barceló (Ed.) Sample Handling and Trace Analysis of Pollutants: Techniques, Applications and Quality Assurance. Elsevier Science B.V, Amesterdão, Holanda, 2000, pp. 73-114.

(80) Loconto, P.R. – Trace Environmental Quantitative Analysis: principles, techniques and applications. Marcel Dekker, Nova Iorque, USA, 2001.

(81) Dean, J.R., Xiong, G. – Extraction of organic pollutants from environmental matrices: selection of extraction technique. Trends Anal. Chem., 19 (2000) 553-564.

(82) Sánchez-Brunete, C., Pérez, R.A., Miguel, E., Tadeo, J.L. – Multiresidue herbicide analysis in soil samples by means of extraction in small columns and gas chromatography with nitrogen-phosphorous and mass spectrometric detection. J. Chromatogr. A, 823 (1998) 17-24.

(83)Sánchez-Brunete, Miguel, E., Tadeo, J.L. – Multiresidue analysis of fungicides in soil by sonication-assisted extraction in small columns and gas chromatography. J. Chromatogr. A, 976 (2002) 319-327.

(84) Sánchez-Brunete, C., Albero, B., Tadeo, J.L. – Multiresidue determination of pesticides in soil by gas chromatography mass spectrometry. J. Agric. Food Chem., 52 (2004) 1445-1451.

(85) Belmonte Vega, A., Garrido Frenich, A., Martínez Vidal, J.L. – Monitoring pesticides in agricultural water and soil samples from Andalusia by liquid chromatography coupled to mass spectrometry. Anal. Chim. Acta, 538 (2005) 117-127.

(86) Tor, A., Aydin, M.E., Özcan, S. – Ultrasonic solvent extraction of organochlorine pesticides from soil. Anal. Chim. Acta, 559 (2006) 173-180.

(87) Navarro, S., Oliva, J., Barba, A, Garcia, C. – Determination of simazine, terbuthylazine and their dealkylated chlorotriazine metabolites in soil using sonication microextraction and gas chromatography. J. AOAC Int., 83 (2000) 1239-1243.

(88) Fenoll, J., Hellín, P., Marín, C., Martínez, C.M., Flores, P. – Multiresidue analysis of pesticides in soil by gas chromatography with nitrogen-phosphorous detection and gas chromatography mass spectrometry. J. Agric. Food Chem., 53 (2005) 7661-7666.

(89) Luque de Castro, M.D., Valcárcel, M., Tena, M.T. – Extracción con fluidos supercríticos en el processo analítico. Editorial Reverté, Barcelona, Espanha, 1993.

(90) Bunker, C.E. – Supercritical fluid extraction. In: J. Cazes (Ed.), Encyclopedia of Chromatography, 2nd Edition, Vol. 2, Taylor & Francis, LLC, Boca Raton (2005) 1616-1618.

(91) Hauthal, W.H. – Advances with supercritical fluids [review]. Chemosphere, 43 (2001) 123-135.

(92) Camel, V. – The determination of pesticide residues and metabolites using supercritical fluid extraction. Trends Anal. Chem., 16 (1997) 351-369.

(93) Motohashi, N., Nagashima, H., Párkányi, C. – Supercritical fluid extraction for the analysis of pesticide residues in miscellaneous samples. J. Biochem. Biophys. Methods, 43 (2000) 313-328.

(94) Koinecke, A, Kreuzig, R., Bahadir, M. – Effects of modifiers, adsorbents and eluents in supercritical fluid extraction of selected pesticides in soil. J. Chromatogr. A, 786 (1997) 155-161.

(95) Camel, V. – Recent extraction techniques for solid matrices – supercritical fluid extraction, pressurized fluid extraction and microwave-assisted extraction: their potentials and pitfalls. Analyst, 126 (2001) 1182-1193.

(96) Reindl S., Höfler, F. – Optimization of the parameters in supercritical fluid extraction of polynuclear aromatic hydrocarbons from soil samples. Anal. Chem., 66 (1994) 1808-1816.

(97) Björklund, E., Nilsson, T., Bowadt, S., Pilorz, K., Mathiasson, L., Hawthorne, S.B. – Introducing selective supercritical fluid extraction as a new tool for determining sorption/desorption behavior and bioavailability of persistent organic pollutants in sediment. J. Biochem. Biophys. Methods, 43 (2000) 295-311.

(98) Gonçalves, C., Rezende Pinto, M., Alpendurada, M.F. – Benefits of a binary modifier with balanced polarity for an efficient supercritical fluid extraction of PAHs from solid samples, followed by HPLC. J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol., 24 (2001) 2943-2959.

(99) Kreuzig, R., Koinecke, A., Bahadir, M. – Use of supercritical fluid extraction in the analysis of pesticides in soil. J. Biochem. Biophys. Methods, 43 (2000) 403-409.

(100) Nemoto, S., Sasaki, K., Toyoda, M., Saito, Y. – Effect of extraction conditions and modifiers on the supercritical fluid extraction of 88 pesticides. J. Chromatogr. Sci., 35 (1997) 467-477

(101) Sun, L., Lee, H.K. – Optimization of microwave-assisted extraction and supercritical fluid extraction of carbamate pesticides in soil by experimental design methodology. J. Chromatogr. A, 1024 (2003) 165-177.

(102) Rissato, S.R., Galhiane, M.S., Apon, B.M., Arruda, M.S.P. – Multiresidue analysis of pesticides in soil by supercritical fluid extraction/gas chromatography with electron-capture detection and confirmation by gas chromatography-mass spectrometry. J. Agric. Food Chem., 53 (2005) 62-69.

(103) Glazkov, I.N., Revelsky, I.A., Efimov, I.P., Zolotov, Y.A. – Supercritical fluid extraction of water samples containing ultratrace amounts of organic pollutants. J. Microcolumn Sep., 11 (1999) 729-736.

(104) Lopez-Avila, V. – Applications of microwave assisted-extraction in environmental analysis. In: D. Barceló (Ed.) Sample Handling and Trace Analysis of Pollutants: Techniques, Applications and Quality Assurance. Elsevier Science B.V, Amesterdão, Holanda, 2000, pp. 115-153.

(105) Camel, V. – Microwave-assisted solvent extraction of environmental samples. Trends Anal. Chem., 19 (2000) 229-248.

(106) Papadakis, E.N., Papadopoulou-Mourkidou, E. – Determination of metribuzin and major conversion products in soils by microwave-assisted water extraction followed by liquid chromatographic analysis of extracts. J. Chromatogr. A, 962 (2002) 9-20.

(107) Patsias, J., Papadakis, E.N., Papadopoulou-Mourkidou, E. – Analysis of phenoxialkanoic acid herbicides and their phenolic conversion products in soil by microwave assisted solvent extraction and subsequent analysis of extracts by on-line solid-phase extraction liquid-chromatography. J. Chromatogr. A, 959 (2002) 153-161.

(108) Vryzas, Z., Papadopoulou-Mourkidou, E. – Determination of triazine and chloroacetanilide herbicides in soils by microwave-assisted extraction (MAE) coupled to gas chromatographic analysis with either GC-NPD or GC-MS. J. Agric. Food Chem., 50 (2002) 5026-5033.

(109) David, M.D., Campbell, S., Li, Q.X. – Pressurized fluid extraction of nonpolar pesticides and polar herbicides using in situ derivatization. Anal. Chem., 72 (2000) 3665-3670.

(110) Hubert, A., Wenzel, K.-D., Manz, M., Weissflog. L., Engewald, W., Schüürmann, G. – High extraction efficiency for POPs in real contaminated soil samples using accelerated solvent extraction. Anal. Chem., 72 (2000) 1294-1300.

(111) Geerdink, R.B., Niessen, W.M.A., Brinkman, U.A.Th. – Trace-level determination of pesticides in water by means of liquid and gas chromatography. J. Chromatogr. A, 970 (2002) 65-93.

(112) Picó, Y., Rodríguez, R., Mañes, J. - Capillary electrophoresis for the determination of pesticide residues. Trends Anal. Chem., 22 (2003) 133-151.

(113) Santos, F.J., Galceran, M.T. – The application of gas chromatography to environmental analysis. Trends Anal. Chem., 21 (2002) 672-685.

(114) Hernández-Borges, J., García-Montelongo, F.J., Cifuentes, A., Rodríguez-Delgado, M.A. – Determination of herbicides in mineral and stagnant waters at the ng/L levels using capillary electrophoresis and UV detection combined with soild-phase extraction and sample staking. J. Chromatogr. A, 1100 (2005) 236-242.

(115) García-Ruiz, C., Álvarez-Llamas, G., Puerta, A., Blanco, E., Sanz-Medel, A., Marina, M.L. – Enantiomeric separation of organophosphorus pesticides by capillary electrophoresis. Application to the determination of malathion in water samples after pre-concentration by off-line solid-phase extraction. Anal. Chim. Acta, 543 (2005) 77-83.

(116) Santos, F.J., Galceran, M.T. – Modern developments in gas chromatography-mass spectrometry-based environmental analysis. J. Chromatogr. A, 1000 (2003) 125-151.

(117) Richardson, S.D. – Environmental mass spectrometry: emerging contaminants and current issues. Anal. Chem., 76 (2004) 3337-3364.

(118) Kirchner, M., Matisová, E., Hrouzková, S., de Zeeuw, J. – Possibilities and limitations of quadrupole mass spectrometric detector in fast gas chromatography. J. Chromatogr. A, 1090 (2005) 126-132.

(119) Mezcua, M., Agüera, A., Lliberia, J.L., Cortés, M.A., Bagó, B., Fernández-Alba, A.R. –

Application of ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry to the analysis of priority pesticides in groundwater. J. Chromatogr. A, 1109 (2006) 222-227.

(120) Meulenberg, E.P., de Vree, L.G., Dogterom, J. – Investigation of indicative methods in the Netherlands: validation of commercial ELISAs for pesticides. Anal. Chim. Acta, 399 (1999) 143-149.

(121) Casino, P., Morais, S., Puchades, R., Maquieira, A. – Evaluation of enzyme-linked immunoassays for the determination of chloroacetanilides in water and soils. Environ. Sci. Technol., 35 (2001) 4111-4119.

(122) Rogers, K.R., Koglin, E.N. – Biosensors for enviornmental monitoring: an EPA perspective. In: D.P. Nikolelis, U.J. Krull, J. Wang, M. Mascini (Eds.) Biosensors for Direct Monitoring of Environmental Pollutants in Field. NATO Advanced Series Institute, Kluwer Academic Publishers, Series 2-Environment, Vol. 38, Holanda, 1998, pp. 335-349.

(123) Oubiña, A., Ballesteros, B., Bou Carrasco, P., Galve, R., Gascón, J., Iglesias, F., Sanvicens, N., Marco, M.-P. – Immunoassays for environmental analysis. In: D. Barceló (Ed.) Sample Handling and Trace Analysis of Pollutants: Techniques, Applications and Quality Assurance. Elsevier Science B.V, Amesterdão, Holanda, 2000, pp. 287-339.

(124) Brena, B.M., Arellano, L., Rufo, C., Last, M.S., Montaño, J., Cerni, E.E., Gonzalez-Sapienza, G., Last, J.A. – ELISA as an affordable methodology for monitoring groundwater contamination by pesticides in low-income countries. Environ. Sci. Technol., 39 (2005) 3896-3903.

(125) Dalvie, M.A., Sinanovic, E., London, L., Cairncross, E., Solomon, A., Adam, H. – Cost analysis of ELISA, solid-phase extraction and solid-phase microextraction for the monitoring of pesticides in water. Environ. Res., 98 (2005) 143-150.

(126) Mallat. E., Barzen, C., Gauglitz, G., Abuknesha, R., Barceló, D. – Immunosensors for pesticide determination in natural waters. Trends Anal. Chem., 20 (2001) 124-132.

(127) Rodriguez-Mozaz, S., López de Alda, M.J., Marco, M.-P., Barceló, D. – Biosensores for environmental monitoring: A global perspective. Talanta, 65 (2005) 291-297.

(128) Marco, M.-P., Barceló, D. – Fundamentals and applications of biosensors for environmental analysis. In: D. Barceló (Ed.) Sample Handling and Trace Analysis of Pollutants: Techniques, Applications and Quality Assurance. Elsevier Science B.V, Amesterdão, Holanda, 2000, pp. 1075-1105.

(129) Bentley, A., Atkinson, A., Jezek, J., Rawson, D.M. – Whole cell biosensors – electrochemical and optical approaches to ecotoxicity testing. Toxicol. Vitro 15 (2001) 469-475.

(130) Strachan, G., Preston, S., Maciel, H., Porter, A.J.R., Paton, G.I. – Use of bacterial biosensors to interpret the toxicity and mixture toxicity of herbicides in freshwater. Water Res., 35 (2001) 3490-3495.

(131) Bhattacharyya, J., Read, D., Amos, S., Dooley, S., Killham, K., Paton, G.I. - Biosensor based diagnostics of contaminated groundwater: assessment and remediation strategy. Environ. Pollut., 134 (2005) 485-492.

(132) Farré, M., Barceló, D. – Characterization of wastewater toxicity by means of a whole-cell bacterial biosensor, using *Pseudomonas putida*, in conjunction with chemical analysis. Fresenius J. Anal. Chem., 371 (2001) 467-473.

(133) Farré, M., Garcia, M.-J., Tirapu, L., Ginebreda, A., Barceló, D. – Wastewater toxicity screening of non-ionic surfactants by Toxalert® and Microtox® bioluminescence inhibition assays. Anal. Chim. Acta, 427 (2001) 181-189.

(134) Boluda, R., Quintanilla, J.F., Bonilla, J.A., Sáez, E., Gamón, M. – Application of the Microtox® test and pollution indices to the study of water toxicity in the Albufera Natural Park (Valencia, Spain). Chemosphere, 46 (2002) 355-369.

(135) Fernández-Alba, A., Guil, L.H., López, G.D., Chisti, Y. – Toxicity of pesticides in wastewater: a comparative assessment of rapid bioassays. Anal. Chim. Acta, 426 (2001) 289-301.

(136) Lin, Y.-J., Karuppiah, M., Shaw, A., Gupta, G. – Effect of simulated sunlight on atrazine and metolachlor toxicity of surface waters. Ecotox. Environ. Safe., 43 (1999) 35-37.

(137) Dimou, A.D., Sakkas, V.A., Albanis, T.A. – Metolachlor photodegradation study in aqueous media under natural and simulated solar irradiation. J. Agric. Food Chem. 53 (2005) 694-701.

(138) EN ISO 11348 – Water quality – Determination of the inhibitory effect of water samples on the light emission of *Vibrio fischeri* (luminescent bacteria test), European Committee for Standardization, Bruxelas, 1998.

(139) Farré, M., Arranz, F., Ribó, J., Barceló, D. – Interlaboratory study of the bioluminescence inhibition tests for rapid wastewater toxicity assessement. Talanta, 62 (2004) 549-558.

(140) Farré, M., Martínez, E., Hernando, M.-D., Fernández-Alba, A., Fritz, J., Unruh, E., Mihail, O., Sakkas, V., Morbey, A., Albanis, T., Brito, F., Hansen, P.D., Barceló, D. – European ring exercise on water toxicity using different bioluminescence inhibition tests based on *Vibrio fischeri*, in support to the implementation of the water framework directive. Talanta, 69 (2006) 323-333.

Capítulo 5

MONITORIZAÇÃO DE PESTICIDAS NA ZONA VULNERÁVEL Nº 1

5.1 MOTIVAÇÕES E PLANO DE MONITORIZAÇÃO

A zona das masseiras da Póvoa de Varzim é uma região litoral que desde o séc. XIX se individualizou pelas suas características geológicas e geomorfológicas ímpares no país. A possibilidade de aproveitamento agrícola dos depósitos sedimentares que a constituem moldou de forma determinante a actividade humana, social e económica na região. A cultura de produtos hortícolas em masseiras granjeou grandes proveitos para a actividade agrícola, dadas as condições óptimas de desenvolvimento que as culturas encontram nestas condições. No entanto, estes ecossistemas são também muito frágeis. A prática de horticultura intensiva na zona dunar aliada à alta permeabilidade do solo, onde é feita uma aplicação descontrolada de fertilizantes e pesticidas, pode fazer perigar a qualidade dos recursos subterrâneos (1, 2). O regime pluviométrico e a irrigação normalmente feita sem critérios de racionalidade favorecem a lixiviação de contaminantes para as águas subterrâneas (3). Sendo a zona das masseiras uma parte integrante muito significativa da ZV1, os impactos da actividade agrícola tornam imperativa a realização de campanhas de monitorização com vista a salvaguardar a saúde pública e a delinear estratégias de actuação conducentes à manutenção da qualidade ambiental (1).

Partilhando uma origem comum e susceptibilidades similares à poluição por nitratos, a contaminação por pesticidas constituiu o objectivo central do plano de monitorização levado a efeito na ZV1. Com vista a delinear a extensão da contaminação com pesticidas, identificar os tipos de contaminantes e os níveis de concentração, bem como as variações sazonais e geográficas, foi desenvolvido um plano de amostragem aproximadamente trimestral para a colheita de amostras de água subterrânea e de solo, durante um período de dois anos.

5.2 CARACTERIZAÇÃO DA ZONA DE ESTUDO

5.2.1 Localização da Zona Vulnerável nº 1

A Zona Vulnerável nº 1 recebeu esta designação e a correspondente delimitação territorial por via da aplicação da Directiva 91/676/CEE, relativa à protecção das águas contra a poluição causada por nitratos de origem agrícola, transposta para a ordem jurídica interna através do Decreto-Lei n.º 235/97, de 03 de Setembro. Este diploma legal estabelece que as zonas que drenam para as águas poluídas, ou susceptíveis de o serem, por nitratos de origem agrícola sejam designadas como zonas vulneráveis. A ZV1 foi inicialmente estabelecida pela Portaria n.º 1037/97, posteriormente revogada pela Portaria n.º 258/2003 e pela Portaria n.º 1100/2004 (4). A zona vulnerável de Esposende - Vila do Conde (ZV1) foi definida como sendo: a área delimitada pelo rio Cávado, a nova via em construção IC1 (actual A28), o rio Ave e a orla costeira (4). A ZV1, representada na Figura 5.1, encerra uma área de cerca de 55,2 km^2 (ou 57,3 km^2, conforme a fonte). Por ordem dos Ministérios do Ambiente e da Agricultura, sob consultação do Instituto da Água (INAG), a extensão actual da ZV1 foi aumentada conforme o estipula a Portaria n.º 833/2005, de 16 de Setembro (5).

5.2.1.1 Localização dos pontos de amostragem

A rede de pontos de monitorização de pesticidas e produtos de degradação utilizada neste estudo, conforme se mostra na Figura 5.1, teve por base a selecção efectuada previamente aquando da implementação de um programa de monitorização de nitratos nas águas subterrâneas, por força da aplicação da Directiva 91/676/CEE. O referido programa foi elaborado em Abril de 1997, tendo a escolha dos pontos de colheita sido efectuada com a colaboração dos técnicos da Direcção Regional de Agricultura de Entre Douro e Minho, de forma a reflectir as características geológicas e hidrogeológicas do aquífero livre subjacente bem como a intensidade dos impactos agrícolas (6). Contingências várias levaram a que os pontos 3, 7 e 23 fossem postos fora de controlo, enquanto que o ponto 2A tenha sido admitido ao programa. A Tabela 5.1 apresenta a localização dos pontos de amostragem considerando as suas coordenadas de cartografia militar bem como algumas características técnicas dos poços e das formações geológicas que estruturam o aquífero (6). A amostragem de águas subterrâneas teve lugar em todos os pontos de colheita disponíveis, ao passo que a de solos decorreu unicamente nos pontos 1, 5, 18, 22 e 25, mantendo o critério de, com esta selecção,

abranger solos com distintas propriedades texturais e culturas agrícolas.

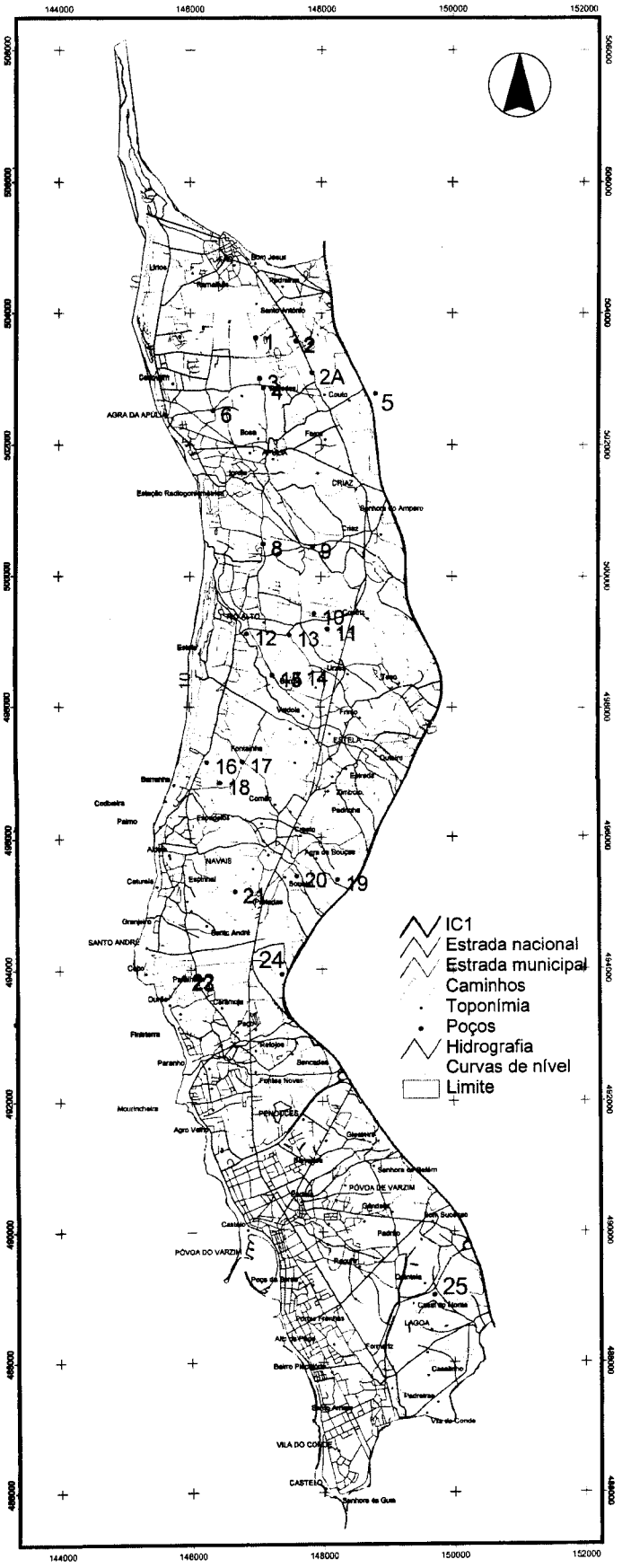


Figura 5.1 – Carta topográfica da ZV1 com a representação dos pontos de colheita (1 a 25)

Com este estudo relativo à presença de pesticidas nas águas subterrâneas será, eventualmente, possível no futuro integrar os resultados obtidos com os decorrentes do plano nacional de monitorização paralelamente em curso nos mesmos pontos de amostragem. Os resultados de pesticidas e diversos parâmetros indicadores bem como os devidos à poluição azotada poderão ser analisados conjuntamente de forma a obter uma imagem mais abrangente do impacto da agricultura local na contaminação das águas subterrâneas.

Tabela 5.1 – Localização, profundidade e geologia dos pontos de colheita na ZV1

Poço	Coordenadas (m)		Concelho / Freguesia	Localidade	Profundidade (m)	Geologia *
	M	P				
68/1	146750	503630	Esposende /Apúlia	Fão - Tomadia	8	Ad
68/2	147750	503380	Esposende /Apúlia	Adabarca (Paredes)	13	Q^4a
68/2A	147850	503263	Esposende /Apúlia	Adabarca (Paredes)		
68/3	146720	503160	Esposende /Apúlia	Lugar de Paredes	10	Ad
68/4	146790	502780	Esposende /Apúlia	Agra de Apúlia	8	Ad - Q^4a
68/5	148830	502720	Esposende /Fonte Boa	Fonte Boa (Paredes)	15	Sa
68/6	146430	502480	Esposende /Apúlia	Apúlia	10	Ad
68/7	148590	501890	Esposende /Apúlia	Q.ta Grande (Paredes)	15	Oe
68/8	147220	500450	Esposende /Apúlia	Campo da bola	15	Ad - Q^4a
68/9	147970	500450	Esposende /Apúlia	Agra Pequena	13	Ocd
82/10	147970	499460	Póvoa de Varzim /Estela	Ramalha	12	Ad
82/11	148480	499230	Póvoa de Varzim /Estela	Masseiras da Estela C2	12	Ad
82/12	146960	499150	Póvoa de Varzim /Estela	Rio Alto	8	Ad
82/13	147600	499020	Póvoa de Varzim /Estela	Maninho	12	Ad
82/14	147790	498520	Póvoa de Varzim /Estela	Campo do Pinheiro Manso	13	Ad
82/15	147360	498410	Póvoa de Varzim /Estela	Ponte de Vareio	12	Ad
82/16	146290	497150	P. Varzim /Aguçadoura	Barranha	9	Ad
82/17	147000	497040	Póvoa de Varzim /Estela	Parau Aguçadoura	12	Ad
82/18	146440	496870	P. Varzim /Aguçadoura	Moio Branco	12	Ad
82/19	148300	495420	P. Varzim /Navais	Campo do Corgo	13,5	Z_2
82/20	147810	495190	P. Varzim /Navais	Navais	14	Q^3
82/21	146700	495140	P. Varzim /Navais	Lugar de Caneiros	8,5	Q^3
82/22	146690	493870	P. Varzim /A Ver-o-Mar	Paralheira	7	G_p
82/23	146690	493790	P. Varzim /A Ver-o-Mar	Paralheira	143	G_p
82/24	147620	493810	P. Varzim /Amorim	Pedroso Amorim	13	Q^3
96/25	149800	489120	P. Varzim /Argivai	Quintela	10	G_p

* formações geológicas dos aquíferos captados: Ad – areias de dunas; Q^4a – depósitos de praia; Sa – xistos de Silúrico; Oe e Ocd – xistos de Ordovícico; Q^3 - depósitos de terraço; Gp – granitos porfiróides

5.2.2 Características hidrogeológicas

A especificidade do sistema agrícola dominante na ZV1, as masseiras, único a nível nacional, justifica que se faça uma descrição breve da sua morfologia, que em muito influencia a produção agrícola bem como a contaminação que dela deriva para as águas subterrâneas. As masseiras resultaram de um processo de aproveitamento agrícola dos solos

levado a efeito a partir de 1900 que consistiu no seguinte: grandes quantidades de areia foram removidas da superfície a ser aproveitada e colocadas em camadas sucessivas nas extremidades do terreno formando os valos. Na superfície inclinada dos valos foram plantadas videiras. A área posta a descoberto no fundo das masseiras proporciona condições excepcionais de cultura, dadas as suas características de estufa natural, devido à protecção da acção do vento e à manutenção de condições estáveis de temperatura e humidade (2, 7). Os produtos hortícolas aí produzidos exigem uma rega intensa a partir de poços de baixa profundidade. Actualmente, parte desta estrutura têm sido destruída e substituída por estufas.

Geologicamente, a maior parte da área abrangida pela ZV1 fica implantada em formações do Moderno e é constituída por depósitos dunares com possança variável entre os 5 e os 15 metros de areias mais ou menos argilosas, por vezes com camadas intercalares de godo e seixo. Estes estratos ocorrem sobrejacentes ao complexo granítico que apresenta, localmente, uma zona de alteração de 15 a 20 metros. A camada superficial dunar forma um aquífero livre, captado por poços (cerca de 150 por km^2) de utilização quase exclusiva para irrigação das culturas, predominantemente hortícolas (1). Na zona da Aguçadoura, por exemplo, o aquífero encontra-se entre 2 a 4 metros de profundidade tornando-se por isso muito vulnerável à poluição (2). Na camada subjacente de granito alterado de possança variável ocorre um aquífero condicionado pelo grau de saturação do estrato superficial dunar. O granito são é uma rocha impermeável. A água circula apenas em zonas tectonizadas de fracturação e falha. Na zona em estudo foram detectadas fracturas produtivas a uma profundidade de 70 a 90 metros, sendo possível obter caudais de cerca de 2 a 4 $L\ s^{-1}$.

As manchas de solos mais representativas da ZV1 são os regossolos úmbricos espessos e os regossolos psamíticos, normais, não húmicos (arenossolos háplicos). Em zonas mais periféricas da ZV1 e afastadas da linha de costa surgem depósitos de terraço classificados como cambissolos, acentuando-se essa tendência fora da ZV1 (3, 8).

Lobo-Ferreira et al. efectuaram o mapeamento da vulnerabilidade das águas subterrâneas da zona costeira de Portugal utilizando para tal o método DRASTIC (9). O conceito de vulnerabilidade subjacente a este método consiste na "sensibilidade da qualidade das águas subterrâneas a uma carga poluente, função apenas das características intrínsecas do aquífero" (9). Deste ponto de vista, a vulnerabilidade distingue-se de risco de poluição, uma vez que a vulnerabilidade deriva das condições hidrogeológicas e morfológicas típicas do aquífero, muito estáveis, enquanto que o risco de poluição depende das actividades poluentes que, em princípio, podem ser educadas e controladas (9). Vários autores reconhecem fragilidades neste método, incluindo os próprios autores do estudo, uma vez que a possibilidade de

contaminação dos recursos subterrâneos também depende da natureza do contaminante. No entanto, dada a informação disponível, este método é o que permite fazer uma apreciação mais objectiva da vulnerabilidade e pode ser integrado com sistemas de informação geográfica (9). Os parâmetros de caracterização do aquífero incluídos no índice DRASTIC são: profundidade do topo do aquífero [5], recarga do aquífero [4], material do aquífero [3], tipo de solo [2], topografia [1], influência da zona vadosa [5] e condutividade hidráulica do aquífero [3], os quais sofrem as ponderações relativas referidas entre parêntesis rectos [1-5].

Num polo oposto ao conceito de vulnerabilidade hidrogeológica encontram-se os índices calculados com base num rol de propriedades físico-químicas dos pesticidas, dos quais um dos mais conhecidos é o índice GUS. Também estes métodos possuem limitações, uma vez que se baseiam em parâmetros experimentais (ex.: DT_{50}, K_{oc}) sujeitos a erro e que não são rigorosamente constantes como seria desejável (10). O mapeamento DRASTIC da ZV1, apresentado na Figura 5.2, mostra que esta inclui extensas áreas de vulnerabilidade elevada (superior a 180), o que aliado a um sistema agrícola intensivo põe em risco a qualidade das águas subterrâneas.

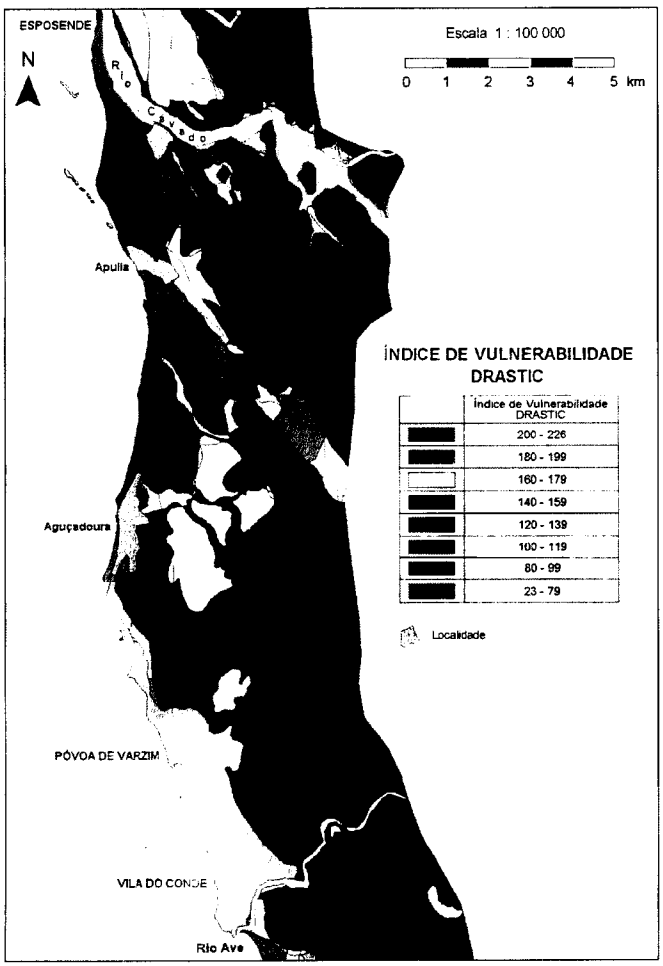


Figura 5.2 – Mapeamento de vulnerabilidade da ZV1 segundo o método DRASTIC

A vulnerabilidade específica frente a pressões poluentes por pesticidas foi ponderada no índice DRASTIC "pesticide", mas esse mapeamento não se encontra disponível para a ZV1.

5.2.2.1 Composição físico-química das águas subterrâneas

A composição físico-química das águas subterrâneas no aquífero livre Esposende - Vila do Conde sofre uma influência definitiva da sua exploração intensa e das elevadas taxas de recirculação. Sendo um aquífero costeiro, sofre igualmente uma influência progressiva da acção da água do mar. Pedrosa, classificou a fácies hidroquímica dos aquíferos litorais de Aguçadoura, Navais e Estela como cloretada sódica, podendo, às vezes, o ião bicarbonato sobrepor-se ao cloreto e o cálcio ao sódio. O resíduo seco e a dureza têm valores médios e o pH é, em geral, inferior a 7 (2). A poluição azotada de natureza orgânica e inorgânica é fruto da intensa actividade agrícola, sendo motivo de grande preocupação não só na ZV1 como a nível nacional e internacional. Um teor de carbono orgânico total da ordem dos 16 mg L^{-1}, tal como foi registado num dos pontos, não será um facto invulgar. Uma proporção significativa das águas subterrâneas da ZV1 é imprópria para consumo humano (2). A Tabela 5.2 apresenta a distribuição dos valores médios do pH, condutividade e concentração de nitratos em águas subterrâneas da ZV1. No Anexo III mostra-se a evolução desses parâmetros num período alargado segundo os valores disponibilizados no Sistema Nacional de Informação de Recursos Hídricos (SNIRH) para os mesmos pontos de amostragem utilizados no presente estudo (11). Os valores médios do pH registados nas amostras apresentam uma correlação evidente com a constituição dos solos: solos húmicos – pH < 6,5 e solos arenosos – pH > 6,5.

Tabela 5.2 – Distribuição dos locais de amostragem de acordo com os valores médios de pH, condutividade e concentração de nitratos encontrados nas águas subterrâneas

Amostras/pontos de amostragem		
pH (escala de Sorensen)		
pH < 6,5	pH > 6,5	pH variável
2, 4, 5, 14, 19, 20, 21, 22, 24, 25	1, 6, 8, 9, 10, 12, 13, 15, 16, 17, 18	2, 11
Condutividade (µS cm^{-1})		
até 400	até 800	até 1200
2, 2A, 5	1, 4, 9, 10, 13, 14, 19, 20, 22, 24, 25	6, 8, 11, 12, 15, 16, 17, 18, 21
Nitratos (mg L^{-1})		
< 50	< 150	< 300
1, 2A, 6, 8, 10, 13, 25	2, 4, 5, 9, 14, 15, 17, 19	11, 12, 16, 18, 20, 21, 22, 24

Nas últimas, por vezes também se verificam períodos de pH baixo. A distribuição dos valores da condutividade segue uma tendência semelhante à do pH. Assim, salvo raras excepções, a condutividade das águas subterrâneas pouco profundas obtidas em pontos de amostragem localizados em solos arenosos pode atingir os 1200 $\mu S\ cm^{-1}$, enquanto que nas águas mais profundas colhidas de solos rochosos a condutividade é geralmente inferior a 800 $\mu S\ cm^{-1}$. Relativamente à distribuição dos nitratos, esta parece seguir uma tendência provavelmente mais dependente da intensidade do uso do solo do que das suas propriedades físico-químicas.

5.2.2.2 Composição físico-química dos solos

A caracterização físico-química e textural dos solos da ZV1 foi efectuada em amostras correspondentes aos 5 pontos de amostragem seleccionados, de forma a representar a composição média desses solos até uma profundidade de 20 cm. Conforme se mostra na Tabela 5.3, os solos 1 e 18 distinguem-se dos restantes por apresentarem um conteúdo em matéria orgânica muito baixo, o mesmo acontecendo à humidade. Na verdade, ambos os solos têm um conteúdo em areia superior a 97%, o que faz deles solos claramente arenosos, ao contrário dos solos 5, 22 e 25 que são franco-arenosos.

Tabela 5.3 – Composição físico-química e propriedades texturais dos solos colhidos na ZV1

Parâmetro	Composição físico-química				
	Solo 1	Solo 5	Solo 18	Solo 22	Solo 25
pH (H_2O)	7,57	5,39	7,40	4,58	5,15
pH (KCl)	7,36	4,91	7,30	4,09	4,30
Matéria orgânica, %	1,6	3,8	2,1	4,9	2,8
Humidade, %	4,00	14,10	6,70	11,30	15,2
Condutividade eléctrica, mS cm^{-1}	0,71	1,72	1,39	2,99	0,35
Saturação, %	Saturada	37,0	Saturada	29,4	16,8
Fósforo (E.R.mod.), ppm P_2O_5	>200	>200	>200	>200	148
Potássio (E.R.mod.), ppm K_2O	198	>200	136	>200	160
Cálcio de troca, meq Ca/100g	5,09	4,35	7,16	3,93	2,33
Magnésio de troca, meq Mg/100g	0,29	0,76	0,19	0,82	0,43
Potássio de troca, meq K/100g	0,29	0,63	0,03	0,64	0,37
Sódio de troca, meq Na/100g	0,1	0,23	0,06	0,35	0,10
Capacidade de troca, meq /100g	5,68	16,16	6,32	19,52	19,20
	Propriedades texturais				
Areia grossa, %	78,49	19,55	89,70	38,78	40,54
Areia fina, %	20,74	46,95	8,28	31,35	32,70
Limo, %	0,28	20,87	1,14	15,37	15,77
Argila, %	0,50	12,63	0,88	14,49	10,99
Textura	Arenoso	Franco-arenoso	Arenoso	Franco-arenoso	Franco-arenoso

5.2.3 Condições climáticas

Segundo a informação disponível aquando da publicação da Portaria n.º 556/2003, os dados meteorológicos indicavam, na estação de Viana do Castelo, uma precipitação média anual de 1427 mm, repartindo-se num semestre chuvoso (com 73,9% da precipitação média anual), coincidente com a estação fria, e num semestre seco (com 26,1% da precipitação média anual), na época quente (8). A Figura 5.3 apresenta a evolução das temperaturas mínima e máxima assim como da precipitação registada na estação de Viana do Castelo, no período entre Maio de 2001 e Novembro de 2003. Nesse período, a temperatura média do ar foi de 16 ºC (ano de 2002 – 15,3 ºC) com uma variação regular ao longo do ano, atingindo os valores médios semanais mínimos entre Dezembro e Janeiro (-1,1 – 3,9 ºC) e os valores médios semanais máximos entre Junho e Agosto (29,3 – 32,5 ºC). Os períodos de precipitação mais intensa registaram-se em Outubro de 2001, Outubro de 2002, Novembro de 2002, Janeiro de 2003 e fim de Fevereiro desse ano. A precipitação média semanal no período em análise foi de 25,5 mm (ano de 2002 – 30,0 mm). O período de insolação ronda as 2400 horas por ano (≈ 140 kCal cm^{-2}), valor este que aumenta na direcção sul de Portugal (9).

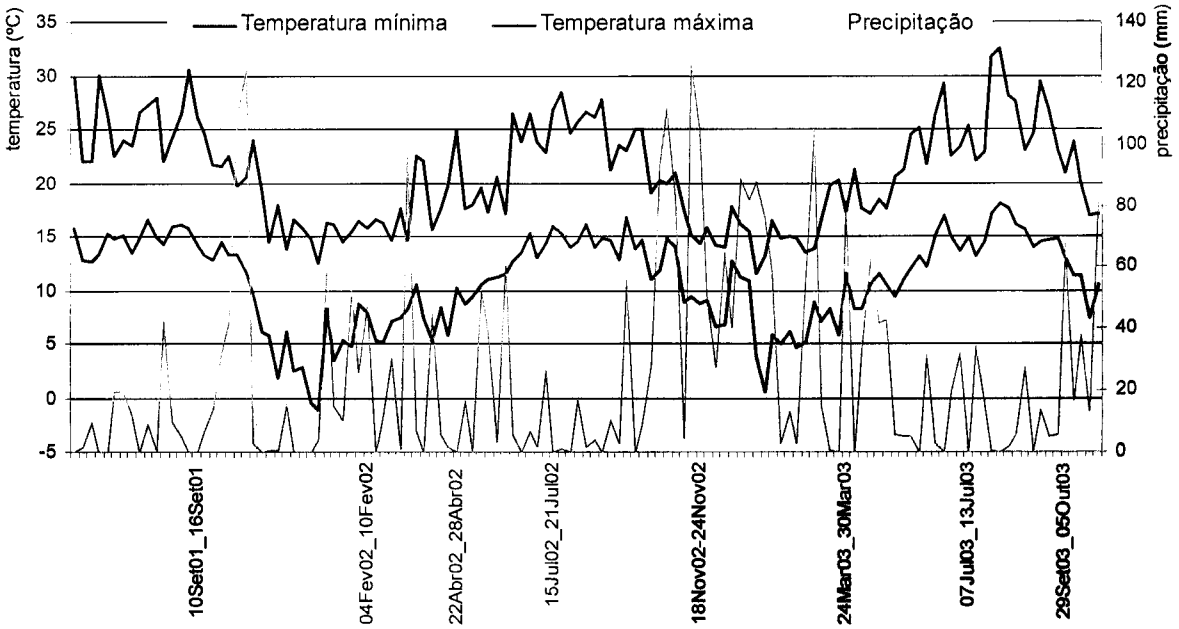


Figura 5.3 – Variação dos valores da temperatura média semanal mínima e máxima no período entre 28 de Maio de 2001 e 02 de Novembro de 2003, bem como dos valores de precipitação registados na estação meteorológica de Viana do Castelo.

5.2.4 Práticas culturais e fitossanitárias

Na ZV1 encontramos dois sistemas agrários predominantes: nos depósitos dunares pratica-se uma horticultura intensiva de ar livre e em estufa; mais para o interior, a pecuária é a actividade principal em que a produção vegetal é usada como forragem para alimentação animal. Assim, os sistemas culturais dominantes na ZV1, considerando a sua rotatividade anual, são os seguintes (3):

- Culturas hortícolas de ar livre em época de Primavera-Verão, com ou sem incorporação de resíduos das culturas
- Culturas hortícolas de ar livre em época de Outono-Inverno, com ou sem incorporação de resíduos das culturas
- Culturas hortícolas em estufa
- Cultura de milho forragem em época de Primavera-Verão
- Cultura forrageira de azevém em época de Outono-Inverno

As culturas hortícolas de ar livre mais praticadas na ZV1 são a alface (*Latuca sativa*), a cebola (*Allium cepa*), a couve comum ou penca (*Brassica oleracea*), a couve repolho ou couve-coração (*Brassica oleracea var. capitata*), o alho francês (*Allium porrum*), o nabo (*Brassica napus*), a salsa (*Petroselium sativum*) e a abóbora (*Cucurbita máxima*). A cenoura (*Daucus carota*) não tem no presente a expressão de outrora. Quanto às culturas hortícolas de estufa, deve mencionar-se a alface, o tomate (*Lycopersicum esculentum*), a meloa (*Cucumis melo*), o pepino (*Cucumis sativus*), o feijão verde (*Phaseolus vulgaris*), o nabo e o pimento (*Capsicum annum*). No caso das forrageiras, a rotação normal é do milho forragem (*Zea mays*) seguido da cultura do azevém (3).

A Tabela 5.4 apresenta um registo das culturas existentes nos diferentes pontos de amostragem, no momento da colheita das respectivas amostras. Relativamente à aplicação de pesticidas nestas culturas, segue um padrão de alguma variabilidade. Dada a existência no mercado de grande variedade de formulações com a mesma finalidade, a escolha depende individualmente de cada agricultor. Além disso, o mercado de pesticidas é bastante activo, particularmente nos últimos anos em que tem sido efectuada uma revisão das substâncias activas autorizadas. Por exemplo, a utilização de lindano foi proibida durante o período de monitorização. Na Tabela 5.5 apresenta-se uma lista das substâncias activas com registo de uso no período anterior a 1995. Na mesma tabela constam também pesticidas dos quais foram encontradas evidências (embalagens) de utilização na zona, no período de amostragem.

Tabela 5.4 – Culturas encontradas ao longo do período de monitorização nas proximidades dos locais de amostragem

Local	Culturas encontradas na ZV1	Sistema
1	Batata e milho	ar livre
2	Nabo, feijão, cebola, couve-penca, alface e nabiça	ar livre
2A	Alface, meloa, feijão, couve-repolho e tomate	estufa
4	Couve-penca, cenoura, batata, cebola e milho	ar livre
5	Azevém e milho	ar livre
6	Cebola, alho, feijão, milho, alface, batata, nabo, couve-penca e alho francês	ar livre
8	Couve-penca, couve-repolho, cenoura e cebola	ar livre e estufa
9	Azevém e milho	ar livre
10	Milho, couve-penca e azevém	ar livre
11	Feijão verde, tomate, couve-penca, cebola, alface e alho francês	ar livre e estufa
12	Cenoura, cebola, couve-penca e batata	ar livre
13	Tomate, nabo, pimento e alface	estufa
14	Tomate, alface, abóbora, couve-penca e alho francês	ar livre e estufa
15	Cebola, alho francês, brócolos, couve-penca, couve-repolho, couve-flor e couve-roxa	ar livre
16	Couve-penca, cenoura, cebola e nabo	ar livre
17	Alface, alho francês, tomate e meloa	estufa
18	Cebola, alho francês e couve-penca	ar livre
19	Azevém e milho	ar livre
20	Nabo, cebola, couve-penca e batata	ar livre
21	Espinafres, beterraba, alface, meloa, pepino e nabo	estufa
22	Azevém, milho, cebola e batata	ar livre
24	Tomate, milho e alface	ar livre e estufa
25	Milho	ar livre

Tabela 5.5 – Pesticidas com registo ou evidências de utilização na ZV1

Pesticidas usados antes de 1995			Período 2001-2003	
Benalaxil	Hexaconazol	Monolinurão	Amitraze	Paraquato
Captana	Iprodiona	Ofurace	Benomil	Pendimetalina
Cimoxanil	λ-cialotrina	Paraquato	Carbendazima	
Ciflutrina	Lindano	Paratião	Clorpirifos	
Ciromazina	Linurão	Pendimetalina	Cimoxanil	
Deltametrina	Mancozebe	Permetrina	Cipermetrina	
Dimetoato	Metalaxil	Prometrina	Dimetoato	
Dinocape	Metanil	Propinebe	Lindano	
Fenamifos	Metabenztiazurão	Propizamida	Mancozebe	
Fluazifope-butilo	Metiocarbe	Zirame	Metalaxil	
Fonofos	Metobromurão		Ofurace	
Glifosato	Metolacloro		Oxifluorfeno	

5.3 DETERMINAÇÃO DE PESTICIDAS EM ÁGUAS E SOLOS

5.3.1 Amostragem

A colheita de amostras de água e solo na ZV1 processou-se em simultâneo nas seguintes datas: 12 de Setembro de 2001, 06 de Fevereiro, 26 de Abril, 19 de Julho e 18 de Novembro de 2002, 27 de Março, 11 de Julho e 01 de Outubro de 2003. As amostras de água subterrânea foram colhidas em poços com auxílio de um recipiente intermédio sendo posteriormente transferida uma alíquota para um frasco de vidro âmbar de 40 mL. Por seu lado, as amostras de solo foram colhidas a diferentes profundidades (superfície, 10 cm e 20 cm) em cada ponto de amostragem, com o auxílio de uma sonda de meia cana, e acondicionadas em papel de alumínio. Ambos os tipos de amostras foram conservadas numa arca térmica com condensador de frio até darem entrada no laboratório. Posteriormente, as amostras de água foram mantidas a 4 ºC até ao momento da análise, enquanto que os solos foram sujeitos a um tratamento de secagem e tamisação e igualmente conservados a 4 ºC.

5.3.2 Análise e quantificação

Para a análise das amostras ambientais foram desenvolvidos métodos analíticos adaptados com base em tecnologias avançadas de extracção/concentração, análise e confirmação. O conjunto de pesticidas alvo, incluído nos métodos analíticos, foi estabelecido tendo em conta:

- a susceptibilidade desses compostos serem analisados por cromatografia gasosa
- a sua persistência ambiental, nomeadamente os pesticidas classificados como POPs
- a inclusão na lista de substâncias prioritárias no domínio da política da água, fixada pela Decisão n.º 2455/2001/CE, que altera a Directiva 2000/60/CE (DQA)
- o volume de produção ou de utilização dos pesticidas
- outros pesticidas e produtos de degradação reconhecidos a nível internacional como contaminantes relevantes.
- informação prévia sobre a utilização de certos pesticidas na zona em estudo.

Os elementos apresentados acima forneceram apenas indícios sobre uma eventual contaminação ambiental uma vez que, até à data, se desconhece qualquer monitorização sistemática de pesticidas naquelas águas e solos.

Todo o processo de optimização e validação de metodologias analíticas adequadas a este programa de monitorização será discutido no capítulo seguinte, constituído pelas publicações

científicas decorrentes do trabalho experimental. Os resultados obtidos na análise de amostras de água subterrânea e de solo serão igualmente tratados mais adiante. Salvo raras excepções, para cada conjunto de amostras resultante de uma campanha de amostragem, foram construídas novas curvas de calibração. A gama de concentrações usada nas calibrações para a análise de águas foi entre 0,01 - 1,0 $\mu g\ L^{-1}$, através de GC-ECD-TSD, e entre 0,001 - 1,0 $\mu g\ L^{-1}$, através de GC-MS, injectando 5 ou 6 padrões, respectivamente, e em triplicado. Para a análise de solos, as calibrações foram produzidas na gama de 1,0 – 100 $\mu g\ kg^{-1}$, em triplicado e acompanhadas do branco.

A quantificação de pesticidas em águas nas três primeiras colheitas foi efectuada por GC-ECD-TSD. As calibrações para OCPs e piretróides foram sempre efectuadas com o recurso a um padrão interno, enquanto que as calibrações para OPPs e triazinas apenas o foram na primeira colheita. A partir da colheita de Julho de 2002 as análises passaram a ser efectuadas por GC-MS, sendo os pesticidas quantificados em modo MS-MS através de calibrações externas. A análise dos extractos de solos foi efectuada por GC-MS e a sua quantificação teve por base calibrações externas preparadas com padrões em matriz similar à das amostras reais, para minimizar os erros de quantificação. Após a análise das amostras da primeira colheita o método sofreu alguns melhoramentos, principalmente em termos dos LODs. A confirmação dos pesticidas provisoriamente identificados pelos respectivos tempos de retenção foi efectuada através de GC-MS, quer em amostras de água quer de solo, usando os critérios mencionados na descrição dos respectivos métodos. Nas análises de água efectuadas por GC-MS-MS, a confirmação foi obtida directamente na mesma análise através do espectro de MS-MS característico dos pesticidas nas condições experimentais usadas.

5.4 VALIDAÇÃO E CONTROLO DE QUALIDADE ANALÍTICO

Actualmente, a todas as entidades que produzam resultados analíticos são impostos requisitos de qualidade, uma vez que as suas determinações químicas são a base para importantes decisões de carácter ambiental, comercial, legal, de saúde, entre outras (12, 13). Assim, torna-se imperioso garantir que esses resultados são correctos, são de confiança e são comparáveis aos que se obteriam com um método alternativo (14). O maior benefício da produção de resultados fiáveis e comparáveis é a aceitação mútua e generalizada por parte de produtores, vendedores, entidades reguladoras e governos, quer nacionais quer internacionais. A qualidade de um resultado analítico é definida como a sua perfeita adequação ao fim a que

se destina ("fitness for purpose") e pode ser estimada pelo grau de satisfação que lhe é atribuído pelo utilizador dessa informação (12). O uso de instrumentação analítica muito sofisticada ou a alta qualificação dos analistas, embora proveitosos, não são garantia imediata de qualidade, que precisa de ser demonstrada. As vias de garantia de qualidade mais comuns são: o uso de métodos analíticos validados, a aplicação de critérios de controlo de qualidade e a demonstração de capacidade analítica em ensaios de aptidão (12). Parâmetros como: LODs, precisão, exactidão, recuperações, linearidade e robustez representam requisitos essenciais na avaliação do desempenho de um método analítico. Normalmente, esta caracterização é feita usando brancos, duplicados, padrões controlo, amostras, etc., segundo um processo de validação exaustivo (15).

As necessidades de controlo de qualidade dependem das características do método que se pretende aferir e do nível de exigência/confiança nos resultados analíticos (12, 13). Certas situações requerem apenas controlo de qualidade interno enquanto que outras necessitam de controlo de qualidade externo. O controlo de qualidade externo fornece evidências conjuntas do desempenho do laboratório e da qualidade do analista. Este controlo pode ser conduzido através da análise de materiais de referência certificados e da participação em ensaios interlaboratoriais. Essencialmente, o controlo de qualidade deve incidir em todas as fases do processo analítico sujeitas a erro, desde a amostragem e armazenamento até à análise (12).

Neste estudo de monitorização, ao mesmo tempo que se analisaram as amostras alvo foram também efectuados outros ensaios, com vista a aferir o estado de funcionamento dos métodos usados. Incluem-se aqui os brancos analíticos e de campo, os padrões controlo e diversos duplicados de amostras. Os brancos nunca revelaram sinais de contaminação. Em média, os resultados de pesticidas obtidos nos duplicados das amostras de água situaram-se entre 86 e 114%, com valores extremos de 70 e 133%. Exceptua-se o valor de 43% obtido num duplicado da análise de endossulfão sulfato, registado com uma concentração muito próxima do respectivo LOQ. Os duplicados da análise de pesticidas em solos originaram valores, em média, entre 62 e 112%, obtendo-se um caso excepcional de 37% relativo à quantificação de uma concentração de 4,4'-DDD próxima do LOQ do método. Note-se que, no caso dos solos, os duplicados foram analisados com calibrações distintas e distanciadas no tempo (cerca de 3 meses), facto que pode explicar parte da maior variabilidade encontrada. Os resultados dos padrões controlo serão tratados na secção que se segue.

5.4.1 Cartas de controlo de qualidade

A performance dos sistemas analíticos tem evoluído continuamente contudo, a sua aplicação a amostras reais em rotina exige cuidados adicionais. Variações nos factores relativos à preparação prévia das amostras, aos sistemas de medição (cromatográficos) e variações ambientais são causas frequentes de desvios (sistemáticos e aleatórios). A exactidão das medições em análise ambiental é difícil de atingir, embora extremamente importante (13). Uma das formas mais usual e simples de monitorizar o funcionamento dos sistemas analíticos ao longo do tempo é através do uso das cartas de controlo de "Shewhart" (16, 17). Um processo de medida está sob controlo estatístico quando a precisão e a exactidão dos resultados são mantidas em valores típicos. As cartas de "Shewhart" assentam no princípio de que um processo sob controlo estatístico apenas apresentará flutuações devidas a causas ditas "normais", ou seja, erros aleatórios provenientes de pequenas e múltiplas causas comuns inerentes aos sistemas de medição. A ocorrência de causas de erro "especiais", inesperadas, conduzirá o sistema analítico a uma situação de fora de controlo. Em princípio, as causas especiais poderão ser identificadas e corrigidas por intervenção do analista de forma a retomar o controlo do método, evitando assim que se tornem fonte de erros sistemáticos permanentes (16, 18). Em casos determinados, pode acontecer que um método sob controlo estatístico esteja a ser afectado por erros sistemáticos, os quais poderão ser evidenciados em estudos pontuais de exactidão, após estabilização/controlo estatístico do método (19). Assim, a principal função das cartas de controlo é auxiliar na distinção da ocorrência de causas de erro comuns das causas especiais, que contribuem para a variabilidade de um processo (20)

Em análise química são diversas as cartas de controlo com utilidade: cartas de médias/indivíduos, cartas de amplitudes/amplitudes móveis, cartas de brancos, cartas de padrões controlo, cartas de recuperações, cartas de duplicados, cartas de declives de rectas de calibração, etc., conforme se julgue necessário o controlo das diversas facetas do método analítico. As cartas de recuperações ou de amostras de controlo dão sobretudo informação sobre a parte de preparação da amostra enquanto que as cartas de declives dão informação sobre a estabilidade do sistema de medição (21).

Tipicamente, as cartas de controlo de "Shewhart" são gráficos contendo linhas horizontais que representam os limites de aviso ($\pm 2\sigma$) e de controlo ($\pm 3\sigma$), relativamente à média ($\bar{x}$), onde são representados os valores obtidos nas medições. Os parâmetros da carta devem ser estabelecidos com base num número elevado de observações de uma população com distribuição normal, excluindo todos os valores fora de controlo (16, 18, 20). Não está

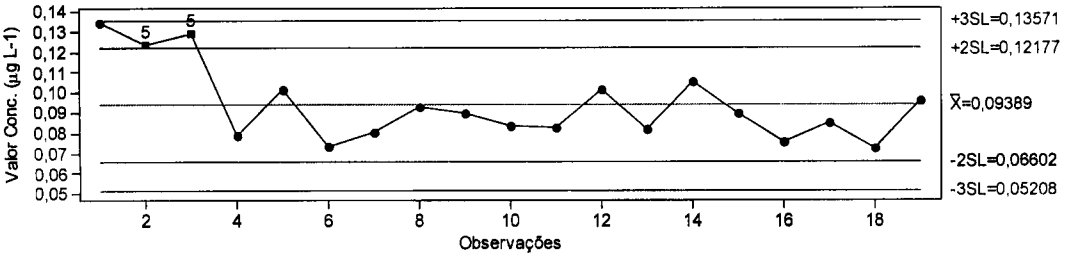
claramente estudada qual a robustez das cartas de "Shewhart" face a populações com uma distribuição não normal, no entanto, vários autores sugerem que as conclusões só perdem validade quando o grau de não normalidade é acentuado (16). A norma ISO 8258:1991 "Shewhart control charts" estabelece a metodologia a seguir para a criação de cartas de controlo (22). As cartas de controlo de indivíduos e de amplitudes móveis são das que têm maior aplicabilidade em análise química (20), e as que foram usadas neste trabalho. Caso as leituras das amostras sejam únicas, é normal obter também valores individuais para os padrões controlo. Quando o número de observações é reduzido (cartas de parâmetro desconhecido), a definição dos limites superior (LSC) e inferior de controlo (LIC) é efectuada considerando a média aritmética dos indivíduos ($\overline{X}$) e a média das amplitudes móveis ($\overline{R}$), segundo as seguintes fórmulas (18, 19, 22):

$$LSC = \overline{X} + \frac{3}{d_2} \times \overline{R} \quad \text{e} \quad LIC = \overline{X} - \frac{3}{d_2} \times \overline{R}, \qquad d_2 = 1{,}128$$

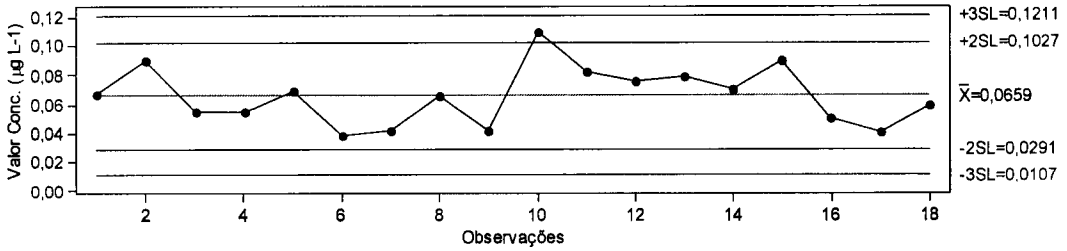
A razão do uso desta forma de cálculo ($\overline{R}/d_2$) reside no facto de, para amostragens pequenas, ser menos afectada por variações bruscas do método, resultantes da ocorrência de causas especiais, do que o desvio padrão (σ) (18, 20). Os limites provisórios devem ser revistos periodicamente (por exemplo, n=25). Apenas quando for possível estimar os valores típicos da população (cartas de parâmetro conhecido), os limites de controlo definitivos são estipulados com base no valor de σ de um conjunto elevado de observações sob controlo (19).

A periodicidade do controlo de qualidade adoptado neste trabalho incluiu a análise de um padrão controlo, tipicamente por cada série de 10 amostras. Na análise de águas, o padrão controlo usado foi uma amostra de água ultrapura fortificada com pesticidas numa concentração de 0,1 $\mu g\ L^{-1}$ (excepto a desetilatrazina, 1,0 $\mu g\ L^{-1}$), ao passo que para os solos, o padrão controlo consistiu num solo isento de pesticidas fortificado com uma concentração de 10 $\mu g\ kg^{-1}$ (excepto o clordano, 1,0 $\mu g\ kg^{-1}$; desetilatrazina e dimetoato, 100 $\mu g\ kg^{-1}$). Em ambos os casos, os padrões controlo foram sujeitos ao procedimento integral aplicado às amostras. Dado o elevado número de cartas de controlo produzidas, apenas serão apresentadas as correspondentes aos 10 pesticidas mais frequentemente quantificados em cada matriz. Na Figura 5.4 estão representadas as cartas construídas na análise de pesticidas em águas com o método SPME-GC-MS-MS (exclui as 3 primeiras colheitas) enquanto que na Figura 5.5 mostram-se as cartas construídas na análise de solos por USE-GC-MS. Os pontos a vermelho indicam que ocorreu uma das situações contemplada nas regras de interpretação das cartas, identificada pelo seu número.

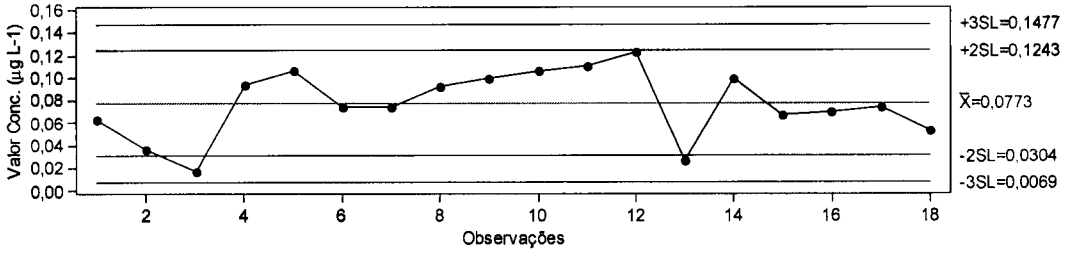
Lindano



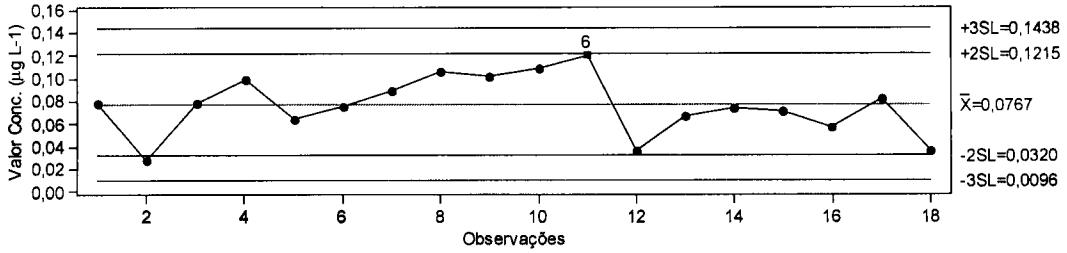
Endossulfão Sulfato



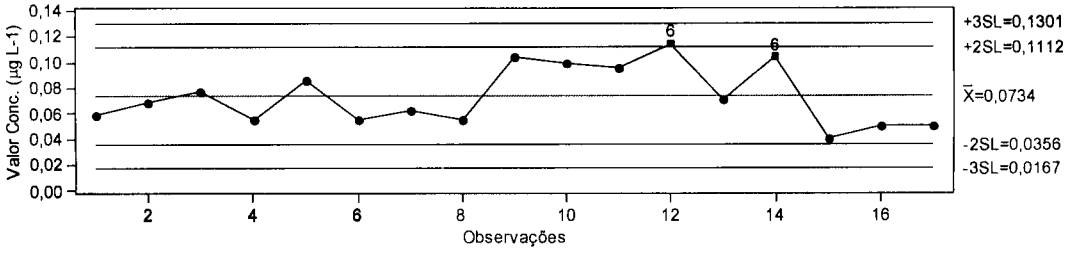
Endossulfão I



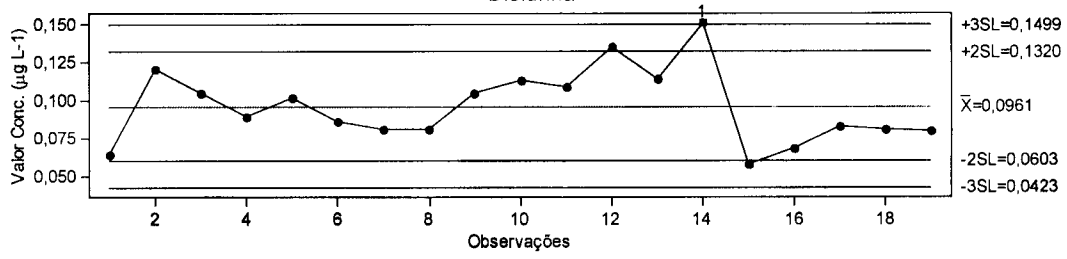
Endossulfão II



Pendimetalina



Dieldrina



(continuação)

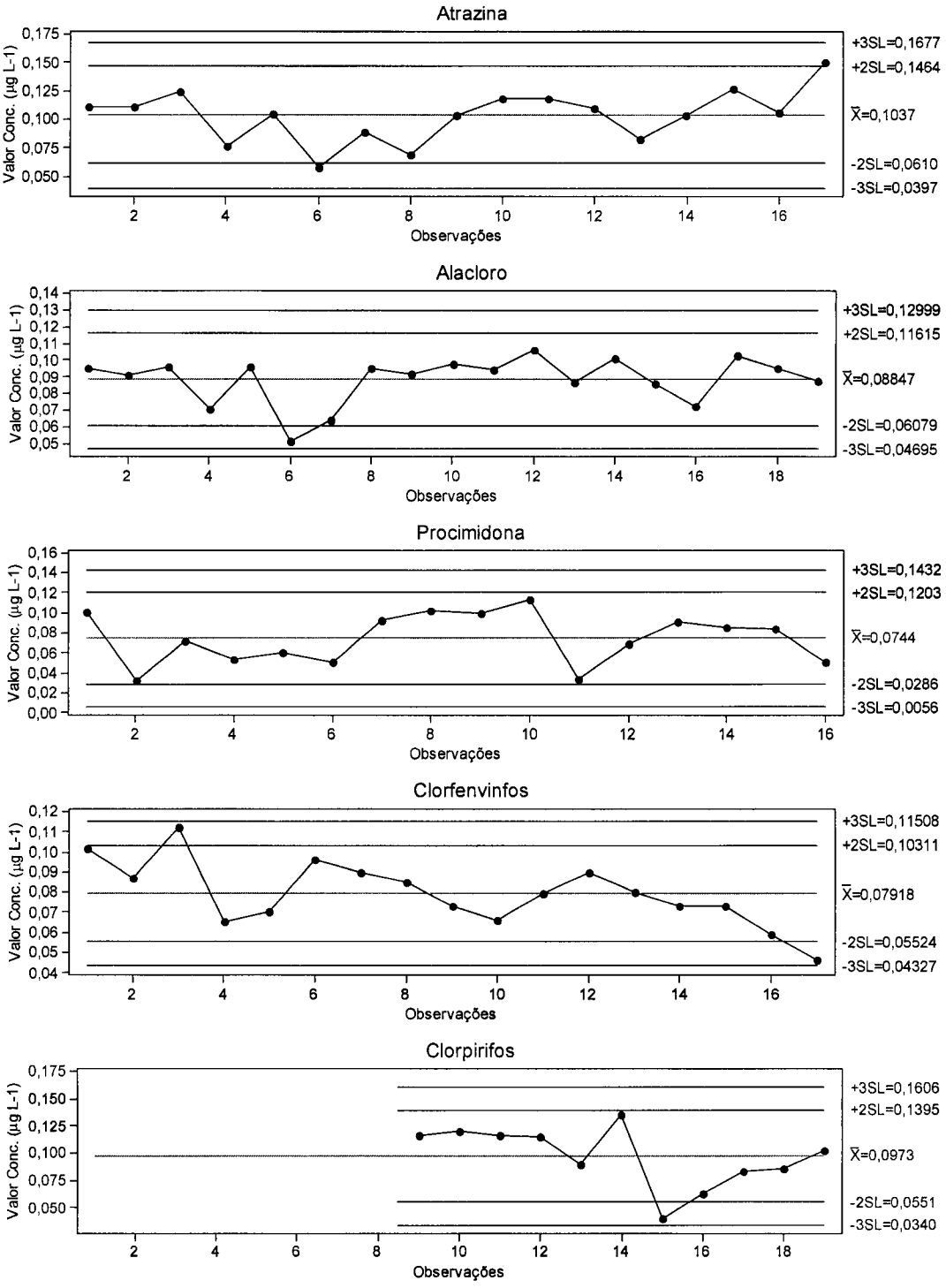
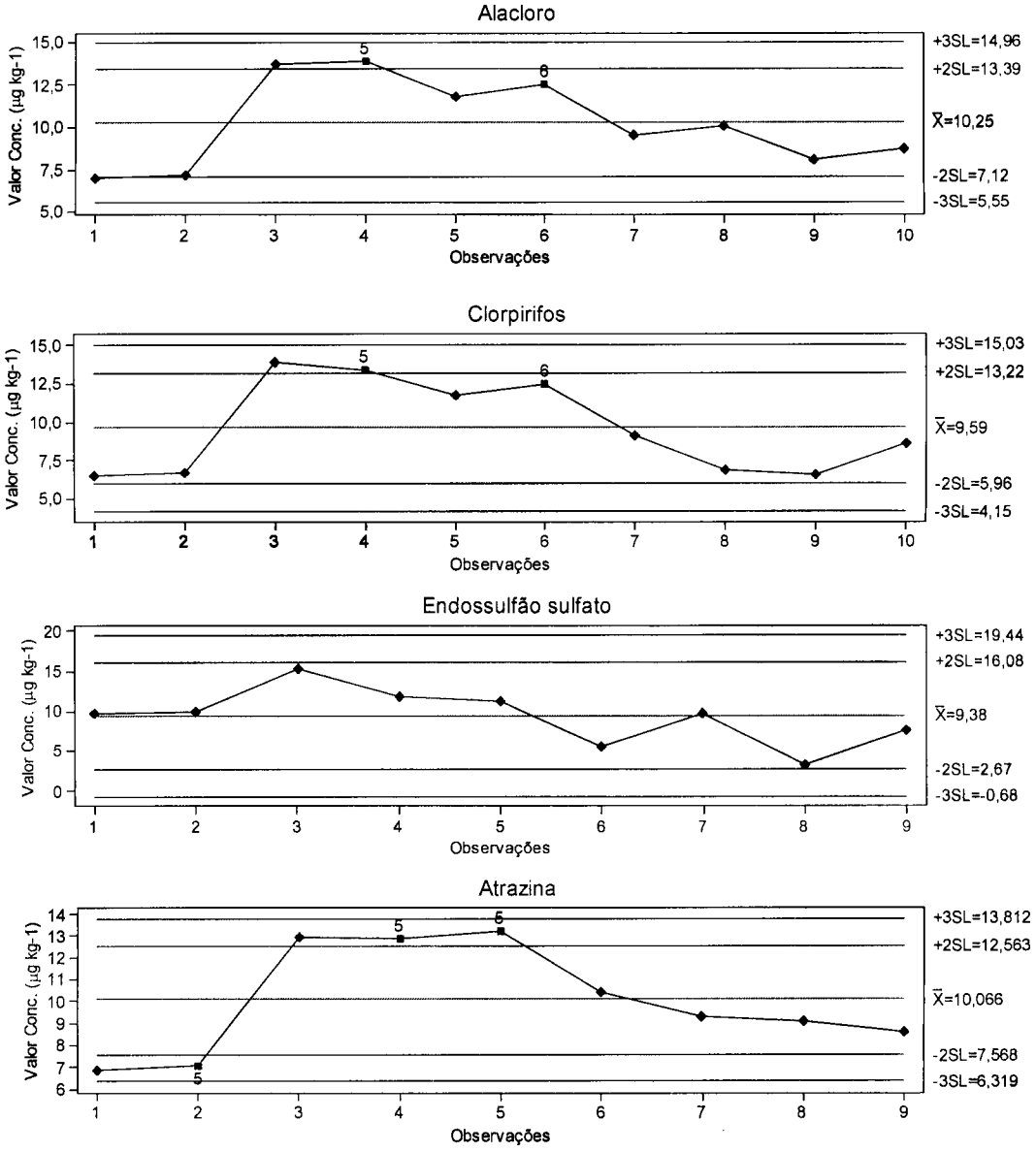


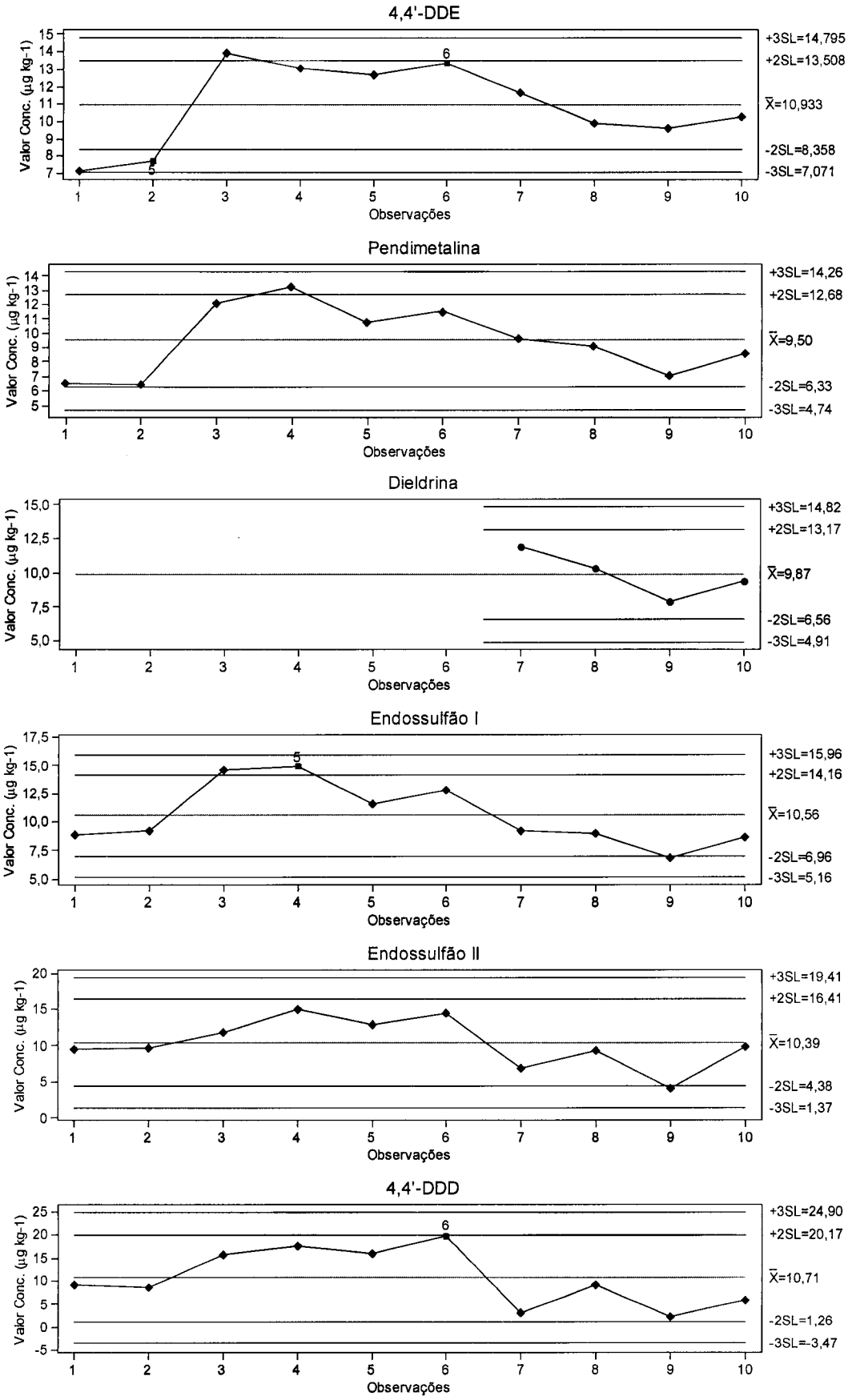
Figura 5.4 – Cartas de controlo de indivíduos para os pesticidas mais encontrados nas águas

A regra número 1 dá a indicação de que o processo se encontra fora de controlo e ocorre quando algum ponto excede os limites de controlo (LSC e LIC). Nas cartas foram, por vezes, verificadas certas regras que traduzem uma tendência não aleatória. São exemplo disso, as

regras 5 e 6 que indicam, respectivamente, a ocorrência de 2 de 3 pontos consecutivos entre as linhas de aviso e de controlo e, 4 de 5 pontos consecutivos entre as linhas de vigilância (1σ) e as linhas de controlo (18, 22). As situações relatadas acima ocorreram de uma forma esporádica. As calibrações frequentes permitiram repor o controlo estatístico nas situações de desvio. Deve notar-se, no entanto, que o número limitado de observações registadas dos padrões controlo não possibilita a fixação dos parâmetros definitivos das cartas, sendo os limites, por vezes, algo alargados. Esta é, aliás, uma limitação das cartas de indivíduos, sendo sabido que os limites impostos são menos apertados do que nas cartas de médias. As cartas do clorpirifos e da dieldrina encontram-se incompletas, devido ao início tardio da sua quantificação, no primeiro caso, e à insuficiência do LOQ inicialmente usado, no segundo.



(continuação)



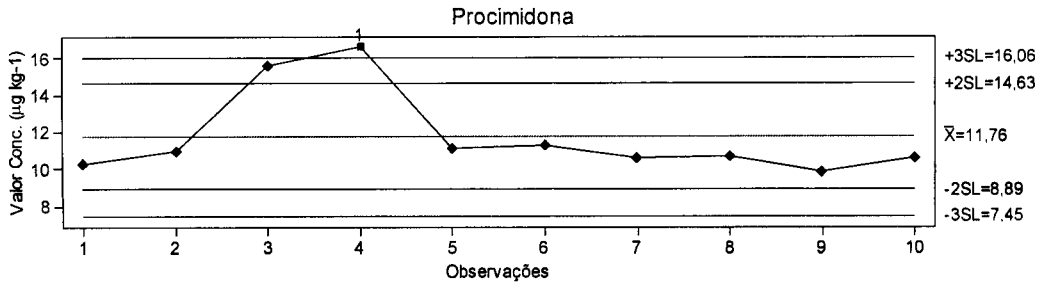


Figura 5.5 – Cartas de controlo de indivíduos para os pesticidas mais frequentes nos solos

5.4.2 Ensaios interlaboratoriais (Aquacheck)

A participação em ensaios interlaboratoriais permite extrair informação importante acerca do ciclo completo da amostra, incluindo a recepção, análise e tratamento dos resultados, que quando incluídos em programas de garantia de qualidade visam a melhoria da qualidade dos resultados. Os ensaios interlaboratoriais podem ser conduzidos com três objectivos: avaliar o desempenho de um método analítico, avaliar a competência de um laboratório ou permitir a certificação do conteúdo de materiais de referência (14). Na prática, por vezes, a participação nestes ensaios cumpre vários objectivos simultaneamente, podendo fornecer indicações quer para a melhoria do desempenho dos métodos analíticos quer do laboratório no seu todo, incluindo a qualificação dos analistas. De forma explícita, ou implícita, na maior parte das vezes a participação em ensaios interlaboratoriais, designados ensaios de aptidão, destina-se a provar a competência técnica para a execução de certas determinações (14). Ela constitui uma forma clara e evidente de demonstrar capacidade analítica (15). Apesar de ser uma das formas melhor aceite, uma vez que é supervisionada por organizações competentes, não é a única forma de atingir esse objectivo. Actualmente, esta vertente dos ensaios interlaboratoriais é a mais procurada, sobrepondo-se relativamente ao uso como meio de provar a comparabilidade dos métodos e dos resultados (23).

Não obstante ser uma área em expansão, ainda não existem ensaios interlaboratoriais para todos os tipos de parâmetros. È um critério óbvio que os analitos (pesticidas) escolhidos devam ter grande relevância para os laboratórios interessados. Dois requisitos fundamentais de um ensaio interlaboratorial são: a confiança no valor considerado de referência, que deve ser o mais rigoroso possível e rastreável a padrões internacionais e; a representatividade, homogeneidade e estabilidade das amostras, de forma a reproduzirem tanto quanto possível a rotina do laboratório (24).

Presentemente, os ensaios interlaboratorias a decorrer na Europa relacionados com a análise de pesticidas de uso corrente (em águas) são escassos, apenas a Aquacheck o faz de forma regular. A instabilidade dos pesticidas em água, devido ao pH, temperatura ou volatilidade, impõe limitações na execução destes ensaios (14). Os ensaios da Aquacheck para a determinação de pesticidas em águas são dos mais abrangentes no número de analitos, dos que reúnem maior número de laboratórios participantes e dos mais reconhecidos pelas entidades reguladoras nacionais e internacionais.

A participação em ensaios interlaboratoriais é uma das formas mais fiáveis de avaliar a exactidão dos resultados analíticos, embora noutras circunstâncias o objectivo também possa ser a avaliação da precisão ou robustez (reprodutibilidade interlaboratorial) dos métodos. A submissão de métodos analíticos com uma componente inovadora a este tipo de ensaios é de todo o interesse, por forma a demonstrar a possibilidade de substituirem os métodos convencionais com um desempenho equivalente ou mesmo superior (14).

No caso presente, a participação nos ensaios promovidos pela Aquacheck visou fundamentalmente a validação e melhoramento de um método de análise de pesticidas em águas baseado numa técnica de preparação de amostras recente, a SPME, para a qual este tipo de estudos é ainda muito incipiente (25). O método utilizado consistiu na extracção dos pesticidas com uma fibra de PDMS-DVB, seguida da análise cromatográfica por GC-ECD-TSD (26). Este mesmo método foi usado para a análise de amostras de água subterrânea no âmbito do programa de monitorização conduzido na ZV1 nas três primeiras colheitas pelo que, a participação nos ensaios da Aquacheck teve também uma componente de controlo de qualidade externo. Segundo o esquema da Aquacheck, os grupos de pesticidas contemplados nos ensaios foram: grupo 7A (organoclorados), grupo 8 (herbicidas, dos quais se analisaram as triazinas) e grupo 9 (organofosforados). O protocolo analítico consistiu na fortificação de uma matriz de água subterrânea com uma solução-mãe desses pesticidas, numa concentração desconhecida. As instruções de preparação preconizam a execução de uma diluição de 10 000 vezes, homogeneização e análise segundo os procedimentos normais do laboratório. Após o tratamento estatístico dos resultados, a Aquacheck emite um relatório com o valor médio encontrado pelos laboratórios participantes para cada parâmetro, o valor de referência e os desvios de cada laboratório, em percentagem e na escala dos "z-scores", classificando assim a qualidade dos resultados. A classificação geralmente aceite estabelece que: $|z\text{-score}| < 2$ – resultado satisfatório; $2 < |z\text{-score}| < 3$ – resultado questionável; $|z\text{-score}| > 3$ – resultado não satisfatório (14, 23). Esta classificação está em sintonia com o critério de 20% que a Aquacheck definiu como o erro máximo para considerar os resultados satisfatórios (27).

Este limite é já mais permissivo que o valor de 17% contestado de forma veemente por alguns autores, considerando as dificuldades inerentes à análise de vestígios de pesticidas em águas (14).

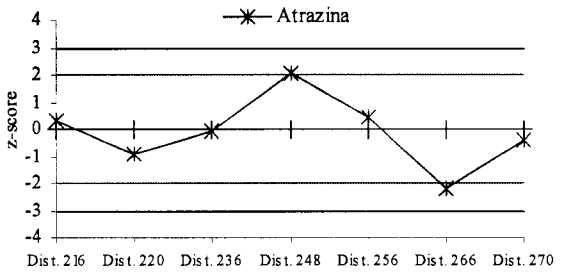
Neste estudo, foram recebidas para análise amostras das distribuições: 216 (Outubro de 2001), 220 (Janeiro de 2002), 236 (Outubro de 2002), 240 (Janeiro de 2003), 248 (Junho de 2003), 256 (Outubro de 2003), 266 (Maio de 2004) e 270 (Julho de 2004). Os pesticidas incluídos nos ensaios e a gama de concentrações fornecida são apresentados na Tabela 5.6.

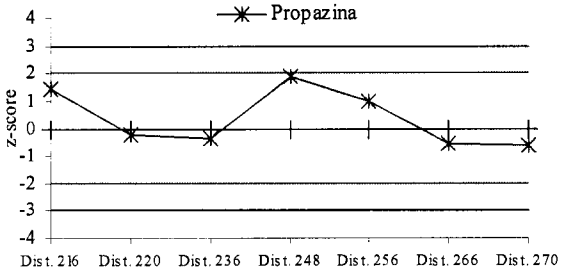
Tabela 5.6 – Pesticidas analisados nos ensaios da Aquacheck bem como a gama das concentrações determinadas e o número de resultados satisfatórios

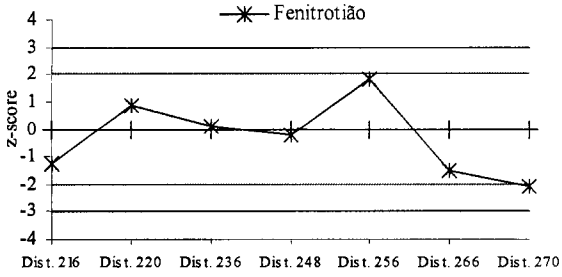
Pesticidas	Grupo	Gama de concentrações (ng L^{-1})	nº distribuições	|z-score| ≤ 2
Endrina	7A	17,0 – 96,5	8	7
Dieldrina	7A	10,5 – 86,1	8	4
Aldrina	7A	13,8 – 79,5	8	1
4,4'-DDT	7A	28,5 – 107,0	7	5
Lindano	7A	11,7 – 95,1	8	7
Endossulfão	7A	14,9 – 105,0	8	6
Hexaclorobenzeno	7A	10,7 – 46,8	8	5
Heptacloro	7A	10,0 – 20,3	0	0
Heptacloro epóxido	7A	7,7 – 32,3	4	4
Simazina	8	40,8 – 165,0	1	1
Atrazina	8	23,4 – 198,0	7	5
Propazina	8	53,9 – 148,0	7	7
Azinfos-metilo	9	29,5 – 104,0	1	0
Diclorvos	9	61,1 - 117,0	2	1
Fenitrotião	9	47,1 – 116,5	7	6
Malatião	9	41,8 – 101,3	7	3
Clorfenvinfos	9	24,9 – 85,1	6	3
Diazinão	9	36,2 – 111,0	7	6
Paratião-etilo	9	57,6 – 113,0	7	4
Paratião-metilo	9	22,5 – 75,9	7	6

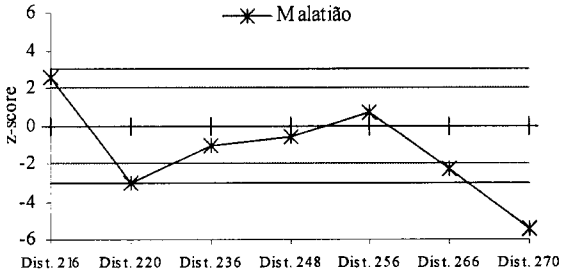
Os pesticidas do grupo 7A são os que foram fornecidos em concentrações mais baixas, em especial os casos do heptacloro, heptacloro epóxido e do hexaclorobenzeno, ao invés das triazinas. A Tabela 5.6 mostra igualmente o número de resultados satisfatórios (|z-score|≤ 2), por pesticida, obtidos nas distribuições efectivamente analisadas. Os pesticidas que merecem maior realce, pelo aspecto negativo, são o malatião, o clorfenvinfos, a dieldrina e, especialmente, a aldrina. Conforme é visível nos gráficos de evolução dos "z-scores" constantes da Figura 5.6, os resultados do malatião e do clorfenvinfos têm um comportamento inconstante, ao passo que no caso da aldrina e da dieldrina se regista uma tendência de convergência para o valor de referência. Por dificuldades criadas pelos LOQs relativamente

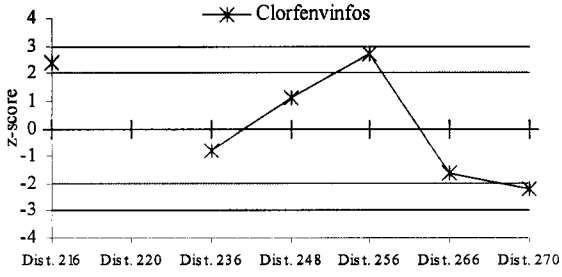
mais elevados da simazina, azinfos-metilo, diclorvos e heptacloro, agravadas por uma interferência neste último, foram apenas reportados resultados destes pesticidas para escassos ensaios, face à incerteza acrescida que os afectava.

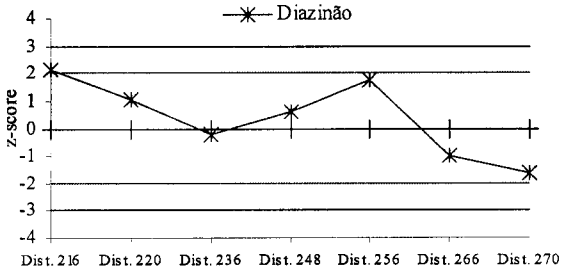


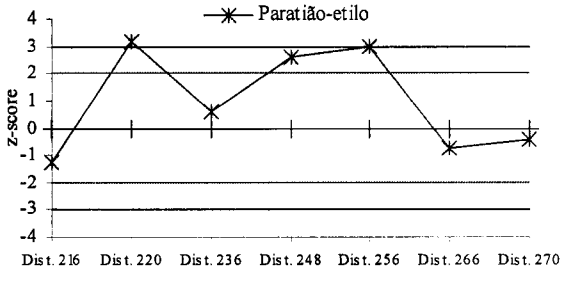


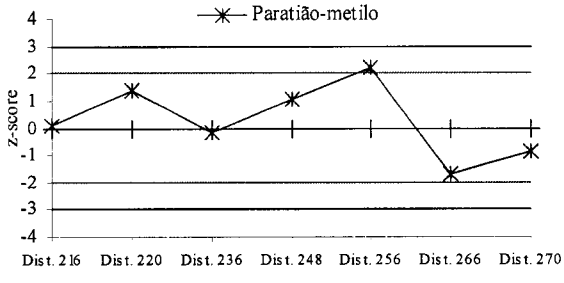


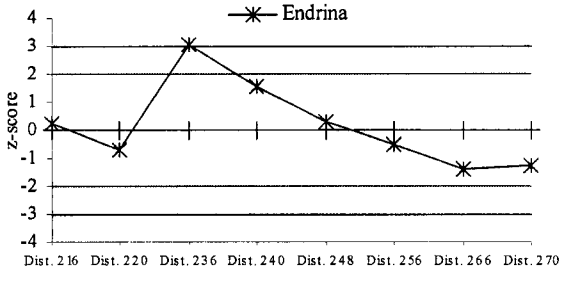


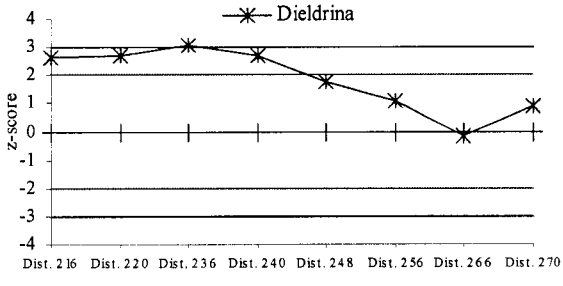












(continuação)

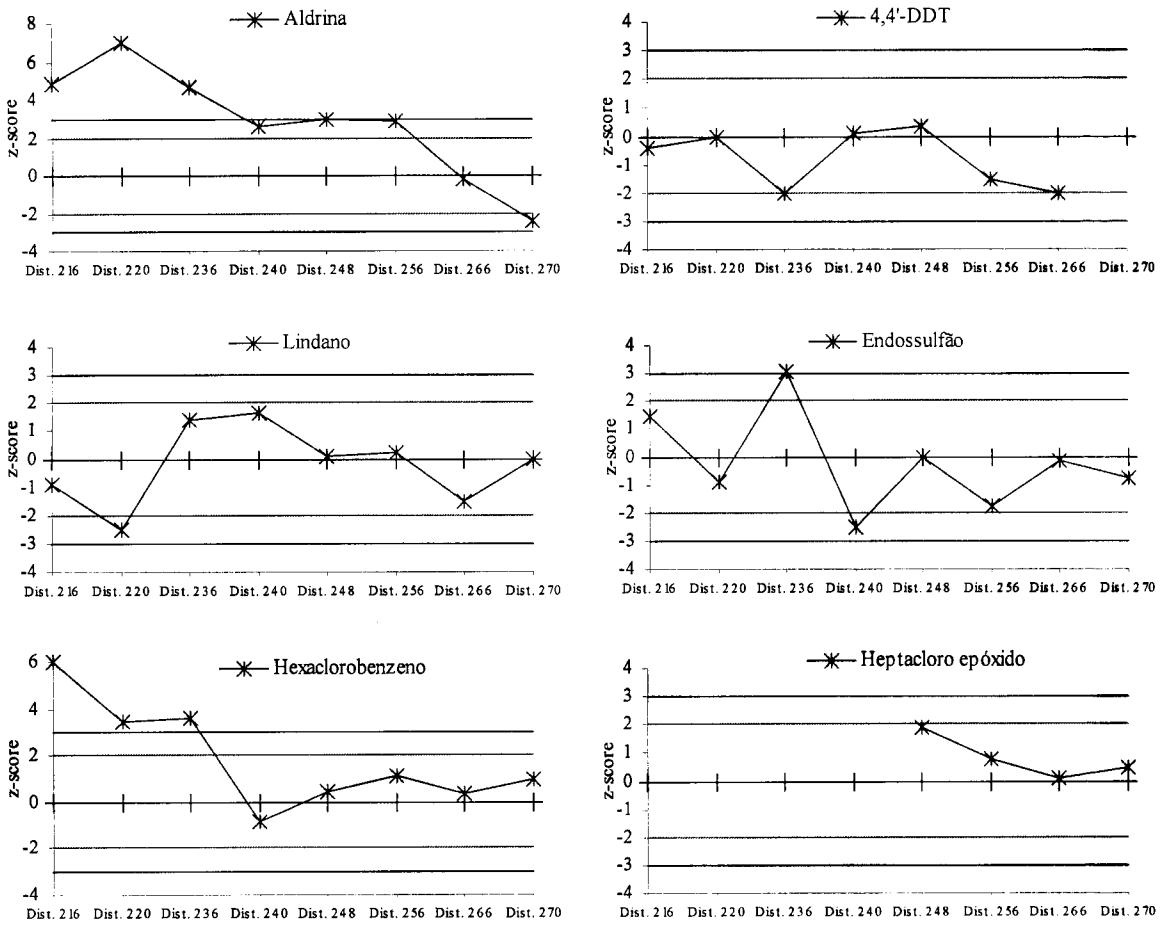


Figura 5.6 – Evolução dos "z-scores" obtidos na análise de diversos pesticidas incluídos no programa de ensaios interlaboratoriais da Aquacheck

Barceló e Hennion, citando um trabalho de Lacorte e Barceló, relataram os resultados da participação em três ensaios da Aquacheck para a análise de OPPs, segundo um procedimento de SPE (14). Os pesticidas que registaram maiores desvios foram o diclorvos, malatião e clorfenvinfos, o que constitui uma coincidência quase total com os resultados aqui obtidos por SPME também para OPPs. Numa primeira análise, esta constatação parece indicar que a menor exactidão dos resultados se deve a características dos pesticidas, por exemplo instabilidade em meio aquoso, minorando a influência da técnica de preparação da amostra nessa variabilidade. Ferrari et al. conduziram um ensaio de colaboração interlaboratorial com 10 participantes, para a análise de triazinas por SPME em concentrações com relevância ambiental. Os autores concluíram que a técnica possui uma linearidade, precisão e exactidão que a tornam apta para substituir as técnicas convencionais com vantagens em vários aspectos (25), facto também aqui confirmado.

No que concerne à quantificação dos OCPs, foram tomadas algumas medidas no sentido de melhorar a exactidão dos resultados, nomeadamente, através do uso de uma mistura padrão de calibração disponível comercialmente, substituindo os padrões individuais preparados no laboratório, e a redução da gama de trabalho. Estas medidas produziram resultados favoráveis no caso do hexaclorobenzeno e da dieldrina, no entanto, persistiram problemas na quantificação da aldrina. Neste caso, constatou-se que as soluções padrão de calibração rapidamente originavam picos cromatográficos menos intensos algum tempo após a preparação, facto que poderá estar relacionado com a elevada hidrofobia do composto, e consequente tendência para adsorver às paredes do frasco.

Uma outra causa de inexactidão dos resultados deriva da constituição da matriz. De facto, verificou-se que a composição iónica das águas subterrâneas fornecidas para os ensaios divergia da composição típica encontrada nas águas subterrâneas da zona norte de Portugal, menos mineralizadas. A dureza total daquelas águas variou entre 160 e 270 mg L^{-1} $CaCO_3$ enquanto que o pH situou-se entre 7,6 e 8,3. Só por si, o pH alcalino predispõe para uma maior hidrólise de alguns OPPs (28), enquanto que a maior mineralização (e força iónica) é susceptível de alterar, em certa medida, o estado de equilíbrio que condiciona a eficiência da extracção por SPME. Embora não existam provas da significância destes efeitos de matriz, a percepção visual permite afirmar que alguma influência física sobre a fibra terá ocorrido pela deposição de sais na sua superfície. Será também oportuno mencionar que, uma possível causa de desvio nos resultados obtidos neste tipo de ensaio se deve à presença de outros pesticidas em solução não contemplados nos métodos de análise e que poderão ocasionar interferência, nomeadamente por co-eluição. È o caso do paratião-etilo, que nas condições usadas co-elui parcialmente com o fentião, presente em concentrações variáveis mas não quantificado através do método adoptado. A presença de inúmeros herbicidas, além das triazinas, não se fez notar dada a sua inadequação à análise por cromatografia gasosa.

Gardner e Dobbs sugerem a obtenção de cerca de 75% de resultados satisfatórios em ensaios interlaboratoriais como um indicador de bom desempenho, não dispensando contudo o acompanhamento dos métodos em causa com o controlo de qualidade interno (23). Considerando que a SPME é uma técnica relativamente recente, e o processo de melhoramento dos resultados que foi implementado, a obtenção de 69% de "z-scores" satisfatórios constitui um desempenho promissor. Refira-se, no entanto, a limitação relativa à não quantificação de alguns pesticidas, em resultado do facto dos respectivos LOQs serem menos adequados às concentrações em análise.

5.5 BIBLIOGRAFIA

(1) Ministério do Ambiente – Avaliação de riscos nas masseiras de Estela. Direcção Regional do Ambiente e Recursos Naturais do Norte, 1996.

(2) Pedrosa, M.Y. – Carta Hidrogeológica de Portugal (escala 1/200 000): notícia explicativa da folha 1. Instituto Geológico e Mineiro, Departamento de Hidrogeologia, Lisboa, 1999, 70 p.

(3) Agostinho, J.M.F.S., Fernando, R.M.C. – A fertilização azotada na zona vulnerável n.º 1. In: Aplicação de Práticas Agrícolas para Redução da Lixiviação de Nitratos na Zona Vulnerável do Aquífero Livre de Esposende e Vila do Conde. Relatório Final do Projecto Agro 35. Instituto Nacional de Investigação Agrária, Lisboa, 2005.

(4) Portaria n.º 1100/2004 – Aprova a lista das zonas vulneráveis e as cartas das zonas vulneráveis do território português. Diário da República n.º 208, série I-B, de 03-09-2004.

(5) Portaria n.º 833/2005 – Aprova novas zonas vulneráveis. Diário da República n.º 179, série I-B, de 16-09-2005.

(6) Macedo, M.E. – Evolução da concentração de nitratos nas águas subterrâneas verificada durante o ano de 1997: relatório 1997. Instituto da Água, Direcção de Serviços de Recursos Hídricos, 1998.

(7) Heitor, A.M. – Variação da qualidade das águas na zona das masseiras, freguesia de Estela, Concelho da Póvoa de Varzim. Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge, Porto, 1998.

(8) Portaria n.º 556/2003 – Aprova o programa de acção para a zona vulnerável n.º 1, constituída pelo aquífero livre entre Esposende e Vila do Conde. Diário da República n.º 159, série I-B, de 12-07-2003.

(9) Lobo-Ferreira, J.P., Oliveira, M.M., Moinante, M.J., Theves, T., Diamantino, C. – Estudo de avaliação da vulnerabilidade da capacidade de recepção das águas e zonas costeiras em Portugal. Meios receptores e suas características: meios subterrâneos. Relatório específico R3.3, Relatório 237/95 - GIAS, Laboratório Nacional de Engenharia Civil, Lisboa, 1995, 585 p.

(10) Worral, F., Thomsen, M. – Quantum *vs.* topological descriptors in the development of molecular models of groundwater pollution by pesticides. Chemosphere, 54 (2004) 585-596.

(11) SNIRH – Sistema de Informação dos Recursos Hídricos, Instituto Nacional da Água, 2005, http://snirh.inag.pt/, páginas visualizadas em 19 de Dezembro de 2005.

(12) Martínez-Vidal, J.L., Frenich, A.G., González, F.J.E. – Internal quality-control criteria for environmental monitoring of organic micro-contaminants in water. Trends Anal. Chem., 22 (2003) 34-40.

(13) ACS Committee on Environmental Improvement, Subcommittee on Environmental Analytical Chemistry – Guidelines for data acquisition and data quality evaluation in environmental chemistry. Anal. Chem., 52 (1980) 2242-2249.

(14) Barceló, D., Hennion, M.-C. - Trace determination of pesticides and their degradation products in water. Elsevier Science B.V, Amsterdão, Holanda, 1997.

(15) Taverniers, I., de Loose, M., van Bockstaele, E. – Trends in quality in the analytical laboratory. II. Analytical method validation and quality assurance. Trends Anal. Chem., 23 (2004) 535-552.

(16) Nijhuis, A., de Jong, S., Vandeginste, B.G.M. – The application of multivariate quality control in

gas chromatography. Chemometrics Intell. Lab. Syst, 47 (1999) 107-125.

(17) Hirata, Y.A. – Gráficos de controlo para laboratórios de ensaios. Biológico 64(2) (2002) 183-185, São Paulo, Brasil.

(18) Mullins, E. – Introduction to control charts in the analytical laboratory: tutorial review. Analyst, 119 (1994) 369-375.

(19) Guia RELACRE 9 – Alguns Exemplos de Cartas de Controlo em Laboratórios de Análise Química. RELACRE, Lisboa, 1998, pp. 25-44.

(20) Lawson, J., Erjavec, J. – Modern Statistics for Engeneering and Quality Improvement. Duxbury Thomson Learning, Pacific Groove, California, EUA, 2001, 637-693.

(21) González, F.J.E., Torres, M.E.H., Frenich, A.G., Vidal, J.L.M., Campaña, A.M.G. – Internal quality control and management tools for enhancing the stability of results in pesticide multi-residue analytical methods. Trends Anal. Chem., 23 (2004) 361-369.

(22) ISO 8258:1991 - Shewhart control charts, 1ª edição, International Organization for Standardization, Genebra, Suíça, 1991.

(23) Gardner, M., Dobbs, T. – How well should laboratories perform in proficiency tests. J. Environ. Monit., 6 (2004) 559-562.

(24) Cortez, L., Duarte, A., Hundewadt, A., Schmidt, A., Steffen, B., Tholen, D., Fostel, H., Papadakis, I., del Monte, M.G., Boley, N., van Berkel, P.M. – How to interpret information from proficiency test exercises concerning the relative performance of accredited laboratories. Accredit. Qual. Assur., 8 (2003) 511-513.

(25) Ferrari, R., Nilsson, T., Arena, R., Arlati, P., Bartolucci, G., Basla, R., Cioni, F., Del Carlo, G., Dellavedova, P., Fattore, E., Fungi, M., Grote, C., Guidotte, M., Morgillo, S., Müller, L., Volante, L. – Inter-laboratory validation of solid-phase microextraction for the determination of triazine herbicides and their degradation products at ng/l level in water samples. J. Chromatogr. A, 795 (1998) 371-376.

(26) Gonçalves, C., Alpendurada, M.F. – Multiresidue method for the simultaneous determination of four groups of pesticides in ground and drinking waters, using solid-phase microextraction-gas chromatography with electron capture and thermionic specific detection. J. Chromatogr. A, 968 (2002) 177-190.

(27) Aquacheck – Scheme operation 2003-4.doc. Documentação distribuida aos participantes.

(28) Tomlin, C.D.S. – The e-Pesticide Manual. 11th edition, version 1.1, British Crop Protection Council, UK, 1999-2000.

Capítulo 6

DESENVOLVIMENTO DE MÉTODOS ANALÍTICOS AVANÇADOS PARA A DETERMINAÇÃO DE PESTICIDAS EM ÁGUAS E SOLOS

6.1 COMPARAÇÃO DE TRÊS FIBRAS DE POLI(DIMETILSILOXANO)-DIVINILBENZENO PARA A ANÁLISE DE MULTIRESÍDUOS DE PESTICIDAS EM AMOSTRAS DE ÁGUA: ESTRUTURA E EFICIÊNCIA

Com base na publicação:

Gonçalves, C., Alpendurada, M.F. – Comparison of three different poly(dimethylsiloxane)-divinylbenzene fibres for the analysis of pesticide multiresidues: structure and efficiency. J. Chromatogr. A, 963 (2002) 19-26.

ELSEVIER

Journal of Chromatography A, 963 (2002) 19–26

JOURNAL OF CHROMATOGRAPHY A

www.elsevier.com/locate/chroma

Comparison of three different poly(dimethylsiloxane)–divinylbenzene fibres for the analysis of pesticide multiresidues in water samples: structure and efficiency

C. Gonçalves[a], M.F. Alpendurada[a,b,*]

[a]*Laboratory of Hydrology, Faculty of Pharmacy, University of Porto, Rua Anibal Cunha, 164/4050-047 Porto, Portugal*
[b]*IAREN-Water Institute of the Northern Region, Rua Anibal Cunha, 164/4050-047 Porto, Portugal*

Abstract

Despite the continuing development of SPME (solid-phase microextraction) fibre coatings, their selection presents some difficulties for analysts in choosing the appropriate fibre for a certain application. There are two distinct types of SPME coatings available commercially. The most widely used are poly(dimethylsiloxane) (PDMS) and poly(acrylate) (PA). Supelco has developed new mixed phases consisting of porous polymer particles, either poly(divinylbenzene) (DVB) or Carboxen suspended in a matrix of PDMS or Carbowax for extracting analytes via adsorption. In addition to the nature of the extracting phase, the thickness of the polymeric film must be taken into account and, surprisingly, the construction of the fibres when apparently they bear the same coating, as it is the case of the three PDMS–DVB fibres available. Other fibre structure properties not well explored were identified and must be taken into consideration. To elucidate their extraction efficiency, three PDMS–DVB fibres, namely 60 μm for HPLC use, 65 μm for GC use and 65 μm StableFlex for GC use, were compared with regard to the extraction of 36 compounds included in four pesticide groups. The first was particularly suited for the extraction of organophosphorus pesticides and triazines whereas the StableFlex exhibited advantages in the analysis of organochlorine pesticides and pyrethroids. An explanation for the extraction differences is suggested based on the different structure of the fibres. Detection limits in the range of 1–10 ng/l for organochlorine pesticides, 1–30 ng/l for organophosphorus pesticides, 8–50 ng/l for triazines and 10–20 ng/l for pyrethroids were attained in a method using the 60 μm PDMS–DVB fibre. The fibre maintains its performance at well above 100 extractions with between-day precision below 10%. © 2002 Elsevier Science B.V. All rights reserved.

Keywords: Water analysis; Solid-phase microextraction; Pesticides; Organochlorine compounds; Organophosphorus compounds; Pyrethroids; Triazines

1. Introduction

Solid-phase microextraction (SPME) was first developed in 1989 at the University of Waterloo (Ontario, Canada) by Pawliszyn and co-workers and has been marketed since 1993 by Supelco. Since then the technique has grown enormously [1].

It can integrate sampling, extraction, concentration and sample introduction into a single uninterrupted process, resulting in high sample throughput. Its important features are its simplicity, low cost, rapidity, selectivity and sensitivity when combined with appropriate detection modes [1–3]. SPME has been applied to analyses in various fields, such as en-

*Corresponding author. Tel.: +351-22-2078958; fax: +351-22-2086258.

0021-9673/02/$ – see front matter © 2002 Elsevier Science B.V. All rights reserved.
PII: S0021-9673(02)00645-3

vironmental chemistry, forensic chemistry, pharmaceutical, food, beverage, and flavour [4–7].

SPME has been introduced as a modern alternative to traditional sample preparation technology. It eliminates the use of organic solvents, and substantially shortens the time of analysis and allows convenient automation of the sample preparation step [1,2,4,8,9].

Nowadays, in addition to the former general purpose poly(dimethylsiloxane) (PDMS) and poly(acrylate) (PA) coated fibres, a large number of fibre coatings based on solid sorbents are available, namely PDMS–divinylbenzene (DVB), Carbowax–DVB, Carbowax–templated resin (TR), Carboxen–PDMS and DVB–Carboxen–PDMS coated fibres. Extraction of analytes by the new porous polymer SPME fibres with mixed coatings is primarily based on adsorption rather than absorption [10,11]. The surface has a limited number of adsorption sites that can be occupied by the sorbate that, by definition, upholds in an immobile state, whereas when absorption is considered, diffusion into the bulk of the coating takes place and the properties of the coating remain unchanged until a significant amount of analyte is absorbed [10].

Diffusion coefficients of organic molecules into the bulk of DVB and Carboxen are so small that within the time interval of an SPME analysis, all the molecules probably remain attached to its surface. Otherwise, persistent carryover would be observed. Adsorption is therefore considered the only extraction mechanism for those coatings [10]. Furthermore, while absorption is a noncompetitive process, adsorption is by definition competitive [1]. The presence of matrix interfering compounds can affect both the amount extracted and the linear range of the method for porous polymer fibres [8,10].

Some of these porous polymer SPME fibres with bipolar characteristics can be very useful for the simultaneous analysis of pesticides enlarging the spectrum of the SPME applications [11]. One of the critical aspects on SPME optimisation is the selection of the appropriate fibre. Many aspects of the extraction mechanism and properties of the new polymeric coatings have not been completely described [11].

The aim of the present paper was to elucidate the different behaviour noted for the PDMS–DVB fibres proposed for GC use, HPLC use and StableFlex for GC use, in the analysis of 36 compounds included in four groups of pesticides: organochlorine, organophosphorus, pyrethroid and triazine pesticides, in water samples.

2. Experimental

2.1. Chemicals, reagents and equipment

The various pesticides were supplied by Riedel-de Häen (Seelze, Germany). Individual stock standard solutions of organochlorine pesticides [(1) hexachlorobutadiene (HCBD), (2) hexachlorobenzene (HCB), (3) lindane (LIN), (4) heptachlor (HEP), (5) aldrin (ALD), (6) isodrin (ISO), (7) heptachlor epoxide (HEE), (8) γ-chlordane (CLD), (9) endosulfan I (ENS I), (10) 4,4′-DDE, (11) dieldrin (DIE), (12) endrin (END), (13) endosulfan II (ENS II), (14) 4,4′-DDD, (15) endosulfan sulfate (ENSS), (16) 4,4′-DDT] were prepared in *n*-hexane, pyrethroids [(17) λ-cyhalothrin (CYH), (18) α-cypermethrin (CYP)] in ethyl acetate, and the organophosphorus pesticides [(19) dichlorvos (DIC), (20) dimethoate (DIM), (25) fonofos (FON), (26) diazinon (DIA), (27) parathion-methyl (PARM), (29) fenitrothion (FET), (30) malathion (MAL), (31) parathion (PAR), (32) chlorfenvinphos E (CLF E), (33) chlorfenvinphos Z (CLF Z), (34) tetrachlorvinphos (TET), (35) fenamiphos (FEM), (36) azinphos-methyl (AZI)] and triazine pesticides [(21) simazine (SIM), (22) atrazine (ATR), (23) propazine (PRO), (24) terbuthylazine (TER), (28) simetryn (SYN)] were dissolved in methanol. Four separate group mixtures were then prepared in methanol containing 2 mg/l of each individual pesticide.

All solvents used were of LiChrosolv gradient grade purchased from Merck (Darmstadt, Germany). Ultrapure Milli-Q water (Millipore, Molsheim, France) was used to prepare the working aqueous solutions. The aqueous pesticide solution used for SPME experiments contained the following concentrations: 0.1 μg/l of organochlorine pesticides (OCPs), organophosphorous pesticides (OPPs) and pyrethroids, 1 μg/l of triazines and DIM and 0.01 μg/l of TET and CLD (used as internal standards). The analyte concentrations and SPME extraction

conditions were such as to give a regular peak height profile.

Chromatographic analyses were carried out in a Varian 3400 CX (Walnut Creek, CA, USA) gas chromatograph. The injector and detector temperatures were set at 250 and 310 °C, respectively. All compounds were resolved in a MDN-5 column (30 m×0.32 mm I.D.×0.25 μm film) (Supelco, Bellefonte, PA, USA) using helium as carrier gas and detected either by electron-capture detection (ECD) or thermoionic-specific detection (TSD) operating at 3.2 A intensity, as more convenient.

At the column exit an adjustable splitter (SGE Europe, Milton Keynes, UK) was interposed in order to give about a tenth of the effluent flow to the ECD system and the remainder to the TSD system. This instrumental configuration allowed quantitating all 36 pesticides in a single 30-min chromatographic run following a single extraction procedure.

2.2. SPME fibres and extraction conditions

The PDMS–DVB coating was selected in its three commercially available fibre types: 65 μm PDMS–DVB for GC, 60 μm PMDS–DVB for HPLC and 65 μm PDMS–DVB StableFlex for GC use. All SPME fibres (Supelco) used for manual sampling were new at the beginning of the study and were conditioned according to the suppliers' instructions.

Several SPME analyses of the aqueous pesticide solution were carried out with each of the fibres in order to collect the peak area data for each individual pesticide. Extractions were performed by immersion of the fibre in 3 ml of sample, with permanent stirring and temperature control at 60 °C. Neither pH adjustment nor ionic strength correction was needed. Analytes were allowed to adsorb onto the fibre at this fixed conditions for 30 min, and afterwards desorbed in the hot injection port of the gas chromatograph, for 5 min. Fibre blanks were also obtained in order to elucidate the contribution of the fibre to the interfering peaks appearing in the chromatogram.

3. Results and discussion

For a better understanding of the sorption mechanism and where it takes place in an adsorption type SPME fibre, especially the PDMS–DVB coated fibre, it would be worthwhile to know its configuration. Table 1 contains information related to the PDMS–DVB fibre structure in terms of different layers and thickness.

The PDMS–DVB coating volume and fibre surface area were calculated based on the data of the different layers and considering its cylindrical geometry.

As can be realised from the data presented, the PDMS–DVB coating is not directly attached to the fused-silica fibre. Instead, two layers of polymeric film acting as a support for the PDMS–DVB coating are inserted just below the thick porous polymer sorbent. The DVB polymer is suspended in a liquid phase, which promotes the adhesion of the sorbent to the fibre.

With the aim of comparing the extraction efficiency of the three apparently similar PDMS–DVB fibre types (differing only 5 μm in the coating thickness), six replicate extractions of the aqueous pesticide solution were made with each of the fibres.

Table 1
Structure composition of the three different PDMS–DVB porous polymer fibres available

	SPME fibre		
	PDMS–DVB 65 μm	PDMS–DVB, 60 μm	PDMS–DVB, StableFlex 65 μm
Fused silica core diameter (μm)	110	80	80
Polymer of core (μm)	0	40	20
PDMS precoat (μm)	5	0	5
PDMS–DVB coating thickness (μm)	65	60	65
Total diameter of fibre (μm)	250–260	280–290	260–270
PDMS–DVB coating volume (μl)	0.378	0.415	0.398
Fibre surface area (mm^2)	7.85	8.80	8.17

The entire experiment was conducted on the same day to avoid additional variation due to samples and equipment bias. With this procedure different results can only be attributed to different extraction efficiency of the fibres.

Figs. 1 and 2 display the results obtained, by representing the mean peak area for each of the pesticides and each of the fibres tested. Fig. 1 presents the results for the pesticides detected by ECD i.e. OCPs and pyrethroids, whereas Fig. 2 presents the results for the pesticides detected by TSD i.e. OPPs and triazines. Compounds were grouped by chemical family and detection system, which allows for easier comprehension of the general behaviour towards the different fibres.

Among the OCPs and pyrethroid pesticides, the StableFlex fibre gives significantly better results for 11 compounds. The fibre proposed for HPLC achieves the second best results for most of compounds, with the exception of LIN, which have a special affinity for this fibre resulting in a significantly better extraction. Considering the HCB and LIN molecular formulas it should be noted that they have a reversed extraction intensity when using a PDMS fibre (results not shown) or the present PDMS–DVB fibres, which highlights the advantage of using a different extraction mechanism.

When analysing OPPs and triazines using the three PDMS–DVB fibres, the chromatographic pattern completely changed. The PDMS–DVB fibre indicated for HPLC use is the chosen one, achieving significantly better results for eleven pesticides. This group contains the most problematic compounds so further considerations must be made. The triazine pesticides lack sensitivity when detected via TSD. Accordingly, the HPLC-indicated fibre should be used. The PDMS–DVB coating was demonstrated to be well suited for extracting many nitrogen containing analytes [12] particularly in the 60 μm form. Furthermore, the OPPs DIC and AZI require enhanced sensitivity, which can only be obtained using the HPLC-indicated fibre. In fact, AZI cannot be

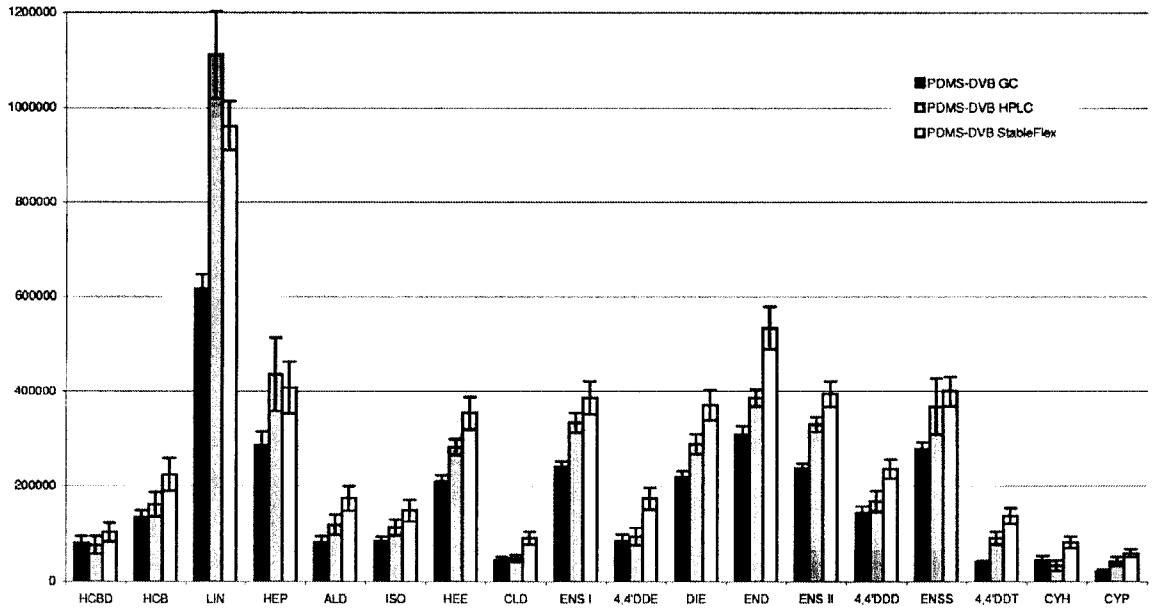


Fig. 1. Graphical display of mean peak areas (n=6) obtained for OCPs and pyrethroid pesticides (ECD) in a comparative study involving the three PDMS–DVB type fibres described in the experimental section. Error bars represent the confidence interval for the mean at 95% confidence level.

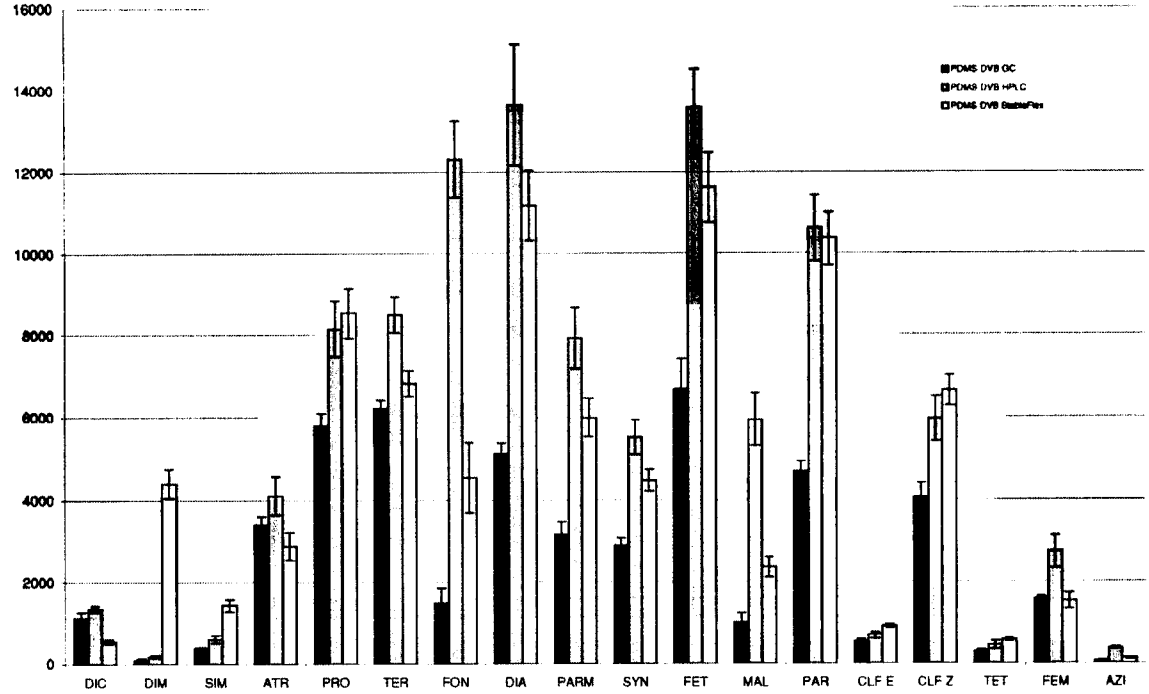


Fig. 2. Graphical display of mean peak areas ($n=6$) obtained for OPPs and triazine pesticides (TSD) in a comparative study involving three PDMS–DVB type fibres. Error bars represent the confidence interval for the mean at 95% confidence level.

detected at all using the GC-indicated fibre and is poorly extracted by the StableFlex fibre. Two more compounds require particular attention, namely FON and MAL. In these cases, the GC use and StableFlex fibres exhibit less than half analyte recovery when compared to the HPLC use fibre, as well as much variation between fibres of the same batch.

The overall mean variation between fibres of the same batch was determined to be 12.6; 25.5 and 39.1%, respectively, for the HPLC use, StableFlex and GC use fibres, with a great contribution for last two from the phenomenon mentioned above.

For some of the pesticides in Fig. 2, the StableFlex fibre would be acceptable, however it introduced several interfering peaks in the chromatogram, both in empty zones and co-eluting with target analytes. The qualitative and quantitative analysis of DIM and SIM is drastically disturbed.

The presence of interfering peaks, including the major 2,4-diisocyanate-1-methylbenzene (confirmed by MS) in the StableFlex chromatograms, even after repeated conditioning and runs, does not have any detrimental effect on the ECD chromatogram, unlike the TSD chromatogram. All fibres gave chromatograms which were easy to interpret, both in ECD and TSD detection, except for the StableFlex fibre which made TSD chromatograms more unreadable (see Figs. 3 and 4).

Using the PDMS–DVB HPLC fibre allows the simultaneous extraction of the 36 pesticides, with a single SPME procedure and analysed in a single chromatographic run with an instrumental configuration of coupled ECD–TSD. The advantages are obvious for the analysis of OPPs and triazines, while the analysis of OCPs and pyrethroids is not so demanding.

Despite the similarities between the fibres studied, namely fibre coating nature and thickness usually used as criterion for fibre selection [9], the information in Table 1 shows that great differences can be found which can explain their different extraction selectivities and efficiencies.

The PDMS–DVB HPLC use fibre is the one containing the larger volume of PDMS–DVB stationary phase. This fact may explain its improved adsorption capacity in the extraction of OPPs and triazine pesticides. Furthermore, this fibre has a thick polymer film directly attached to the silica core. This

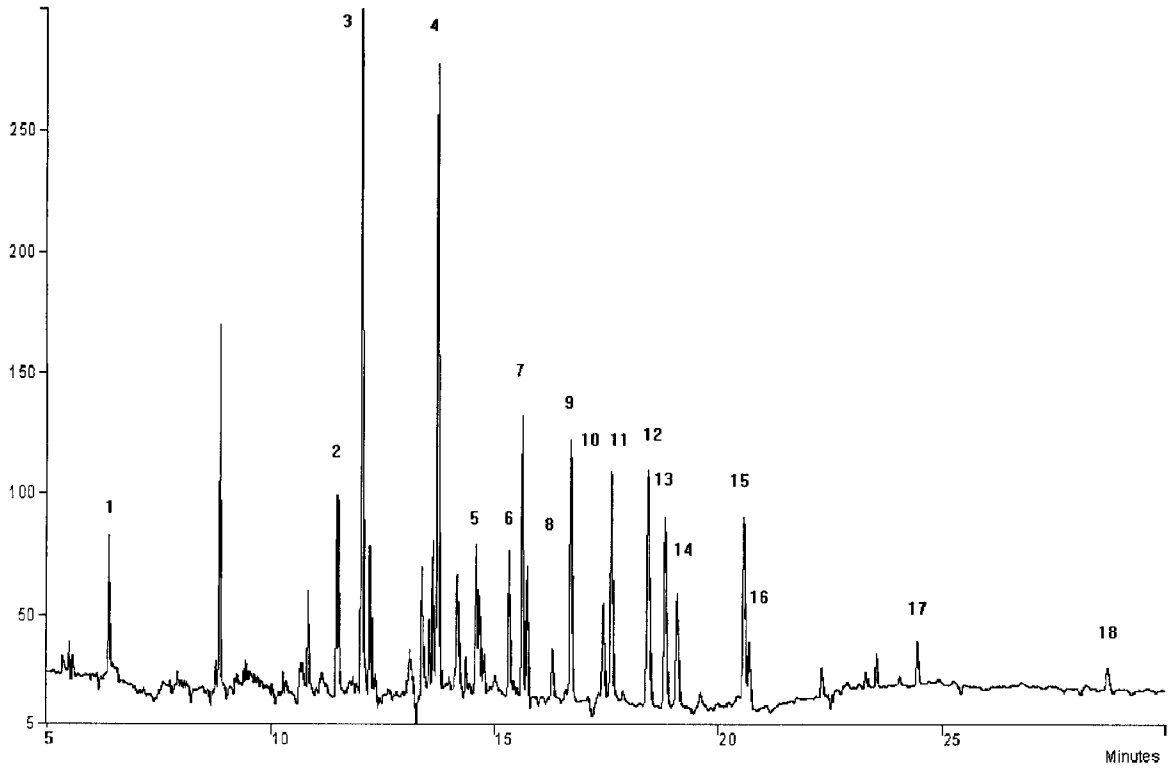


Fig. 3. Chromatogram acquired by ECD after SPME of an aqueous pesticide solution according to the procedure adopted in the Experimental section. The 60 μm PDMS–DVB fibre was used. For peak assignment refer to Section 2.

is a moderately polar polymer that may interact with analytes of close related polarity. Analytes with a certain degree of polarity like some OPPs and triazines can benefit from the existence of the polymer of core.

The 60 μm PDMS–DVB fibre is especially recommended for HPLC use due to its resistance to organic solvents because of the absence of the epoxy glue. However, it can also be used for GC analysis with thermal desorption and no damage was detected over a long usage period.

The organochlorine and pyrethroid pesticides are generally better extracted using the new PDMS–DVB StableFlex fibre. This fibre was the last of this type to be introduced, as an expanding improvement to all adsorbent type fibres. The thin coating of plastic on the fused silica makes the StableFlex fibre more flexible. The phase coating partially binds to the flexible core, which results in a more stable coating and less breakable fibre [12]. This fibre also contains a thinner moderately polar polymer of core together with 5 μm of PDMS precoat. This fact can be favourable to the extraction of nonpolar analytes but does not seem to be sufficient to justify the improved affinity of the StableFlex fibre for OCPs and pyrethroid pesticides. In any case, it was previously shown that the selectivity of StableFlex fibres may be slightly different to the same coating on a standard fused-silica core [12].

The PDMS–DVB fibre proposed for GC use has the lowest extraction ability for all the pesticides studied. It does not have a polymer of core and has the smallest PDMS–DVB coating volume and fibre surface area. As a bipolar adsorbent fibre, it maintains the extractions characteristics of the others but in a lower profile.

In a recent paper Valor et al. discussed the issue of fibre type selection for the analysis of 52 pesticides based on the determination of the fibre–water partition coefficients [11]. The benefits of mixed phases like PDMS–DVB in multiresidue pesticide analysis were noted [11,13].

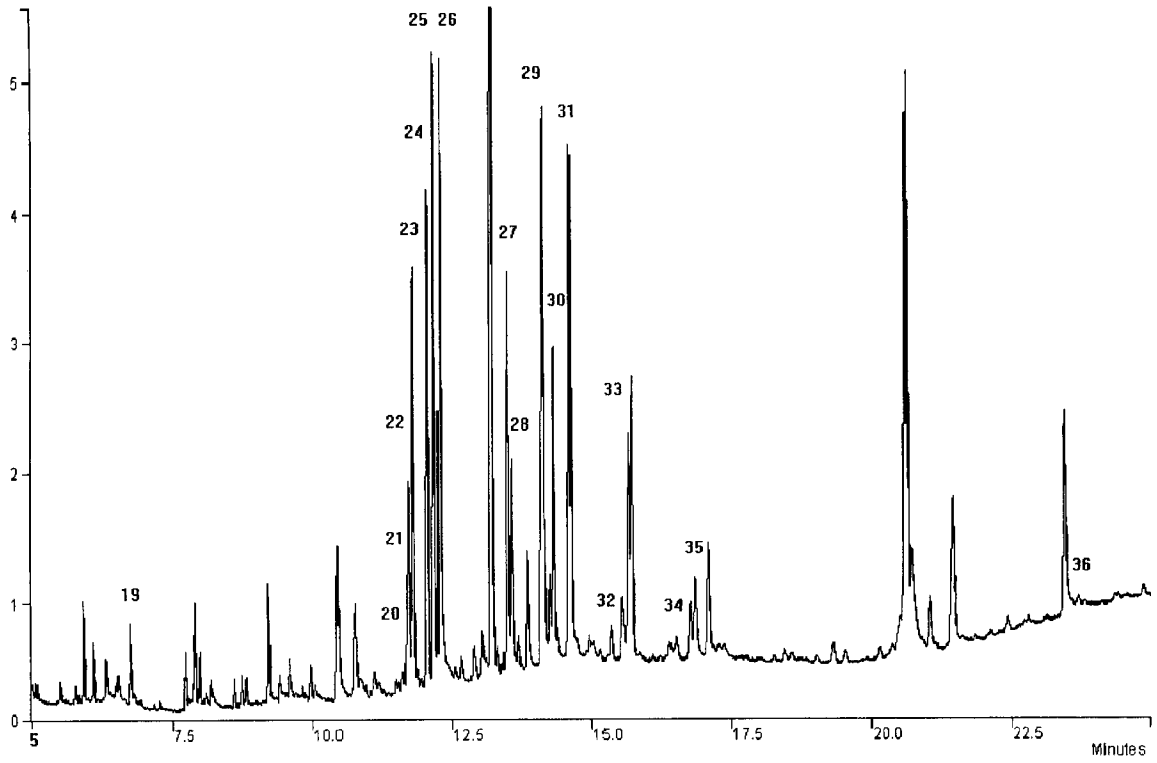


Fig. 4. Chromatogram acquired by TSD after SPME of an aqueous pesticide solution according to the procedure adopted in the Experimental section. The 60 μm PDMS–DVB fibre was used. For peak assignment refer to Section 2.

By extending the extraction time to 60 min, detection limits in the range of 1–10 ng/l for OCPs, 1–30 ng/l for OPPs, 8–50 ng/l for triazines and 10–20 ng/l for pyrethroid pesticides were attained using the reported 60 μm PDMS–DVB fibre. The fibre maintains its performance well for >100 extractions with between-day precision below 10%, using internal standard calibration.

4. Conclusions

Usually the process of fibre type selection is made based on the nature and thickness of the polymeric coating. In our study, involving three different PDMS–DVB coated fibres, we wanted to demonstrate that they do not have equal extraction efficiencies and there are other fibre structure properties that must be taken into consideration. Internal sublayers that exist in PDMS–DVB fibres can have an important role in the selectivity of the fibre towards small differences in the polarity of analytes.

The process of SPME fibre selection for a particular application cannot be entirely dependent on product information but based on a deep knowledge of inherent properties of the fibre. In our opinion this is another aspect be taken into account.

In our target group of 36 pesticides the 60 μm PDMS–DVB fibre gives the best combination of sensitivity fulfilling the requirements of the method for drinking and surface water analysis, according to EU Directives.

Acknowledgements

The authors would like to thank Sigma–Aldrich for providing valuable technical information and

support. Also the FCT-Fundação para Ciência e Tecnologia is greatly acknowledged for the Ph.D grant PRAXIS XXI/BD/21823/99. We also thank the IAREN–Water Institute of the Northern Region for technical and financial support.

References

[1] J. Pawliszyn, Solid-Phase Microextraction: Theory and Practice, Wiley–VCH, New York, 1997.
[2] J. Dugay, C. Miége, M.-C. Hennion, J. Chromatogr. A 795 (1998) 27.
[3] Z. Zhang, M. Yang, J. Pawliszyn, Anal. Chem. 66–17 (1994) 844A.
[4] M. de Fátima Alpendurada, J. Chromatogr. A 889 (2000) 3.
[5] M. Correia, C. Delerue-Matos, A. Alves, J. Chromatogr. A 889 (2000) 59.
[6] J.J. Jiménez, J.L. Bernal, M.J. del Nozal, M.T. Martín, A.L. Mayorga, J. Chromatogr. A 829 (1998) 269.
[7] H. Kataoka, H.L. Lord, J. Pawliszyn, J. Chromatogr. A 880 (2000) 35.
[8] H. Lord, J. Pawliszyn, J. Chromatogr. A 885 (2000) 153.
[9] D. Barceló, M.-C. Hennion, Trace Determination of Pesticides and Their Degradation Products in Water, Elsevier, Amsterdam, 1997.
[10] T. Górecki, X. Yu, J. Pawliszyn, Analyst 124 (1999) 643.
[11] I. Valor, M. Perez, C. Cortada, D. Apraiz, J.C. Moltó, G. Font, J. Sep. Sci. 24 (2001) 39.
[12] R.E. Shirey, R.F. Mindrup, SPME—Adsorption vs. Absorption: Which Fiber is Best for your Application, Sigma–Aldrich, 1999.
[13] J. Beltran, F.J. López, F. Hernández, J. Chromatogr. A 885 (2000) 389.

6.2 MÉTODO MULTIRESÍDUO PARA A DETERMINAÇÃO SIMULTÂNEA DE 4 GRUPOS DE PESTICIDAS EM ÁGUAS SUBTERRÂNEAS E PARA CONSUMO HUMANO ATRAVÉS DE MICROEXTRACÇÃO EM FASE SÓLIDA E CROMATOGRAFIA GASOSA COM DETECÇÃO POR CAPTURA ELECTRÓNICA E TERMIÓNICA ESPECÍFICA

Com base na publicação:

Gonçalves, C., Alpendurada, M.F. – Multiresidue method for the simultaneous determination of four groups of pesticides in ground and drinking waters , using solid-phase microextraction-gas chromatography with electron-capture and thermionic specific detection. J. Chromatogr. A, 968 (2002) 177-190.

ELSEVIER

Journal of Chromatography A, 968 (2002) 177–190

JOURNAL OF CHROMATOGRAPHY A

www.elsevier.com/locate/chroma

Multiresidue method for the simultaneous determination of four groups of pesticides in ground and drinking waters, using solid-phase microextraction–gas chromatography with electron-capture and thermionic specific detection

C. Gonçalves[a], M.F. Alpendurada[a,b,*]

[a]*Laboratory of Hydrology, Faculty of Pharmacy, University of Porto, Rua Anibal Cunha 164, 4050-047 Porto, Portugal*
[b]*IAREN—Water Institute of the Northern Region, Rua Anibal Cunha 164, 4050-047 Porto, Portugal*

Received 5 March 2002; received in revised form 29 May 2002; accepted 4 June 2002

Abstract

A common sample preparation procedure capable of efficiently concentrating various groups of pesticides, taking advantage of universal detectors like the mass spectrometer or combined techniques of group selective detectors like gas chromatography–electron capture detection (ECD)/thermionic specific detection (TSD), is desirable in environmental analysis. Six solid-phase microextraction fibres available for analysis of semi-volatiles (7, 30 and 100 μm poly(dimethylsiloxane) (PDMS), 85 μm polyacrylate, 60 μm PDMS–divinylbenzene (PDMS–DVB) and 65 μm Carbowax–DVB) were evaluated and the 60 μm PDMS–DVB was selected for the simultaneous extraction of 34 compounds, included in the organochlorine (OCPs), organophosphorous (OPPs), pyrethroid and triazine pesticide groups. All parameters affecting the extraction efficiency from water samples, namely fibre coating, sample agitation, pH and ionic strength, extraction temperature and time, were optimised. The analytical procedure involves solid-phase microextraction extraction, gas chromatographic separation and subsequent ECD and TSD via a post-column splitter adjusted to a split ratio of 1:10, respectively. Detection limits in the range of 1–10 ng l^{-1} for OCPs, 1–30 ng l^{-1} for OPPs, 20–30 ng l^{-1} for pyrethroids and 8–50 ng l^{-1} for triazines are easily attainable with the optimised procedure. The method validated for ground and drinking waters has low cost of implementation and operation although it requires careful maintenance.
© 2002 Elsevier Science B.V. All rights reserved.

Keywords: Solid-phase microextraction; Water analysis; Pesticides; Organochlorine compounds; Organophosphorus compounds; Triazines; Pyrethroids

1. Introduction

Chlorinated pesticides are very toxic and persistent compounds in the environment. Although most of them have been banished from use, they are still detected. The organophosphorous insecticides and triazine herbicides, namely atrazine, are among the most commonly used and detected pesticides in water streams around the world [1,2]. Pyrethroids are pesticides of the last generation, very stable to light

*Corresponding author. Tel.: +351-22-2078958; fax: +351-22-2086258.
E-mail address: iaren@esoterica.pt (M.F. Alpendurada).

0021-9673/02/$ – see front matter © 2002 Elsevier Science B.V. All rights reserved.
PII: S0021-9673(02)00788-4

and temperature although they may suffer rapid biological degradation in the environment [3].

The need for simple methods for screening water samples for environmental contaminants is well known. Due to the large number of active ingredients used, trace analyses of these substances require techniques for the detection of the greatest number of compounds possible, with the fewest number of extraction and clean-up steps [3,4].

Pesticides are generally found in waters at ppt levels, mixed with other contaminants at higher concentrations. To monitor sources of water intended for human consumption in compliance with the EU legislation, analytical methods with detection limits well below 0.1 $\mu g\ l^{-1}$ are needed.

Solid-phase microextraction (SPME) represents a further advance as a solvent-free alternative to the extraction of organic compounds [3,5–9]. Furthermore, SPME overcomes problems related to matrix effects and elution of impurities generated by extraction materials.

Nowadays, in addition to the former general purpose poly(dimethylsiloxane) (PDMS) and polyacrylate (PA)-coated fibres, a large number of fibre coatings based on solid sorbents are available, namely the PDMS–divinylbenzene (PDMS–DVB), Carbowax–DVB (CW–DVB), CW–templated resin (CW–TR), Carboxen–PDMS and DVB–Carboxen–PDMS coated fibres [10]. Some of these porous polymer SPME fibres with bipolar characteristics can be very useful for the simultaneous analysis of pesticides presenting a wide range of polarities. In a previous work by the same authors, the PDMS–DVB coating was compared in its three different commercial types, regarding pesticide analysis, and a structure–efficiency relationship was established [11].

In recent years, many studies can be found using SPME as a sample preparation method for the analysis of organochlorine (OCPs) [12–14], organophosphorous (OPPs) [15–19], and triazine pesticides [20–23] using separate or restrict methods.

The aim of the present work was to develop an SPME multiresidue method, including OCPs, OPPs, triazines and pyrethroid pesticides, in combination with an instrumental set-up of two highly sensitive and selective gas chromatography detection systems, electron-capture detection (ECD) and thermionic specific detection (TSD). Preferably this method should present similar or better sensitivity than the available solid-phase extraction (SPE) methods, when applied to ground and drinking waters. The main reason for developing this method was the need for a methodology able to determine pesticides with different biological activities, some of which can be found together in intensive culture areas.

Not many SPME methods have been developed for the analysis of more than 25 analytes from more than two of the main classes of pesticides [24,25], which is especially true considering the new possibilities of bipolar SPME fibres in trace multiresidue analysis. Effects on extraction efficiency of parameters such as: polarity and thickness of the coating on the fibre, sample agitation, pH and ionic strength of the sample, extraction temperature and extraction time will be discussed. Validation parameters of the optimised procedure will be given.

2. Experimental

2.1. Chemicals and reagents

The various pesticides were supplied by Riedel-de Häen (Seelze, Germany). Individual stock standard solutions of OCPs: hexachlorobenzene (HCB), lindane, heptachlor, aldrin, isodrin, heptachlor epoxide, γ-chlordane, endosulfan I, 4,4′-DDE, dieldrin, endrin, endosulfan II, 4,4′-DDD, endosulfan sulfate and 4,4′-DDT were prepared in *n*-hexane, whereas pyrethroid insecticides: λ-cyhalothrin and α-cypermethrin were prepared in ethyl acetate, and the OPPs: dichlorvos, dimethoate, fonofos, diazinon, parathion-methyl, fenitrothion, malathion, parathion-ethyl, chlorfenvinphos, tetrachlorvinphos, fenamiphos and azinphos-methyl, and triazines: desethylatrazine (DEA), simazine, atrazine, propazine, terbuthylazine and simetryn were dissolved in methanol. Four separate group mixtures were then prepared in methanol containing 2 mg l^{-1} of each individual pesticide.

All solvents used were of LiChrosolv gradient grade purchased from Merck (Darmstadt, Germany). Ultrapure Milli-Q water (Millipore, Molsheim, France) was used to daily prepare the working aqueous solutions in the range of 0.01 to 10 $\mu g\ l^{-1}$. When convenient, 0.01 $\mu g\ l^{-1}$ γ-chlordane and 0.04

μg l^{-1} tetrachlorvinphos were used as internal standards (I.S.), respectively for ECD and TSD chromatograms. These compounds are not allowed as pesticides in Portugal since 1986. The organic solvent content in a 0.1 μg l^{-1} standard and real samples was always below 0.5% in methanol, with a major contribution from the internal standard.

2.2. Equipment and SPME fibres

Chromatographic analyses were carried out in a Varian 3400 CX (Walnut Creek, CA) gas chromatograph. The injector and detector temperatures were set at 250 and 310 °C isothermal, respectively. The split/splitless injector was maintained in splitless mode during 5 min of SPME fibre desorption. All compounds were resolved in an MDN-5 column (5% diphenyl–95% dimethylsiloxane) (30 m×0.32 mm I.D×0.25 μm film) (Supelco, Bellefonte, PA) using helium as carrier gas and detected either by ECD or TSD operating at 3.2 A intensity, as more convenient. The oven temperature programme was as follows: initial temperature 80 °C (held 2 min), increased by 15 °C/min to 190 °C (held 2 min), increased by 10 °C/min to 220 °C (held 5 min) and finally, increased by 10 °C/min to 260 °C and held at this temperature for 7 min. At the column exit an adjustable splitter (SGE Europe, Milton Keynes, UK) was inserted and later fine-tuned to give about a tenth of the effluent flow to ECD and the remaining to TSD. A supplementary make-up gas (N_2) at a flow-rate of 10 ml/min was also delivered to the splitter. This instrumental configuration allowed complete separation of the pesticides in a single 30-min chromatographic run (with two channels) following a single extraction procedure. OCPs and pyrethroids were detected using ECD whereas OPPs and triazines were analysed by TSD, although ECD can also give a measurable signal for a few of them.

Six SPME fibres with different coating phase or thickness, 7 μm PDMS, 30 μm PDMS, 100 μm PDMS, 85 μm PA, 60 μm PDMS–DVB and 65 μm CW–DVB, were tested for their suitability for the combined pesticide analysis. All SPME fibres (Supelco) were new at the beginning of the study and were conditioned according to the supplier's instructions.

3. Results and discussion

3.1. Method development

3.1.1. Fibre type selection

The sensitivity of an SPME method greatly depends on a correct selection of the fibre coating and thickness, regarding the compounds of interest. In relation to SPME fibres used, the vast majority of work has been done using the PDMS and PA fibres [12,16,26–28]. As they were the first commercially available, their performance for certain types of applications is already well established and still are unsurpassed well-performing and rugged fibres, able to withstand aggressive extraction conditions. Recently, new fibres appeared in order to solve the limitations of the former, when dealing with more polar analytes or multiresidue analysis [8,26,29,30]. In a recent review on solid-phase microextraction of pesticide residues, among 34 references, Beltran et al. reported only one citation where the weakly polar CW–DVB fibre was used in SPME of OCPs, two citations of this fibre for SPME of triazines and one citation each of the CW–DVB and PDMS–DVB fibres for extraction of OPPs. Most papers refer to using the PDMS fibres for the determination of OCPs, the PA fibre for the analysis of triazines and PA or PDMS fibres, indistinctly, for the analysis of OPPs [26]. Several other pesticides were successfully analysed using SPME but no pyrethroid was referenced. Further, Sabik et al. recently reviewed 32 references of multiresidue methods mainly for the determination of triazines and degradation products where only four of them can be found dealing with SPME [4].

In our study, six SPME fibres (7, 30 and 100 μm PDMS, 85 μm PA, 60 μm PDMS–DVB and 65 μm CW–DVB) were evaluated for the simultaneous extraction of OCPs, OPPs and triazine pesticides in water samples. It should be noted that the pyrethroid pesticides were included in the method later, and considering their low representativity it is not likely that they would affect the decisions to be taken. At this point of the discussion, it should also be mentioned that in a previous work developed by the same authors, comparing the extraction efficiency of three available PDMS–DVB fibre coatings (65 μm for GC-use, 60 μm for HPLC-use and 65 μm

StableFlex for GC-use) regarding the analysis of the same target pesticides, it was observed that the 60 μm PDMS–DVB fibre gave the most equilibrated results for the totality of analytes. Further details are described elsewhere [11].

Figs. 1–3 present the results obtained in a study comparing the six selected SPME fibres, respectively, for OCPs, OPPs and triazine pesticides. Significantly different extraction capacities were found for the fibres tested. The OCPs were equally well extracted by the 100 μm PDMS and PA fibres whereas the OPPs and triazines were better extracted with the PDMS–DVB fibre. The latter showed very good response for all 34 compounds, thus, was considered to be the more adequate for the simultaneous analysis of OCPs, OPPs and triazines. Recently some authors have also reported this fibre for the analysis of OCPs in different matrices [14,31].

The PDMS–DVB fibre obtained the best global performance due to its intermediate polarity properties. Using this fibre in a multiresidue method has the advantage of improving the extraction efficiency for those compounds that require enhanced sensitivity, i.e. triazines and some polar OPPs. Especially for fenamiphos, atrazine and dichlorvos, Dugay et al. agree that the PDMS–DVB fibre is the best to use [5]. Lambropoulou et al. demonstrated, also, the benefits of this fibre on the analysis of triazines [22]. In a recent paper, Valor et al. discussed the issue of fibre type selection for the analysis of 52 pesticides based on the determination of the fibre–water partition coefficients [24]. The remarks that were made are fully comparable with our findings, highlighting the benefits of mixed phases like PDMS–DVB in trace analysis of pesticides. From now on the 60 μm PDMS–DVB fibre will be used.

3.1.2. Sample agitation

Concerning SPME, the speed of extraction and the time to reach equilibrium are primarily dependent on the rate of mass transport in the bulk of the sample. In this sense, for optimum performance of the technique it is essential that constant rapid stirring is employed [6,22]. We used magnetic stirring as

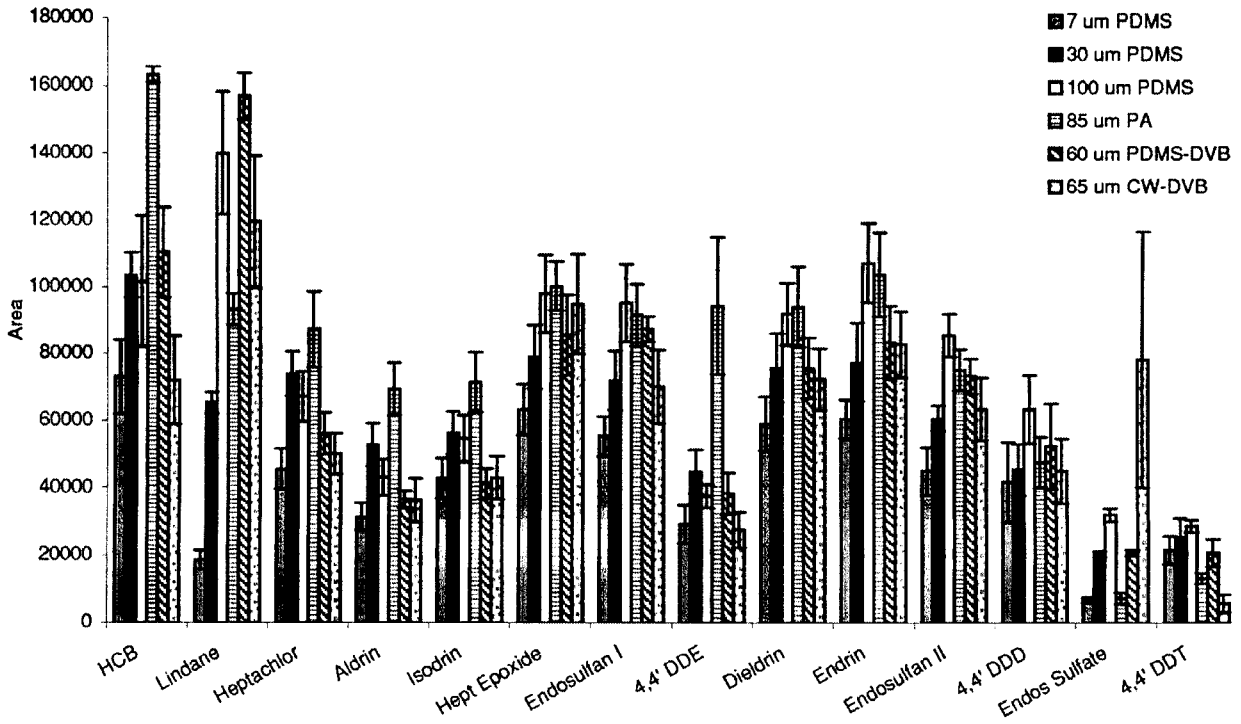


Fig. 1. Extraction efficiency of six SPME fibres, graphically represented as average peak areas obtained for each organochlorine pesticide. Error bars represent the standard deviation of five replicates. SPME conditions were as follows: 1.5-ml sample containing 1.0 μg l^{-1} each OCP, 30 min extraction at ambient temperature without agitation.

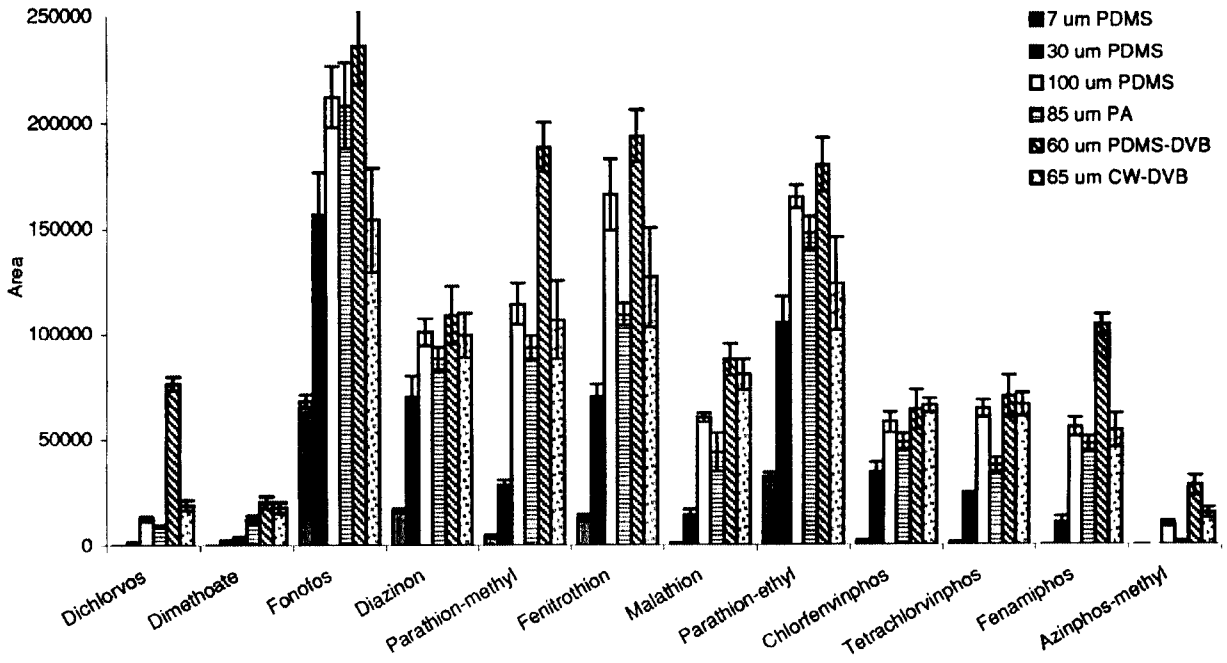


Fig. 2. Extraction efficiency of the six SPME fibres tested, graphically represented as average peak areas obtained for each organophosphorous pesticide. Error bars represent the standard deviation of five replicates. Extraction conditions were the same as in Fig. 1, but using a 10 $\mu g\ l^{-1}$ pesticide solution.

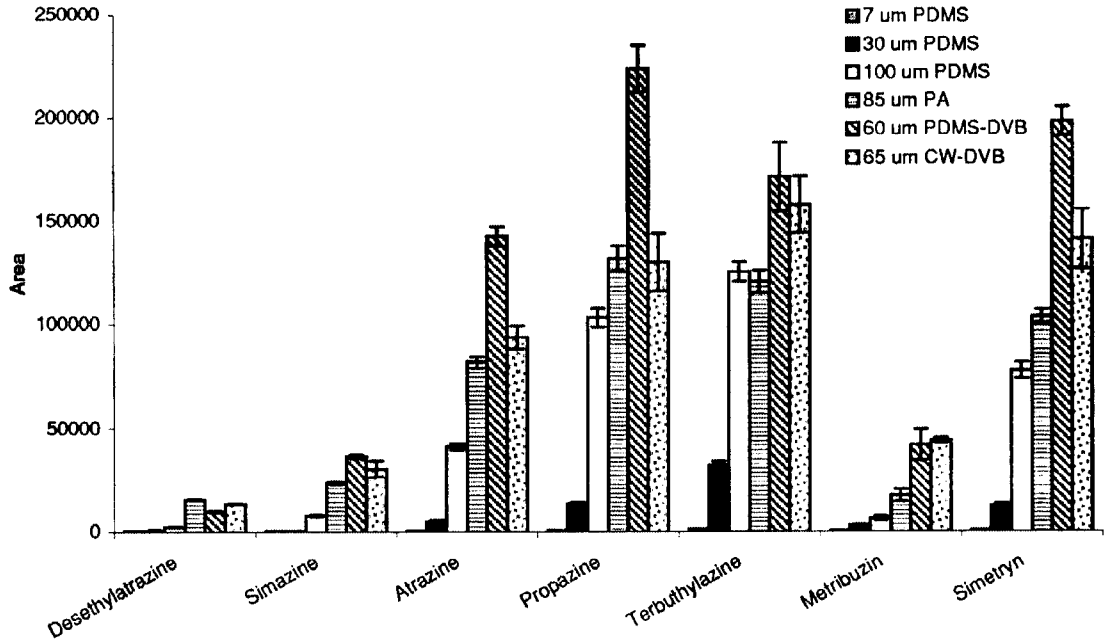


Fig. 3. Extraction efficiency of six SPME fibres towards triazines, graphically represented as average peak areas obtained for each compound. Error bars represent the standard deviation of five replicates. Extraction conditions were the same as in Fig. 2.

agitation method and demonstrated that static extraction could only achieve 10–30% in extraction efficiency of that at 600 rev./min, so the latter was selected.

3.1.3. Sample pH effect

The affinity of target analytes for an adsorbent acting primarily by hydrophobic interactions can be enhanced keeping the molecules in a non-ionized form. The pesticides selected for this study are predominantly apolar and non-charged compounds thus, the sample pH does not seem to have a drastic impact in analyte extraction. The same conclusion could be drawn by experimentally analysing the pH effect between 4, 7 and 10. Although the results were not significantly different, keeping the sample pH unchanged seems to be advantageous and it prevents analyte breakdown detected for malathion and endosulfan at pH 10.

3.1.4. Extraction temperature

Extraction temperatures between 25 and 70 °C were tested in order to compare the effect of this parameter on extraction yields. Regarding the results presented in Fig. 4, it is recommended to increase the sample temperature to around 60 °C to improve the simultaneous extraction of different OCPs, OPPs and triazine pesticides. This figure was constructed converting the peak area values in the following manner: peak area values for individual pesticides, over the range of the variable, were normalized considering the highest area obtained as 1. The plot for each pesticide group, intended to show the particular behaviour of a relatively homogeneous chemical family, was then obtained by adding the plots of the

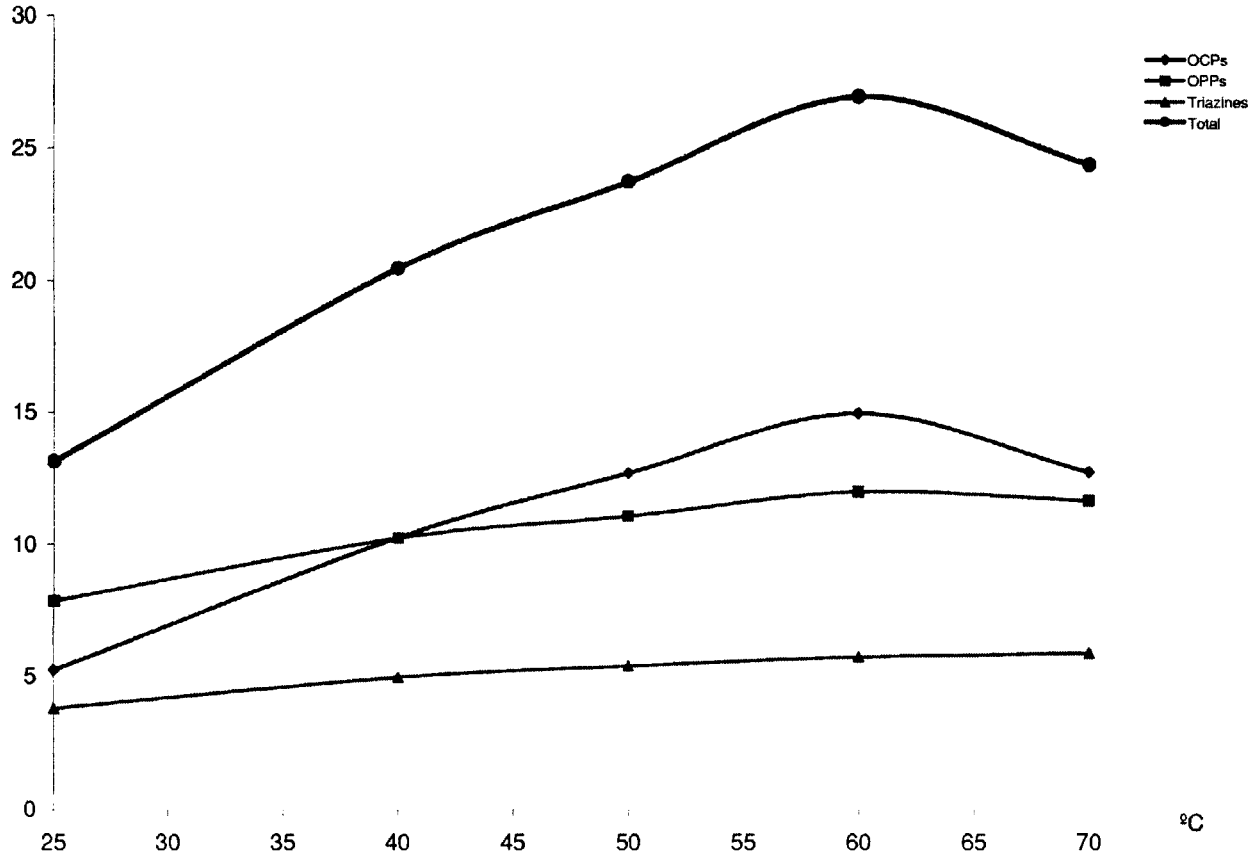


Fig. 4. Optimisation of the extraction temperature regarding the analysis of three groups of pesticides. Four replicate analyses were performed at the following levels: 25, 40, 50, 60 and 70 °C. SPME conditions, 3 ml pesticide solution at 0.1 μg l^{-1}, extraction with a 60 μm PDMS–DVB fibre during 30 min, rapid agitation applied and neutral pH. *y*-Axis, arbitrary scale.

respective members. To obtain a trace of the total behaviour of the pesticides in order to extract less subjective conclusions about the optimum variable level, another plot was created as the arithmetic sum of pesticide group plots. The same procedure applies to Figs. 5 and 6.

Temperatures higher than 60 °C have a detrimental effect on the extraction of OCPs. Above this point the temperature effect favouring the transfer rate of analytes to the fibre coating is overcome by its negative effect on the analyte's partition coefficient between the fibre and the sample matrix. The plot for OPPs shows that between 60 and 70 °C there is equilibrium between positive and negative effects of temperature (except for dichlorvos). In the case of triazines the situation is different and extraction yields would benefit with higher temperatures than 60 °C. This result is not surprising as these compounds generally have a lower fibre–water partition coefficient, even using a bipolar SPME fibre, which results in a proportionally lower negative interference of temperature on the fibre–water partition coefficient comparatively with the favourable effect on mass transfer rate. Considering the different profiles obtained there is evidence that whenever various families are being analysed a medium value should be encountered. Most authors agree on the importance of extraction temperature optimisation on SPME of pesticides and recommend employing temperatures up to 100 °C depending on the target pesticides and on the matrix type [9,26,32].

3.1.5. Ionic strength adjustments

Most authors report beneficial effects of the addition of NaCl to the sample over extraction efficiency of many compounds. Nevertheless many

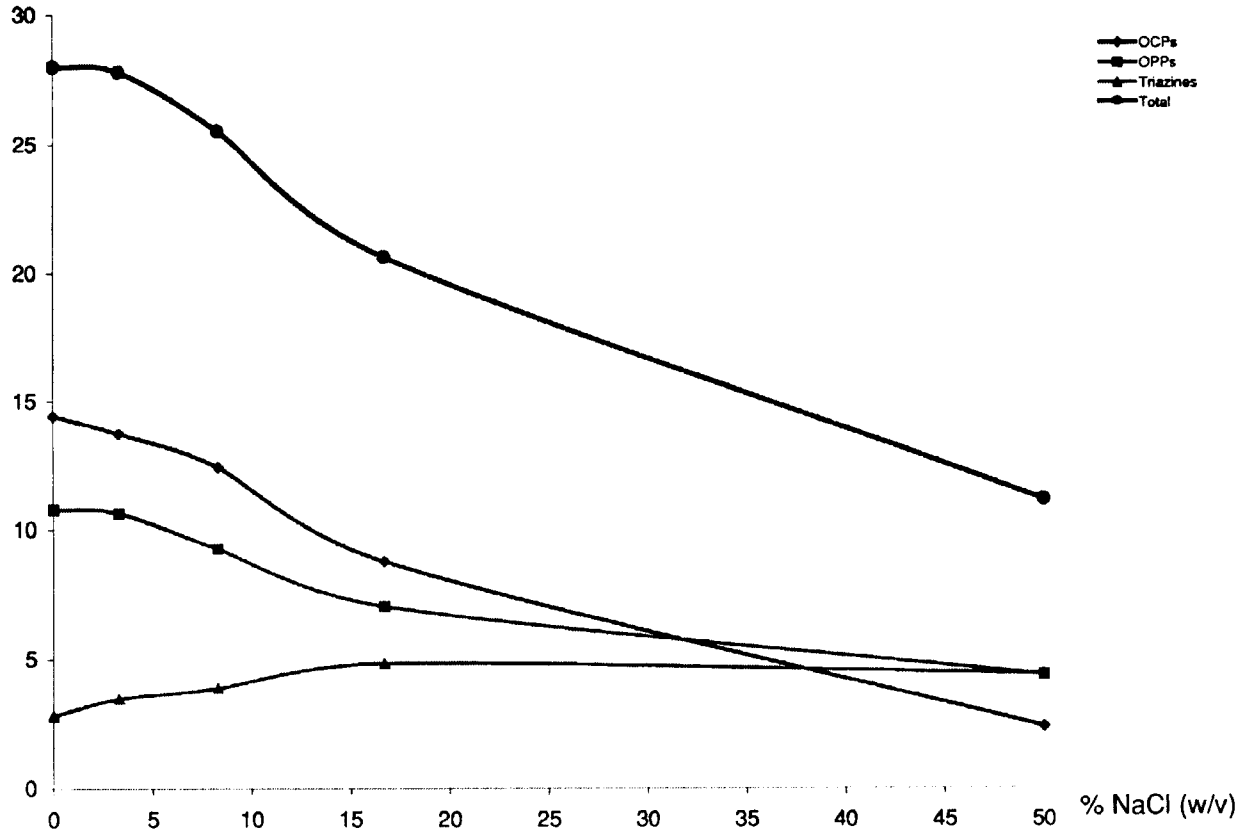


Fig. 5. Influence of the ionic strength of the sample on SPME of pesticides using a PDMS–DVB coated fibre. Effects on extraction efficiency were evaluated at the following salt contents: 0, 3.3, 8.3, 16.7% NaCl and at saturation. SPME conditions, the same as in Fig. 4, at controlled temperature of 60 °C, four replicates. *y*-Axis, arbitrary scale.

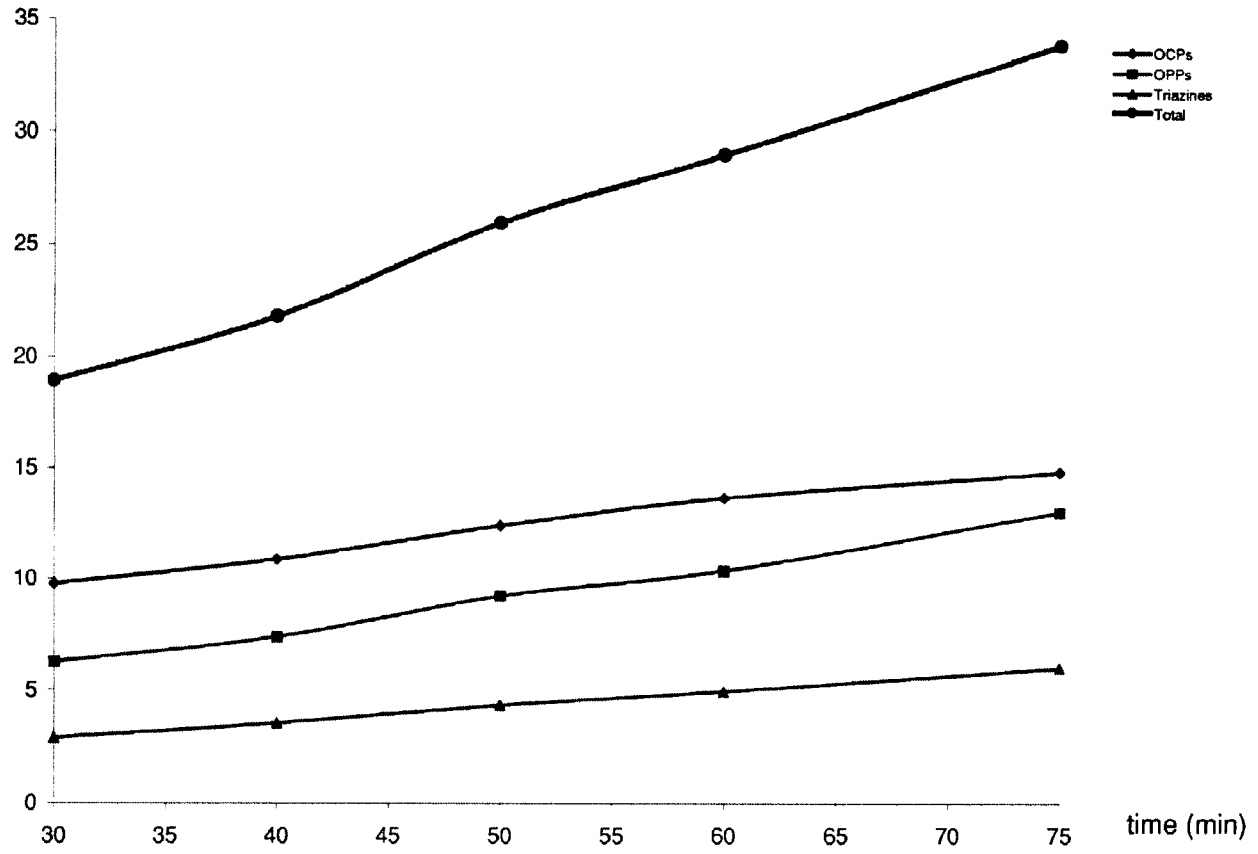


Fig. 6. Extraction time profile for target pesticide groups using the PDMS–DVB fibre. Extracted amounts over different extraction times: 30, 40, 50, 60 and 75 min, were determined. SPME conditions, 3 ml pesticide solution at 0.1 μg l^{-1}, extraction using a 60 μm PDMS–DVB fibre at 60 °C, rapid agitation of the sample without pH and ionic strength correction, five replicates. *y*-Axis, arbitrary scale.

exceptions have been noted [26]. The influence of this parameter over the extraction of several pesticides using the PDMS–DVB fibre, was experimentally verified testing pesticide solutions containing 3.3, 8.3, 16.7% and saturation of NaCl, in comparison with a solution in ultrapure water. The results are shown in Fig. 5.

The extraction yield of all triazines and some polar OPPs (i.e. dichlorvos, dimethoate and fenamiphos) was improved by 1.2 to 3 times until the concentration of 16.7% NaCl. At saturation conditions it was possible to obtain improvements of 13.7, 4.3, 4.7 and 9.9 times, respectively for DEA, simazine, dichlorvos and dimethoate. Unfortunately, for the rest and the majority of the pesticides the extraction yield was greatly reduced, even at low NaCl concentrations. Particularly for apolar compounds, with very low water solubility, the presence of other species in solution may reduce the molecules' movement towards the fibre coating, negatively affecting recoveries and precision. Additionally, high salt contents can affect the fibre stability, particularly in the case of CW–DVB fibre [26]. By observation of Fig. 5, it can be seen that the salinity condition most appropriate would be between 0 and 3.3% NaCl. Considering that real samples naturally have an ionic strength higher than ultrapure water it was considered better not to make any ionic strength adjustments.

3.1.6. Extraction time

The speed and efficiency of SPME extractions are determined by the parameters previously discussed in this paper, as well as by intrinsic properties of the analytes. Once the extraction parameters were set-up at the most favourable conditions, the extraction time

profile was studied. As a general rule, the quantities extracted by the fibre are initially proportional to time and as equilibrium is approached a further increase in the extraction time will not produce substantial sensitivity gains. Fig. 6 displays the extraction time profile for the pesticide groups being studied. The extraction of OCPs shows a tendency to the equilibrium state around 60 min. On the other hand, at this point the extraction of OPPs and triazines maintains an increasing pathway until 75 min extraction time. Some authors referred to equilibrium extraction times for these analytes, although using other extraction conditions, of the order of 90–120 min [6,24,32].

Larger extraction times than 60 min are not reasonable on method implementation since analysis output is greatly reduced. For practical reasons, a 60-min extraction was selected and proved to be sufficient to attain the desired sensitivity.

3.1.7. Splitter adjustment

Considering the relative sensitivities of both detection methods, ECD and TSD, the splitter included in the chromatographic system was adjusted in order to give about a tenth of the column effluent flow to ECD and the remaining flow to TSD. The flow ratio was established like this as a result of the extremely high sensitivity of the ECD for OCPs and pyrethroids, whereas the TSD requires as much analyte as possible entering the detector. Under these conditions the best performance of both detectors working simultaneously can be obtained. The split ratio has minor changes during the oven temperature programme. Since the splitter is a crucial element in method calibration, careful maintenance and regular confirmation of its performance should be undertaken.

3.2. Method validation

Method validation is an important part in method development that consists in the process of defining analytical requirements, and confirming that the method under consideration has performance capabilities consistent with those requirements. The method being discussed was optimised and validated at the following operational conditions: 3 ml of sample are extracted by immersion of a 60 μm PDMS–DVB fibre during 60 min; sample agitation is employed at 600 rev./min and temperature control at 60 °C; neither pH adjustment nor ionic strength correction are applied.

Table 1 presents the validation parameters of the developed method, consisting of SPME extraction using a bipolar PDMS–DVB coated fibre and subsequent chromatographic analysis using two selective detectors functioning simultaneously. Linear calibration curves for all pesticides over five calibration levels, from 0.01 to 1.0 μg l^{-1}, were constructed using 0.01 μg l^{-1} γ-chlordane as internal standard for OCPs and pyrethroids, and 0.04 μg l^{-1} tetrachlorvinphos as internal standard for OPPs and triazines. Linear regression coefficients are present in Table 1.

Typical chromatograms for a 0.1 μg l^{-1} aqueous pesticide solution can be seen in Figs. 7 and 8. Clear chromatograms can be observed where target peaks are easily identified.

Limits of detection (LODs) were calculated by the analysis of pesticide solutions at a low concentration (0.002 μg l^{-1} OCPs and OPPs, 0.02 μg l^{-1} triazines and pyrethroids) to obtain the respective peak areas and afterwards applying the formula:

$$\mathrm{LOD} = \frac{3.3\sigma}{S}$$

where σ is the standard deviation of the response and S is the slope of the calibration curve.

These were later confirmed by extraction of aqueous pesticide solutions at the same levels. The LODs obtained applying an S/N ratio of 3 to the analytical signal are in good agreement with the ones resulting from theoretical calculation. The method described showed very good sensitivity with detection limits in the low ng l^{-1} range for almost all of the target analytes, well below the regulatory limit of 0.1 μg l^{-1} for individual pesticides in drinking water. These were equivalent or better than the ones obtained by other authors, despite using a flow splitter to ECD and TSD [16,18,21,22]. Likewise, the quantitation limits calculated applying a factor of 10 in the formula above, comply with the referred limit. DEA and dimethoate cannot be analysed with this method at the required limits.

The precision of the entire analytical procedure was determined as repeatability and intermediate

Table 1
Validation parameters of the SPME method at optimum extraction conditions. Compounds numbered from 1 to 17 were detected using ECD whereas compounds numbered from 18 to 36 were detected by TSD

Peak no.	Pesticides	t_R (min)	LOD[a] ($\mu g\ l^{-1}$) ($n=14$)	LOD[b] ($\mu g\ l^{-1}$)	Precision (RSD) ($n=20$)	Extraction yield (%) ($n=8$)	Recovery (%) ($n=10$)	Carryover (%) ($n=5$)	Calibration curve r^2
1	HCB	11.49	0.003	0.003	11.6	16.7	102.1	2.3	0.996
2	Lindane	12.03	0.0009	0.0005	9.7	25.1	99.1	n.d.	0.994
3	Heptachlor	13.74	Invalid	0.007	12.3	16.8	78.3[d]	n.d.	0.989
4	Aldrin	14.60	0.003	0.007	10.0	14.1	93.8	0.2	0.992
5	Isodrin	15.34	0.003	0.001	9.8	15.5	97.5	0.8	0.991
6	Hept. epoxide	15.62	0.002	0.002	5.8	21.4	103.4	n.d.	0.992
7 I.S.	γ-Chlordane	16.28	–	~0.001	–	26.6	–	n.d.	–
8	Endosulfan I	16.70	0.002	0.001	3.7	24.5	103.6	0.4	0.993
9	4,4′-DDE	17.43	0.006	0.007	10.0	15.0	99.8	1.5	0.992
10	Dieldrin	17.62	0.002	0.0008	13.6	21.3	102.4	0.4	0.994
11	Endrin	18.44	0.003	0.001	6.8	24.2	103.1	0.2	0.995
12	Endosulfan II	18.80	0.003	0.002	6.1	26.0	102.4	0.9	0.996
13	4,4′-DDD	19.08	0.004	0.002	8.6	19.1	102.0	1.6	0.993
14	Endos. sulfate	20.56	0.012	0.005	12.2	34.0	104.1	n.d.	0.992
15	4,4′-DDT	20.69	0.007	0.005	9.6	20.4	102.5	1.6	0.993
16	λ-Cyhalothrin	24.44	0.015	0.020	9.8	–	–	n.d.	0.992
17	α-Cypermethrin	28.72	0.027	0.030	12.3	–	–	n.d.	0.977
18	Dichlorvos	6.75	0.008	0.010	10.6	3.9	117.3[d]	n.d.	0.994
19	DEA	10.85	Invalid	0.800	56.2[c]	0.4	96.8	n.d.	0.969
20	Dimethoate	11.54	Invalid	0.400	23.7[c]	1.3	94.4	n.d.	0.982
21	Simazine	11.61	0.031	0.050	39.1[c]	–	131.7[d]	n.d.	0.956
22	Atrazine	11.71	0.001	0.030	9.4	16.1	103.4	n.d.	0.996
23	Propazine	11.78	0.003	0.025	12.3	22.1	100.5	n.d.	0.994
24	Terbutylazine	12.04	0.005	0.008	8.5	25.4	104.5	n.d.	0.992
25	Fonofos	12.16	0.001	0.001	8.5	43.4	96.2	n.d.	0.992
26	Diazinon	12.27	0.003	0.003	7.9	37.1	98.8	n.d.	0.995
27	Parathion-methyl	13.47	0.002	0.001	7.0	37.7	96.6	n.d.	0.998
28	Simetryn	13.55	0.027	0.030	8.8	16.5	94.7	n.d.	0.989
29	Fenitrothion	14.09	0.004	0.010	6.4	46.5	96.0	n.d.	0.991
30	Malathion	14.30	0.004	0.005	8.7	36.2	102.7	n.d.	0.987
31	Parathion-ethyl	14.59	0.004	0.004	8.0	43.2	95.7	n.d.	0.993
32	Chlorfenvinphos E	15.33	0.001	0.005	13.9	49.0	104.5	n.d.	0.948
33	Chlorfenvinphos Z	15.65	0.014	0.005	16.4	46.4	97.3	n.d.	0.966
34 I.S.	Tetrachlorvinphos	16.50	–	~0.003	–	51.9	–	n.d.	–
35	Fenamiphos	16.84	0.002	0.006	13.2	27.4	103.5	n.d.	0.961
36	Azinphos-methyl	23.67	0.002	0.020	9.2	33.9	77.4[d]	n.d.	0.997

t_R, retention time; n.d., not detected.
[a] Detection limits theoretically calculated on the basis of the background noise.
[b] Detection limits confirmed with standard solutions applying an $S/N=3$.
[c] The concentration tested was close to the detection limit resulting in higher RSDs.
[d] Matrix effect is statistically significant at 95% confidence level.

precision of retention times, peaks areas and calculated concentrations for a 0.1 $\mu g\ l^{-1}$ aqueous pesticide mixture. The precision of retention times was excellent at 0.07% relative standard deviation (RSD). The intermediate precision of concentrations, expressed by the RSD of 20 replicate analyses spread over 3 days, was generally below 15% with many cases below 10%, see Table 1. The precision of the method benefits from using internal standards.

The SPME technique does not produce exhaustive

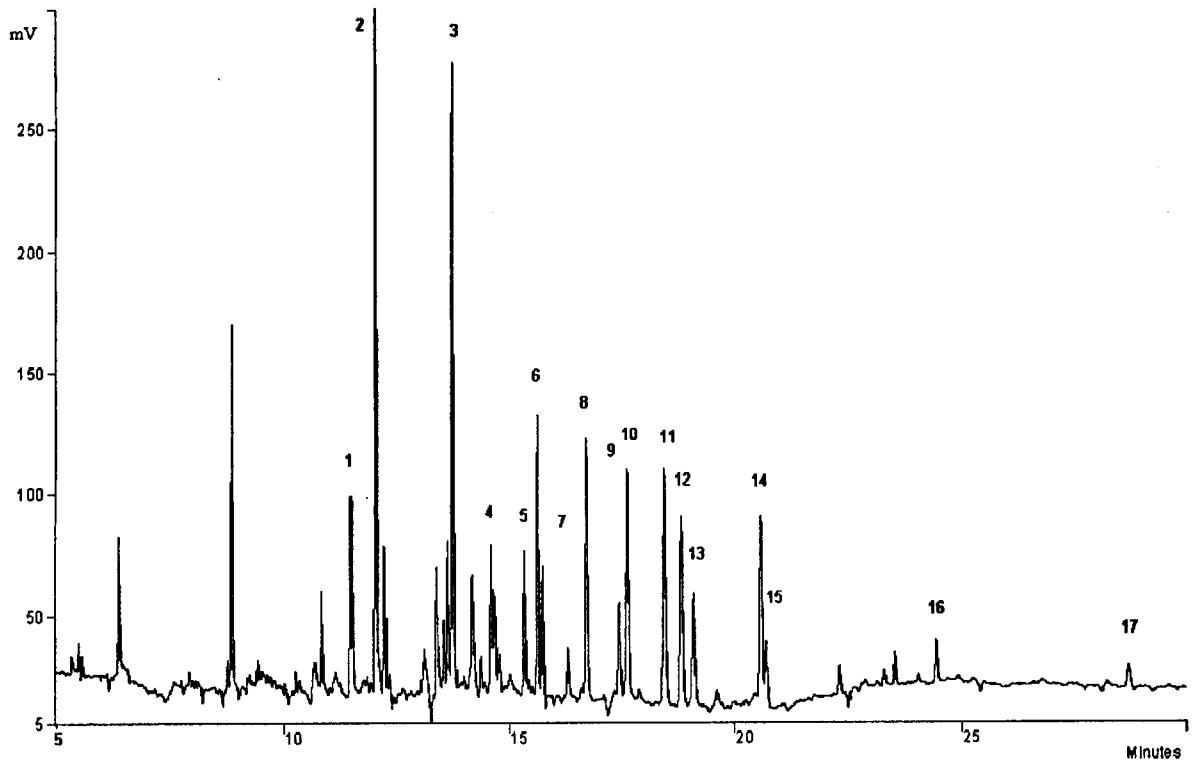


Fig. 7. Chromatographic separation of OCPs and pyrethroids detected by ECD, after SPME extraction of an aqueous pesticide solution containing 0.1 μg l^{-1} (0.01 μg l^{-1} γ-chlordane I.S.), using the optimised conditions. For peak assignment refer to Table 1.

extraction of analytes. The PDMS–DVB fibre's extraction yields were determined as the ratio between the extracted amount (calculated from calibration curves of standards directly injected) and the initial amount added to the vial. The results are displayed in Table 1. As can be seen, mass recoveries between 14.1 and 34% for OCPs, between 27.4 and 51.9% (except dimethoate 1.3%) for OPPs, and between 16.1 and 25.4% (except DEA 0.4%) for triazine pesticides, were obtained. In comparison with a study published by Correia et al. [32], using a 100 μm PDMS fibre, the results obtained by us are fairly higher which positively confirms the suitability of the PDMS–DVB fibre for pesticide residue analysis. The authors reported extraction yields always below 25%. To our knowledge, extraction yields for such an extensive list of pesticides using the PDMS–DVB coating have not been reported so far.

Matrix effects were also investigated comparing the peak areas obtained in the analysis of spiked ultrapure water and groundwater at a concentration of 0.1 μg l^{-1}. Although it is admissible that humic and fulvic acids interfere with pesticide extraction, matrix effects were significantly detected in only seven situations. Since the method uses an internal calibration, those situations were compensated by the internal standard and only four of them remained significant. In this sense, final results do not require correction for the recoveries. It should be stressed that the fibre performance suffers a continuous degradation during usage, which could be responsible for some recovery decrease.

The carryover of the system is a phenomenon that can be a source of false positives in pesticide analysis, which is particularly important for methods capable of trace level detection. In order to investigate its occurrence, five extractions of a 0.1 μg l^{-1} pesticide solution were carried out, each followed by a blank extraction. The results can be found in Table 1. This study revealed some carryover of the system in the analysis of OCPs, which can be understood since they are very apolar pesticides with high

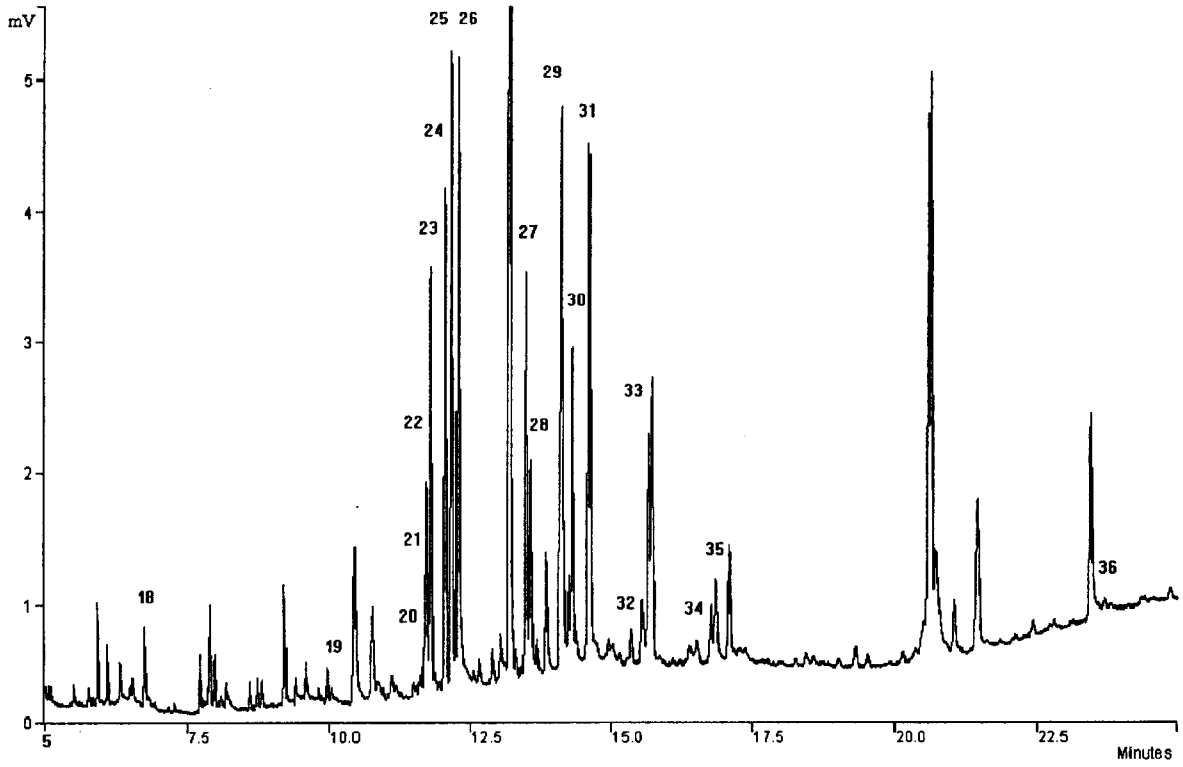


Fig. 8. Chromatographic separation of OPPs and triazines detected by TSD, after SPME extraction of a pesticide solution containing 0.1 μg l^{-1} (0.04 μg l^{-1} I.S., 1.0 μg l^{-1} DEA, dimethoate) using the optimised conditions. For peak assignment refer to Table 1.

molecular mass. DDT and degradation products registered carryover inferior to 1.6%, while HCB presented 2.3%. Some other OCPs presented also carryover but always below 1.0%. This degree of carryover does not present analytical difficulties since it corresponds to an analytical signal below the detection limit. In the analysis of OPPs, pyrethroids and triazines, no carryover effect was detected.

The present validated method was successfully implemented in the analysis of several groundwater samples containing pesticides in the range of 0.5 μg l^{-1} to non-detectable. A chromatogram of a contaminated sample can be seen in Fig. 9.

4. Conclusions

We have optimised and applied a new analytical protocol using a PDMS–DVB fibre coupled with selective gas chromatography detectors, able to determine up to 34 pesticides in water samples. It includes parent compounds, degradation products and some pesticides, like terbuthylazine and pyrethroids, that are being introduced in some EU countries to replace widespread contaminants.

The high selectivity of SPME analysis was enhanced in combination with selective detectors, which reduced interfering background in pesticide analysis, making analyte identification and quantification more reliable. The detection limits obtained were equivalent to the ones characteristic of many multiresidue SPE methods, well below the regulatory limit for pesticides in drinking waters.

The former SPME fibres were especially suited for the extraction of a restricted class of compounds but in recent years new fibres were developed, like the PDMS–DVB fibre, to address the issue of multiresidue analysis. In the future, multiresidue methods can be valuable in an effort to reduce the cost of analysis while increasing their number.

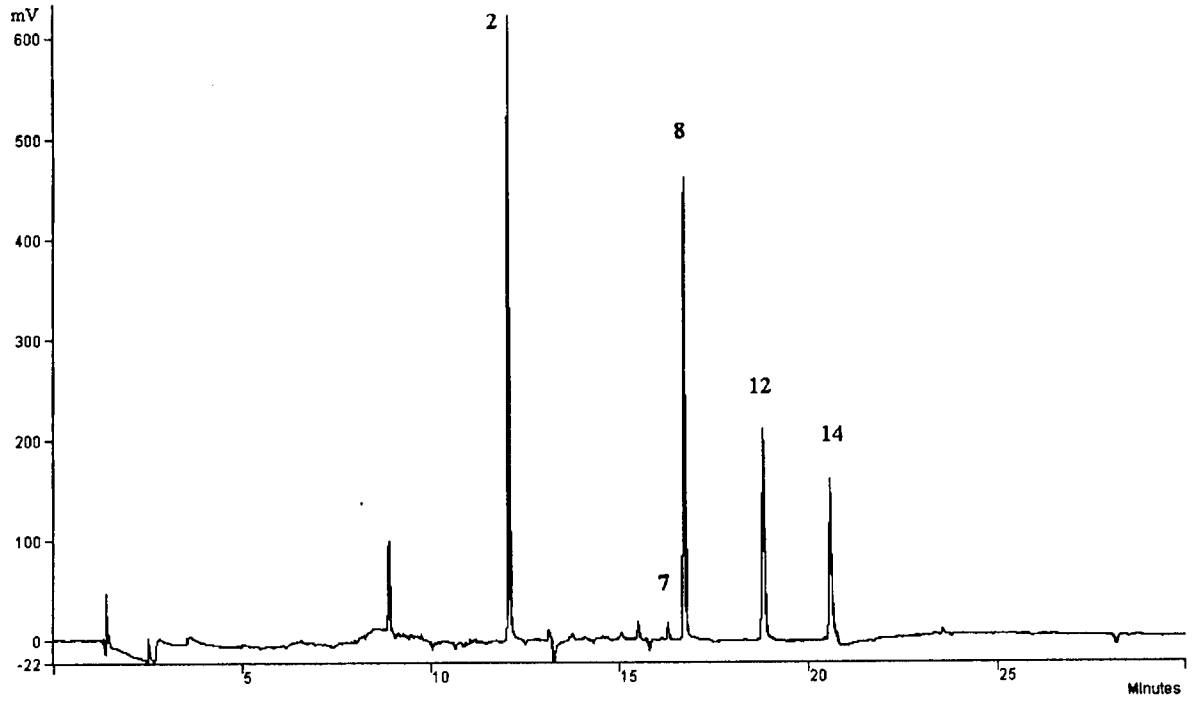


Fig. 9. An ECD chromatogram representative of a real sample contaminated with the following concentrations of pesticides: (2) 0.182 μg l^{-1}, (7) internal standard, (8) 0.340 μg l^{-1}, (12) 0.252 μg l^{-1}, (14) 0.235 μg l^{-1}. For peak assignment refer to Table 1.

Acknowledgements

Sigma–Aldrich is thanked for the gift of some SPME fibres. Also the FCT—Fundação para Ciência e Tecnologia is greatly acknowledged for the Ph.D. grant PRAXIS XXI/BD/21823/99. The authors would like to thank the IAREN for technical and financial support.

References

[1] A.M. Carro, R.A. Lorenzo, Analyst 126 (2001) 1005.
[2] D.A. Azevedo, S. Lacorte, T. Vinhas, P. Viana, D. Barceló, J. Chromatogr. A 879 (2000) 13.
[3] D. Barceló, M.-C. Hennion, Trace Determination of Pesticides and their Degradation Products in Water, Elsevier, Amsterdam, 1997.
[4] H. Sabik, R. Jeannot, B. Rondeau, J. Chromatogr. A 885 (2000) 217.
[5] J. Dugay, C. Miége, M.-C. Hennion, J. Chromatogr. A 795 (1998) 27.
[6] A.A. Boyd-Boland, S. Madgic, J.B. Pawliszyn, Analyst 121 (1996) 929.
[7] J. Pawliszyn, Solid-phase Microextraction: Theory and Practice, Wiley–VCH, New York, 1997.
[8] Z. Zhang, M. Yang, J. Pawliszyn, Anal. Chem. 66 (1994) 844A.
[9] H. Lord, J. Pawliszyn, J. Chromatogr. A 885 (2000) 153.
[10] R.E. Shirey, R.F. Mindrup, SPME-adsorption vs. Absorption: Which Fiber is Best For Your Application?, Sigma–Aldrich, 1999.
[11] C. Gonçalves, M.F. Alpendurada, J. Chromatogr. A 963 (2002) 19.
[12] C. Aguilar, A. Penalver, E. Pocurull, J. Ferre, F. Borrull, R.M. Marcé, J. Chromatogr. A 844 (1999) 425.
[13] S. Madgic, J.B. Pawliszyn, J. Chromatogr. A 723 (1996) 111.
[14] R.A. Doong, P.L. Liao, J. Chromatogr. A 918 (2001) 177.
[15] I. Valor, J.C. Moltó, D. Apraiz, G. Font, J. Chromatogr. A 767 (1997) 195.
[16] D.A. Lambropoulou, T.A. Albanis, J. Chomatogr. A 922 (2001) 243.
[17] M.E.C. Queiros, S.M. Silva, D. Carvalho, F.M. Lancas, J. Environ. Sci. Health Part B, Pest Food. Contam. Agri. Wastes 36 (2001) 517.
[18] Z.W. Yao, G.B. Jiang, J.M. Liu, W. Cheng, Talanta 55 (2001) 807.
[19] J. Beltran, F.J. Lopez, O. Cepria, F. Hernandez, J. Chromatogr. A 808 (1998) 257.

[20] R. Ferrari, T. Nilsson, R. Arena, P. Arlati, G. Bartolucci, R. Basla, F. Cioni, G. Del Carlo, P. Dellavedova, E. Fattore, M. Fungi, C. Grote, M. Guidotti, S. Morgillo, L. Muller, M. Volante, J. Chromatogr. A 795 (1998) 371.
[21] F. Hernandez, J. Beltran, F.J. Lopez, J.V. Gaspar, Anal. Chem. 72 (2000) 2313.
[22] D. A Lambropoulou, I.K. Konstantinou, T.A. Albanis, Int. J. Environ. Anal. Chem. 78 (2000) 223.
[23] C.G. Zambonin, F. Palmisano, J. Chromatogr. A 874 (2000) 245.
[24] I. Valor, M. Perez, C. Cortada, D. Apraiz, J.C. Moltó, G. Font, J. Sep. Sci. 24 (2001) 39.
[25] A.A. Boyd-Boland, S. Madgic, J.B. Pawliszyn, Analyst 121 (1996) 929.
[26] J. Beltran, F.J. López, F. Hernández, J. Chromatogr. A 885 (2000) 389.
[27] E. Baltussen, P. Sandra, F. David, H.G. Janssen, C. Cramers, Anal. Chem. 71 (1999) 5213.
[28] J. Poerschmann, T. Gorecki, F.D. Kopinke, Environ. Sci. Technol. 34 (2000) 3824.
[29] T. Górecki, X. Yu, J. Pawliszyn, Analyst 124 (1999) 643.
[30] J. Koziel, M. Jia, J. Pawliszyn, Anal. Chem. 72 (2000) 5178.
[31] L. Wennrich, P. Popp, G. Koller, J. Breuste, J. AOAC Int. 84 (2001) 1194.
[32] M. Correia, C. Delerue-Matos, A. Alves, J. Chromatogr. A 889 (2000) 59.

6.3 APLICAÇÃO DA MICROEXTRACÇÃO EM FASE SÓLIDA SEGUIDA DE CROMATOGRAFIA GASOSA E ESPECTROMETRIA DE MASSA SEQUENCIAL PARA A ANÁLISE DE RESÍDUOS DE PESTICIDAS EM AMOSTRAS DE ÁGUA, COM ELEVADA SENSIBILIDADE, SELECTIVIDADE E CAPACIDADE DE CONFIRMAÇÃO

Com base na publicação:

Gonçalves, C., Alpendurada, M.F. – Solid-phase micro-extraction-gas chromatography-(tandem) mass spectrometry as a tool for pesticide residue analysis in water sample at high sensitivity and selectivity with confirmation capabilities. J. Chromatogr. A, 1026 (2004) 239-250.

Available online at www.sciencedirect.com
SCIENCE DIRECT®
JOURNAL OF CHROMATOGRAPHY A
ELSEVIER
Journal of Chromatography A, 1026 (2004) 239–250
www.elsevier.com/locate/chroma

Solid-phase micro-extraction–gas chromatography–(tandem) mass spectrometry as a tool for pesticide residue analysis in water samples at high sensitivity and selectivity with confirmation capabilities

C. Gonçalves[a], M.F. Alpendurada[a,b,*]

[a] *Laboratory of Hydrology, Faculty of Pharmacy, University of Porto, Rua Anibal Cunha 164, 4050-047 Porto, Portugal*
[b] *IAREN – Water Institute of the Northern Region, Rua Dr. Eduardo Torres 229, 4450-113 Matosinhos, Portugal*

Received 4 August 2003; received in revised form 17 October 2003; accepted 30 October 2003

Abstract

Gas chromatography–mass spectrometry (GC–MS) has been widely applied for pesticide monitoring because of its high sensitivity and specificity and for the potential of multi-residue and multi-class analysis. An analytical procedure was developed for the determination of pesticide multi-residues in water samples combining solid-phase micro-extraction (SPME) and gas chromatography–ion trap mass spectrometry. For SPME extraction a poly(dimethylsiloxane)–divinylbenzene coated fibre was selected whereas the mass spectrometer was operated under full scan, selected ion storage (SIS), μSIS (SIM) and MS–MS and the figures of merit compared. Quantitative and qualitative (confirmatory) capabilities of each operation mode are discussed. Using MS–MS, precision was typically below 10% and limits of detection (LODs) were improved by 1.3 to 20 times (to low- or sub-ppt levels) compared to μSIS, with the advantage of maintaining identification capabilities. The combination of selective extraction by SPME and highly selective determination by GC–MS–MS made possible ultra-selective and essentially error-free determination of pesticides in complex environmental samples. This aspect will be highlighted in the paper.
© 2003 Elsevier B.V. All rights reserved.

Keywords: Water analysis; Pesticides

1. Introduction

The contamination of the aquatic environment by organic pollutants, such as pesticides is a matter of great concern world-wide. In addition to effecting human health many pesticides released into the environment can also disrupt the normal endocrine function in a variety of aquatic life and wildlife [1,2].

In the last few decades, pesticides have been used on an increasingly wider scale throughout the world, although lately there is a tendency to slow down, or at least a motivation to use less harmful molecules. Pesticides are characterised by their diversity, their different physical and chemical properties and their low concentrations in real samples [3]. On account of the large number of active ingredients used, analytical procedures are required for the detection of the greatest number of compounds possible, with the fewest number of extraction and clean-up steps [3–5]. Because of the large-scale dilution these contaminants undergo in aquatic matrices, an enrichment procedure consisting on liquid–liquid extraction (LLE), solid-phase extraction (SPE), or more recently, solid-phase micro-extraction (SPME) is currently employed. SPME is a modern technique that consists on direct extraction of the analytes with the use of a small-diameter fused-silica fibre coated with an adequate polymeric stationary phase [6,7]. In recent years, SPME has gained widespread acceptance for the determination of a wide spectrum of analytes in various fields, such as environmental, forensic, pharmaceutical, food, beverage and flavour chemistry [8–10]. In the present study, a poly(dimethylsiloxane)–divinylbenzene (PDMS–DVB) SPME fibre was used and subsequent analysis was carried

* Corresponding author. Tel.: +351-222078958; fax: +351-22-9364219.
E-mail address: mfalpendurada@iaren.pt (M.F. Alpendurada).

0021-9673/$ – see front matter © 2003 Elsevier B.V. All rights reserved.
doi:10.1016/j.chroma.2003.10.117

out by gas chromatography–mass spectrometry (GC–MS). MS is a very powerful tool for the identification and quantification of organic compounds in complex samples [1,3,5,11–14]. GC–MS operated under electron impact (EI) ionisation is certainly the most widely employed technique for these purposes [5]. A compound specific fragmentation pattern is thereby obtained comprising valuable information for elucidation of the identity of the solutes, which can be accomplished comparing their mass spectra with library-standard spectra (full scan or MS–MS). For quantification of priority pollutants, recording full scan spectra is advised and, in some countries, even required [11]. The identity of the analytical results must be firmly established prior to meaningful quantitative information can be extracted from the chromatograms i.e. without producing false positive results. Recently, a tendency has been observed towards the use of GC–MS (in the selected ion monitoring mode (SIM)) for quantitative purposes, in addition to the application as a confirmation technique following analysis by other GC detection systems such as electron-capture detection (ECD) and nitrogen–phosphorus detection (NPD). When operated in the scan mode, MS works as an universal detection method with only moderate sensitivity, however monitoring specific fragment ions from the analytes usually results in improved sensitivity, selectivity and accuracy in the determination [5,11,12].

Compared to single stage MS modes, tandem mass spectrometry (MS–MS) offers a higher degree of selectivity and sensitivity. MS–MS enables the analysis of pesticide trace levels in the presence of interfering compounds without losing identification capability due to a drastic reduction in the background [2,11,13–15]. Those analysis, in the past, which proved to be complicated are now made more straightforward by using MS–MS. Ion trap detectors are the most commonly used mass analysers to perform MS–MS once they have clear advantages in terms of cost, size, weight and pumping requirements [16].

The literature contains examples of the application of MS–MS to the determination of pesticide residues, with SPE enrichment or clean-up, in different matrices such as: waters [1,3,15], biological fluids [17–20] and vegetables [21]. This paper reports on the association of SPME with mass spectrometric detection and the merits of different operation modes will be compared. The aim of the present work was: (i) to develop a SPME-based procedure for screening purposes capable of qualitative (full scan) and quantitative (SIM) determination of organochlorine (OCPs), organophosphorous (OPPs), triazine, pyrethroid and other pesticides in groundwater samples; (ii) to develop a SPME–GC–MS–MS method based on pesticide occurrence in groundwater from an intensive horticulture area in Póvoa de Varzim in North Portugal. To our knowledge, only a few authors have explored the excellent selectivity and sensitivity that is recognisable to both SPME and MS–MS combined in a single technique.

2. Experimental

2.1. Chemicals and reagents

All pesticide analytical standards were supplied by Riedel-de Häen (Seelze, Germany). Exception noted for the organochlorine insecticides, which were purchased as a commercial mixture (EPA 608 Pesticide mix, 20 mg l^{-1}) from Supelco (Bellefonte, PA, USA), individual stock standard solutions were prepared by exact weighting of high-purity substances and dissolving them in an appropriate solvent as follows: pyrethroid insecticides were prepared in ethyl acetate, the organophosphorous insecticides and triazine herbicides were dissolved in methanol, individual solutions of some other pesticides were also made in methanol. Four separate mixtures by chemical group were then prepared in methanol containing 2.0 mg l^{-1} each individual pesticide, while hexachlorobenzene (HCB) and isodrin were added to the OCPs commercial mixture to obtain a stock solution of 100 μg l^{-1}, in methanol. Stock standard solutions were stored in a freezer whereas working standard solutions at concentrations ranging from 0.001 to 1.0 μg l^{-1} were prepared daily by appropriate dilution in ultrapure Milli-Q water (Millipore, Molsheim, France).

Ethyl acetate, methanol and *n*-hexane used in the handling of standards were of Pestanal and ChromaSolv grade from Riedel-de Häen, and SupraSolv grade from Merck (Darmstadt, Germany), respectively. Initial SPME optimisation involved pH adjustment using a Crison pH meter (Crison, Barcelona, Spain), and ionic strength corrections with NaCl analytical-reagent grade from Merck.

2.2. SPME extraction procedure

All SPME fibres (Supelco, Bellefonte, USA) used for sample preparation were new at the beginning of the study and were conditioned according to supplier's instructions. Manual operation of the SPME technique was performed using 4 ml amber glass vials, manual SPME holder and a Variomag agitation plate (Monotherm, Munich, Germany) with temperature control. The extraction procedure adopted for this study consisted on the following: 3 ml-aliquots of the samples were extracted by immersion of a 60 μm PDMS–DVB coated fibre during 60 min; sample agitation was employed at the maximum agitation rate (around 900 rpm) and extraction temperature kept at 60 °C; neither pH adjustment nor ionic strength correction were needed.

2.3. Gas chromatographic analysis

Chromatographic analyses were carried out in a Varian 3400 CX (Walnut Creek, CA, USA) gas chromatograph equipped with a SPI/1078 temperature-programmable injector and a CPSil-8 CB low bleed MS capillary column (30 m × 0.25 mm I.D., 0.25 μm film thickness) from Chrompack (Middelburg, The Netherlands). The split/splitless injection

port was maintained in split-less mode for 5 min, the lapse of time for SPME fibre desorption and set at a fixed temperature of 250 °C.

High-purity helium (99.9999%) at a flow rate of 1.0 ml/min (150 °C oven temperature) was used as the carrier gas and also as the collision gas at the ion trap chamber for MS–MS experiments. Samples were analysed using the following oven temperature programme: initial temperature 80 °C (held for 2 min), increased by 15 °C min^{-1} to 190 °C (held for 4 min), increased by 10 °C min^{-1} to 230 °C (held for 5 min) and, finally, increased by 10 °C min^{-1} to 290 °C and held at this temperature for 6 min (3 min in the case of MS–MS method).

2.4. Mass spectrometry instrumental conditions

A Saturn 2000 ion trap mass spectrometer from Varian Instruments (Sunnyvale, CA, USA) operated in the EI mode was used for full scan, selected ion storage (SIS), μSIS (similar to SIM) and MS–MS experiments. The manifold, trap and transfer line temperatures were set at 50, 200 and 240 °C, respectively. The analyses were performed with a filament–multiplier delay of 5 min (11 min for MS–MS) and acquisition was performed in the range *m/z* 35–430, with a background mass of *m/z* 45. The emission current of the ionisation filament was set at 50 μA generating electrons with 70 eV energy and the axial modulation amplitude voltage was 3.7 V. The mass spectrometer was calibrated frequently to perfluortributylamine (PFTBA) through an auto tune process. The electron multiplier voltage was established by auto tune at around 2000 V (+300 V offset above the adjusted value). The automatic gain control (AGC) was turned on in order to achieve the maximum sensitivity by completely filling the trap with target ions. Nevertheless, its adjustment depends on the operation mode because the correct number of ions present simultaneously in the trap may be different [8]. To avoid phenomena of charge repulsion or ion molecule reactions induced by the ion trap saturation, the target counts (target total ion chromatogram TIC) were limited to: 65 000 in full scan MS, 15 000 in SIS and μSIS, and 5000 in MS–MS. Instrument control and mass spectrometry data were managed by a personal computer running the Saturn GC–MS WorkStation software (version 5.52).

3. Results and discussion

3.1. SPME details

Most of the papers published until now dealing with pesticide multi-residue methods use SPE as the extraction procedure [22–24]. Although this wide application of SPE to the analysis of environmental water samples, which is also the recommended technique by the regulatory agencies in the EU and USA, losses of analyte or matrix interferences are frequently mentioned [25]. In addition to obvious advantages in terms of simplicity, rapidity, low cost, automation and solvent-free properties, SPME overcomes problems related to matrix effects and elution of impurities generated by extraction materials [6,7,10,25]. In a previous work by the same authors, an effective analytical protocol was established based on SPME extraction and coupled electron-capture detection–thermionic specific detection (ECD–TSD) [9]. The same extraction protocol was adopted here in association with MS detection, which should give equivalent sensitivity but also allowing the uncquivocal confirmation of the identity of the pesticides. As a result of the quite different relative sensitivities between detectors towards the groups of pesticides studied, the extraction conditions were checked with this detection system (data not shown). However, no relevant discrepancies were found to entail the use of a different set of SPME conditions. In comparison with the previous method, a few more compounds were included which can now be analysed together. Briefly, a PDMS–DVB fibre was chosen with regard to its intermediate polarity properties that proved to be especially suited for the simultaneous analysis of the target analytes. 3 ml-aliquots of the samples were directly extracted, without any pH or ionic strength correction, by immersion of a 60 μm PDMS–DVB fibre during 60 min; a vigorous sample agitation was employed and the temperature controlled at 60 °C. Further details can be found elsewhere [9].

3.2. Single MS analysis

An extent list of pesticides including the most currently used, former persistent compounds and degradation products belonging to the chemical classes mentioned in Section 2.1 were selected for a screening method based on single stage MS (see Table 1). Despite the well-known selectivity of SPME procedure, MS total ion chromatograms (TICs) were characterised by the appearance of some peaks in the blank, mainly from impurities of the fibres, glass material or septa. The selection of characteristic fragment ions for integration avoided such possible interferences and allowed to obtain acceptable reagent and field blanks. As it is well accepted, MS in full scan mode lacks sensitivity when compared to conventional selective detection methods like ECD or NPD. Indeed, its major utility is related to identity confirmation and structural elucidation rather than for quantitative purposes. Even so, most of the times this approach showed adequate sensitivity for pesticide residue analyses, on account of the 0.1 μg l^{-1} limit established by the European Union (EU) legislation for drinking waters. The limits of detection (LODs) for each pesticide were determined as the lowest concentration of a compound giving a response with a signal-to-noise ratio (S/N) of 3 and the limits of quantitation (LOQs) giving a S/N ratio of 10, computed from the analysis of a low concentration standard (0.1 μg l^{-1}). Retention time data, quantitation ions and LODs are summarised in Table 1. Positive results in real samples at defined retention times would be confirmed later by comparing their

Table 1
Pesticides included in the SPME–GC–MS methods (full scan, SIS and μSIS), respective retention times (t_R) and quantitation ions (m/z) used for calculations

Peak no.	Pesticides	t_R (min)	Quantitaion ion (m/z)	SIS, μSIS segment	Full scan LOD ($\mu g l^{-1}$)	SIS, LOD ($\mu g l^{-1}$)	μSIS			
							LOD ($\mu g l^{-1}$)	Repeatability (% R.S.D.), $n = 6$	Intermediate precision (% R.S.D.), $n = 20$	Determination coefficient (r^2)
1	Dichlorvos	7.298	109	1	0.078	0.020	0.032	13.5	15.1	0.958
2	DEA	11.932	172	2	1.006	0.236	0.146	8.5	8.2	0.991
3	HCB	12.920	284	3	0.005	0.002	0.001	18.7	19.8	0.990
4	Dimethoate	13.115	87	3	12.414	12.857	5.263	11.7	10.1	0.848
5	Simazine	13.295	201	4	0.131	0.182	0.200	15.6	28.5	0.870
6	Atrazine	13.432	200	4	0.010	0.008	0.006	8.9	9.4	0.993
7	Propazine	13.535	214	4	0.006	0.005	0.005	5.6	11.1	0.994
8	Terbuthylazine	13.908	214	4	0.004	0.002	0.004	4.0	9.6	0.994
9	Lindane	13.934	181	4	0.005	0.002	0.001	5.1	9.1	0.992
10	Diazinon	14.017	179	4	0.003	0.002	0.002	13.3	13.0	0.998
11	Propyzamide	14.019	173	4	0.005	0.004	0.004	7.6	17.2	0.984
12	Fonofos	14.123	109	4	0.003	0.002	0.002	10.9	13.0	0.993
13	Metribuzin	15.715	198	5	0.032	0.038	0.045	7.8	11.9	0.995
14	Parathion-methyl	15.890	263	5	0.006	0.006	0.012	5.5	10.5	0.996
15	Alachlor	15.895	188	5	0.005	0.004	0.003	6.8	11.3	0.992
16	Simetryn	16.024	213	5	0.014	0.011	0.008	13.9	17.9	0.890
17	Heptachlor	16.224	272	6	0.010	0.004	0.002	12.4	20.0	0.983
18	Fenitrothion	16.631	260	6	0.005	0.003	0.001	11.6	11.0	0.997
19	Malathion	16.822	127	6	0.030	0.021	0.019	11.4	17.0	0.981
20	Chlorpyrifos	17.059	314	6	0.004	0.001	0.002	12.1	19.4	0.962
21	Aldrin	17.289	66	7	0.014	0.012	0.120	35.3	26.4	0.864
22	Parathion-ethyl	17.299	139	7	0.014	0.016	0.014	15.9	21.1	0.988
23	Chlorfenvinphos E	18.006	267	7	0.027	0.025	0.005	12.8	19.9	0.981
24	Pendimethalin	18.054	252	7	0.002	0.002	0.003	9.2	25.7	0.994
25	Isodrin	17.187	193	7	0.018	0.010	0.012	17.3	21.4	0.964
26	Chlorfenvinphos Z	18.356	267	7	0.068	0.045	0.009	9.1	11.6	0.981
27	Heptachlor epoxide	18.475	353	7	0.001	0.0006	0.001	12.1	11.7	0.995
28	Procymidone	18.729	96	8	0.005	0.003	0.006	8.8	11.1	0.994
29	γ-Chlordane	19.275	373	8	0.003	0.002	0.0006	17.6	22.1	0.997
30	Tetrachlorvinphos	19.304	329	8	0.058	0.020	0.010	10.5	12.1	0.998
31	Endosulfan I	19.792	241	9	0.010	0.006	0.004	10.8	11.7	0.991
32	Fenamiphos	19.823	303	9	0.036	0.030	0.012	8.1	10.2	0.991
33	4,4′- DDE	20.558	318	10	0.001	0.0009	0.0007	15.3	26.0	0.983
34	Dieldrin	20.898	79	10	0.009	0.009	0.010	11.5	14.8	0.988
35	Endrin	21.872	81	10	0.051	0.060	0.019	14.6	18.8	0.984
36	Endosulfan II	22.395	195	11	0.018	0.008	0.005	11.2	11.9	0.991
37	4,4′-DDD	22.537	235	11	0.002	0.002	0.001	7.3	17.1	0.994
38	Endrin aldehyde	23.074	345	12	0.009	0.012	0.014	10.6	18.1	0.984
39	Endos. sulphate	24.067	272	12	0.005	0.003	0.001	4.9	11.5	0.997
40	4,4′-DDT	24.184	235	12	0.013	0.012	0.002	14.7	24.6	0.979
41	Azinphos-methyl	27.263	160	13	0.194	0.053	0.057	21.9	26.1	0.996
42	λ-Cyhalothrin	27.513	181	13	0.015	0.006	0.008	34.5	34.2	0.983
43	α-Cypermethrin	30.570	181	14	0.067	0.029	0.037	20.6	26.3	0.977
44	Deltamethrin	34.041	172 + 174 + 181	14	0.375	0.338	0.170	31.5	31.5	0.975

Quantitation ions are valid for the three operation modes except lindane with m/z 183 and azinphos-methyl with m/z 132 in the SIS mode, and dimethoate with m/z 85 + 86, lindane with m/z 183, procymidone with m/z 95 and azinphos-methyl with m/z 132 in the μSIS mode. Time segments are applicable for SIS and μSIS methods (see also Table 2). LODs are given for the three operation modes under single MS whereas other validation parameters are also given for the μSIS approach.

measured mass spectra with reference spectra included in the US National Institute of Standards and Technology (NIST) database, requiring a minimum spectral fit of 700. Not always, this could be attained around the LOQ value due to high background signal, unless background correction was applied. This procedure was most useful for identification of unknown compounds, not included in the present method, that were detected in real samples such as: metolachlor, metalaxyl, benalaxyl, pirimicarb, quinalphos and prometryn.

Through a technique called selected ion storage (SIS), ion trap mass spectrometers are able to enrich the sample ions relative to the unwanted matrix ions by storing the former and ejecting the later from the trap. This allows for a much cleaner spectrum and a considerable increase in sensitivity. In practice, this is accomplished defining time segments throughout the chromatographic run containing the most appropriate mass ranges to be stored. Since the most typical parts of each particular spectrum can be collected in a narrow scan range this technique also allows to obtain a library-search spectrum. The time segments and SIS mass ranges are presented in Table 2 whereas LODs calculated as S/N 3, as described above, are presented in Table 1. Exception noted for dimethoate, simazine, metribuzin, parathion-ethyl, endrin and endrin aldehyde, the LODs ranged from equal to 4.3 times lower than those obtained under the full scan acquisition, with an average improvement of 1.7. Despite combining an enhanced sensitivity while maintaining some degree of qualitative information, this technique is labour intensive to settle the mass ranges that best match the spectra of the analytes included in a SIS segment.

Another alternative to improve by a significant factor the LODs in MS analyses is to perform μSIS (similar to SIM) although with the expense of qualitative information. Table 1 shows the LODs (S/N of 3) obtained by monitoring the corresponding quantitation ion (1 *m/z* window) of each pesticide in μSIS mode. With exception for simazine, metribuzin, parathion-methyl, aldrin, pendimethalin, procymidone, dieldrin and endrin aldehyde, the LODs were lowered up to 7.5 times (2.6 times on average), regarding those in full scan mode. These values were later confirmed analysing standards of decreasing concentrations down to 0.001 $\mu g l^{-1}$. Only those for dichlorvos, malathion, endrin and endrin aldehyde proved to be a little higher than the ones theoretically calculated.

As these were the lowest detection limits that we could achieve for pesticide analysis in water samples processed according to the described SPME–GC–MS procedure, the validation of the method included also an estimation of the repeatability and intermediate precision at 0.1 $\mu g l^{-1}$ concentration level (see Table 1). With a few exceptions, repeatability as within-day RSD of peak areas was always below 20%. The values obtained for aldrin and azinphos-methyl can be explained by their LODs being close to the tested concentration whereas the pyrethroids group typically show higher variation between analyses. Pyrethoids are detected as a pair of chromatographic peaks and the values presented here are reported for the most intense one, although for quantitation purposes both should be considered. The intermediate precision calculated as between-day RSD of peak areas in three consecutive days can be considered acceptable, as it was generally lower than 25% (average value of 17%). The poorer values obtained for aldrin, simazine and pyrethroids can be explained by the same reasons discussed above whereas for pendimethalin and 4,4′-DDE it seems that the extraction performance of the SPME fibre was less consistent during time.

Since this method was intended for quantitative purposes, calibration curves were constructed over 6 concentration levels (three replicates each): 0.001, 0.01, 0.05, 0.1, 0.5 and 1.0 $\mu g l^{-1}$ (10 times higher for dimethoate and desethylatrazine DEA). The determination coefficients (r^2) are presented in Table 1. In summary, for most of the compounds the calibration graphs were good ($r^2 > 0.990$), however for 12 of them the values can only be considered acceptable ($r^2 > 0.980$) while for 9 compounds they were considered

Table 2
Instrumental conditions for operation of the mass spectrometer in selected ion storage (SIS) mode: SIS time ranges, SIS mass ranges and number of compounds monitored

SIS segments	Time ranges (min)	Number of peaks	SIS mass ranges (*m/z*)
1	6.00–9.00	1	109–110, 185–185
2	11.00–12.10	1	172–174, 187–187
3	12.10–13.20	2	87–93, 142–142, 282–288
4	13.20–14.50	8	109–110, 137–137, 172–184, 200–202, 214–219
5	14.50–16.10	4	109–109, 188–188, 198–200, 213–214, 262–264
6	16.10–17.15	4	97–100, 124–127, 260–278, 314–316
7	17.15–18.60	7	65–67, 137–139, 193–195, 252–278, 352–354
8	18.60–19.50	3	95–97, 109–109, 283–283, 329–331, 371–375
9	19.50–20.30	2	154–159, 195–197, 237–243, 302–304
10	20.30–22.00	3	78–82, 246–246, 277–281, 316–318
11	22.00–22.90	2	159–165, 195–197, 234–241
12	22.90–24.40	3	165–165, 229–236, 270–274, 345–345, 387–387
13	26.50–29.00	2	130–132, 159–161, 180–182, 197–197
14	29.00–34.33	2	170–174, 180–182

poor ($r^2 > 0.848$). The authors consider that these values are mostly affected by some less precision of the method for certain compounds, as can be observed in Table 1, rather than a lack of linearity. The inclusion of a great number of compounds to be monitored under MS may have produced a negative effect in the precision of the technique.

The overall evaluation of SPME–GC–MS performance characteristics indicates that this method is appropriate for pesticide residue analysis in ground and drinking waters, on account of the 0.1 $\mu g l^{-1}$ regulatory limit. Except for DEA, dimethoate and deltamethrin, which cannot be analysed at the required levels, the method showed adequate sensitivity, selectivity and precision. In general, as it has been reported by other authors, the technique is a bit less sensitive and precise compared to others employing selective detectors, however it has several advantages as discussed before. Fig. 1 presents chromatograms of a pesticide mixture and a contaminated groundwater sample analysed by SPME–GC–MS in the μSIS mode.

3.3. Tandem MS analysis

Recent improvements in commercial ion trap tandem MS equipment are encouraging their introduction into research and routine environmental laboratories [5]. In fact, application of MS–MS as a tool for unequivocal confirmation of pesticides in environmental samples is only in the beginning. Monitoring secondary fragmentation products enables better discrimination from matrix interferences than single MS [3]. In MS–MS, a specific ion (parent ion) formed by EI or chemical ionisation is isolated in the ion trap and subsequently undergoes fragmentation increasing its collisions with the helium molecules, that acts as carrier and collision gas [26]. By excluding all ions from the trap except the selected parent ion, a drastic reduction in the background of the sample is achieved. Only the parent ion is fragmented into characteristic product ions and MS–MS spectrum is obtained by scanning the mass spectrometer in the normal manner.

An MS–MS method was established based on the known occurrence of certain pesticides in groundwater samples from Póvoa de Varzim, in North Portugal, due to contamination from intensive horticulture and greenhouse farming (see Table 3).

MS–MS requires: (i) good selection of the parent ion, (ii) efficient ion isolation and storage and (iii) optimum collision induced dissociation (CID) conditions.

(i) The selection of the parent ion was accomplished from a compromise of the following two considerations: it should have the highest possible *m/z* value, good selectivity (high *m/z* ions are less prone to interferences) and the highest ion intensity in the single MS spectrum, good sensitivity (detection limits are highly dependent on the abundance of the parent ion). Whenever possible, selecting the molecular ion can give rise to an MS–MS spectrum matching a standard electron impact spectrum.

(ii) The isolation efficiency of the parent ion depends on the radiofrequency (RF)-storage voltage applied, which is related to the trapping field that stabilises the parent ion. The RF storage level for each analyte was calculated using the ion trap MS–MS tool kit software considering the *m/z* ratio of the parent ion and a "*q*" value of 0.4. A 2-*m/z*-isolation window was used.

(iii) The non-resonant mode of excitation gave enough cleavage energy to obtain good quality secondary spectra. The optimisation of the excitation amplitude voltage for each pesticide was carried out experimentally using the automated method development (AMD) option included in the MS–MS tool kit software. The optimum value for this parameter was reached when a secondary spectrum with multiple and intense product ions was obtained while keeping the parent ion intensity around 10%. Information on the selected parent ion, excitation storage voltage and collision-induced dissociation CID amplitude voltage for each individual pesticide, arranged in time segments, is shown in Table 3. It should be noted that, slightly different CID conditions were selected for the endosulfan isomers, which allowed the confirmation of the identity of each one by library-search. For MS–MS a good chromatographic resolution of the solutes is desirable however, even when this is not possible, the technique may be useful through a variation called multiple reaction monitoring (MRM). MRM allows the resolution of overlapped signals applying different CID conditions that commutate in a short period of time. After acquisition, separate plotting of the experimental data obtained for each pesticide offers a selective chromatogram where quantitation and identification can be conducted [20]. In the established method the entire chromatogram was split into 13 MS–MS segments and 2 MRM segments for the analyte pairs lindane/propyzamide and metolachlor/chlorpyrifos. Fig. 2 presents the MS–MS spectra of alachlor, propyzamide, chlorfenvinphos and endosulfan II. MS–MS spectra of the pesticides obtained in our optimum instrumental conditions were stored in a home-built EI–MS–MS library. Positive analyte identification in real samples required a spectral fit >700 relative to those spectra stored in the home built library. Table 3 presents data on the product ions in MS–MS spectra and respective relative ion intensities.

To confirm that the analytical method has performance capabilities compatible with its use in pesticide monitoring, method validation was carried out afterwards, calculating the detection limits and precision of the entire analytical procedure. At this point of the discussion should be noted that, for the majority of analytes the extracted ion chromatograms (EICs) monitoring the respective quantitation ions had

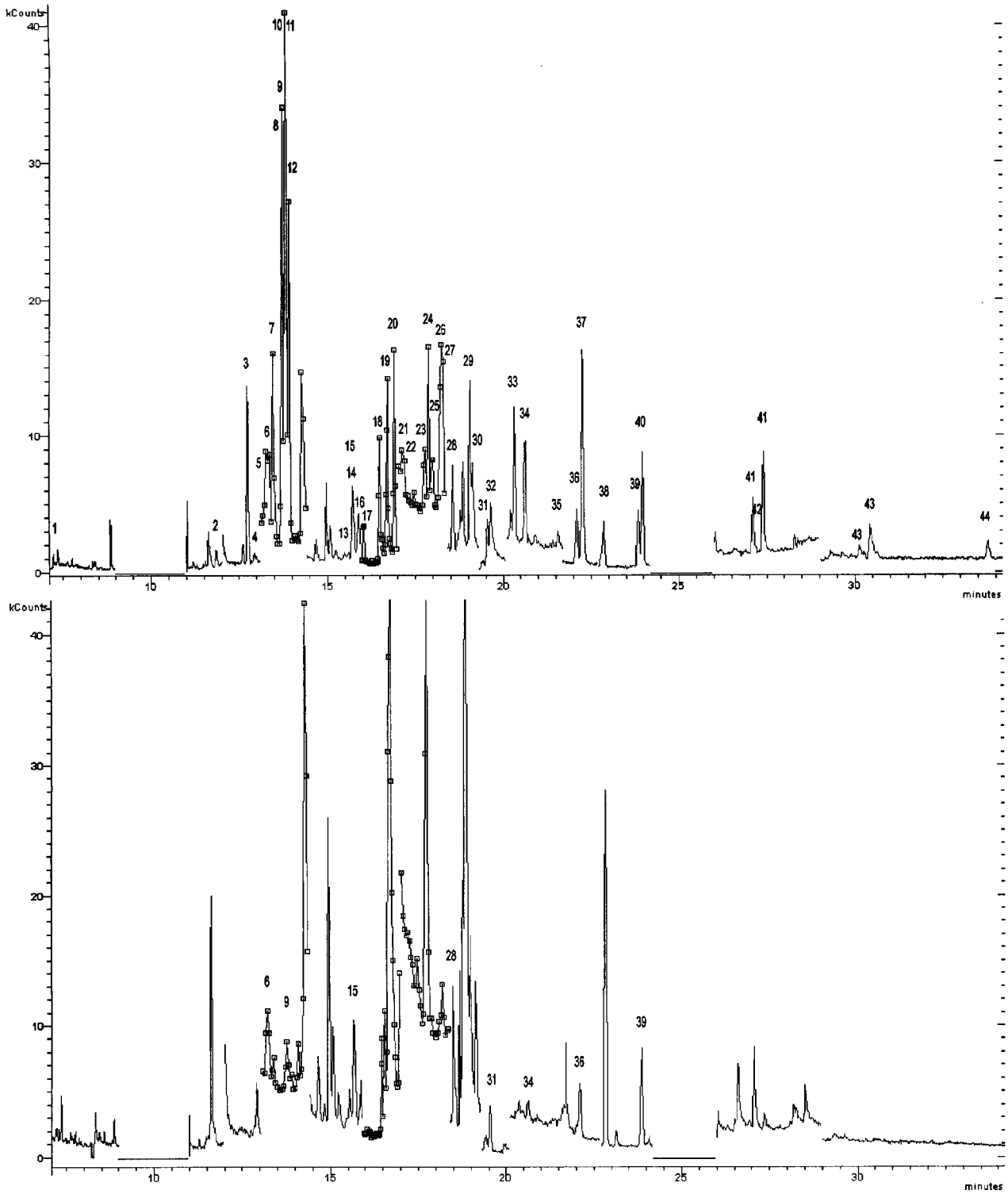


Fig. 1. GC–MS total ion chromatograms obtained under μSIS acquisition after SPME extraction of a 0.1 $\mu g\,l^{-1}$ spiked sample (above) and a contaminated groundwater sample (below) containing the following pesticide concentrations: atrazine 0.043 $\mu g\,l^{-1}$, lindane 0.006 $\mu g\,l^{-1}$, alachlor 0.020 $\mu g\,l^{-1}$, procymidone 0.068 $\mu g\,l^{-1}$, endosulfan I 0.115 $\mu g\,l^{-1}$, dieldrin not quantitated, endosulfan II 0.108 $\mu g\,l^{-1}$ and ensosulfan sulphate 0.597 $\mu g\,l^{-1}$. For peak assignment see Table 1.

Table 3
Operation conditions of the mass spectrometer in order to perform MS–MS: parent ion isolation, collision–induced dissociation (CID) and product ions obtained under the selected instrumental conditions, on distinct time segments

Pesticides	MS–MS segments (min)	Main EI fragment ions *m/z* and (abundance, %)	Parent ion (*m/z*)	Excitation storage level (*m/z*)	CID excitation amplitude (V)	Product ions *m/z* and (relative abundances,%)
DEA	11.00–12.20	187(30), 172(100), 68(26)	172	75.7	85	136(21), 109(32), 100(100)
Atrazine	12.20–13.60	215(64), 200(100), 58(33)	215 (M)	143	98	200 (100), 172 (20)
Lindane	13.60–15.20[a]	219(55), 181(100), 111(33)	183	80.5	76	148(100), 109(58)
Propyzamide		254(35), 173(100), 157(39)	173	76.1	75	145(39), 109(100)
Alachlor	15.20–16.20	188(100), 160(84), 45(44)	188	82.8	66	160(100), 132(98)
Metolachlor	16.20–17.12[a]	238(70), 162(100), 146(12)	162	71.3	68	132(100), 117(60)
Chlorpyrifos		314(100), 197(61), 97(66)	314	138.5	84	286(50), 258(100)
Parathion-ethyl	17.12–17.50	291(100), 109(98), 97(63)	291 (M)	81	58	125(34), 114(100), 109(52)
Pendimethalin	17.50–18.16	252(100), 191(21), 162(20)	252	111.1	72	208(100), 191(65), 162(62)
Chlorfenvinphos Z	18.16–18.60	323(58), 295(38), 267(100)	267	117.7	98	203(46), 159(100)
Procymidone	18.60–19.50	283(60), 96(100), 67(77)	283 (M)	124.3	94	255(100)
Endosulfan I	19.50–20.50	241(99), 195(100), 160(79)	241	106.2	99	206(94), 170(100)
Dieldrin	20.50–21.50	277(34), 263(24), 79(100)	277	122.1	94	241(100), 239(43)
Endosulfan II	21.50–22.70	241(85), 195(100), 160(95)	241	80	83	206(41), 170(100), 136(32)
Endosulfan sulphate	22.70–24.40	387(72), 272(100), 239(50)	272	119.9	98	237(100)
λ-Cyhalothrin	26.80–28–20	197(81), 181(100), 141(50)	197	86.7	70	161(11), 141(100)
α-Cypermethrin	28.20–31.33	181(89), 163(100), 127(99)	181	79.7	90	152(100)

CID time was 20 ms except for endosulfan I and endosulfan sulphate 30 ms. CID fragmentation was achieved with non-resonant wave forms for all compounds. M indicates molecular ion.
[a] Multiple reaction monitoring segments.

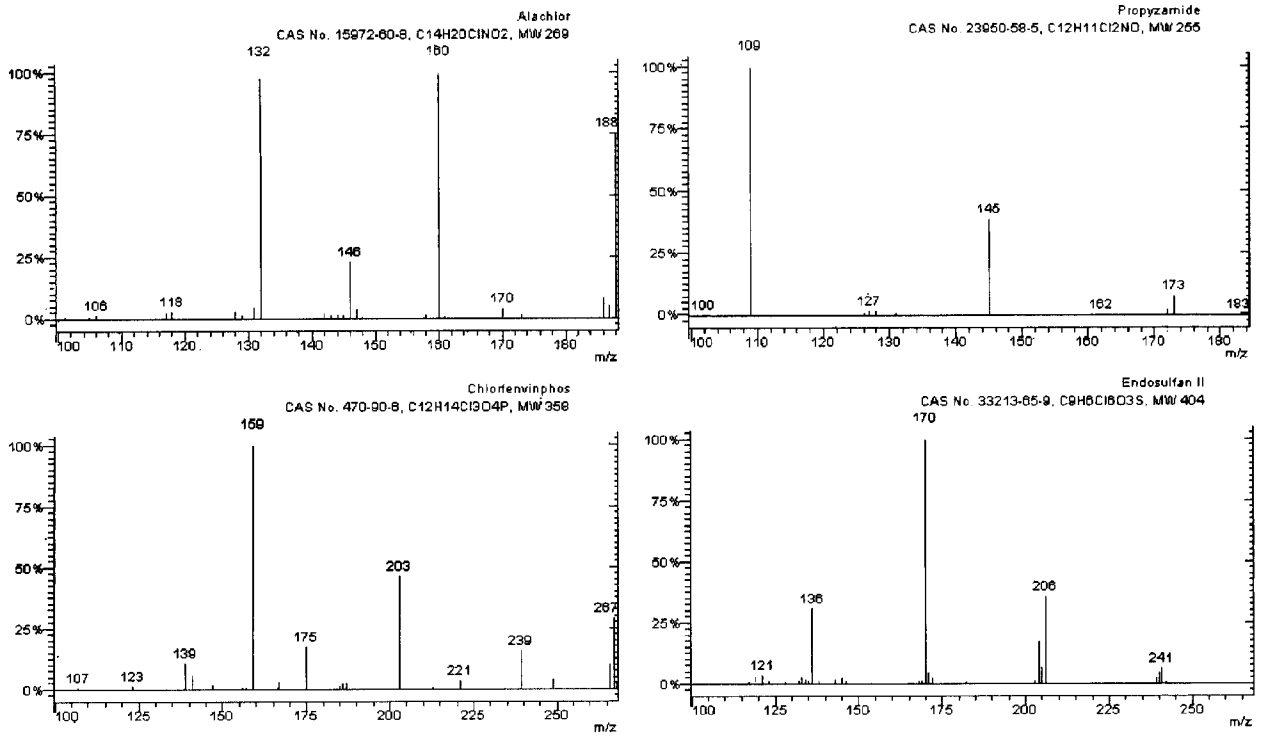


Fig. 2. MS–MS spectra for alachlor, propyzamide, chlorfenvinphos and endosulfan II showing their typical fragmentation patterns in our experimental conditions.

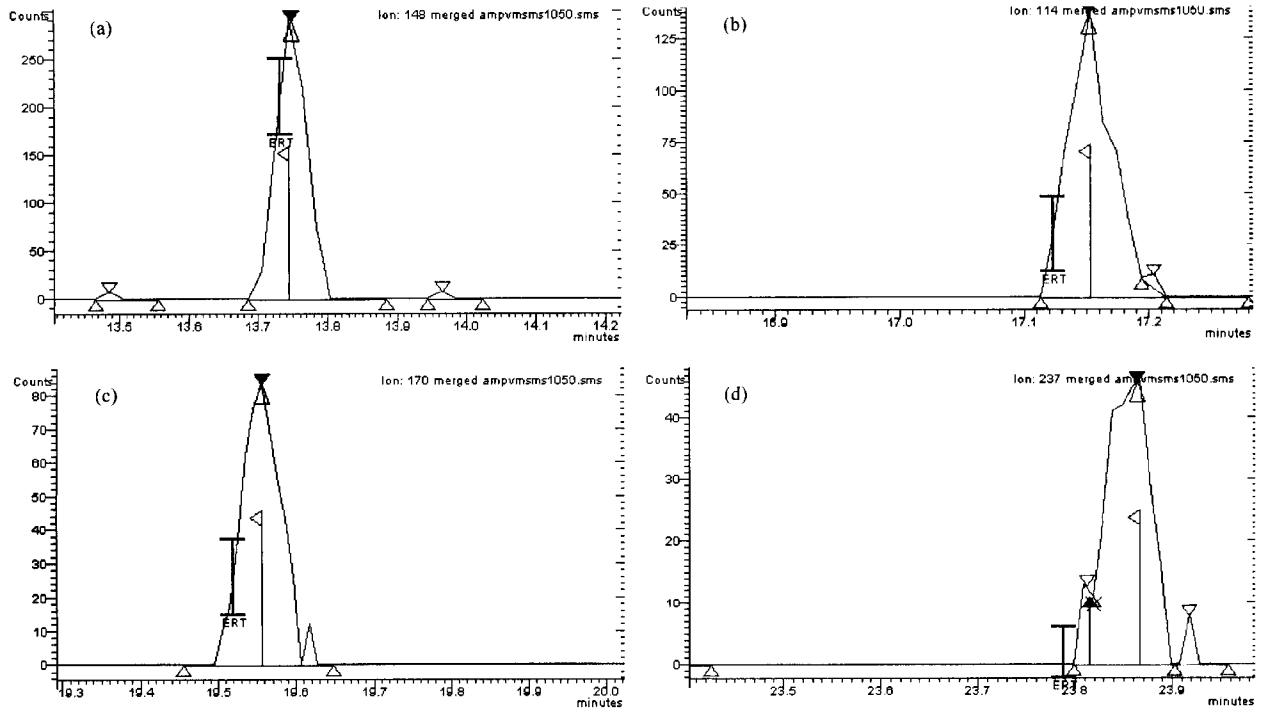


Fig. 3. Analysis of a 0.01 $\mu g l^{-1}$ aqueous solution of the following pesticides: (a) lindane, (b) parathion-ethyl, (c) endosulfan I and (d) endosulfan sulphate by SPME–GC–MS–MS. Extracted ion chromatograms monitoring the quantitation ions of these pesticides and showing low baseline noise.

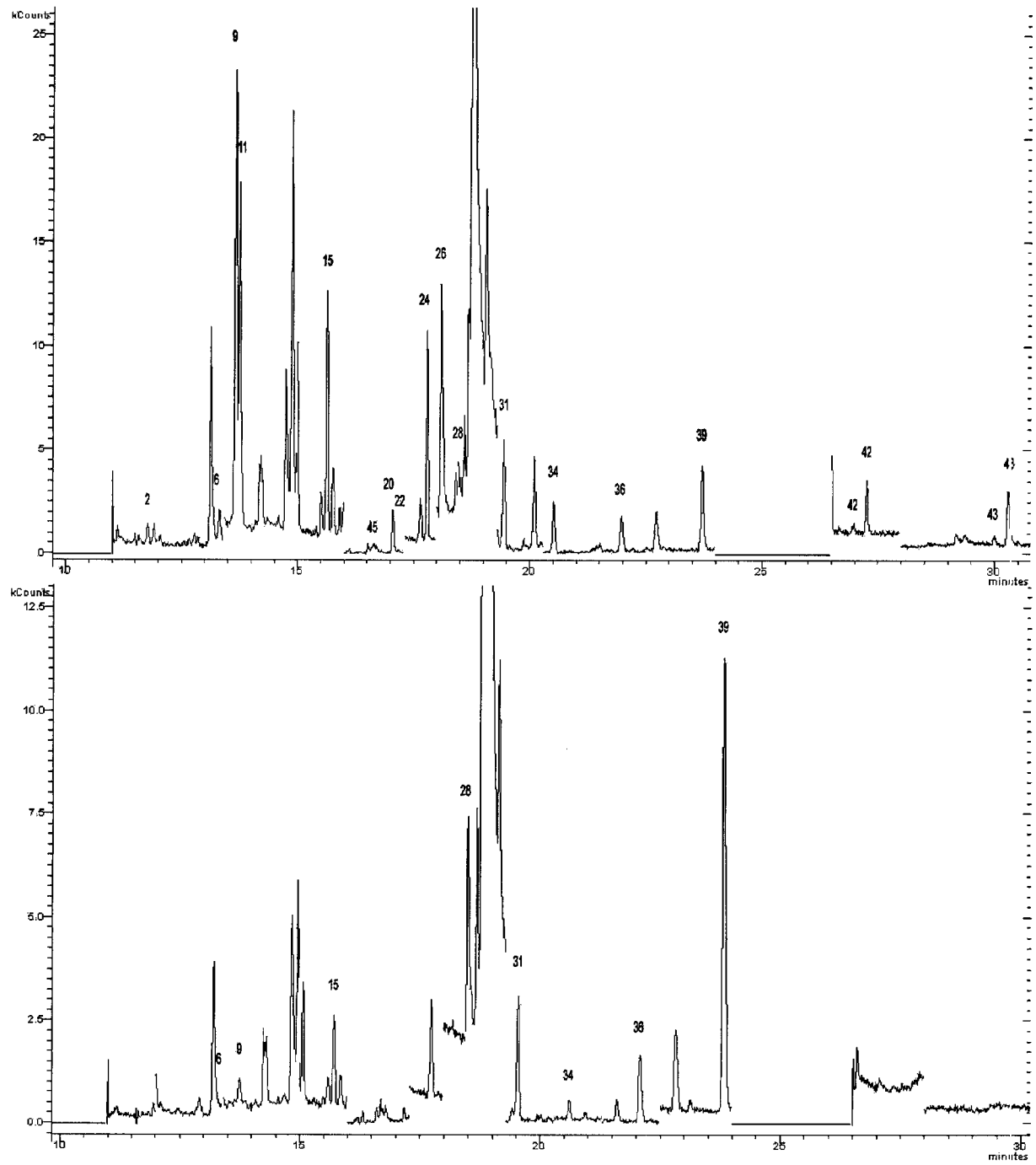


Fig. 4. Tandem MS chromatogram representative from a 0.1 $\mu g l^{-1}$ pesticide standard solution obtained by GC–MS–MS after SPME (above). Tandem MS chromatogram resulting from the analysis of the same contaminated groundwater sample as in Fig. 1 (below). For peak assignment refer to Table 4.

complete absence or extremely low baseline noise in the vicinity of target retention times, both for reagent and field blanks. Fig. 3 presents EICs for lindane, parathion-ethyl, endosulfan I and endosulfan sulphate at 0.01 $\mu g l^{-1}$ concentration level showing what has been described. In this situation, detection limits were determined as the lowest concentration giving a chromatographic peak for the quantitation ion that met the following criteria: peak width higher than 4 scans; maintaining two typical fragments in the spectrum; do not exist in the blank or a S/N of 3. Repeatability as within-day R.S.D. and intermediate precision as between-day R.S.D. of peak areas were also calculated for

Table 4
Pesticides included in the SPME–GC–MS–MS method and respective performance parameters in terms of sensitivity, precision and calibration

Peak No.	Pesticides	Quantitation. ion (m/z)	LOD ($\mu g l^{-1}$)	Repeatability (% R.S.D.), $n = 9$	Intermediate precision (% R.S.D.), $n = 20$	Determination coefficient (r^2)
2	DEA	100	0.040	11.7	15.4	0.991
6	Atrazine	200	0.004	3.7	5.8	0.994
9	Lindane	148	0.0002	7.1	8.1	0.993
11	Propyzamide	109	0.0005	4.6	5.2	0.996
15	Alachlor	160	0.0005	5.6	7.0	0.998
45	Metolachlor	132	0.002	2.9	8.9	0.997
20	Chlorpyrifos	258	0.001	9.9	12.8	0.995
22	Parathion-ethyl	114	0.001	9.2	10.0	0.993
24	Pendimethalin	208	0.002	8.2	10.5	0.995
26	Chlorfenvinphos Z	159	0.002	8.6	9.7	0.997
28	Procymidone	255	0.004	8.5	9.7	0.992
31	Endosulfan I	170	0.0008	5.8	9.8	0.997
34	Dieldrin	241	0.0005	7.7	9.3	0.994
36	Endosulfan II	170	0.001	7.8	8.7	0.999
39	Endos. Sulphate	237	0.0005	6.3	8.5	0.995
42	λ-Cyhalothrin	141	0.002	26.9	24.3	0.985
43	α-Cypermethrin	152	0.004	25.5	28.9	0.989

Note that peak number 45 corresponding to metolachlor at 16.880 min was only analysed by MS–MS.

a 0.1 $\mu g l^{-1}$ pesticide solution. As can be seen in Table 4, the LODs obtained were very low, some of them below 1.0 $ng l^{-1}$ and the rest below 10 $ng l^{-1}$ (except DEA). The precision was also very good typically below 10%. Method calibration was conducted in the same manner as reported before and good determination coefficients ($r^2 > 0.991$) were obtained. MS–MS chromatograms of a 0.1 $\mu g l^{-1}$ standard solution and a contaminated sample are presented in Fig. 4. Better LODs and precision values were obtained using GC–MS–MS rather than GC–MS for all pesticides, likewise it has been reported by other authors [3,15]. Gains in sensitivity up to 10-fold and LODs below 1.0 $ng l^{-1}$ using MS–MS, were also reported [1,3]. The SPME–GC–MS–MS method presented here lowered by a factor of 1.3–20.7 the detection limits obtained in single MS (μSIS mode). SPME-tandem MS allowed to attain a sensitivity comparable to SPE methods, which represent the great majority of applications on this field, with additional advantages.

It is clear from the chromatographic data in Figs. 1 and 4 that the analysis of contaminated samples is much easier using tandem MS, which allows quantitation of lower concentration levels, readily confirmable in the same analysis at LOQ level, which is unlikely with single MS. Furthermore, the SPME–GC–MS–MS method is as sensitive and precise when compared with the previously published SPME–GC–ECD/TSD. Depending on the purpose, screening or monitoring, single MS can also be chosen.

4. Conclusions

Multi residue analysis is the commonest way of determining pesticides. We have carried out experiments on mass spectrometric determination of pesticide residues in water samples after solid-phase micro-extraction and successful methods were established. The PDMS–DVB coating proved to be efficient on the extraction of about 40 pesticides and, thus, suitable for multi residue analysis. Subsequently, the GC–MS technique was selected due to its high selectivity i.e. high discriminating power among analytes and between these and matrix interferences. Used for monitoring or screening purposes a single MS method in the μSIS mode showed adequate sensitivity, selectivity and precision for pesticide analysis, regarding the 0.1 $\mu g l^{-1}$ EU limit. However, its improved sensitivity was accomplished on the expense of qualitative data and thus for confirmation of positive results a second analysis in full scan mode should be conducted. Additionally, in certain circumstances only concentrations well above the LOQ could be confirmed due to the presence of high background in the spectra. The GC–SIS–MS approach didn't prove much useful. For a set of pesticides currently found as contaminants in groundwater samples from Póvoa de Varzim also an SPME–GC–MS–MS method was developed. This approach allowed important improvements in selectivity and sensitivity and thus in identification and quantification capabilities for low traces of pesticides in water samples. Background noise and interferences were almost completely eliminated and clean secondary spectra permitted identifications with high certainty. Analysis of an extent list of analytes under MS–MS is not a limitation however it's difficult to implement and manage.

Acknowledgements

FCT–Fundação para Ciência e Tecnologia is greatly acknowledged for the Ph.D grant PRAXIS XXI/BD/21823/99. The authors would like to thank the IAREN for technical and

financial support. Emílio de Azevedo Campos, S.A. and J. Melo are thanked for technical assistance. We are also grateful to Professor F. Amado from the University of Aveiro, Deptartment of Chemistry for his useful comments on fragmentation and interpretation of MS–MS spectra.

References

[1] M.C. Pablos Espada, F.J. Arrebola-Liebanas, A. Garrido-Frenich, J.L. Martinez-Vidal, Int. J. Environ. Anal. Chem. 75 (1999) 165.
[2] M.C. Pablos Espada, A. Garrido Frenich, J.L. Martinez Vidal, P. Parilla, Anal. Lett. 34 (2001) 597.
[3] A.G. Frenich, J.L. Martinez Vidal, M.C. Pablos Espada, M.D. Gil Garcia, F.J. Arrebola, Chromatographia 52 (2000) 614.
[4] H. Sabik, R. Jeannot, B. Rondeau, J. Chromatogr. A 885 (2000) 217.
[5] D. Barceló, M.-C. Hennion, Trace Determination of Pesticides and their Degradation Products in Water, Elsevier, Amsterdam, 1997.
[6] A.A. Boyd-Boland, S. Madgic, J.B. Pawliszyn, Analyst 121 (1996) 929.
[7] Janusz Pawliszyn, Solid-phase Micro-extraction: Theory and Practice, Wiley–VCH, New York, 1997.
[8] M. Correia, C. Delerue-Matos, A. Alves, J. Chromatogr. A 889 (2000) 59.
[9] C. Gonçalves, M.F. Alpendurada, J. Chromatogr. A 963 (2002) 19.
[10] H. Lord, J. Pawliszyn, J. Chromatogr. A 885 (2000) 153.
[11] P. Sandra, J. Beltran, F. David, J. High Resolut. Chromatogr. 18 (1995) 545.
[12] A. Garrido Frenich, M.C. Pablos Espada, J.L. Martinez Vidal, L. Molina, J. AOAC Int. 84 (2001) 1751.
[13] N. Sauret, M. Millet, P. Herckes, P. Mirabel, H. Wortham, Environ. Pollut. 110 (2000) 243.
[14] M.J. Gonzalez-Rodriguez, A. Garrido-Frenich, F.J. Arrebola, J.L. Martinez Vidal, Rapid Commun. Mass Spectrom. 16 (2002) 1216.
[15] J.L. Martinez Vidal, M.C. Pablos Espada, A. Garrido Frenich, F.J. Arrebola, J. Chromatogr. A 867 (2000) 235.
[16] S.A. McLuckey, G.A. Van Berkel, D.E. Goeringer, G.L. Glish, Anal. Chem. 66 (1994) 689A.
[17] M.R. Lee, J. See, W.S. Hsiang, C.M. Chem, J. Chromatogr. A 775 (1997) 267.
[18] J.L. Martinez Vidal, F.J. Arrebola, A. Fernandez Gutierrez, M.A. Rams, J. Chromatogr. B 719 (1998) 71.
[19] J.L. Martinez Vidal, M. Moreno Frias, A. Garrido Frenich, F. Olea Serrano, N. Olea, Rapid Commun. Mass Spectrom. 14 (2000) 939.
[20] M. Moreno Frias, A. Garrido Frenich, J.L. Martínez Vidal, M. Mateu Sánchez, F. Olea, N. Olea, J. Chromatogr. B 760 (2001) 1.
[21] R.S. Sheridan, J.R. Meola, J. AOAC Int. 82 (1999) 982.
[22] A.M. Carro, R.A. Lorenzo, Analyst 126 (2001) 1005.
[23] D.A. Azevedo, S. Lacorte, T. Vinhas, P. Viana, D. Barceló, J. Chromatogr. A 879 (2000) 13.
[24] A.B. Deger, T.J. Gremm, F.H. Frimmel, Acta Hydrochim. Hydrobiol. 28 (2000) 292.
[25] M.A. Baez, S. Navarro, A. Solar, Bol. Soc. Chil. Quim. 44 (2) (1999) 217.
[26] M. Natangelo, S. Tavazzi, R. Fanelli, E. Benfenati, J. Chromatogr. A 859 (1999) 193.

6.4 AVALIAÇÃO DA CONTAMINAÇÃO COM PESTICIDAS EM SOLOS DE UMA ZONA DE HORTICULTURA INTENSIVA, USANDO A EXTRACÇÃO POR ULTRA-SONS SEGUIDA DE ANÁLISE POR CROMATOGRAFIA GASOSA – ESPECTROMETRIA DE MASSA

Com base na publicação:

Gonçalves, C., Alpendurada, M.F. – Assessment of pesticide contamination in soil samples from an intensive horticulture area, using ultrasonic extraction and gas chromatography-mass spectrometry. Talanta, 65 (2005) 1179-1189.

Available online at www.sciencedirect.com
SCIENCE DIRECT®
Talanta
ELSEVIER
Talanta 65 (2005) 1179–1189
www.elsevier.com/locate/talanta

Assessment of pesticide contamination in soil samples from an intensive horticulture area, using ultrasonic extraction and gas chromatography–mass spectrometry

C. Gonçalves[a], M.F. Alpendurada[a,b,*]

[a] *Laboratory of Hydrology, Faculty of Pharmacy, University of Porto, Rua Anibal Cunha, 164/4050-047 Porto, Portugal*
[b] *IAREN-Water Institute of the Northern Region, Rua Dr. Eduardo Torres, 229/4450-113 Matosinhos, Portugal*

Received 28 May 2004; received in revised form 16 August 2004; accepted 24 August 2004
Available online 12 October 2004

Abstract

In order to reduce the amount of sample to be collected and the time consumed in the analytical process, a broad range of analytes should be preferably considered in the same analytical procedure. A suitable methodology for pesticide residue analysis in soil samples was developed based on ultrasonic extraction (USE) and gas chromatography–mass spectrometry (GC–MS). For this study, different classes of pesticides were selected, both recent and old persistent molecules: parent compounds and degradation products, namely organochlorine, organophosphorous and pyrethroid insecticides, triazine and acetanilide herbicides and other miscellaneous pesticides. Pesticide residues could be detected in the low- to sub-ppb range (0.05–7.0 $\mu g\,kg^{-1}$) with good precision (7.5–20.5%, average 13.7% R.S.D.) and extraction efficiency (69–118%, average 88%) for the great majority of analytes. This methodology has been applied in a monitoring program of soil samples from an intensive horticulture area in Póvoa de Varzim, North of Portugal. The pesticides detected in four sampling programs (2001/2002) were the following: lindane, dieldrin, endosulfan, endosulfan sulfate, 4,4′-DDE, 4,4′-DDD, atrazine, desethylatrazine, alachlor, dimethoate, chlorpyrifos, pendimethalin, procymidone and chlorfenvinphos. Pesticide contamination was investigated at three depths and in different soil and crop types to assess the influence of soil characteristics and trends over time.
© 2004 Elsevier B.V. All rights reserved.

Keywords: Ultrasonic extraction; Pesticides; Herbicides; Soil; Contamination

1. Introduction

Great productivity gains can be achieved in agriculture using the adequate pesticides. Indeed, they are needed to meet the world's demand on foodstuffs and no other alternative can compete to be used in such a large scale. Slow degradation of pesticides in the environment and extensive or inappropriate usage by farmers can lead to environmental contamination of the water, soil, air, several types of crops and indirectly to humans [1,2].

Chlorinated pesticides (OCPs) are very toxic and persistent compounds in the environment. Although most of them have been banned decades ago, they can still be found in the environment even in remote regions; thus, they are still of great concern [3]. The organophosphorous insecticides (OPPs) and triazine herbicides are among the most commonly used and detected pesticides around the world; thus, monitoring is important from an agricultural and environmental point of view [4–6]. Pesticides is a family of compounds in continuous evolution in terms of chemical synthesis; some of the recent chemicals such as dinitroanilines, chloroacetamides, dicarboximides, acylalanines, regarded as safer to the environment can be found in high-quantities in soils, conversely to the previously referred groups.

Soil is the principal reservoir of environmental pesticides, thus representing a source from which residues can be released to the atmosphere, ground water and living organisms

* Corresponding author. Tel.: +351 22 9364210; fax: +351 22 9364219.
E-mail address: mfalpendurada@iaren.pt (M.F. Alpendurada).

0039-9140/$ – see front matter © 2004 Elsevier B.V. All rights reserved.
doi:10.1016/j.talanta.2004.08.057

[7]. In modern analytical laboratories, the classical methodology for determination of micropollutants in solid matrices based on agitation procedures and Soxhlet extraction [8–10] has been replaced by less time- and solvent-consuming, and often automated techniques, which include high-pressure and/or high-temperature processes: microwave-assisted extraction (MAE) [11], supercritical fluid extraction (SFE) [12,13], accelerated solvent extraction (ASE) [14–16], or vigorous agitation like ultrasonic extraction (USE) [17,18]. Recently, some attempts have been made to enlarge the solid-phase microextraction (SPME) applications to the analysis of solid matrices, which would be beneficial in terms of simplification in sample handling, reduction in sample size and solvent volume, and absence of additional clean-up procedures [19]. Extraction of the soil samples can be achieved by direct dipping of the fibre in a soil/water slurry, indirect extraction in the headspace or by dilution of the extract obtained by other liquid extraction technique with distilled water [19]. Although successful, only a limited number of references can be found reporting the analysis of OCPs [20], OPPs [21] and herbicides [19,22,23] in soil samples, which can be attributed to some limitations in terms of fibre stability or analyte release/volatility.

As common advantages of all the enhanced extraction techniques regarded as environmentally friendly can be referred the improved selectivity, rapidity and automation, however, some particular drawbacks must be considered. SFE cannot handle large sample amounts and recoveries can be somewhat lower for markedly polar pesticides/metabolites [24]. ASE and SFE require expensive instrumentation and laborious optimisation processes [24]. MAE can improve extraction efficiency of thermal stable pesticides particularly of aged pollutants but on the expense of extraction selectivity, thus requiring a further clean-up step [25,26].

The target compounds for analysis in soil and sediment samples have traditionally been highly hydrophobic and persistent contaminants like OCPs [2,3,7,17,20] and, with few exceptions [27,28], little attention has been dedicated either to other type of pesticides or multiresidue analysis. Due to the large number of active ingredients used nowadays, trace analyses of these substances require techniques for the detection of the greatest number of compounds possible, with the fewest number of extraction and clean-up steps [29]. If well-established, ultrasonic extraction has the potential to fulfil the requirements of a multiresidue method. The initial use of ultrasonic energy as a means to extract pesticides from soil was first reported by Johnsen and Starr in 1967 [17]. USE is a very versatile technique due to the possibility of selecting the solvent type or solvent mixture that allows the maximum extraction efficiency and selectivity. The primary advantage of this method is the fact that several extractions can be done simultaneously and no specialized laboratory equipment is required, although it is not easily automated. In combination with state-of-the-art separation and detection techniques good performance can be obtained, eventually in the absence of additional clean-up of the concentrated extract. This paper describes the development and application of an USE technique combined with gas chromatography and mass spectrometric detection for the analysis of OCPs, OPPs, triazines, pyrethroids, acetanilides and other miscellaneous pesticides in soil samples from an intensive horticulture area in North Portugal. This region comprises mainly two types of soil (sand and sandy-loam); thus, their influence on the pesticides behaviour will be investigated. The implemented monitoring program is expected to allow observing temporal trends on pesticide contamination as well as variations according to depth in five sampling points, during two years. Results for the 2001/2002 period will be reported.

2. Experimental

2.1. Chemicals and reagents

All pesticide analytical standards of Pestanal® grade were supplied by Riedel-de-Häen (Seelze, Germany). The OCPs were obtained as a commercial mixture (EPA 608 pesticide mix, 20 mg l^{-1}) from Supelco (Bellefont, PA, USA). Individual pesticide stock standard solutions were prepared by exact weighing of high-purity substances in 10 ml volumetric flasks and filled up with an appropriate solvent as follows: pyrethroids were prepared in ethyl acetate whereas OPPs and triazines were dissolved in methanol; individual solutions of other pesticides were also made in methanol. Four group mixtures at 2.0 mg l^{-1} concentration of each pesticide were then prepared in methanol, while hexachlorobenzene (HCB) and isodrin were added to the OCPs commercial mixture to obtain a stock solution of 100 μg l^{-1}, in methanol. All stock standard solutions were stored in a freezer protected from light at −18 °C. Ethyl acetate used in handling of standards and soil extractions was of Pestanal® grade from Riedel-de-Häen whereas methanol and dichloromethane were of ChromaSolv and Analytical Reagent grade, respectively (Fluka, Buchs, Switzerland). *n*-Hexane was of SupraSolv grade from Merck (Darmstadt, Germany), and acetonitrile HPLC gradient grade was supplied by Panreac (Barcelona, Spain). In the filtration of extracts regular cotton wool with no special treatment and anhydrous sodium sulfate from Merck, were used.

2.2. Soil samples

An uncontaminated bulk soil sample was selected to use in the optimisation and validation experiments. All studies were conducted with spiked soil at 10 μg kg^{-1} concentration level, except for desethylatrazine and dimethoate 10 times higher and γ-chlordane 10 times lower, after evaporation of the residual solvent and aging during a period of not less than 4 days. Once the method was established, real soil samples from five sampling points at three depths (surface, 10 and 20 cm), as depicted in Fig. 1, were collected in four sampling dates and analysed with the USE method.

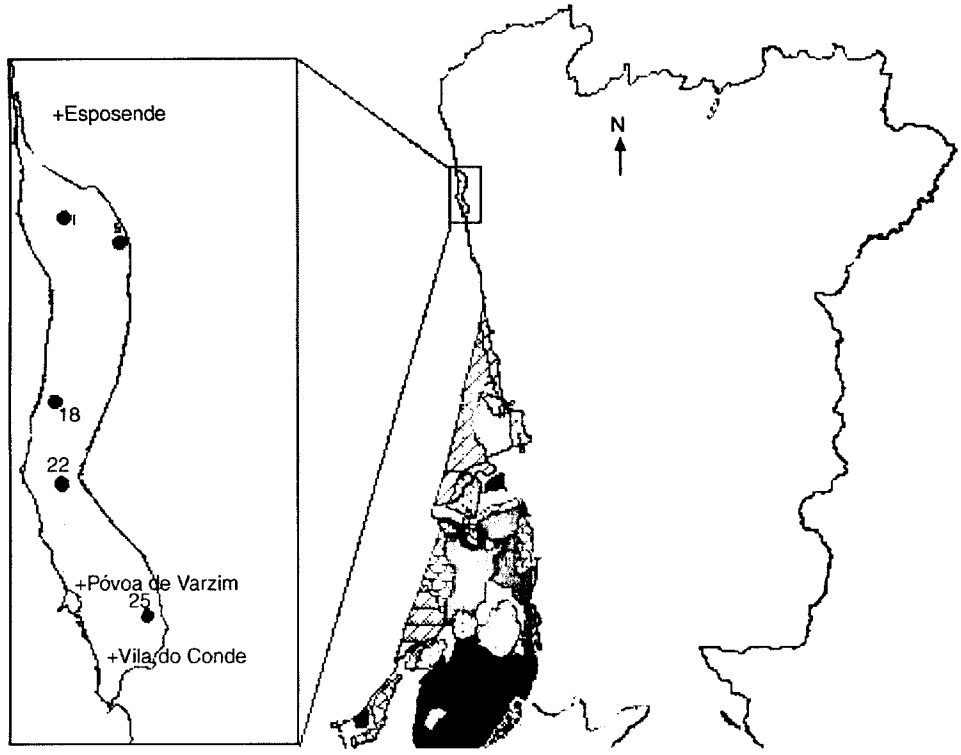


Fig. 1. Map of North Portugal showing a delimited region corresponding to the Vulnerable Area no. 1 where the sampling points were located.

This monitoring program was scheduled to include a sampling event approximately every 3 months. After collection and transport to the laboratory in aluminium foil packets, the samples were dried in an oven at 40 °C during 48 h, sieved at 500 μm, perfectly well homogenized and kept refrigerated at 4 °C before analysis. Table 1 presents the humidity and organic mater content of the reference soil and surface horizon of five soil samples, as indicative of the general characteristics of these soils.

2.3. Ultrasonic extraction procedure

In order to analyse a large number of pesticides from a variety of chemical groups, a simple method was developed to expand the range of applicability of the EPA method 3550C [18]. This method consists on USE and it is indicated to extract non-volatile and semi-volatile organic compounds from solids, such as soil, sludge and waste. The USE conditions consisted in the following: 5 g of soil samples was placed in small Erlenmyer flasks and 5 ml of a suitable organic solvent added. The soil samples were firstly manually agitated and then exposed to USE in a Bandelin RK 100H (80/160 W) ultrasonic bath (Sonorex, Germany) for 15 min, three times. After each extraction period, extracts were collected by pouring the extractant through a funnel plugged with a small piece of cotton wool overlaid by a portion of anhydrous sodium sulfate, which had been previously washed with the same solvent. In order to achieve the adequate concentration factor, 5 g aliquot of sample was submitted to extraction and the final extract (ca. 15 ml) evaporated to dryness under a gentle stream of nitrogen without need of any clean-up procedure and redissolved in 200 μl of ethyl acetate. For higher productivity, up to eight samples could be processed in a row using this procedure.

Table 1
Physico-chemical characteristics of the bulk soil used in method development and the real samples

	Soil type	Humidity (%, w/w)	Organic matter (%, w/w)
Bulk soil	Sandy-loam	1.12	7.44
Soil 1	Sand	0.12	1.69
Soil 5	Sandy-loam	0.73	7.82
Soil 18	Sand	0.33	4.08
Soil 22	Sandy-loam	0.75	8.62
Soil 25	Sandy-loam	0.89	8.01

Humidity was determined by drying the samples to constant weight at 105 °C and the organic matter content determined by loss-on-ignition at 550 °C in a muffle furnace for 3 h [30].

2.4. Chromatographic analysis

Chromatographic analyses were carried out in a gas chromatograph Agilent 6890 (Palo Alto, CA, USA) interfaced to an Agilent 5973N mass selective detector. The GC–MS system was equipped with an HP-5MS fused silica capillary column (30 m × 0.25 mm i.d. × 0.25 μm film thickness) and helium was used as carrier gas at 1 ml min^{-1} flow rate.

The injection port temperature was set at 250 °C and a liner with a plug of glass wool was installed. An amount of 1 μl of the concentrated extracts was injected in splitless mode, during 0.75 min. MS temperatures were: ion source, 230 °C; quadrupole, 150 °C; and transfer line, 280 °C. The 44 pesticides were separated with a 33.67 min oven temperature program built as follows: initial temperature 80 °C (hold 2 min), increase at 15 °C min^{-1} to 180 °C (hold 4 min), increase at 10 °C min^{-1} to 230 °C (hold 5 min) and finally increase at 10 °C min^{-1} to 290 °C (hold 5 min). Quantitation was carried out in the selected ion monitoring mode (SIM) selecting characteristic fragment ions for each pesticide while, when needed, confirmation was achieved in a second analysis recording the full scan mass spectra and requiring a minimum spectral fit of 80.

3. Results and discussion

3.1. Method development

In the early beginning of USE, Johnsen and Starr demonstrated that sonic energy could allow a very efficient extraction method for the analysis of OCPs in soils, comparing the performance of the Polytron, ultrasonic cleaner, Soxhlet and other techniques. The authors concluded that the extraction performance was comparable, differing only on the time to achieve complete recoveries [17]. Also, some other authors developed successful methodologies based on this technique [3,4].

One of the most important parameters that can influence extraction efficiency and selectivity in USE is the solvent nature, which is a critical parameter when attempting multiresidue analysis. To minimize the effect of soil co-extractives on the determination of analytes as well as to improve recoveries several solvents were tested: *n*-hexane, ethyl acetate, acetonitrile and dichloromethane. Since the target list of pesticides includes highly apolar to mid-polar compounds and even degradation products the extraction solvent should have polarity properties compatible with all analytes. The complete list of target pesticides can be found in Table 2.

Dichloromethane was discarded because solvent decantation became difficult. Ethyl acetate gave the best recoveries for all analytes except one (dichorvos) and also best precision. Hexane (5.2–81.1% of ethyl acetate) and acetonitrile (14.7–81.3% of ethyl acetate) showed good properties for the extraction of OCPs; however, hexane almost could not recover the OPPs and triazines from soil. In conclusion, ethyl acetate was the most suitable solvent for USE of these target analytes whereas acetonitrile was only acceptable and hexane was unacceptable. In an attempt to further improve the extraction recovery, the soil sample was previously wetted with 15% NaCl aqueous solution. The salting-out effect expected to occur with this strategy did not enhance extraction recoveries, except for dichlorvos (32.0–122.4% of ethyl acetate), which can be explained by water shielding of soil particles. From the evaluation of method performance using 5 ml of ethyl acetate as extractant in ultrasonic extraction during 15 min repeated three times (as described in the Section 2), it was concluded that these conditions exhibited excellent extraction capabilities; therefore, no further optimisation would be needed.

3.2. Method performance

The USE method as described above was extensively tested in order to assess its precision, sensitivity, selectivity and completeness. The critical validation parameters were compiled and presented in Table 2. All the results were calculated based on peak areas obtained monitoring the respective pesticide fragment ions (*m/z*) in SIM mode. Chromatographic data acquisition was divided into 11 different MS segments in order to include the lowest number of compounds in each, this way maximising sensitivity (see Table 3).

The precision of the technique was evaluated in terms of repeatability (within-day relative standard deviation, R.S.D.) by the analysis of six replicate spiked soil samples at 10 μg kg^{-1} concentration level, and in terms of intermediate precision (between-day R.S.D.) at the same concentration level in three non-consecutive days (results displayed in Table 2). The precision can be considered very good taking into account a non-automated procedure having a repeatability of less than 8% for the great majority of analytes. Likewise, the intermediate precision was consistently below 15%, only a few exceptions up to 20%. Endrin however presented an anomalous result due to a decrease in chromatographic response with time.

The recoveries were calculated on spiked soil at 10 μg kg^{-1} concentration level after ageing during 4 days. First experiments gave immediately good recovery values for the organophosphorous insecticides, triazine herbicides and miscellaneous pesticides; however, excessively high (above 130%) recovery values were obtained for some organochlorine and pyrethroid pesticides. Even after some attempts to find out the origin of such behaviour, namely changing the injector temperature, matching the solvent in extracts and standards and testing a higher concentration, the problem persisted essentially for the following pesticides: lindane, heptachlor, dieldrin, endrin, 4,4′-DDD, λ-cyhalothrin, α-cypermethrin and azinphos methyl. Soon the cause of this phenomenon appeared to be related with the extract matrix, since the blank extracts were free of interferences at the retention time and quantitation ions of the pesticides and the same concentration injected in pure solvent gave lower peak areas compared to the recovery standards. This observation led us to perform the calculations based on the analysis of matrix-matched standards and the results obtained are those presented in Table 2. In general, the recovery values obtained this way were lower than the ones previously obtained and were acceptable for the majority of the compounds (except dichlorvos and fenamiphos) ranging from 70 to 118%. Nevertheless, some results remained somewhat above 100% essen-

Table 2
Validation parameters of the USE–GC–(SIM)MS method used for pesticide analysis in soil samples: precision, limits of detection, recoveries and calibration data

Peak no.	Pesticides	t_R (min)	Quantitation ion (m/z)	Repeatability (%R.S.D.) $n=6$	Intermediate precision (%R.S.D.) $n=18$	LOD ($\mu g\,kg^{-1}$)	Recovery (%R.S.D.) ($10\,\mu g\,kg^{-1}$) $n=6$	Determination coefficients (r^2)
1	Dichlorvos	7.03	109	16.8	15.4	2.00	58 (12.4)	0.997
2	Desethylatrazine	11.97	172	3.9	12.3	2.00	75 (4.6)	0.999
3	Hexachlorobenzene	13.03	284	5.2	12.3	0.07	78 (7.5)	1.000
4	Dimethoate	13.21	87	4.9	17.0	1.00	79 (17.2)	1.000
5	Simazine	13.36	201	4.8	11.1	0.80	79 (7.0)	1.000
6	Atrazine	13.54	200	5.8	11.6	0.20	78 (6.4)	0.999
7	Propazine	13.68	214	5.1	11.0	0.30	78 (5.3)	0.999
8	Lindane	13.90	181	13.0	19.3	0.50	86 (15.6)	0.991
9	Terbuthylazine	14.03	214	4.1	11.8	0.10	79 (6.4)	0.999
10	Propyzamide	14.14	173	3.9	10.9	0.50	87 (3.5)	1.000
11	Fonofos	14.17	109	4.8	12.4	2.00	88 (13.9)	0.999
12	Diazinon	14.44	179	7.0	13.5	3.00	74 (10.5)	0.999
13	Metribuzin	15.73	198	4.7	14.2	2.00	80 (9.6)	0.998
14	Parathion-methyl	15.93	125	6.0	17.1	4.00	92 (13.7)	1.000
15	Simetryn	16.04	213	9.3	16.9	2.00	69 (4.6)	0.989
16	Alachlor	16.15	160	4.9	12.3	0.50	84 (6.2)	0.999
17	Heptachlor	16.15	272	4.5	7.5	0.10	118 (9.2)	1.000
18	Fenitrothion	16.72	125	5.7	11.8	4.00	90 (12.1)	1.000
19	Malathion	17.02	127	5.5	10.8	4.00	89 (7.2)	1.000
20	Metolachlor	17.08	162	7.4	11.2	0.10	94 (8.1)	0.999
21	Aldrin	17.14	66	5.4	12.9	2.00	78 (11.5)	0.999
22	Chlorpyrifos	17.32	314	4.7	10.4	0.05	79 (3.6)	1.000
23	Parathion-ethyl	17.34	291	6.0	11.1	0.07	90 (8.0)	1.000
24	Isodrin	17.93	193	5.4	10.2	1.00	78 (10.3)	1.000
25	Chlorfenvinphos E	18.12	267	7.5	13.1	0.20	92 (14.5)	1.000
26	Pendimethalin	18.20	252	4.6	9.5	0.30	101 (4.6)	1.000
27	Heptachlor Epoxy	18.25	353	8.3	12.4	0.05	91 (5.7)	0.999
28	Chlorfenvinphos Z	18.46	267	4.8	10.6	0.20	91 (10.8)	1.000
29	Procymidone	18.73	96	7.6	11.5	2.00	110 (4.7)	0.997
30	γ-chlordane	18.95	373	7.8	11.6	0.10	97 (4.4)	1.000
31	Tetrachlorvinphos	19.30	329	5.4	18.5	0.07	76 (17.0)	0.999
32	Endosulfan I	19.35	241	7.1	12.6	1.00	88 (4.6)	1.000
33	Fenamiphos	19.79	303	5.6	15.7	0.20	70 (19.0)	1.000
34	4,4′-DDE	20.15	246	5.3	12.7	0.50	93 (3.9)	0.999
35	Dieldrin	20.25	79	6.0	12.8	1.40	104 (9.2)	0.956
36	Endrin	21.08	263	14.8	33.7	0.30	80 (14.0)	0.991
37	Endosulfan II	21.45	195	9.3	17.4	2.00	87 (8.7)	0.999
38	4,4′-DDD	21.83	235	12.2	16.7	0.50	109 (10.5)	1.000
39	Endosulfan sulfate	23.38	272	9.4	20.1	0.10	90 (10.3)	1.000
40	4,4′-DDT	23.40	235	10.4	17.4	7.00	115 (11.4)	0.989
41	Azinphos-methyl	26.62	160	4.5	19.2	2.00	76 (14.6)	0.998
42	λ-cyhalothrin[a]	27.36	181	5.6	9.2	1.00	103 (10.0)	1.000
43	α-cypermethrin[a]	30.14	181	5.7	10.8	4.00	103 (7.0)	1.000
44	Deltamethrin[a]	33.06	181	12.1	12.9	4.00	111 (9.7)	1.000

[a] Pyrethroid pesticides consist on a mixture of several (R, S) diastereoisomers and although for validation purposes a single peak was used, the pair was considered for quantitation purposes

tially for the compounds listed above. Due to some heating of the ultrasonic bath, the recovery of slightly volatile compounds like dichlorvos can be prejudiced; however, it also helps in the extraction of other compounds.

Influence of matrix co-extractives on the response of analytes is a well-known phenomenon in pesticide residue analysis, which can result in either decreased detection response [30] or increased analytical signal [2,28]. Excessively high-recovery values were observed before and explained by the phenomenon known as 'matrix-induced chromatographic response enhancement' that can occur for particular pesticides, matrix types and depending on the status of the capillary column [31,32].

Although recommended to improve accuracy, use of matrix-matched analysis is still limited due to the wide range of soil types and inherent organic matter content in soil samples [30]. Humic substances constitute the major part of the organic carbon present in soils and especially humic acids play a major role in the environmental behaviour of pesticides. Prosen and Zupancic-Kralj found that a fraction of

Table 3
GC–MS instrumental conditions for operation in the selected ion monitoring mode including the appropriate time segments and respective fragment ions (*m/z*)

SIM groups	Pesticides no.	Segment start (min)	Quantitation ions (*m/z*)
Group 1	1, 2	5.00	109, 172
Group 2	3–7	12.50	87, 200, 201, 214, 284
Group 3	8–12	13.75	109, 173, 179, 181, 214
Group 4	13–17	15.20	125, 160, 198, 213, 272
Group 5	18–23	16.40	66, 125, 127, 162, 291, 314,
Group 6	24–28	17.60	193, 252, 267, 353
Group 7	29–33	18.60	96, 241, 303, 329, 373
Group 8	34, 35	19.90	79, 246
Group 9	36–38	20.80	195, 235, 263
Group 10	39–41	22.50	160, 235, 272
Group 11	42–44	26.80	181

triazine residues are virtually impossible to extract from environmental samples presumably because of an interaction with humic acids particularly at strongly acidic pH. However, since the natural soil pH is either weakly acidic or weakly alkaline, some doubts still persist about triazine binding to soil organic matter [33].

In order to determine the sensitivity of the technique and its appropriateness for environmental behaviour and pollution monitoring studies, limits of detection (LODs) of the USE–GC–MS procedure were determined testing decreasing concentrations of analytes spiked on soil until obtaining a signal/noise ratio of 3 (S/N 3). Limits of quantitation (LOQs) were derived from LODs to give a S/N of 10. LODs in the low- to sub-ppb ($\mu g\,kg^{-1}$) level were obtained ranging from 0.05 to 7.00 $\mu g\,kg^{-1}$, which can be mainly attributed to the excellent sensitivity and selectivity widely recognised to mass spectrometry.

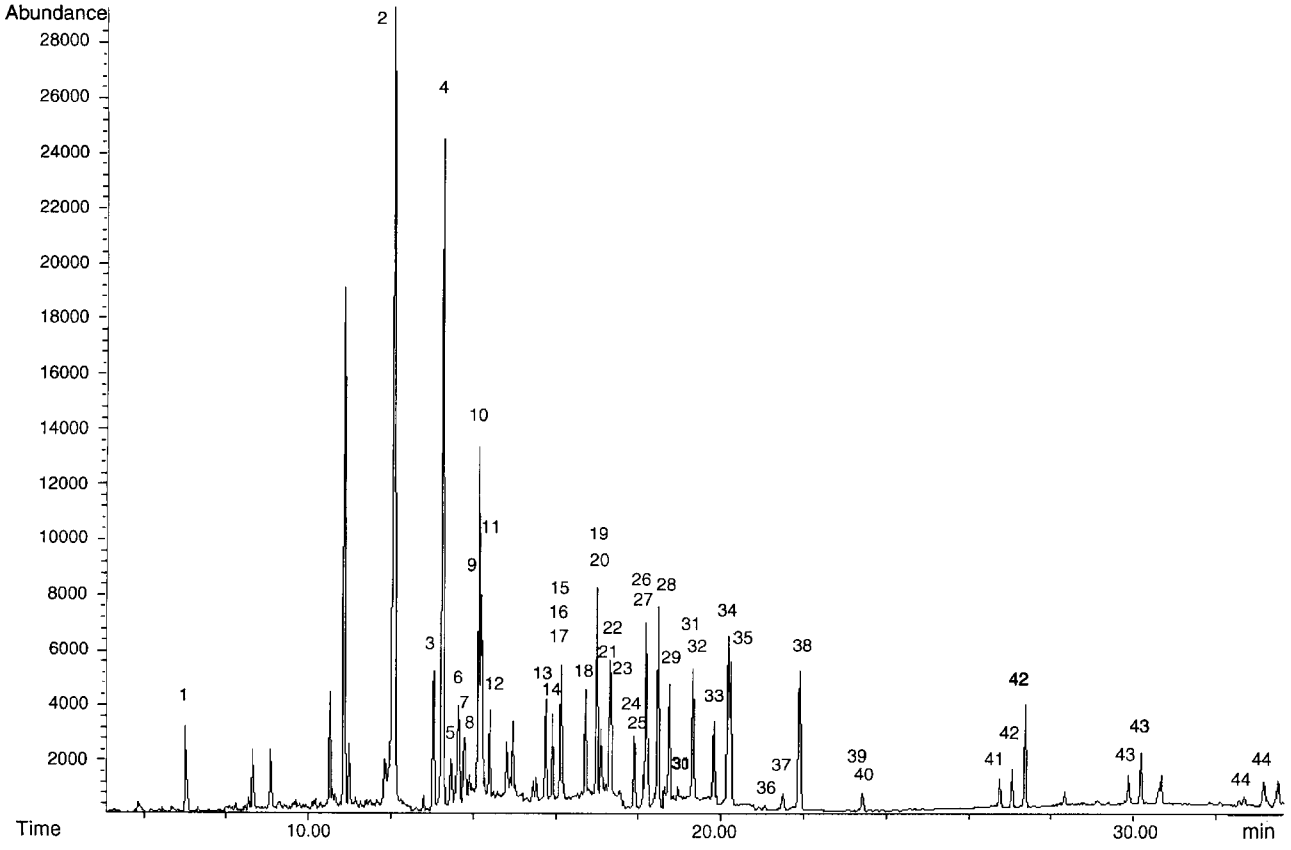


Fig. 2. GC–MS total ion chromatogram (SIM mode) obtained from the analysis of a spiked soil at 50 $\mu g\,kg^{-1}$ concentration level after USE using the optimised conditions. *Note*: Desethylatrazine and dimethoate concentration is 10 times higher whereas γ-chlordane is 10 times lower. For peak assignment refer to Table 2.

Table 4
Pesticide concentrations in $\mu g\,kg^{-1}$ of dry soil obtained in a monitoring program of five sampling points at three depths carried out in the intensive horticulture area of Póvoa de Varzim, over 1 year period

	Alachlor			
Soil 1	September 01	February 02	April 02	July 02
Surface	–	–	–	3.7
10 cm	–	–	–	–
20 cm	–	–	–	–

	Atrazine				Alachlor				Chlorpyrifos				Endosulfan I			
Soil 5	September 01	February 02	April 02	July 02	September 01	February 02	April 02	July 02	September 01	February 02	April 02	July 02	September 01	February 02	April 02	July 02
Surface	–	–	1.9	4.6	–	11.7	16.9	26.1	–	1.1	2.4	2.0	–	–	–	61.3
10 cm	–	–	–	2.8	–	2.3	–	8.5	–	0.2	–	1.3	–	–	–	18.1
20 cm	–	–	–	1.0	–	–	–	11.6	–	–	–	2.0	–	–	–	4.7

	Endosulfan II				Endosulfan Sulfate			
Soil 5	September 01	February 02	April 02	July 02	September 01	February 02	April 02	July 02
Surface	–	–	–	135.6	–	–	–	280.8
10 cm	–	–	–	36.9	–	–	–	77.2
20 cm	–	–	–	9.2	–	–	–	16.9

	Dimethoate				Lindane				Chlorpyrifos				Pendimethalin			
Soil 18	September 01	February 02	April 02	July 02	September 01	February 02	April 02	July 02	September 01	February 02	April 02	July 02	September 01	February 02	April 02	July 02
Surface	–	–	7.1	–	22.3	–	–	–	–	0.9	53.3	33.8	–	13.4	6906.2	454.8
10 cm	–	–	–	–	31.0	–	–	–	–	0.8	148.8	2.6	–	7.2	9.5	35.3
20 cm	–	–	–	–	60.0	–	–	–	–	0.5	5.3	1.7	–	3.5	232.5	11.5

	Procymidone			
Soil 18	September 01	February 02	April 02	July 02
Surface	–	133.0	–	12.2
10 cm	–	11.8	–	8.6
20 cm	–	7.1	–	–

	Dimethoate				Alachlor				Lindane				Chlorpyrifos			
Soil 22	September 01	February 02	April 02	July 02	September 01	February 02	April 02	July 02	September 01	February 02	April 02	July 02	September 01	February 02	April 02	July 02
Surface	–	–	95.6	44.8	12.6	2.1	–	–	–	58.3	–	–	–	–	–	67.3
10 cm	–	–	42.7	–	8.0	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	6.1
20 cm	–	–	35.4	–	1.9	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	1.7

Table 4 (*Continued*)

	Chlorfenvinphos				Pendimethalin			Procymidone			Dieldrin			
Soil 22	September 01	February 02	April 02	July 02	September 01	February 02	April 02	July 02	September 01	February 02	April 02	July 02	September 01	February 02	April 02	July 02
Surface	–	–	–	–	–	–	2.9	1.6	–	–		11.6	279.3	297.6	132.9	435.3
10 cm	1.4	–	–	–	–	–	2.0	–	–	–	–	9.1	309.6	331.7	254.7	465.5
20 cm	–	–	–	–	–	–	2.6	–	–	–	–	–	279.3	147.1	235.4	407.5
	Endosulfan II[a]				Endosulfan Sulfate				4,4′-DDE				4,4′-DDD			
Soil 22	September 01	February 02	April 02	July 02	September 01	February 02	April 02	July 02	September 01	February 02	April 02	July 02	September 01	February 02	April 02	July 02
Surface	18.2	35.1	19.7	20.2	65.3	155.6	86.9	136.9	17.0	12.6	7.1	22.5	4.3	7.4	2.9	9.2
10 cm	13.4	18.5	20.9	21.6	67.3	104.4	109.2	149.1	15.5	15.3	11.2	24.0	6.0	6.0	4.0	8.4
20 cm	13.6	7.1	10.8	15.5	41.7	38.0	61.0	111.6	12.2	10.6	10.8	20.0	3.9	3.0	3.1	6.8
	Desethylatrazine				Atrazine						Alachlor					
Soil 25	September 01	February 02	April 02	July 02	September 01	February 02	April 02	July 02	September 01	February 02	April 02	July 02				
Surface	12.2	–	–	–	85.4	4.1	11.8	5.2	60100	927.8	225.2	10.4				
10 cm	3.7	–	–	10.8	42.2	11.4	–	76.1	8341.0	300.2	5.9	300.3				
20 cm	–	–	–	–	8.2	7.2	–	3.8	2985.0	8.3	7.4	11.9				

[a] Although endosulfan I was detected in soil 22 it could not be quantified, thus only the endosulfan II isomer was reported.

Method calibration was then conducted using spiked soil standards at different calibration levels: 1.0, 5.0, 10, 50, and 100 $\mu g\,kg^{-1}$ and the blank, injected in triplicate. The determination coefficients presented in Table 2 confirm the excellent linearity between analytical signal and analyte concentration. It should be noted, however, that since the data treatment was carried out in the MSD ChemStation, Data Analysis Application ver. G1701DA (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA) replicates at each concentration level were first averaged and then applied a linear regression. This way, coefficients of determination (r^2) appear somehow better (rounded to three decimal places) even though the remaining linear regression coefficients are the same as keeping replicates separate. Fig. 2 shows a chromatogram of a 50 $\mu g\,kg^{-1}$ spiked soil standard where the peaks have been numbered as assigned in Table 2.

From the chromatographic point of view the method presented herein does not require a clean-up step of the soil extracts which was evident from the absence of interfering peaks in the blanks and uncontaminated samples. Though a few matrix peaks exist they do not hamper identification and quantitation of pesticides. Chromatographic resolution was not also affected for a long period of time. The only shortcoming exists when calculating recoveries, which would probably benefit of injecting a cleaner extract. Nevertheless, calibration with matrix-matched standards equivalent to real soil samples minimizes errors and special care has only to be taken when analysing quite different soil matrices.

3.3. Monitoring program

The present method was applied to real soil samples included in a monitoring program of soil and groundwater samples from an intensive horticulture area in Póvoa de Varzim, North Portugal. This program will be extended for 2 years with a sampling schedule approximately every 3 months. The main objective was to identify the pesticides that were contaminating the soil, their quantities and fate. The location of sampling points was selected to include soil with different composition, from sand to loam, and different crops such as vegetables, potatoes, corn, grass and others. A pre-treatment of all samples was employed as described in Section 2.

Results from only four sampling dates will be discussed here: September 2001, February, April and July 2002. New calibration curves were created every time before the soil analyses of each sampling event, and blanks and control standards at 10 $\mu g\,kg^{-1}$ level were analysed ensemble.

Pesticide concentrations in soils over 1 year period are reported in Table 4.

Results below the method quantitation limits or in the case the pesticide identity could not be confirmed are not reported. Sampling point no. 1 was a very low contaminated site. Soil 5 was moderately contaminated with the herbicide formulation atrazine and alachlor. There were found traces of chlorpyri-

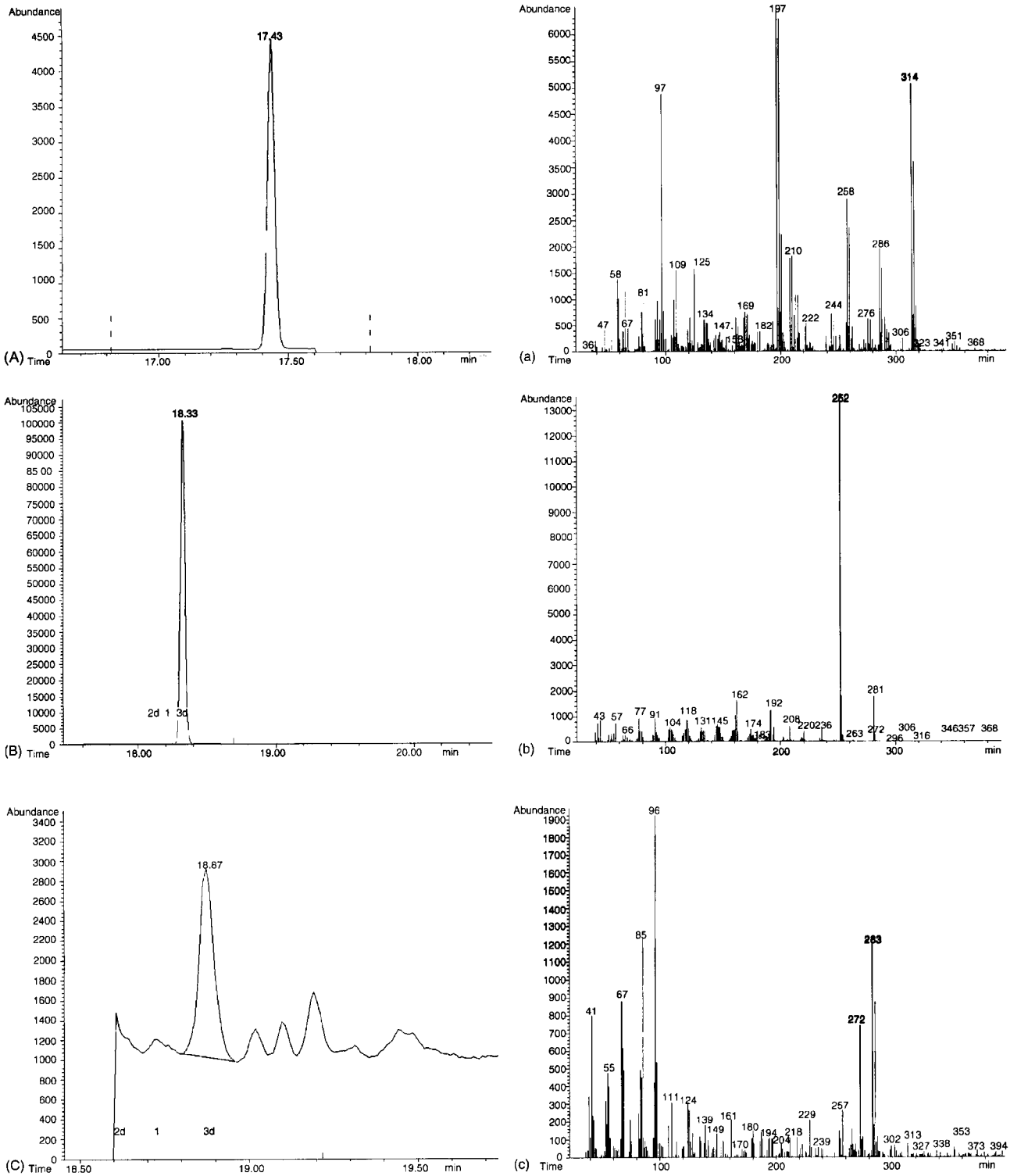


Fig. 3. Analytical peaks (A, B, C) obtained in SIM mode and respective full scan mass spectra (a, b, c) of pesticides detected in the contaminated sample: soil 18, surface, July 2002. Pesticides and respective concentrations were the following: (A) chlorpyrifos—33.8 $\mu g\,kg^{-1}$, (B) pendimethalin 454.8 $\mu g\,kg^{-1}$, (C) procymidone—12.2 $\mu g\,kg^{-1}$.

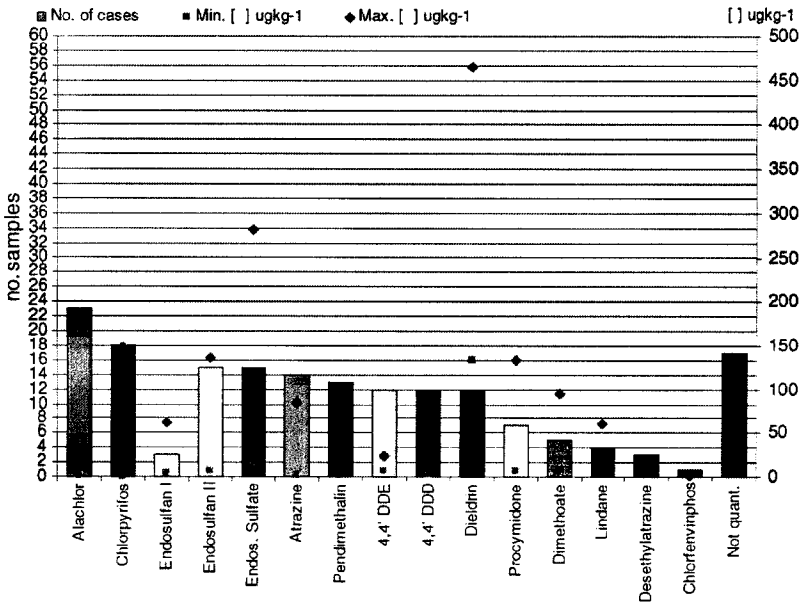


Fig. 4. Schematic representation of pesticide occurrence and concentration range in total 60 soils collected in Póvoa de Varzim from September 2001 to July 2002. The number of uncontaminated samples is also displayed.

fos but fairly high concentrations of endosulfan and endosulfan sulfate. The concentration of these compounds decreased with depth. In soil 18, besides the low contamination with dimethoate and moderate contamination with lindane, chlorpyrifos and procymidone, should be emphasized the very high amounts of pendimethalin found in April 2002. It was mainly present in the surface layer and decreased significantly in a 3-month period. Soil 22 was a highly contaminated site with a large diversity of identified pesticides, in total 12 compounds. The OCPs (except lindane) were present in all samples at different soil depths and sampling campaigns. Currently used pesticides as well as superseded compounds and degradation products were identified. Dieldrin, 4,4′-DDE and 4,4′-DDD contamination was widespread in soil with similar quantities over the soil profiles and sampling dates, which confirms the persistent character of these molecules and their adsorption to soil. Dieldrin was, indeed, present in quite high concentrations, also detectable in water samples. As reported before, DDE was the main contributor to the sum of DDTs, indicating that the transformation of DDT to DDE is favoured in aerobic systems [3]. Endosulfan was detected in all soil samples at medium concentration mainly represented by the β-isomer (or II) (α-isomer (or I) below LOQ), which differs from the technical formulation and can be due to the faster degradation of the α-isomer in soils. Indeed, measured half-lives for α- and β-endosulfan were 60 and 800 days, respectively [34]. The concentration of endosulfan sulfate was always higher than the sum of both endosulfan isomers, as it is the major degradation product by soil bacteria, which raises concerns about its toxicity since it is known to be as toxic as the parent compound [7,35]. The same comments are applied to soil 5. Sample 25 was contaminated with atrazine, its degradation product desethylatrazine (DEA) and alachlor. Traces of DEA were found where the concentration of atrazine was higher. In September 2001, a very high-episode of alachlor contamination occurred. Even it has decreased significantly with time; it did not recover completely after almost 1 year (considering no further input of the herbicide). This finding may be related with corn cultivation during summer. Fig. 3 is representative of a real contaminated sample where the chromatographic peaks obtained in SIM mode and the respective mass spectra obtained under full scan acquisition are shown.

A complete summary of all results comprising the identified pesticides, their individual occurrence and concentration range in soil samples are represented in Fig. 4.

Alachlor, chlorpyrifos and endosulfan are among the most detected pesticides. On the other hand, 17 samples were not contaminated with any of the target pesticides or their presence could not be confirmed. In addition to the pesticides we have been dealing with, some others of diverse chemical families were identified as follows: metalaxyl, benalaxyl, quinalphos, pirimicarb and metolachlor. Since they were not considered in the USE–GC–MS method, only qualitative analysis could be conducted.

4. Conclusions

Monitoring of the widespread distribution of pesticides in the environment requires the availability of efficient and robust multiresidue analytical methods. Some experiments were carried out to develop an USE method which proved to be a fast, reliable and inexpensive technique, therefore,

more applicable to routine analysis than the existing conventional techniques. The sensitivity and precision were excellent, added of confirmation capabilities, however, care should be taken in the calibration to encompass a similar matrix to the samples. Although not automated, simultaneous extraction of up to eight samples can be easily handled. Solvent consumption is reduced, taking into account the large number of compounds analysed with a single procedure.

The above-referred method was applied in a monitoring program of sand- and loam-type soils from Póvoa de Varzim, Portugal. The main contaminants that were identified in soils from this region comprise old persistent compounds, currently used herbicides and insecticides, and degradation products. In total, 19 compounds were identified. The most ubiquitous compounds were alachlor (38% of the samples), chlorpyrifos (30%), endosulfan (25%), endosulfan sulfate (25%), atrazine (23%) and pendimethalin (22%). Twenty-eight percent of the samples were not contaminated with any of the pesticides studied. Very high contamination levels, around 7 and 60 mg kg^{-1}, were found for pendimethalin and alachlor, respectively. Recent contamination predominantly affected surface layers of the soil whereas old persistent contamination was more dispersed in the soil profile. Since on intensive culture areas soil horizons are frequently disturbed, the understanding of the results may become difficult. These are partial conclusions and the data gathered along 2 years will allow a more clear understanding of pesticides dynamics in soil, as well as its prevalence and degradation. A different behaviour could be roughly observed in sandy and loam soils.

Acknowledgements

Fundação para Ciência e Tecnologia (FCT) is greatly acknowledged for the Ph.D. grant PRAXIS XXI/BD/21823/99. The authors would like to thank the IAREN for technical and financial support. We are also grateful to Prof. E.P. Mourkidou, Pesticide Science Laboratory, Aristotle University of Thessaloniki, for her assistance and useful comments on validation aspects of the USE–GC–MS method. A. Matos, Região Agrária da Póvoa de Varzim is thanked for his help in the collection of samples and Direcção Regional de Agricultura entre Douro e Minho (DRAEDM) is greatly acknowledged for the soil analyses.

References

[1] A. Navalón, A. Prieto, L. Araújo, J.L. Vilchez, J. Chromatogr. A 946 (2002) 239.
[2] I. Silgoner, R. Krska, E. Lombas, O. Gans, E. Rosenberg, M. Grasserbauer, Fresenius J. Anal. Chem. 362 (1998) 120.
[3] P. Manirakiza, A. Covaci, S. Andries, P. Schepens, Intern. J. Environ. Anal. Chem. 81 (2001) 25.
[4] S. Navarro, J. Oliva, A. Barba, C. Garcia, J. AOAC Int. 83 (5) (2000) 1239.
[5] A.M. Carro, R.A. Lorenzo, Analyst 126 (2001) 1005.
[6] D.A. Azevedo, S. Lacorte, T. Vinhas, P. Viana, D. Barceló, J. Chromatogr. A 879 (2000) 13.
[7] L.C. Luchini, T.B. Peres, M.M. de Andréa, J. Environ. Sci. Health B35 (1) (2000) 51.
[8] US EPA method 3540, US Government Printing Office, Washington, USA, 1995.
[9] AOAC methods 963.15, Association of Official Analytical Chemists, USA, 1990.
[10] M.D. Luque de Castro, L.E. Garcia-Ayuso, Anal. Chim. Acta 369 (1998) 1.
[11] V. Lopez Avila, R. Young, J. Benedicto, P. Ho, R. Kim, Anal. Chem. 67 (1995) 2096.
[12] S.B. Hawthorne, Y. Yang, D.J. Miller, Anal. Chem. 66 (1994) 2912.
[13] C. Gonçalves, M. de Rezende Pinto, M.F. Alpendurada, J. Liq. Chromatogr. Related Technol. 24 (19) (2001) 2943.
[14] B.E. Richter, B.A. Jones, J.L. Ezzel, N.L. Porter, Anal. Chem. 68 (1996) 1033.
[15] J. Gan, S.K. Papiernik, W.C. Koskinen, S.R. Yates, Environ. Sci. Technol. 33 (1999) 3249.
[16] A. Hubert, K.D. Wenzel, M. Manz, L. Weissflog, W. Engewald, G. Schuurman, Anal. Chem. 72 (2000) 1294.
[17] R.E. Johnsen, R.I. Starr, J. Agric. Food Chem. 20 (1967) 48.
[18] U.S. EPA, Ultrasonic Extraction, Test Methods for Evaluating Solid Waste, Method 3550C, Revision 3, US Environmental Protection Agency, Washington, D.C., November 2000.
[19] F. Hernandez, J. Beltran, F.J. Lopez, J.V. Gaspar, Anal. Chem. 72 (2000) 2313.
[20] R-A. Doong, P-L. Liao, J. Chromatogr. A 918 (2001) 177.
[21] W.F. Ng, M.J.K. Teo, H.A. Lakso, Fresenius J. Anal. Chem. 363 (1999) 673.
[22] F. Hernandez, J. Beltran, F.J. Lopez, J.V. Gaspar, Anal. Chem. 72 (2000) 2313.
[23] M. Moder, P. Popp, R. Eisert, J. Pawliszyn, Anal. Chem. 363 (1999) 680.
[24] F.E. Ahmed, TrAC Trends. Anal. Chem. 20 (11) (2001) 649.
[25] L. Sun, H.K. Lee, J. Chromatogr. A 1014 (2003) 165.
[26] G. Shen, H.K. Lee, J. Chromatogr. A 985 (2003) 167.
[27] P. Mogadati, J.B. Louis, J.D. Rosen, J. AOAC Int. 82 (3) (1999) 705.
[28] E. Papadopoulou-Mourkidou, J. Patsias, A. Kotopoulou, J. AOAC Int. 80 (2) (1997) 447.
[29] D. Barceló, M.-C. Hennion, Trace Determination of Pesticides and their Degradation Products in Water, Elsevier, Amsterdam, 1997.
[30] C. Molins, E.A. Hogendoorn, H.A.G. Heusinkveld, A.C. van Beuzekom, P. van Zoonen, R.A. Baumann, Chromatographia 48 (5/6) (1998) 450.
[31] H. Mol, M. Althuizen, H. Janssen, C. Cramers, U. Brinkman, J. High Resolut. Chromatogr. 19 (1996) 69.
[32] D.D. Erney, T.M. Pawlowski, C.F. Poole, J. High Resolut. Chromatogr. 20 (1997) 375.
[33] H. Prosen, L. Zupancic-Kralj, Chromatographia 51 (2000) S155.
[34] D.K.R. Stewart, K.G. Cairns, J. Agric. Food Chem. 22 (1974) 984.
[35] WHO, Environmental Health Criteria: Endosulfan, 1984.

6.5 OPTIMIZAÇÃO DA EXTRACÇÃO DE PESTICIDAS EM SOLOS ATRAVÉS DE FLUIDOS SUPERCRÍTICOS, RECORRENDO A UM DESENHO EXPERIMENTAL COMPOSTO, E POSTERIOR ANÁLISE POR CROMATOGRAFIA GASOSA E ESPECTROMETRIA DE MASSA SEQUENCIAL

Com base na publicação:

Gonçalves, C. Carvalho, J.J., Azenha, M.A., Alpendurada, M.F. – Optimization of supercritical fluid extraction of pesticide residues in soil by means of central composite design and analysis by gas chromatography-tandem mass spectrometry. J. Chromatogr. A, 1110 (2006) 6-14.

Available online at www.sciencedirect.com
SCIENCE DIRECT
ELSEVIER
Journal of Chromatography A, 1110 (2006) 6–14
JOURNAL OF CHROMATOGRAPHY A
www.elsevier.com/locate/chroma

Optimization of supercritical fluid extraction of pesticide residues in soil by means of central composite design and analysis by gas chromatography–tandem mass spectrometry

C. Gonçalves [a], J.J. Carvalho [b], M.A. Azenha [c], M.F. Alpendurada [a,b,*]

[a] *Laboratory of Hydrology, Faculty of Pharmacy, University of Porto, Rua Aníbal Cunha 164, Porto 4050-047, Portugal*
[b] *IAREN – Water Institute of the Northern Region, Rua Dr. Eduardo Torres 229, Matosinhos 4450-113, Portugal*
[c] *CIQUP, Department of Chemistry, Faculty of Sciences, University of Porto, Rua do Campo Alegre 687, Porto 4169-007, Portugal*

Received 18 November 2005; received in revised form 17 January 2006; accepted 19 January 2006
Available online 14 February 2006

Abstract

An environmentally friendly methodology is proposed for the analysis of pesticides in soil samples based on supercritical fluid extraction (SFE) and analysis at high selectivity and sensitivity, by gas chromatography–tandem mass spectrometry (GC–MS–MS). The pesticides investigated are among the most commonly used in intensive horticulture activities comprising organochlorine and organophosphorous insecticides, triazine and acetanilide herbicides, amongst others. An experimental design approach was used for modelling SFE and optimised extraction conditions were derived for the total pesticides extraction or for specific sub-groups of interest. Pesticide residues could be detected in soils in the sub-ppb range (0.1–3.7 $\mu g\,kg^{-1}$), with quite good precision (4.2–15.7%) and extraction efficiency (80.4–106.5%). The analysis of soil samples from an intensive horticulture area in Póvoa de Varzim, north of Portugal, revealed the presence of persistent pesticides, parent compounds and degradation products among the following: endosulfan, endosulfan sulfate, dieldrin, 4,4′-DDE, 4,4′-DDD, atrazine, alachlor, metolachlor, chlorpyrifos, pendimethalin and lindane. The important features to point out are the easy interpretation of chromatograms and straightforward confirmation of analytes that greatly facilitates the analyst judgement on the contamination of the sample.
© 2006 Elsevier B.V. All rights reserved.

Keywords: Soil; Pesticides; SFE; Central composite design; Intensive horticulture; Tandem-MS

1. Introduction

A supercritical fluid can be defined as a physical state, in which a substance is compressible, behaves like a gas, has a density of a liquid, fills and assumes the shape of its container [1]. Supercritical fluids are macroscopically homogeneous but microscopically inhomogeneous consisting of solvent clusters and free volumes which result in unusual properties attributed to local density effects [2]. As general properties, they possess high diffusive power, low viscosity, good penetration capabilities and adjustable density to fit any particular needs [3].

A trend towards more time-effective and environmentally friendly processes has boosted the interest in supercritical fluid extraction (SFE) [2,4–6]. Unanimously recognized advantages of SFE have been discussed in the literature which are worth mentioning: rapidity, simplicity, great analyte selectivity [7], good extraction efficiency, no need of clean-up step, suitability for thermally labile compounds, automation, solventless or near solvent free character and reduced environmental hazard [3,5,7–12]. Despite evident advantages, SFE is not widely adopted in official methods and several analytical protocols for pesticide analysis in soils still rely on liquid–solid extraction, e.g. the DFG S19 multimethod [9,13]. Several research papers have demonstrated the suitability of SFE to replace the conventional solvent extraction methods [14–17]. A good assortment of SFE-based analytical protocols have been developed for a wide range of matrix types [8,10,18] and specific category of pollutants such as: polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) [12,19], organochlorine pesticides (OCPs) [14], triazines [20,21], organophosphorus pesticides (OPPs) [22] and carbamates [4]. Nevertheless, a few approaches have dealt with multiresidue analysis of pesticides in soils [9], which presents

* Corresponding author. Tel.: +351 22 9364210; fax: +351 22 9364219.
E-mail address: mfalpendurada@iaren.pt (M.F. Alpendurada).

0021-9673/$ – see front matter © 2006 Elsevier B.V. All rights reserved.
doi:10.1016/j.chroma.2006.01.089

an additional complexity due to the disparity of chemical structures, solubilities in the extraction fluid and interaction with the matrix. As investigation on SFE became more intense, some analytical difficulties turned out apparent, as follows: somewhat lower efficiency in the extraction of polar analytes, the different extraction efficiencies obtained from spiked and naturally incurred samples and the limited sample amount that can be used [7,10–13]. Although, undoubtedly, requiring extensive optimisation any time a new class of compounds or a new matrix is investigated [10], the successful implementation of the technique is within the reach of any experienced analyst [13]. Present scientific consciousness considers selectivity of an extraction method of paramount importance, since the presence of co-extracted compounds frequently requires tedious clean-up steps before chromatographic analysis [19] and contributes to analytical performance deterioration and biased results.

A recent perspective of SFE capabilities is dedicated to environmental ecotoxicology of pollutants and field remediation studies [23,24]. From this point of view, it may be more important to recover only the environmentally relevant molecules available for transport and microorganisms rather than complete extraction of all pollutants [19].

One of the main advantages that have been attributed to tandem mass spectrometry (MS–MS) is the enhanced selectivity that can be exploited to identify and quantify compounds at low levels in complex matrices with higher precision [25]. Despite this attractive feature, surprisingly few applications have been reported for soils [26] conversely to vegetables and water where literature is profuse [27,28].

The present study aims at demonstrating the practical applicability of SFE in combination to gas chromatography–tandem mass spectrometry (GC–MS–MS) for the determination of a range of modern pesticides, abundantly used in intensive horticulture. This is part of an effort for the use of clean sample preparation techniques, as replacement for Soxhlet extraction, with the aim to reduce the occupational exposure of the analysts to toxic solvents and their overall disposal to the environment by laboratories whose principal role should be to ensure the environmental safety.

The optimisation strategy of SFE was based on an experimental design approach, which provided the tools for efficient data collection and management. Additionally, this paper aims to demonstrate the versatility of the optimization strategy upon which collected data was used to derive optimum extraction conditions for the whole set of pesticides or particular chemical subgroups, according to the user needs. As it will be shown, no longer is the analyst's work a matter of delicate distinction between trace pesticide residues and massive interferences in complex matrices, using SFE coupled to GC–MS–MS.

2. Experimental

2.1. Chemicals and reagents

Studied pesticides were chosen based on previous information on the occurrence of pesticide residues in soils of the target study area and represent typical active ingredients currently used in intensive horticulture [29]. All pesticide analytical standards were of Pestanal grade supplied by Riedel-de Häen (Seelze, Germany). Individual stock standard solutions were prepared by gravimetric weighing of high purity substances to give a concentration of about 200 mg L^{-1} and dissolved in 10 mL of an appropriate solvent, as follows: the OCPs were prepared in *n*-hexane SupraSolv grade from Merck (Darmstadt, Germany) whereas the OPPs and triazines were dissolved in methanol ChromaSolv grade from Fluka (Buchs, Switzerland). Individual solutions of chloroacetanilides, acylalanines and diverse pesticides were also prepared in methanol. Two working standard solutions combining the OCPs plus OPPs and triazinas plus miscellaneous pesticides, respectively, were prepared in methanol at 2.0 mg L^{-1} individual concentration level. All pesticide solutions were stored in a freezer protected from light at −18 °C. Ethyl acetate, Pestanal grade, from Riedel-de Häen was used for collection of analytes in SFE.

2.2. Preparation of soil samples

Prior analysis samples were dried at 40 °C during 48 h, sieved at 500 μm and kept refrigerated at 4 °C. An uncontaminated bulk soil and real contaminated samples were collected with average composition till 20 cm depth. Their texture classification varies from sandy-loam (soils 5, 22 and 25) to sandy (soils 1 and 18) with organic matter content ranging from 1.7 to 8.6%. The uncontaminated soil used for optimisation purposes belongs to the sandy-loam category containing 7.4% organic matter. Further details can be found elsewhere [29]. Pesticides were spiked onto the bulk soil at 50 μg kg^{-1} concentration level (except desethylatrazine, 10-fold greater) by slurry spiking in acetonitrile solution and the solvent was allowed to evaporate overnight. An ageing period of 20 days was observed prior to SFE. As it is not feasible to reproduce experimentally the environmental conditions that occur during deposition of pollutants, aged spiked soil can be used as a model for method evaluation but the results must be regarded with caution [5,30]. Furthermore, spiked soils were used for the calculation of recoveries since it is unlikely to find a naturally contaminated sample containing all the pesticides the method is proposed for.

2.3. Supercritical fluid extraction

SFE extractions were performed using an Isco SFE System (Isco Europe, Hengoed, UK) consisting of a supercritical fluid extractor SFX 220, a controller SFX 200, two syringe pumps MODEL 260 D and a restrictor temperature controller associated with two coaxially heated capillary restrictors. A restrictor temperature setting of 90 °C was chosen since experience tells that problems of restrictor plugging are avoided, giving a flow rate about 1.2–1.3 mL min^{-1}. The extraction chamber was a stainless steel cartridge with 2.5 mL capacity, able to accommodate 2.3 g of sample and an additional portion of anhydrous sodium sulphate placed at the bottom of the cell. Experimental conditions such as: restrictor temperature, trapping solvent and volume, pressure, temperature, percentage and composition of modifier, extraction time and supercritical fluid volume were

controlled for maximum operation efficiency. Extracts collected by depressurisation of the supercritical fluid into 12 mL of solvent were then evaporated to dryness under a gentle stream of nitrogen, thereafter recovered to 200 μL of ethyl acetate and 1 μL injected for chromatographic analysis.

2.4. Chromatographic analysis by GC–MS–MS

Direct chromatographic analysis of the SFE extracts was performed on a Varian 3400 CX (Walnut Creek, USA) gas chromatograph equipped with a SPI/1078 temperature-programmable injector and a CPSil-8 CB low bleed MS capillary column (30 m × 0.25 mm I.D., 0.25 μm film thickness) from ChromPack (Middelburg, The Netherlands). The split/splitless injector was kept at 250 °C and injections were performed in splitless mode for 0.75 min. High purity helium at 1.0 mL min^{-1} flow rate (150 °C oven temperature) under constant pressure was used as the carrier gas, and collision gas in the ion trap chamber during MS–MS experiments. The oven temperature programme was as follows: initial temperature 80 °C (held 2 min), ramped at 15 °C min^{-1} to 180 °C (held 4 min), ramped at 7 °C min^{-1} to 220 °C (held 6 min) and, finally, increased at 20 °C min^{-1} to 290 °C (held 1 min). Detection of pesticides was accomplished using a Saturn 2000 ion trap mass spectrometer from Varian (Sunnyvale, CA, USA) with electron impact ionisation (EI, filament emission current of 50 μA) and MS–MS of fragment ions. The manifold, trap and transfer line temperatures were set at 50, 200 and 240 °C, respectively. The axial modulation amplitude voltage was adjusted to 3.7 V for optimal mass resolution and the electron multiplier voltage was established by autotune at around 1800 V (+300 V offset). Target counts (target TIC) in MS–MS operation were limited to 5000 in order to avoid phenomena of charge repulsion or ion-molecule reactions, leading to mass spectra distortion. For MS–MS operation, instrumental parameters must be set up on a per-analyte basis, which was carried out through the automated method development (AMD) tool.

3. Results and discussion

3.1. Optimised conditions of MS–MS operation

Secondary mass spectra can be obtained nowadays in an affordable manner by using bench top ion trap mass spectrometers performing the so-called "tandem in time mass spectrometry" [31]. Each particular analyte and equipment requires that appropriate instrumental conditions be settled in order to achieve maximum sensitivity, selectivity and adequate product spectra quality. Such goal is accomplished by defining pesticide-specific time segments throughout the chromatographic run containing the experimentally determined settings, mainly concerning: ion isolation, collision induced dissociation (CID) and analysis of the product ions.

Regardless of the excitation mode, resonant or non-resonant, the resultant secondary mass spectra thereby obtained are highly specific to each molecule and can be compiled in a searchable spectra library. Further considerations on MS–MS fine-tuning can be found elsewhere [32,33]. MS–MS instrumental parame-

Table 1
Instrumental settings for detection of selected pesticides using GC–MS–MS: parent ion isolation, collision induced dissociation (CID) and product ions obtained on distinct time segments

Pesticides	MS–MS segments (min)	Parent ion (*m/z*)	Excitation storage level (*m/z*)	CID excitation amplitude (V)	Product ions *m/z* and (relative abundances, %)	Quantitation ion (*m/z*)
Desethylatrazine	12.00–13.00	172	**75.7**	78	104 (100) 109(67) 146(63)	104
Dimethoate	13.00–13.93	125	**60.0**	59	79 (100) 125(13)	79
Atrazine	13.93–14.34	215(M)	143.0	97	172 (20) 200(100) 214(43)	200
Lindane	14.34–15.50	183	80.0	76	109 (58) 147(61) 148(100)	148
Alachlor	15.50–16.90	188	**82.8**	66	132 (98) 160(100) 188(75)	160
Metalaxyl	16.90–17.70	206	**90.7**	72	132 (100) 146(27) 162(80)	132
Metolachlor	17.70–18.50[a]	162	**71.3**	68	117 (58) 132(100) 144(13)	132
Chlorpyrifos		314	**138.5**	84	258 (100) 286(56) 314(7)	258
Pendimethalin	18.50–19.35	252	**111.1**	72	162 (62) 191(65) 208(100)	208
Chlorfenvinphos E	19.35–20.01[a]	267	**117.7**	99	159 (100) 203(52) 267(31)	159
Chlorfenvinphos Z		267	**117.7**	99	159 (100) 203(46) 267(29)	159
Quinalphos		298	**131.4**	0.28[b]	190 (100) 156(50) 252(18)	190
Procymidone	20.01–21.00	283 (M)	124.3	94	254 (39) 255(100) 282(20)	255
Endosulfan I	21.00–22.00	241	106.2	99	170 (100) 206(94) 241(53)	170
4,4′ DDE	22.00–22.45	318	**140.3**	0.25[b]	246 (100) 248(92) 283(71)	246
Dieldrin	22.45–23.50	277	**122.1**	94	239 (43) 241(100) 277(77)	241
Endosulfan II	23.50–24.67	241	**80.0**	83	136 (32) 170(100) 206(41)	170
4,4′ DDD	24.67–25.40	235	**103.5**	95	165 (100) 199(40)	165
Benalaxyl	25.40–26.00	206	**90.7**	72	132 (100) 146(36) 162(59)	132
Endos. Sulfate	26.00–28.87	272	119.9	98	235 (31) 237(100) 272(19)	237

M: molecular ion.
[a] Multiple reaction monitoring segments.
[b] CID fragmentation was achieved with resonant excitation conversely to the remaining pesticides (non-resonant).

ters were studied to give the finest sensitivity and mass spectra quality and are presented in Table 1 along with respective product ions used for quantitation.

3.2. SFE optimisation through experimental design approach

The traditional optimisation procedure varying "one variable-at-a-time", is a strategy "based on experience, educated guesswork and luck" [34] that does not guarantee the attainment of a true optimum of the extraction conditions [4,8,34,35]. Conversely, the chemometric approach relies on a rational experimental design, which allows the simultaneous variation of all experimental factors, saving time and materials [35]. The central composite design (CCD), is probably the most widely used experimental design for fitting a second-order response surface [36,37]. This design has the additional capability of intrinsic confirmation of results and estimation of experimental error, using orthogonal designs and built-in "hidden replication" [34]. A CCD was employed in order to derive optimal SFE extraction conditions. A total of 30 experiments were carried out to optimise the influence of four variables: extraction temperature and pressure, volume of supercritical fluid (or extraction time) and added amount of modifier. Table 2 presents the levels of the actual experimental variables that were tested and their correspondence with the coded variables of the CCD. The aims of the CCD strategy were: (i) to maximize the extraction efficiency of the selected pesticides; (ii) to determine which variables have a higher impact on extraction recoveries; (iii) to give an insight on the robustness of the method close to the optimum conditions and (iv) eventually show interactions between variables.

Preliminary experiments for the selection of the best solvent to use in the collection of analytes dictated the preference for 12 mL of ethyl acetate. This evaluation took in consideration the requisites of good solubility for the analytes and the balance of fast evaporation in the concentration step but small volume reduction during the collection step. From the consideration of the chemical properties of the pesticides studied, bearing varied polar character, the use of a modifier appeared to be essential to improve the SFE extraction efficiency. This suggestion is corroborated by the findings of several authors [4,9–11,13], in the sense that addition of a co-solvent can compensate CO_2 insufficiencies for the quantitative extraction of polar pesticides or pesticide metabolites. The modifier might increase the polarity of the supercritical fluid [2,13] and/or interact with the sample matrix altering its physical properties or the sorption bonds that retain the analytes [10,38]. Methanol behaves as an universal modifier for pesticide analysis, bearing all good properties, as confirmed by several studies [4,5,9–11,13]. Our results are in agreement with these reports but a significant advantage over other modifiers could not be clearly perceived (only in certain experimental conditions). Nevertheless, an extraction improvement compared to pure CO_2 was found for 10 out of 19 pesticides when used at 20% proportion. Based on these criteria methanol content was included in the optimisation design. The experiments comprised in the CCD were performed in three orthogonal blocks (3 consecutive days) and the data computed as the sum of normalized peak areas to assign an equal weight to all pesticides. Models were produced for the total or partial combination of pesticides responses. The significance at $p = 0.05$ of the linear and quadratic effects of the four variables as well as 2-factor interactions were examined. The Pareto charts of effects were drawn for chemically distinct pesticide groups using Statistica software, ver. 5.1 (Statsoft, Tulsa, USA) and significant factors were identified as seen in Table 2. See also Figure S1 (figures with S-numbers can be found as Supplementary material in the web publication of this paper). The worst case scenario of the analytical error was adopted, i.e. the esti-

Table 2
Correspondence of coded and actual variable levels generated by the central composite design, combining factorial points (−1,1), axial points (−2,2) and centre points (0). Significant factors and optimised SFE conditions according to predominant chemical nature

Preliminary experiments					
Collection solvent	Methanol, acetonitrile, DCM, ethyl acetate, hexane, acetone				
Modifier type	Methanol, acetonitrile, DCM, ethyl acetate				
CCD variables					
	−2 (−α)	−1	0	+1	+2 (+α)
Temperature (°C)	50	68	85	102	120
Pressure (MPa)	30	35	40	45	50
Volume supercritical fluid (ml)	10	20	30	40	50
Modifier (%)	0	5	10	15	20

Optimised conditions

	All pesticides	OCPs	OPPs	Triazines	Miscellaneous	Polar
Significant effects ($p = 0.05$)	Pressure, temperature	Pressure, temperature	–	% Modifier, pressure, volume	Pressure, temperature	% Modifier
Temperature (°C)	120	120	120	80	120	100
Pressure (MPa)	42	50	30	50	50	50
Volume supercritical fluid (ml)	15	50	10	50	50	50
Modifier (% methanol)	8	8	15	20	8	20

mation given by MS residual rather than MS pure error. The prediction quality of the models was assessed by the evaluation of the degree of agreement between the experimental and the predicted responses, as illustrated in Figure S2. An acceptable suitability of the models can be observed.

The extraction of OCPs and miscellaneous pesticides seems to be predominantly affected by the linear effects of pressure and temperature. The same trend is displayed by the complete set of pesticides since these two groups comprise the majority of the elements. High temperature and fluid densities were shown to benefit the extraction efficiency probably due to an easier desorption of semi-volatile analytes from the active sites on the matrix and better solubilization in the supercritical fluid [2,10,39]. On the contrary, modifier content was demonstrated to be a crucial factor that affects the recovery of triazines and polar compounds. This statistically significant evidence is in agreement with the known limitations of CO_2 referred above.

The extraction of OPPs is not significantly dependent on any of the studied parameters. Moreover, the overall supercritical fluid volume used for extraction and corresponding extraction times (8–40 min) was generally not significant. This points out to a fast extraction process controlled by solubilization and transport rather than from desorption kinetics of analytes from the matrix [23]. In accordance, a short extraction time can be selected (15 min), largely benefiting throughput. Based on the above remarks, optimised extraction conditions were derived for the complete set of pesticides or specific subgroups and presented in Table 2. The conditions of maximum yield were approximated by empirical trial of combinations of the variables with the assistance of the contour plots. Figure S3 presents response surfaces concerning the behaviour of different groups of pesticides. In order to further validate the selected conditions and to assess the method's robustness for the complete set of pesticides, three experimental conditions in the vicinity of the optimum were assayed (A: 120 °C, 38 MPa, 10 mL supercritical fluid, 7% MeOH; B: 120 °C, 40 MPa, 15 mL supercritical fluid, 8% MeOH; C: 120 °C, 42 MPa, 15 mL supercritical fluid, 8% MeOH) and compared to the results obtained at the design centre (85 °C, 40 MPa, 30 mL supercritical fluid, 10% MeOH). Exception for condition A, with only 10 mL of supercritical fluid that was found to be insufficient, the remaining conditions gave better results than those obtained at the centre point. This observation was more pronounced for the OCPs: 4,4′-DDE and 4,4′-DDD, which have been demonstrated to require high temperature for efficient extraction whereas the optimum settings for the rest of the variables were actually close to the centre, so small influence was observed for other compounds. Therefore, the method was shown to be robust to small changes in the input variables.

3.3. Analytical performance achieved with SFE–GC–MS–MS

Some of the most desirable analytical features of a method intended for analysis of complex matrices are selectivity and sensitivity. The combination of SFE and GC–MS–MS should allow achieving these goals, which can greatly simplify the analyst work and improve the confidence in analytical data. The proposed method was evaluated regarding several performance parameters, as shown in Table 3 . The limits of detection (LODs) were estimated as the lowest concentration of an analyte spiked on the soil giving a S/N ratio of 3 whereas the limits of quantitation correspond to a S/N ratio of 10. The estimation was based on a low concentration in soil, 10 $\mu g\,kg^{-1}$. LODs varied from 0.1 $\mu g\,kg^{-1}$ for lindane, pendimethalin and chlorpyrifos to 3.7 $\mu g\,kg^{-1}$ for dimethoate, which constitutes an average sensitivity improvement of 4.1-times compared to the same method operated in SIM mode, or 10-times if operated in scan mode. These results were also generally better (1.5-times) compared to a previously described method using ultrasonic extraction (USE) and GC–MS(SIM) [29], but the difference is marginal. It should be emphasized, however, that concentrations at the LOD-level, or preferably LOQ, can be readily confirmed by MS–MS whereas SIM methodologies require a second analysis for unequivocal confirmation.

The analytical precision of the entire method was evaluated in repeatability (within-day RSD of peak areas) and intermediate precision conditions (between-day RSD). Both figures were reasonably low, the former varying from 0.7 to 10.8% (on average 6.4%) and the latter in the range 4.2–15.7% (on average 8.5%). The extraction efficiency was also evaluated by the calculation of recoveries based on matrix-matched standards at 50 $\mu g\,kg^{-1}$ concentration level, after 20-days ageing on soil. As can be seen in Table 3, the technique affords high extraction efficiency and accuracy. Recoveries obtained applying a previously reported ultrasonic extraction method are also given, SFE showing a similar extraction pattern with advantage for selected compounds.

Method calibration was also conducted using spiked soil standards at different calibration levels: 1.0, 5.0, 10, 50 and 100 $\mu g\,kg^{-1}$, including blanks, each injected in triplicate. Calibration data allowed good quantitative results to be obtained. To further characterise the method additional tests were performed to assess the likelihood of cross-contamination following a highly contaminated sample and a confirmation of the extraction completeness. Regarding the carryover effect, residual presence of pesticides in the system was always below 0.4% following the analysis of a 100 $\mu g\,kg^{-1}$ soil ($n = 5$), except 4,4′-DDE (1.3%), without the need of any extensive cleaning of restrictors and extraction cell. A second extraction of a same sample ($n = 4$) revealed the presence of minute amounts of compounds (0.2–1.5%) without any correlation with the recovery figures previously described. This finding points to a complete first extraction, as already emphasized, or the presence of non-extractable residues. The latter case might reflect the behaviour of desethylatrazine since a portion of analyte added to the sample could never be recovered, but the results are not conclusive. However, non-extractable atrazine has been reported by Kreuzig et al. [9], while other authors referred the negative correlation between carbon content of the soil and recovery, being this effect more pronounced for polar compounds [10,40,41]. Overall performance parameters can be considered highly satisfactory however, confirmation capabilities and operation features of the method, such as automation and near solvenless nature, should also be highlighted.

Table 3
Analytical figures of merit of the proposed procedure consisting on SFE of pesticide multiresidues coupled to GC–MS–MS detection regarding sensitivity, precision, efficiency and calibration data

Peak no.	Pesticides	t_R (min)	LOD ($\mu g\,kg^{-1}$)	LOQ ($\mu g\,kg^{-1}$)	Repeatability (% RSD), $n=6$	Intermediate precision (% RSD), $n=18$	% Recovery SFE, (% RSD)	% Recovery USE, (% RSD)	Calibration equation	Determination Coeficient (r^2)
1	Desethylatrazine	12.344	2.3	7.6	10.8	15.7	80.4 (5.5)	79.8 (5.2)	$y=114.1x+28.0$	0.998
2	Dimethoate	13.738	3.7	12	5.1	13.1	94.1 (8.5)	63.4 (5.5)	$y=279.5x-409.8$	0.995
3	Atrazine	14.050	0.5	1.6	7.1	10.9	87.1 (8.5)	95.7 (2.9)	$y=507.6x+41.3$	0.999
4	Lindane	14.461	0.1	0.4	5.2	5.4	100.6 (5.7)	87.7 (3.2)	$y=1041.6x+597.7$	0.997
5	Alachlor	16.690	0.3	1.1	8.0	8.1	100.9 (6.0)	98.3 (5.2)	$y=978.34x+622.2$	0.997
6	Metalaxyl	17.037	1.8	6.1	5.9	8.3	96.7 (2.5)	94.4 (4.5)	$y=433.5x+336.8$	0.998
7	Metolachlor	18.000	0.2	0.8	3.9	4.5	103.2 (7.1)	103.4 (6.5)	$y=2705.4x+1574.3$	0.996
8	Chlorpyrifos	18.036	0.1	0.3	0.7	4.2	89.2 (4.3)	88.8 (4.9)	$y=947.1x+730.0$	0.997
9	Pendimethalin	19.241	0.1	0.5	2.4	4.6	106.5 (3.0)	104.2 (5.3)	$y=1274.6x+738.2$	0.998
10	Chlorfenvinphos E	19.479	1.5	5.2	8.5	13.0	98.2 (6.9)	93.9 (13.5)	$y=382.8x+105.4$	0.990
11	Chlorfenvinphos Z	19.768	0.6	1.9	7.2	11.8	96.5 (7.3)	101.3 (2.4)	$y=1006.3x-49.7$	0.999
12	Quinalphos	19.901	1.0	3.5	7.6	7.1	91.8 (9.1)	97.3 (4.0)	$y=151.8x+165.6$	0.998
13	Procymidone	20.070	1.1	3.8	8.8	9.5	99.5 (9.2)	100.5 (5.8)	$y=148.9x+87.1$	0.996
14	Endosulfan I	21.235	0.6	2.0	7.0	7.3	100.9 (7.1)	101.5 (4.2)	$y=221.4x+195.0$	0.998
15	4,4′ DDE	22.295	0.2	0.7	7.8	7.4	96.2 (5.6)	92.3 (13.3)	$y=299.1x-446.2$	0.991
16	Dieldrin	22.604	0.4	1.3	6.2	7.3	103.7 (7.0)	101.4 (5.7)	$y=297.6x+615.0$	0.999
17	Endosulfan II	24.529	0.7	2.2	6.0	7.2	99.2 (8.8)	105.4 (1.9)	$y=267.9x+46.5$	1.000
18	4,4′ DDD	24.786	0.2	0.7	4.3	6.7	105.1 (6.0)	101.3 (4.9)	$y=3857.5x+8321.4$	0.998
19	Benalaxyl	25.781	1.4	4.7	8.2	9.7	98.7 (6.2)	102.1 (5.2)	$y=380.7x+426.4$	0.997
20	Endos. Sulfate	26.162	1.2	4.0	6.9	8.7	96.5 (3.5)	83.9 (7.7)	$y=147.3x+134.2$	0.999

Both recoveries by SFE and USE were estimated at 50 $\mu g\,kg^{-1}$ ($n=6$) concentration level. %RSD denotes the relative standard deviation of measurements.

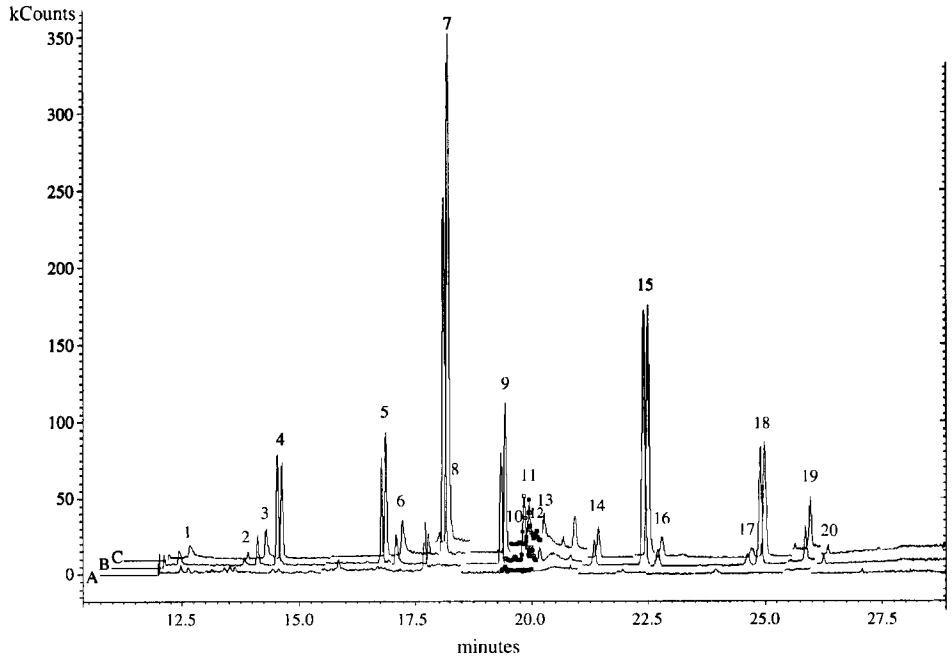


Fig. 1. Overlay of three chromatograms showing high selectivity of pesticide determination achieved by SFE–GC–MS–MS: (A) extract of a blank soil; (B) extract of spiked soil at 50 $\mu g\,kg^{-1}$ and (C) pesticide standard solution at a concentration equivalent to 50 $\mu g\,kg^{-1}$ in soil. For peak assignment refer to Table 3.

3.4. Evaluation of chromagraphic data and analysis of real samples

The ultimate goal of an analytical methodology is to provide the necessary enrichment of target analytes and subsequent detection in the absence of interfering substances. The present method might contribute to this aim, as can be seen in Fig. 1 where three SFE–GC–MS–MS total ion chromatograms are shown. The blank soil chromatogram is free from any relevant peak. On the other hand, the chromatograms at 50 $\mu g\,kg^{-1}$ and the corresponding concentration of pesticides injected in pure solvent are almost indistinguishable, which constitutes a major achievement.

A number of real samples of different texture characteristics, as part of a supplementary sampling carried out in August 2004, was analysed with the proposed method and the results are reported in Table 4. These results generated by an advanced technique with improved capabilities are aimed to confirm the previous findings of a monitoring programme carried out in north of Portugal during the period 2001–2003. An illustrative chromatogram of a multi-contaminated sample (sample 5) is given in Fig. 2 , showing the corresponding MS–MS mass spectra of detected compounds.

Essentially, the samples kept the same profile of contaminants as seen before. With three exceptions, the pesticides shown in Table 4 have been previously detected and quantitated in the corresponding samples, confirming past results. Two of these exceptions refer to the presence of chlorpyrifos in sample 1 and dieldrin in sample 5 which have never been quantitated before although their presence had been suspected in 5 and 2 occasions, respectively. In contrast, metolachlor occurred in sample 22 for the first time, but the amounts are still very low. Insecticides and herbicides were the most frequently detected compounds and their distribution is correlated to the crops being produced (e.g. sample 5 and 25 belong to maize cultivation areas). However, due to intensive cultivation, overlap of fitossanitary treatments can give rise to multi-contaminated samples where persistent pesticides and/or metabolites might also be found (see sample 22).

Table 4
Levels and type of pesticide contamination found in 5 soil samples as part of a supplementary sampling carried out in north of Portugal during August 2004

Pesticides ($\mu g\,kg^{-1}$)	Sample 1	Sample 5	Sample 18	Sample 22	Sample 25
Desethylatrazine	–	–	–	–	–
Dimethoate	–	–	–	–	–
Atrazine	–	4.4	–	52	–
Lindane	–	–	0.9	3.6	–
Alachlor	–	2.3	–	6.4×10^2	2.1
Metalaxyl	–	–	–	–	–
Metolachlor	–	2.4×10^2	–	2.2	–
Chlorpyrifos	2.7	–	2.0	1.3	–
Pendimethalin	–	–	1.0×10^2	1.2	–
Chlorfenvinphos E	–	–	–	–	–
Chlorfenvinphos Z	–	–	–	–	–
Quinalphos	–	–	–	–	–
Procymidone	–	–	–	–	–
Endosulfan I	–	2.5×10^2	–	4.3	–
4,4′ DDE	–	–	–	11	–
Dieldrin	–	7.2	–	6.7×10^2	–
Endosulfan II	–	4.4×10^2	–	27	–
4,4′ DDD	–	–	–	4.0	–
Benalaxyl	–	–	–	–	–
Endos. Sulfate	–	5.5×10^2	–	96	–

Result not given (–) means that the measured value was below the quantitation limit.

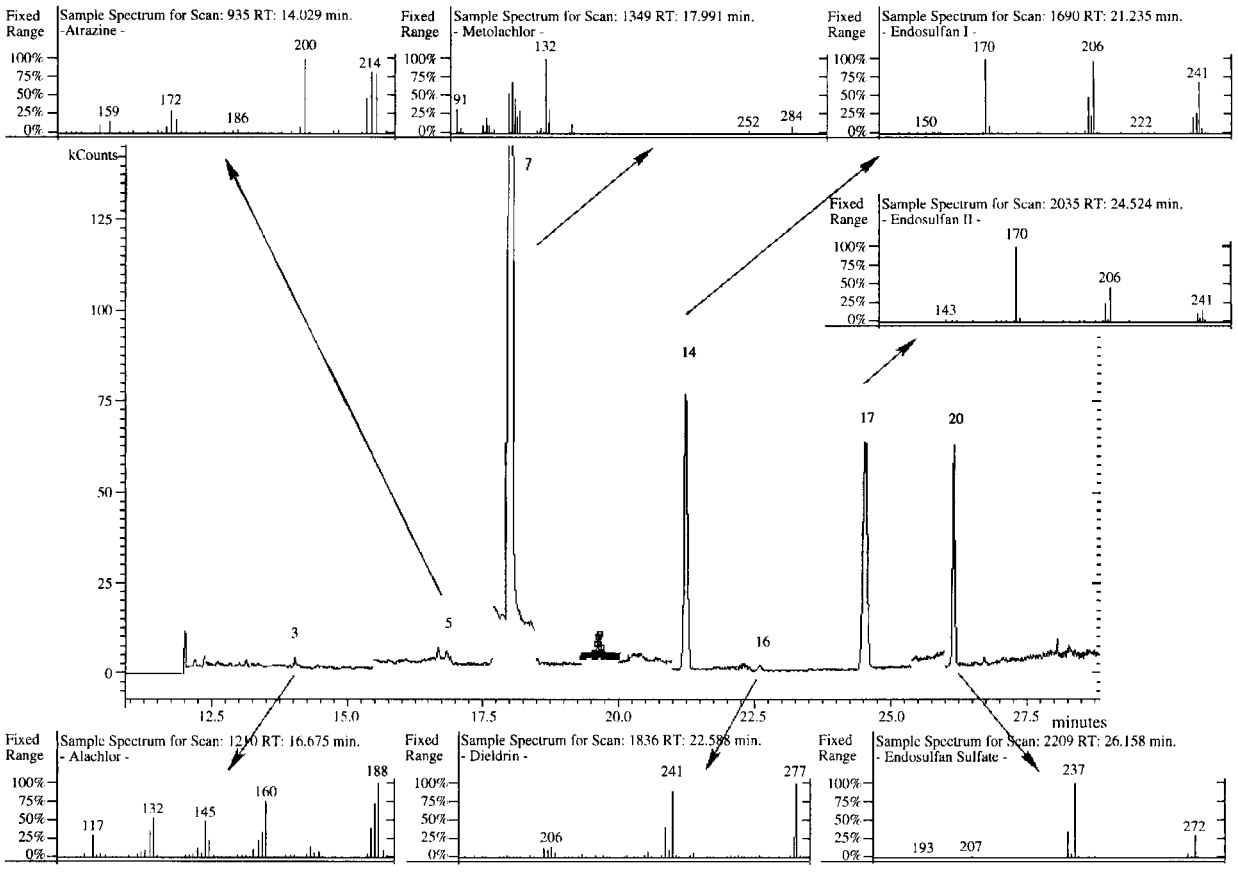


Fig. 2. Chromatographic plot and MS–MS spectra of pesticides detected in soil sample no. 5 analysed under the conditions established for the SFE–GC–MS–MS procedure. For peak identity assignment refer to Table 3. Concentration values are those in Table 4.

4. Conclusions

In addition to well-known theoretical and practical advantageous features, the response surface methodology allowed to perform a variety of calculations after all data has been collected. Useful information about the experimental system was made available however, a high precision analysis method is recommended to distinguish statistically significant effects.

Once adequately operated, SFE was shown to be an attractive technique for the analysis of pesticide multiresidues in soil samples. High extraction temperature was favoured in result of the high proportion of non-polar or semi-polar compounds, whereas addition of modifier was beneficial for the extraction of more polar pesticides. The analytical performance parameters reflect the excellent detection capacity (LODs of 0.1–3.7 $\mu g\,kg^{-1}$) and good precision (RSD between 4.2 and 15.7%) of the SFE technique coupled to GC–MS–MS. Clean chromatograms were obtained greatly simplifying data handling.

Persistent OCPs and degradation products were detected in soil samples as well as common herbicides and insecticides confirming, this way, previous data on the occurrence of same type of pollutants through the use of a highly selective and sensitive technique.

Acknowledgements

FCT- Fundação para Ciência e Tecnologia is greatly acknowledged for the Ph.D. grant PRAXIS XXI/BD/21823/99. The authors thank the IAREN for technical and financial support. The Department of Pharmaceutical Technology is thanked for lending the sieves for soil preparation all across the sampling campaigns.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at doi:10.1016/j.chroma.2006.01.089.

References

[1] M.D. Luque de Castro, M. Valcárcel, M.T. Tena, Extracción con Fluidos Supercríticos en el Processo Analítico, Editorial Reverté, Barcelona, Spain, 1993. p. 46.
[2] C.E. Bunker, in: J. Cazes (Ed.), Encyclopedia of Chromatography, Vol. 2, 2nd ed., Taylor & Francis Group, LLC, Boca Raton, 2005, p. 1616.
[3] A. Brachet, L. Mateus, S. Cherkaoui, P. Christen, J.-Y. Gauvrit, P. Lanteri, J.-L. Veuthey, Analusis 27 (1999) 772.
[4] L. Sun, H.K. Lee, J. Chromatogr. A 1014 (2003) 165.
[5] S.R. Rissato, M.S. Galhiane, B.M. Apon, M.S.P. Arruda, J. Agric. Food Chem. 53 (2005) 62.

[6] R.M. Smith, J. Chromatogr. A 856 (1999) 83.
[7] F.E. Ahmed, Trends Anal. Chem. 20 (2001) 649.
[8] N. Motohashi, H. Nagashima, C. Párkányi, J. Biochem. Biophys. Methods 43 (2000) 313.
[9] R. Kreuzig, A. Koinecke, M. Bahadir, J. Biochem. Biophys, Methods 43 (2000) 403.
[10] V. Camel, Trends Anal. Chem. 16 (1997) 351.
[11] A. Koinecke, R. Kreuzig, M. Bahadir, J. Chromatogr. A 786 (1997) 155.
[12] M.F. Alpendurada, in: J. Cazes (Ed.), Encyclopedia of Chromatography, 2004 Update Supplement, Marcel Dekker, New York, 2004, p. 224.
[13] J.R. Dean, G. Xiong, Trends Anal. Chem. 19 (2000) 553.
[14] E.G. van der Velde, M. Dietvorst, C.P. Swart, M.R. Ramlal, P.R. Kootstra, J. Chromatogr. A 683 (1994) 167.
[15] E.G. van der Velde, W. de Haan, A.K.D. Liem, J. Chromatogr. A 626 (1992) 135.
[16] V. Janda, K.D. Bartle, A.A. Clifford, J. Chromatogr. A 642 (1993) 283.
[17] V. Lopez-Avila, W.F. Beckert, C. Charan, Trends Anal. Chem. 13 (1994) 118.
[18] S.J. Lehotay, J. Chromatogr. A 785 (1997) 289.
[19] S.B. Hawthorne, C.B. Grabanski, E. Martin, D.J. Miller, J. Chromatogr. A 892 (2000) 421.
[20] S.A. Senseman, M.L. Ketchersid, Arch. Environ. Contam. Toxicol. 38 (2000) 263.
[21] E.G. Van der Velde, M.R. Ramlal, A.C. van Beuzekom, R. Hoogerbrugge, J. Chromatogr. A 683 (1994) 125.
[22] K. Norman, S. Panton, J. Chromatogr. A 907 (2001) 247.
[23] E. Björklund, T. Nilson, S. Bøwadt, K. Pilorz, L. Mathiasson, S.B. Hawthorne, J. Biochem. Biophys. Methods 43 (2000) 295.
[24] P. Hallgren, R. Westbom, T. Nilsson, S. Sporring, E. Björklund, Chemosphere, in press.
[25] P. Sandra, J. Beltran, F. David, J. High Resolut. Chromatogr. 18 (1995) 545.
[26] S.M. Pyle, A.B. Marcus, G.L. Robertson, Environ. Sci. Technol. 32 (1998) 3213.
[27] M.J. Gonzalez-Rodriguez, A. Garrido-Frenich, F.J. Arrebola, J.L. Martinez Vidal, Rapid Commun. Mass Spectrom. 16 (2002) 1216.
[28] J.L. Martinez Vidal, M.C. Pablos Espada, A. Garrido Frenich, F.J. Arrebola, J. Chromatogr. A 867 (2000) 235.
[29] C. Gonçalves, M.F. Alpendurada, Talanta 65 (2005) 1179.
[30] C. Gonçalves, M. Rezende Pinto, M.F. Alpendurada, J. Liq. Chromatogr. Rel. Technol. 24 (2001) 2943.
[31] N. Sauret, M. Millet, P. Herckes, P. Mirabel, H. Wortham, Environ. Pollut. 110 (2000) 243.
[32] C. Gonçalves, M.F. Alpendurada, J. Chromatogr. A 1026 (2004) 239.
[33] S. Schachterle, C. Feigel, J. Chromatogr. A 754 (1996) 411.
[34] K.K. Hockman, D. Berengut, Chem. Eng. – New York, (1995) 142.
[35] A.M. Carro, J.C. Cobas, J.B. Rodrigues, R.A. Lorenzo, R. Cela, J. Anal. Atom. Spectrom. 14 (1999) 1867.
[36] D.C. Montgomery, Design and Analysis of Experiments, John Wiley and Sons, New York, 1991, p. 521.
[37] S. Bolton, Pharmaceutical Statistics: Practical and Clinical Applications, Marcel Dekker, New York, 1984, p. 435.
[38] C. Nerin, R. Batle, M. Sartaguda, C. Pedrocchi, Anal. Chim. Acta 464 (2002) 303.
[39] W.H. Hauthal, Chemosphere 43 (2001) 123.
[40] J.B. Weber, G.G. Wilkerson, C.F. Reinhardt, Chemosphere 55 (2004) 157.
[41] J.R. Dean, I.J. Barnabas, S.P. Owen, Analyst 121 (1996) 465.

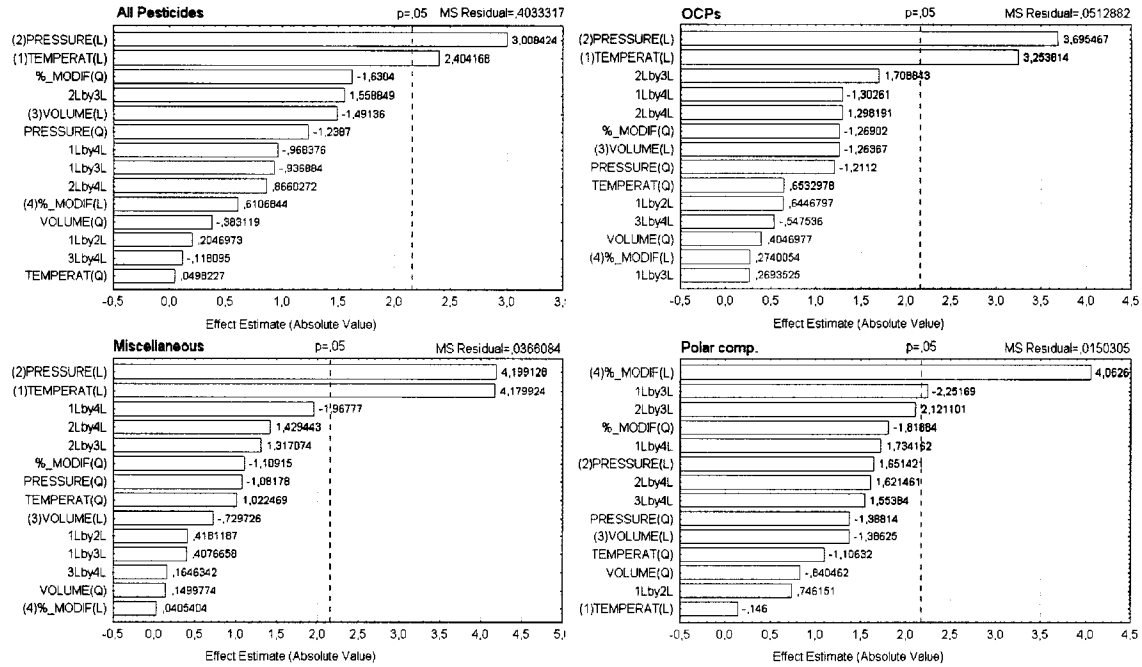


Figure S1- Pareto charts of standardized effects displaying main effects, both linear (L) and quadratic (Q), interactions effects and significant factors at p=0.05, based on the computation of data for all pesticides, OCPs alone, miscellaneous (alachlor, metolachlor, metalaxyl, benalaxyl, pendimethalin and procymidone) and polar compounds (desethylatrazine-DEA, dimethoate and atrazine).

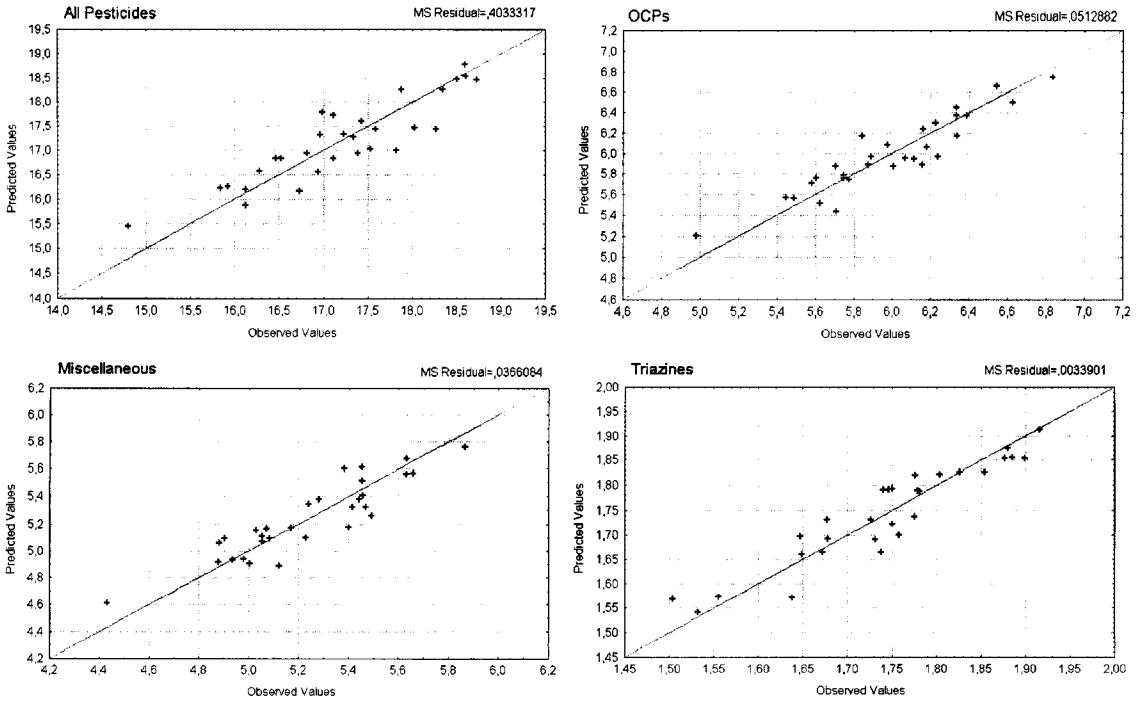


Figure S2- Representation of observed versus predicted responses based on the models fitted by the CCD to the behaviour of different groups of pesticides regarding four SFE variables.

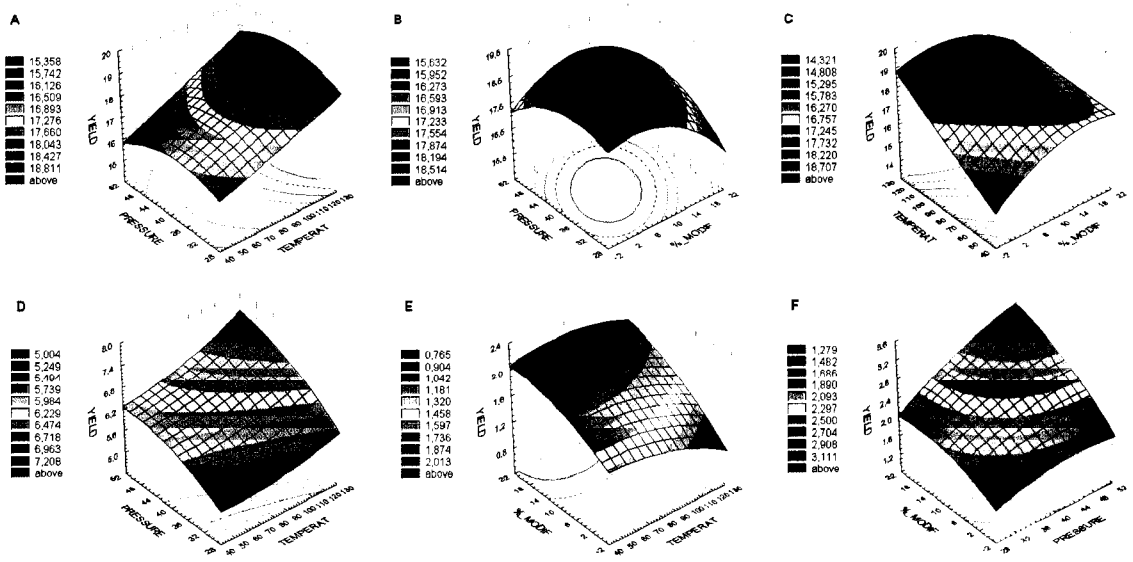


Figure S3- Response surfaces fitted by the central composite design to the experimental data on SFE of pesticides. A, B and C- response surfaces for all pesticides, D- response surface for OCPs, E- response surface for triazines and F- response surface for polar compounds.

Capítulo 7

RESULTADOS DA MONITORIZAÇÃO DE PESTICIDAS EM ÁGUAS E SOLOS DA ZONA VULNERÁVEL N.º 1, NO PERÍODO 2001-2003

7.1 CARACTERIZAÇÃO DA CONTAMINAÇÃO COM PESTICIDAS EM AMOSTRAS DE ÁGUA SUBTERRÂNEA DE UMA ZONA VULNERÁVEL LOCALIZADA NO NORTE DE PORTUGAL, BASEADA NUM ESTUDO DE 2 ANOS: ANÁLISE DESCRITIVA E QUIMIOMÉTRICA

Com base no artigo submetido para publicação:

Gonçalves, C., Esteves da Silva, J.C.G., Alpendurada, M.F. – Characterization of the pesticide contamination of groundwater samples from a vulnerable zone located in north Portugal based on a 2-year study: descriptive and chemometric interpretation. Environmental Pollution (2006).

O Anexo IV contém informação adicional

Characterization of the pesticide contamination of groundwater samples from a vulnerable zone located in north Portugal based on a 2-year study: descriptive and chemometric interpretation

C. Gonçalves [a], Joaquim C. G. Esteves da Silva [b], M. F. Alpendurada [a, c] *

[a] *Laboratory of Hydrology, Faculty of Pharmacy, University of Porto, Rua Anibal Cunha 164, 4050-047 Porto, Portugal*
[b] *Centro de Investigação em Química, Department of Chemistry, Faculty of Sciences, University of Porto, Rua do Campo Alegre, 687, 4169-007 Porto, Portugal*
[c] *IAREN - Water Institute of the Northern Region, Rua Dr. Eduardo Torres, 229, 4450-113 Matosinhos, Portugal*

Submitted for publication in Environmental Pollution, September 2006

* Corresponding author. Tel.: +351 22 9364210, fax: +351 22 9364219
E-mail address: mfalpendurada@iaren.pt (M.F. Alpendurada)

Abstract

A monitoring programme of pesticides was implemented in the vulnerable zone n.o 1 (Directive 91/676/EEC), in north Portugal (ZV1), in order to assess the impact of intensive horticulture practices on the contamination of soils and groundwater. Herein, the groundwater contamination will be discussed. The monitoring network comprised 23 samplings points sampled every trimester during a 2-year period. Forty-two pesticides belonging to varied chemical families, including current pesticides and persistent organic pollutants (POPs), parent pesticides and degradation products were analysed by solid-phase microextraction (SPME) and gas chromatography with electron-capture detection-thermoionic specific detection (GC-ECD-TSD) or mass spectrometry (GC-MS). Statistical treatment of a large data matrix was performed initially by descriptive analysis followed by chemometric multivariate analysis. The latter included cluster analysis, linear discriminant analysis and factor analysis to reveal the dynamics of pesticide behaviour. Twenty-two pesticides were quantitated, 20 pesticides were not detected and metalaxyl, benalaxyl, quinalphos, pirimicarb and prometryn were only qualitatively detected. The pesticides most frequently detected were: lindane (53%), pendimethalin (49%), endosulfan sulphate (44%), and endosulfan (38%) while the ones that most frequently exceeded the 0.1 $\mu g\ L^{-1}$ limit were: pendimethalin (13%), endosulfan (12%), endosulfan sulphate (11%), and atrazine (9%). 45% of the samples overcame the EU limit for individual pesticides while 27% overcame the limit imposed to the sum of pesticides. Principal component analysis revealed 5 principal components that jointly represented 68% of data variance and were attributed to environmental/agrochemical managing factors. The broad range of pesticides investigated in our work combined with the intensive character of the local agriculture contributed to the diversity of pesticides that were detected. However, the persistence of pesticides above the EU regulatory limit is equivalent to that found in the literature concerning different Portuguese and European regions.

Keywords: Environmental monitoring, vulnerable zone, groundwater, pesticides, multivariate analysis

1. Introduction

Nowadays, the enormous benefits brought to humankind by pesticides are well recognized (Stephenson, 2003). They not only dramatically improved the quantity and quality of food commodities available, but they have been also successfully used for vector control in sanitation campaigns (Ma et al., 2005; Porazzi et al., 2005; Sánchez-Camazano et al., 2005). Besides these main application areas, i.e. agriculture and public health, pesticides find many other uses: domestic use, landscape management at industrial facilities, transportation routes and recreational spaces, etc. (Porazzi et al., 2005). The quantities of pesticides applied worldwide, the variety of chemical identities and associated toxic

mechanisms as well as their mobility generate particular concern as environmental pollutants. The environment constitutes the ultimate reservoir where pesticides may suffer dissipation or, on the other hand, they may cause deleterious effects on non-target species, e.g. endocrine system disruption (Kamrin, 2000).

The environmental contamination by pesticides raises a serious alert since current decisions based on a better understanding of their fate are unable of producing an immediate recovery on already installed contamination. The pesticide policy falls within two approaches: exhaustive study of new candidate pesticides regulated under the EU Directive 91/414/EEC, which advocates that pesticides shall not be found as water contaminants under normal usage practices, and monitoring studies, as a means to disclose the present contamination status and assess the impact of newly implemented measures. In Europe, monitoring groundwaters has received somewhat less attention compared to surface waters and comprehensive monitoring surveys are urgently necessary (Guzzella, et al, 2005). The quality of groundwater, as far as the pesticides content is concerned, is usually assessed in the European Union in respect to the 98/83/EC Directive, that establishes the quality criteria of water intended for human consumption, since this is one of the most sensitive uses of groundwater (EEA, 1999; Hamilton et al., 2003). Besides the limit set for individual pesticides at 0.1 $\mu g\ L^{-1}$ (0.03 $\mu g\ L^{-1}$ for cyclodienes, except endosulfan), we shall recall especial attention also to the limit set for the sum of pesticides (0.5 $\mu g\ L^{-1}$) in intensively cultivated areas, because of the large number of pesticides that may coexist.

Pesticide contamination of groundwater might be anticipated when the mitigation capacity of the soil system is exceeded, especially when enhanced productivity agriculture is carried out on hydrogeological vulnerable soils. Particularly, the agriculture developed in the Mediterranean region has a strong reliance on pesticides (EEA, 1999; Garcia et al., 2006; Guzzella et al., 2005). Monitoring studies carried out under realistic agronomic conditions may provide a reliable insight on the threat posed to groundwater quality (Papadopoulou-Mourkidou et al., 2004). The presence of pesticide residues in groundwater as a result of their agricultural application, with special emphasis on herbicides, is a common finding (Cerejeira et al., 2003; Papastergiou and Papadopoulou-Mourkidou, 2001; Sánchez-Camazano et al., 2005; van Maanen et al., 2001). In 1999, the European Environment Agency (EEA) produced a report on the status of groundwater quality in Europe where several pesticides were ranked according to their ubiquity (EEA, 1999).

As essential to producing monitoring data, is the sound interpretation of the main trends inside often massive datasets, where only a few factors are meaningful. Combining advanced statistical exploratory features to resolve chemical issues, chemometrics is a powerful tool to explore analytical data (Tauler et al., 2004). Less obvious patterns can be highlighted in an amalgamated data matrix, namely the deduction of correlated variables, sample grouping and outlier detection as well as to define the sources of data variation (Singh et al., 2005; Tauler et al., 2001).

To elucidate the impact of the intensive horticulture taking place in a vulnerable region located in north Portugal, a monitoring study was carried out comprising groundwater and soils, for a 2-year period. In the present paper, the results of water samples will be dealt with by descriptive and multivariate statistical approaches whereas the main findings for soil samples have been published (Gonçalves et al., 2006). By nature, water is a mobile media thus, pesticide contamination tends to follow geographical and temporal patterns that are better understood on a regional basis rather than site by site; this aspect will be investigated.

2. Experimental

2.1. Characterization of the samples and the sampling area

To conform to the EU Directive 91/676/EEC, the protection area of the free aquifer between Esposende and Vila do Conde was designed as the Vulnerable Zone

no. 1 (ZV1). Although this Directive aims at reducing or impeding the contamination of the underlying aquifers by nitrates of agricultural origin, some reports correlate the concentrations of nitrate with those of pesticides (Batista et al., 2004; Silva et al., 2006; Squillace et al., 2002; van Maanen et al., 2001), thus the contamination by pesticides is also a relevant topic to be investigated.

The Portuguese seashore has been mapped using the DRASTIC vulnerability index, which ascribes a value above 180 (highly vulnerable) to extensive regions included in the ZV1 (Lobo-Ferreira et al., 1995). Although it gives a first indication for the need of protective measures, Worral and Kolpin (2004) argument that, in certain circumstances, the interdependence of the hydrogeological factors and the pesticide chemical properties may apportion higher significance to the likelihood of groundwater contamination than each factor by its own. The ZV1 is located in the littoral north of Portugal with an enclosed are of 57.3 Km^2. In 1997, when it was established, it was delimited by the Atlantic ocean on the West, the A28 highway on the East, the Cávado river in the North and the Ave river in the South. This is the present study area, although in the future the ZV1 will be enlarged. A map depicting the ZV1 and the selected sampling sites can be seen in Fig. 1. The local aquifer is unconfined and shallow, with a phreatic depth as low as 2-4 m in certain regions but mostly less than 9.1 m. The majority of the cultivated area consists of sandy dunes of sedimentary origin, particularly the central region, where the fields are dug in the ground. This creates an unique configuration and climate conditions. Due to the high permeability of the soils, groundwater is easily available.

The monitoring network considered in this study is shared with the national groundwater quality system which was established to support the implementation of the above EC Directive. Initially it comprised 25 sampling points that were later reduced to 23, since sites 3, 7 and 23 were withdrawn while site 2A was added. The wells are of 1.2-1.6 m width and vary in depth from 7 to 15 m. The selected wells are used for irrigation purposes and are located in the fringe of the cultivated fields or even inside them. Particularly those lying along the eastern boundary are excavated on consolidated rock of schistic and granitic type. The most popular vegetables produced in intensive regime are: tomato, beans, cucumber, pepper, varieties of melon, lettuce, onion, carrots, garlic, different types of cabbage and broccoli either cultivated in the open air or in greenhouses. Maize, grass and potatoes are the main crops produced in humic cambisols of sites 5, 19, 22 and 25.

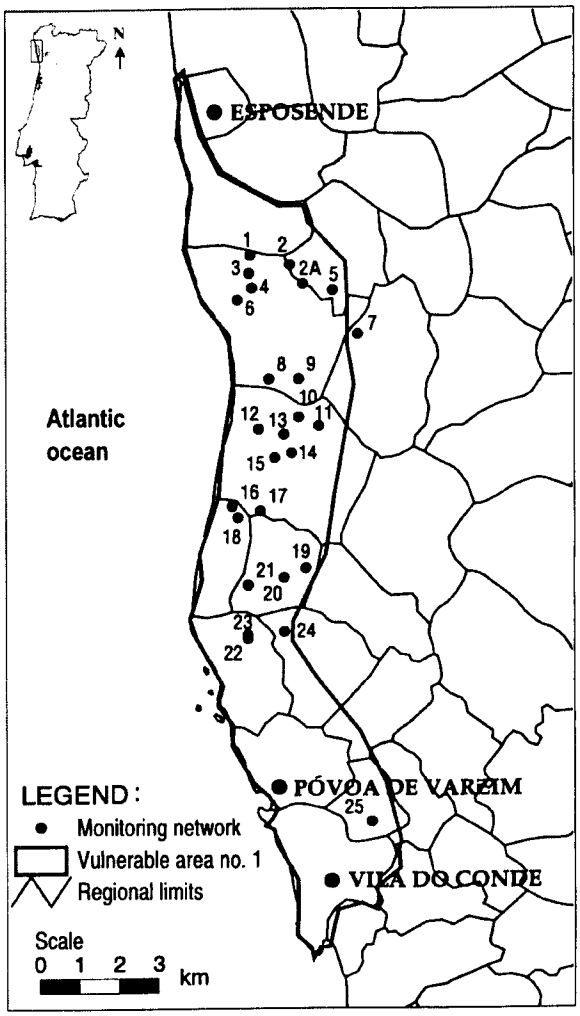


Fig. 1. Map of the vulnerable zone no. 1 (ZV1) designed in the framework of the 91/676/EEC Directive and showing the distribution of the sampling points considered for the present study.

2.2. Sampling schedule and analytical work

The evaluation of pesticide residues in water samples was carried out concurrently to the soil samples during a 2-year period. Collection of samples was performed in 8 sampling events with an approximate schedule every trimester, as follows: September 2001, February, April, July and November 2002, March, July and October 2003. Water samples were first collected from the homogenised top meter of each well and an aliquot was transferred to a 40 mL amber glass vial and capped tightly with a screw cap holding a Teflon lined silicone septum. At randomly selected sampling points duplicates were also collected and field blanks were obtained. All samples were transported to the laboratory in refrigerated containers and kept in a cool environment (4 °C) till their analysis. The analytical methodology was tailored for this monitoring programme, and it was

adaptable as new pesticides were identified and included in the course of the project. As soon as more sophisticated methods were developed, always based on solid-phase microextraction (SPME) and taking profit of the knowledge gathered in previous samplings, these were applied. Such SPME multiresidue methods have been conveniently optimized, validated and calibrated each time a new sample set was to be analysed. The samples gathered in September 2001, February and April 2002 were subjected to quantitative analysis of pesticide residues by gas chromatography and electron-capture detection-thermoionic specific detection (GC-ECD-TSD) while confirmation was carried out by gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS), acquiring the full scan mass spectra. In the sampling of April 2002, analysis was extended to 4 new pesticides: alachlor, propyzamide, pendimethalin and procymidone, using GC-MS-MS. Later on, the samples obtained from July 2002 to October 2003 were firstly analysed for a group of most frequently detected pesticides by GC-MS-MS (quantitation and confirmation), and thereafter for the presence of the remaining pesticides by GC-MS in μSIS mode (quantitation) and scan mode (confirmation). The target list of pesticides comprising organochlorine (OCP), organophosphorous (OPP), triazine, pyrethroid and miscellaneous pesticides settled in each of the methods, either GC-ECD-TSD, GC-MS or GC-MS-MS, can be found elsewhere (Gonçalves and Alpendurada, 2002; Gonçalves and Alpendurada, 2004). Quality control samples including blanks, control standards and replicates were run as part of each sample set.

2.3. Description of the data set and initial pre-treatment

The data array generated within the monitoring programme consisted of concentration values for 42 pesticides (the Z+E isomers of chlorfenvinphos and α+β of endosulfan were added) analysed in 181 water samples (6976 valid observations). Site 13 failed the samplings of February, April and November 2002 due to our inability to access the well located in a private property. The array contained additional data gaps: values for propyzamide, alachlor, pendimethalin and procymidone initiated only in April 2002; metribuzin, chlorpyrifos, deltamethrin, tetrachlorvinphos and chlordane started being monitored only in July 2002, especially the first 3 pesticides given the possibility offered by GC-MS. Metolachlor, on the other hand, was shown to be of interest only in November 2002. The threshold limit considered to report pesticide concentration values, expressed in μg L^{-1}, was the respective limits of quantitation (LOQ). The spectral information required to ascertain the identity of whichever pesticide was obtained by single or tandem mass spectrometry with a spectral fit requisite higher than 700.

To prepare the data for statistical evaluation some conversion was mandatory. Since the attained analytical LOQs were generally far below the 0.1 μg L^{-1} limit, in practice concentrations below the LOQ can be considered negligible and meaningless, thus the following criteria was adopted: non quantifiable results were considered as zero; quantifiable results for which identity confirmation was not achieved were also assumed as zero. A few pesticides were only qualitatively investigated in the samples, since they were considered at a later stage and hadn't been subjected to extensive method validation. The occurrence of: trifluralin, fenthion, endrin aldehyde, azinphos ethyl, metalaxyl, benalaxyl, quinalphos, pirimicarb and prometryn will be discussed, briefly.

2.4. Statistical work out of the monitoring results

The thorough interpretation of the monitoring data requires that both univariate and multivariate statistical approaches be employed. While the former gives an uncomplicated summary of original data arguments either organized by pesticide (variable) or sample/site (case), the later allows the deconvolution of internal relationships that lay latent in an intricate data matrix. The relevant environmental information embedded in the data matrix was firstly explored by means of descriptive parameters, such as: frequencies, minimum and maximum values, mean, median, values above and below a reference limit, etc. Then, a stepwise multivariate analysis followed. Hierarchical cluster analysis was used as an unsupervised exploratory technique to discover unanticipated natural affinities within the data, both considering associations of pesticides and samples. Squared Euclidean distance was used as the interval measure for clustering, preferably using the Ward's linkage method. Raw data was computed after standardization based on Z-scores by variable. All variables that assumed a constant value equal to zero all across the samples and dates were eliminated from any multivariate statistical handling. With the purpose to reduce the "noise" present in the data, which was seen in preliminary trials to disturb the resolution of main trends, a simplification strategy was adopted. It was based on the assumption that variables characterized by a standard error of the mean higher than the mean itself, concomitantly with a very few non-zero data points (less than 5/181), should carry an erratic behaviour resulting from casualty rather than a consistent pattern driven by natural forces. This criterion led us to additionally exclude the following pesticides from multivariate analysis: dimethoate, terbuthylazine, diazinon, metribuzin, parathion, fenamiphos, 4,4'-DDE, λ-cyhalothrin and α-cypermethrin. It should be stressed

that the requisite of a symmetric data matrix to carry these calculations forced the segregation of the two first samplings, containing many data gaps, from multivariate analysis but not from descriptive analysis. Clusters of samples were further examined with the assistance of linear discriminant analysis (LDA) in order to check the discriminant capacity of the variables. Finally, factor analysis was applied to reveal the main sources of data variance, and therefore allow the comprehension of putative relationships between chemical data and the natural environment. Computation was based on the correlation matrix. All the statistical multivariate handling was performed using the SPSS 14.0 for Windows software (SPSS Inc., Chicago, IL, USA).

3. Results and discussion

3.1. Occurrence of pesticides in groundwater samples

From the extensive list of pesticides encompassed in this monitoring project, compounds belonging to all activity classes were found: insecticides, herbicides and fungicides. The pesticides metalaxyl (3), benalaxyl (11), quinalphos (5), pirimicarb (10) and prometryn (2) were only qualitatively detected, in a number of samples quoted in parentheses. These pesticides were recognized by their characteristic mass spectra through meticulous search of the mass spectrometry chromatograms. To the best of our knowledge, a great lack of information exists regarding the presence of some of these pesticides in groundwaters, thus this prior information vividly recommends their inclusion in future analytical work. Opposite evidence was found for trifluralin, fenthion, endrin aldehyde and azinphos ethyl, which do not get support as probable water contaminants in the investigated area. Propyzamide, alachlor, pendimethalin, procymidone and metolachlor were identified by their mass spectra in an early stage of the survey therefore, they were included in the analytical methods for quantitation in the subsequent samples.

Besides the full proficiency of the methods, 20 pesticides were always absent from the samples. These include: dichlorvos, hexachlorobenzene, simazine, propazine, fonofos, parathion-methyl, simetryn, heptachlor, heptachlor epoxide, fenitrothion, malathion, aldrin, isodrin, chlordane, tetrachlorvinphos, endrin, 4,4'-DDD, 4,4'-DDT, azinphos-methyl and deltamethrin. The focus of the following statistical description will be reserved to those 22 pesticides effectively quantitated in the samples, as shown in Table 1. This Table shows the distribution of the pesticide concentrations by a few ranges of interest, namely in respect to the drinking water quality directive. Some pesticides, such as: DIA, PAR, 4,4'-DDE and CYH were detected in a few samples and never exceeded the value of 0.1 $\mu g\ L^{-1}$. On the contrary, pesticides equally little frequent were detected in excess to that limit, i.e.: TER and FEM, or in high excess, i.e.: DIM and MTB. One of the most frequently used indicators to assess the severity of groundwater contamination is given by the percentage of detections above the 0.1 $\mu g\ L^{-1}$ limit. From this standpoint, it must be emphasized the detection of PEN, ENS and ENSS in more than 10% of the samples, followed by ATR, CLF and DEA. Whether their occurrence is due to high intensity of use or the favourable leaching properties, ENS and ENSS never reached concentrations as high as the rest, probably due to the high adsorption to soil (Barceló and Hennion, 1997). In this group of compounds we readily identify two pesticide degradation products, ENSS and DEA. Although DEA appeared in fewer samples than ATR, the concentrations were high to extremely high. It is noteworthy, the detection of DEA in the absence of the parent compound, particularly in sites 12, 16 and 17 (see Table 2). A similar finding occurs with ENSS, illustrated in site 22. This observation supports the already well-known evidence that degradation not always correspond to detoxification.

Regarding the detection frequency of ATR and ALA above 0.1 $\mu g\ L^{-1}$, we may realise that ATR is as much as twice more prevalent than ALA, despite the fact they are found together in some commercial formulations. Indeed, ATR is classified according to the GUS index as potential leacher, while ALA is a transient leacher and less persistent (Barceló and Hennion, 1997; Sánchez-Camazano, 2005).

Table 1
Occurrence of pesticides in groundwater with respect to the regulatory limit enforced by the 98/83/EC Directive. An estimation of the mean and median concentrations in the data set, as well as the maximum and minimum measured concentrations. All the concentrations are given in μg L^{-1}

	no. samples (N)	<LOQ	LOQ<N≤0.1 (%)	0.1<N≤1.0 (%)	N>1.0 (%)	**N>0.1 (%)**	Mean	Median	Range
Desethylatrazine (DEA)	181	169	0	8 (4.4)	4 (2.2)	**12 (6.6)**	3.4	0.58	0.14 – 34
Dimethoate (DIM)	181	179	0	0	2 (1.1)	**2 (1.1)**	81	81	48 – $1.1x10^2$
Atrazine (ATR)	181	145	19 (10.5)	14 (7.7)	3 (1.7)	**17 (9.4)**	2.4	0.096	0.015 – 42
Terbuthylazine (TER)	181	180	0	1 (0.6)	0	**1 (0.6)**	0.16	0.16	0.16
Lindane (LIN)	181	85	88 (48.6)	8 (4.4)	0	**8 (4.4)**	0.034	0.007	0.001 – 0.58
Diazinon (DIA)	181	178	3 (1.7)	0	0	**0**	0.040	0.016	0.013 – 0.092
Propyzamide (PPY)	136	119	12 (8.8)	4 (2.9)	1 (0.7)	**5 (3.7)**	0.26	0.027	0.003 – 2.9
Metribuzin (MTB)	115	114	0	0	1 (0.9)	**1 (0.9)**	$2.8x10^2$	$2.8x10^2$	$2.8x10^2$
Alachlor (ALA)	136	104	25 (18.4)	4 (2.9)	3 (2.2)	**7 (5.1)**	0.97	0.015	0.002 – 18
Clorpyrifos (CLP)	114	93	16 (14.0)	5 (4.4)	0	**5 (4.4)**	0.096	0.021	0.003 – 0.58
Parathion-ethyl (PAR)	181	177	4 (2.2)	0	0	**0**	0.035	0.026	0.010 – 0.078
Pendimethalin (PEN)	136	69	49 (36.0)	12 (8.8)	6 (4.4)	**18 (13.2)**	0.71	0.030	0.008 – 18
Chlorfenvinfos (CLF)	181	152	15 (8.3)	13 (7.2)	1 (0.6)	**14 (7.7)**	0.20	0.049	0.008 – 1.0
Procymidone (PCY)	136	104	24 (17.6)	7 (5.1)	1 (0.7)	**8 (5.9)**	0.42	0.040	0.015 – 11
Endosulfan (ENS)	181	113	47 (26.0)	18 (9.9)	3 (1.7)	**21 (11.6)**	0.24	0.043	0.003 – 4.2
Fenamifos (FEM)	181	180	0	1 (0.6)	0	**1 (0.6)**	0.25	0.25	0.25
4,4'- DDE	181	179	2 (1.1)	0	0	**0**	0.005	0.005	0.003 – 0.006
Dieldrin (DIE)	181	137	43 (23.8)	1 (0.6)	0	**1 (0.6)**	0.021	0.014	0.002 – 0.10
Endosulfan sulphate (ENSS)	181	102	59 (32.6)	20 (11.0)	0	**20 (11.0)**	0.095	0.034	0.002 – 0.92
λ-cyhalothrin (CYH)	181	180	1 (0.6)	0	0	**0**	0.059	0.059	0.059
α-cypermethrin (CYP)	181	177	1 (0.6)	2 (1.1)	1 (0.6)	**3 (1.7)**	0.46	0.21	0.052 – 1.4
Metolachlor (MET)	69	58	7 (10.1)	3 (4.3)	1 (1.4)	**4 (5.8)**	0.24	0.041	0.007 – 1.6

N- number of samples having each pesticide in the given interval

Table 2
Contamination of water samples above the limits set by the EU Directive 98/83/EC and detected pesticides, arranged by sampling site. * the sample was not available.

Site no.	No. of quantitated pesticides above 0.1 μg L^{-1}								No. of samples		Detected pesticides and (frequency)
	Sept. 2002	Feb. 2002	April 2002	July 2002	Nov. 2002	March 2003	July 2003	Oct. 2003	Sum above 0.5 μg L^{-1}	No pesticides quantitated	
1			1							5	LIN (3), CLP (1), PEN (2), CLF (2), DIE (1), ENSS (1)
2			1	1		1	3		4	2	ATR (2), LIN (3), ALA (5), CLP (2), PEN (6), CLF (2), DIE (4)
2A		1	1	1	1	2	1	1	4	1	ATR (1), LIN (2), CLP (2), PEN (5), PCY (1), ENS (7), DIE (2), ENSS (7)
4			2			1	4	1	2	1	ATR (5), LIN (3), ALA (2), CLP (1), PAR (1), PEN (5), ENS (6), DIE (1), ENSS (6), MET (3)
5						1				3	ATR (2), LIN (1), PEN (3), ENS (3), ENSS (2)
6		2	2	5	1	3	2	2	7	0	DEA (1), DIM (2), ATR (6), LIN (8), DIA (1), PPY (4), ALA (2), CLP (4), PEN (6), CLF (3), PCY (5), ENS (2), 4,4'-DDE (1), ENSS (4), CYP (3)
8	1	3	1	2	3	3		2	5		LIN (7), CLP (1), PEN (4), CLF (7), PCY (2), ENS (7), DIE (5), ENSS (7)
9							1		1	3	ATR (2), LIN (3), MET (3)
10			1					1		1	ATR (2), LIN (5), ALA (2), PEN (2), ENS (3), DIE (1), ENSS (4), MET (2)
11	1	3				1		2	2	0	LIN (7), ALA (1), CLP (1), PEN (3), CLF (3), ENS (7), ENSS (7)
12				1	1	1	1	3	4	1	DEA (3), LIN (6), PPY (4), ALA (3), CLP (2), PEN (5), ENS (1), DIE (3), MET (1)
13		X *	X		X	1		1		0	ATR (1), LIN (2), CLF (2), PCY (3), DIE (3)
14										5	LIN (1), PEN (2), ENS (1), DIE (1), ENSS (1)
15				1		2		2		1	LIN (7), PPY (1), CLP (1), PEN (6), CLF (2), PCY (1), ENS (2), ENSS (1)
16			1		2			2	2	2	DEA (2), LIN (4), PPY (1), CLP (1), PEN (2), ENS (2), FEM (1), DIE (1), ENSS (3)
17	2	2		2	4	4	2	2	3	0	DEA (5), LIN (5), PPY (4), ALA (1), PAR (1), PEN (4), PCY (2), ENS (8), ENSS (7)
18	1					2			2	0	LIN (7), CLP (1), PEN (6), PCY (4)
19										5	LIN (1), ALA (1), PAR (1), PEN (1), CLF (1), ENS (1), DIE (1), ENSS (1)
20			3	3	1		2	6	4	0	DEA (1), ATR (4), LIN (8), PPY (2), MTB (1), ALA (4), CLP (2), PAR (1), PEN (5), CLF (1), PCY (6), ENS (6), DIE (4), ENSS (7), CYH (1), MET (2)
21			1	1			1		3	1	LIN (2), CLP (1), PCY (4), ENS (4), DIE (1), ENSS (7)
22	1						1		1	0	ATR (3), LIN (5), ALA (3), 4,4'-DDE (1), DIE (8), ENSS (5)
24	1	1	1	2	1	1	4		2	0	ATR (1), LIN (4), ALA (2), CLP (1), CLF (1), PCY (4), ENS (8), DIE (8), ENSS (8)
25			3	3	2	2	1		3	1	ATR (7), TER (1), LIN (2), DIA (1), PPY (1), ALA (6), ENS (1), ENSS (1), CYP(1)
No. samples	6	6	12	11	9	14	12	12			
No. pesticides	7	12	18	22	16	25	23	25			

Table 1 also indicates that 4 pesticides out of 6 measured above 10 μg L^{-1} are herbicides. Fig. 2 displays the total frequency of pesticide detection, regardless of the concentration and above 0.1 μg L^{-1}. From the 27 pesticides present in water samples, 8 are herbicides, 12 are insecticides, 3 are fungicides, 1 is a nematicide and 3 are degradation products. Obviously, such statement is definitely linked with the list of pesticides searched in the samples. Although LIN was the pesticide mostly detected (53%) and ubiquitous (present in all but one sampling site), it should be noted that a few samples exceeded the EU limit (4%), which contrasts with PEN (13%), ENS (12%) and ENSS (11%) that reached also much higher maximum concentrations. Due to its environmental persistence, LIN was banned in Portugal since 2002. Nevertheless, an increase in residue levels was noticed in 3 sites in the sampling of October 2003, conversely to rest of the sites. Also persistent, DIE was still detected with a noteworthy frequency (24%), but the levels were markedly low, while 4'4-DDE appeared sporadically at trace levels. In a ranking order, then follow the herbicides and OPP insecticides, that range in Fig. 2 from ATR (20%) to DEA (7%) and MET (16% of 69 samples).

An interesting paper on Portuguese groundwater samples produced by Cerejeira et al., (2003) reports the detection of triazine and chloroacetanilide herbicides, that were all the pesticides searched for in the period 1991-1998. In the "Ribatejo and Oeste" region, centre Portugal, ATR (64%), simazine (45%) and ALA (25%) were the pesticides detected most often. The maximum residue levels of ATR and ALA were slightly lower than our results, but in a similar proportion.

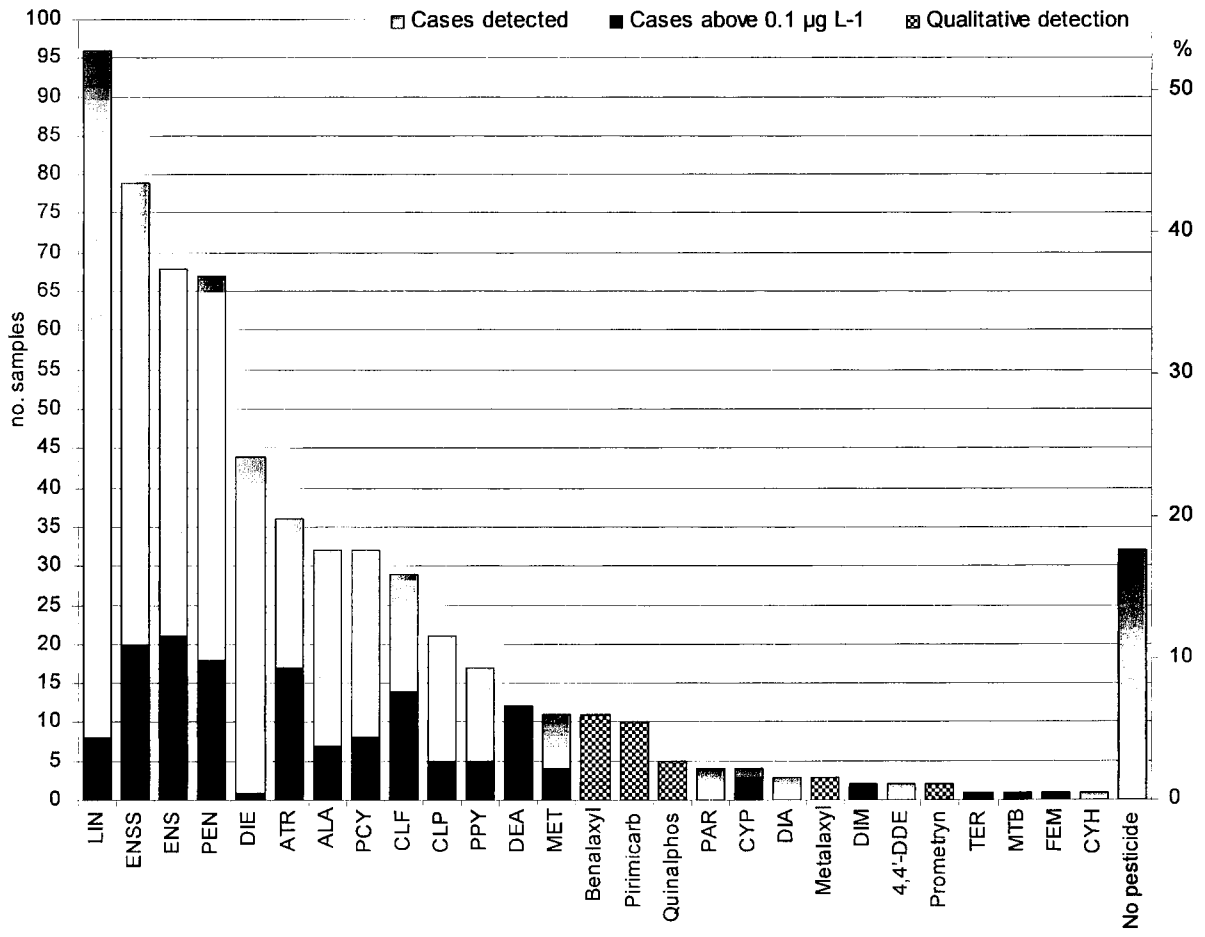


Fig. 2. Graphical representation of the absolute occurrence of each pesticide in groundwater and frequency above de regulatory limit of 0.1 μg L^{-1}. Pesticides acronyms as in Table 1.

Subsequently to this study, Batista et al. (2002) extended the programme to the vulnerable area of "Beira Litoral" and widen the range of pesticides to include some other herbicides, degradation products and insecticides. The detection frequency was in the following sequence: ATR (70% of the samples), DEA (56%), desisopropylatrazine (48%), simazine (37%), ALA (25%), MET (24%), MTB (15%), ENS (6%), LIN (6%), DIM, prometryn, molinate and 3,4-dichloroaniline (5% each). However, their occurrence at levels above 0.1 μg L^{-1} was lesser than 10%, except ATR (19%). Compared to these studies, the range of pesticides investigated in our work is much wider, which was reflected in the diversity of pesticides that were detected. Additionally, the crops produced in both regions also differ: here the green vegetables dominate the cultivations in intense rotation and no fruit trees or vineyards are grown, although both regions have maize crops.

Most of the studies carried throughout Europe were focused on herbicides, which limited the range of substances that were actually detected. Papadopoulou-Mourkidou et al. (2004) have investigated the impact of intense agriculture (predominantly maize, wheat and cotton crops) in the subsoil water in northern Greece. ATR and prometryn were the most frequently found pesticides (>30% of samples). ATR was found above 0.1 μg L^{-1} in 73% of the positive samples, whereas prometryn was found in around 20% of them. ALA and propanil were other herbicides detected in phreatic water while carbofuran and paraoxon-methyl were not very frequent although their levels were relatively high. Papastergiou and Papadopoulou-Mourkidou (2001) detected with a descending frequency the following pesticides: ATR > DEA > ALA = MET, in groundwater collected from drinking and irrigation water wells of 5 maize producing areas. On the other hand, the decreasing order of concentrations was the following: metamitron (single case) > ATR > MET > DEA > ALA. Similarly to our study, ATR was quantitated with higher frequency than DEA. Conversely to this study, our results point to a significant degradation of ATR before reaching groundwater, since DEA levels are usually higher and sometimes occur in the total absence of the parent herbicide. Actually, our findings are not completely exceptional since also Guzzella et al. (2005) detected degradation products of triazines (DEA and DET) in greater concentrations than their relative active ingredients, ATR and TER. These authors conducted a survey of 5 herbicides and 17 degradation products in intensively cultivated areas of maize and cereals. They concluded that, although ATR was banned in Italy in 1986, it was still the main groundwater contaminant present in 100% of the selected samples and in 30% of them it even exceeded the 0.1 μg L^{-1} limit. These results indicate a low degradation rate of pesticides in groundwater. TER used in replacement of ATR was detected in 85% of the samples. ALA and MET pollution was limited, despite their large use in maize crop. Due to their quantities and frequency in groundwater, triazine degradation products pose a significant risk to the environment. Sánchez-Camazano et al. (2005) evaluated specifically the inputs of ATR and ALA to surface and groundwater from irrigated areas devoted to maize cultivation in Central Spain. A notable contamination of groundwater has been reported: ATR was detected in 87% of the samples (70% > 0.1 μg L^{-1}) and ALA in 81%. van Maanen et al. (2001) examined the occurrence of pesticides, mainly triazines and organochlorines, in groundwater (well and spring water) in relation with nitrate, in cultivated areas with winter wheat, sugar beet, maize, vegetables and fruit trees. Higher levels, particularly exceeding the EU limit, were found in natural springs rather than well water. Again, ATR was the most abundant pesticide showing correlation with elevated nitrate levels. Simazine, propazine and dieldrin were found in a few samples. The European association of water suppliers and wastewater operators (EUREAU) reported that, in the most affected countries of central and northern Europe, 5-10% of water resources contained pesticides above 0.1 μg L^{-1}. The pesticides identified to pose a greater threat to

groundwater quality were: ATR and metabolites, simazine, mecoprop and bentazone (EUREAU, 2001). From the studies above, the type of pesticides that pollute groundwater and their abundance didn't change much, at the European level, in relation to the scenario described by the EAA, in 1999 (EEA, 1999).

In order to envisage the spatial and temporal distribution of pesticides in groundwaters of the ZV1 area, Table 2 summarises the data on individual pesticide detection above 0.1 μg L^{-1} and above 0.5 μg L^{-1} for the sum of pesticides, arranged by sampling site and date. Pesticide levels above the EU limit appear distributed all across the sampling periods. Only a slight temporal pattern is noticeable considering the sum of pesticide detections by sampling date. In the beginning of the monitoring programme fewer pesticides were detected, probably due to less searched analytes. In November 2002 there seems to be a drop in pesticide concentrations, following heavy rain periods in October and mid November. Water samples collected from sites 14 and 19 never exceeded the individual and total pesticide limits, thus these groundwaters present a good quality status. Another indicator of the absence of relevant pollution is the total number of samples, by site, where no pesticides were measured. Sites 1, 14 and 19 scored 5 unpolluted samples out of 8 analysed. In a more critical situation are sites 6 and 8, which combine abundant violations both to the individual and total pesticide limits all across the monitoring scheme. In any of the periods, samples from these sites were free of pesticides, but the same happened in sites 11, 13, 17, 18, 20 and 22, although the results show that, in the latter, an acceptable water quality was restored at some point during the survey. From the 49 (out of 181) samples where the cumulative limit for pesticides was overcome we detach the 10 most heavily contaminated samples, as presented in Table 3. On the other hand, 32 samples were consistently free of pesticides. Considering that our monitoring studies took place in an intensive horticulture area, another important aspect to address is the diversity of pesticide substances detected in any one sampling site along the 2-year monitoring. From the data presented in Table 2 it is clear that sites 9<18<5=13=14 were those with less variety of pesticides. On the contrary, the most polluted sites were 20>6 where about 15 different pesticides were found at least once, while the average varied from 6-10 individual substances. Most likely, the explanation for this diversity goes beyond the agricultural practices undertaken in the narrow proximity of the wells. As an example, site 6 probably reflects the practices in a larger common area where it is included. In site 19, the number of pesticides contrasts with its low contamination level. It probably reflects a residual residence of pesticides in the aquifer close to the methods' LOQs.

Table 3
The ten most contaminated samples found in the ZV1 area from September 2001 to October 2003

Site no.	Sampling date	Total concentration (μg L^{-1})	Concentration of pesticides > 0.1 μg L^{-1} and (number of pesticides present)
20	April 2002	$2.9x10^2$	MTB- $2.8x10^2$ / PCY- 11 / ENS- 0.21 (9 pesticides)
6	February 2002	$1.1x10^2$	DIM- $1.1x10^2$ / CYP- 0.11 (3 pesticides)
25	July 2002	61	ATR- 42 / ALA- 18 / TER- 0.16 (8 pesticides)
6	April 2002	49	DIM- 48 / PCY- 0.46 (7 pesticides)
6	July 2002	41	ATR- 38 / PEN- 1.7 / CYP- 1.4 / PCY- 0.20 / DEA- 0.14 (11 pesticides)
17	October 2003	36	DEA- 34 / PPY- 2.9 (4 pesticides)
12	March 2003	18	PEN- 18 (5 pesticides)
12	October 2003	10	ALA- 9.3 / DEA- 0.70 / PPY- 0.31 (6 pesticides)
6	March 2003	7.9	PEN- 7.5 / ATR- 0.15 / CLP -0.12 (8 pesticides)
6	July 2003	6.4	PEN- 6.0 / ATR- 0.13 (9 pesticides)

As a whole, 45% of the samples exceeded the 0.1 μg L^{-1} limit and 27% exceeded the 0.5 μg L^{-1} limit. No single pesticide violated these limits, *per si*, in more than 13.2% of the samples, but the complex mixture of pesticides and degradation products that have built up in groundwater appears as one of the main factors of concern. Our results improve the knowledge already existing in the literature since it clearly shows that, besides triazines and chloroacetanilides, a wide range of pesticides (>20) are used in intensive horticulture and reach groundwater, particularly in vulnerable zones. Frequent irrigation with contaminated waters leads to leaching and recirculation of pesticides in the system.

3.2. Cluster analysis

Hierarchical cluster analysis is an unsupervised multivariate agglomerative technique that seeks for pattern recognition. It may be useful to assign groupings between variables when it is plausible that some of them may display similar attributes (Singh et al., 2004). Conversely to the descriptive statistics, multivariate data analysis provides a dynamic view of the variables' behaviour in multidimensional systems, as the natural environment. As mentioned in section 2.4, multivariate analysis was applied selectively to a subset of data that could contribute with consistent organic relationships rather than factual coincidence. The criterion as been stated previously but it can be checked against Fig. 2. The pesticides included in the multivariate resolution were those in the left hand side of the graph, till DEA, except CLP. The 11 most significant pesticides and degradation products were clustered, as shown in the dendrogram reproduced in Fig. 3. It gives a first overview of the associations found between pesticides in water. Two of them can be immediately highlighted, and not unexpectedly: ATR/ALA and ENS/ENSS. The first consists on a mixture of widely used herbicides and the second the agglutination of parent pesticide/degradation product. The former association is a common finding in groundwaters (Batista et al., 2002; Sánchez-Camazano et al., 2005). Cluster analysis was also applied to produce a grouping of samples according to their pollution pattern, as far as the above-referred 11 pesticides are concerned. Due to its excessive dimensions, the corresponding dendrogram can not be presented.

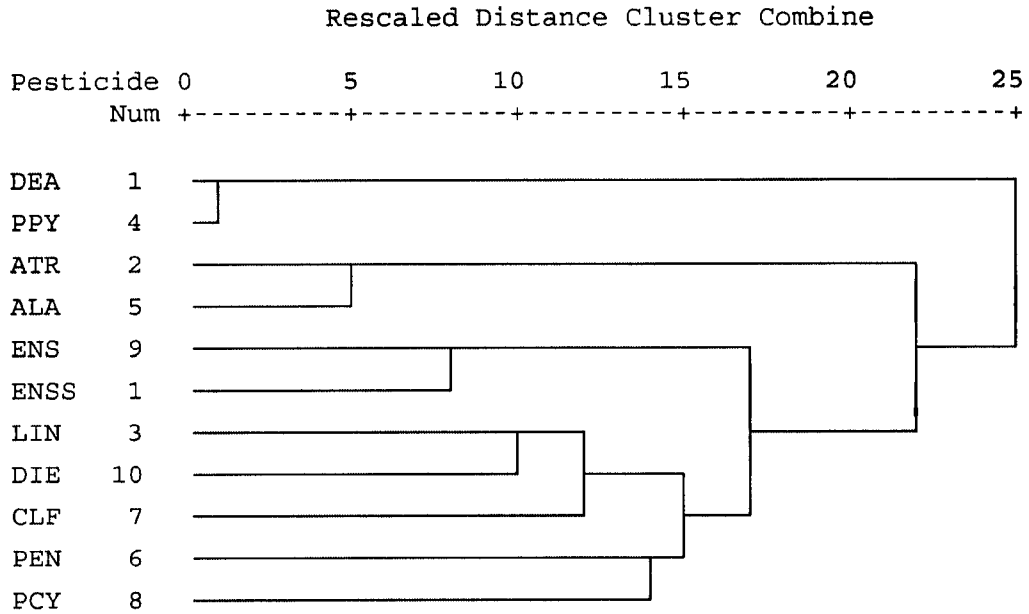


Fig. 3 – Dendrogram obtained by cluster analysis of variables (11 most relevant pesticides) based on the Squared Euclidean distance measure and the Ward's method of linkage. Pesticides acronyms as in Table 1.

Nevertheless, it allowed allocating all the variability inherent to the data in 12 relatively homogeneous classes that will be characterized by linear discriminant analysis (LDA), and also to identify outliers. The assignment of any one particular sample to the respective class and the corresponding spatial representation, as shown in Fig. 4, didn't allow identifying a clear geographical pattern in pesticide pollution – classes are disperse. In general, a high-numbered class membership corresponds to an increased overall pesticide concentration. The ZV1 area is characterized by intensive horticulture carried out on predominantly sandy soils overlying a shallow aquifer. This combination of factors strengthens the susceptibility of the local groundwaters to non-point source pollution by pesticides. The core of the cultivated area is devoted to horticulture relying on essentially similar pest protection practices, which reinforces the absence of a clear geographical pattern in pesticide distribution.

3.3. Linear discriminant analysis

LDA can be used to resolve numerous environmental issues, namely those that deal with the distinction of samples arranged in groups based on a complex set of attributes (Singh et al., 2005). The objectives may range from the determination of the variables which are more typical from whichever group, and hence have the highest discriminant capacity, to the modelling of the variables' behaviour in order to be able to predict group membership based on sample characteristics. Here, our purpose is to use LDA as a means to make clear which variables have driven the segregation of groups of samples based on their pesticide content, as seen in cluster analysis. Firstly, we assessed the discriminant capacity that the pesticides input to the discriminant function associated with each class analysing the Wilks' lambda and F-values in the test of equality of group means. The F-value was always below 75.5 which is a rather low value, indicating that none of the pesticides retain an extremely distinctive feature among the samples. A complex mixture of pesticides is always present in every class, except class 4 (ATR and ALA). This evidence supports our conviction drawn from the previous descriptive statistics that the ZV1 is affected by non-point source pollution related to pesticides. Clear examples of their ubiquity in groundwater are the presence of LIN in 11 classes and ALA, ENS, ENSS and DIE in 10 of them.

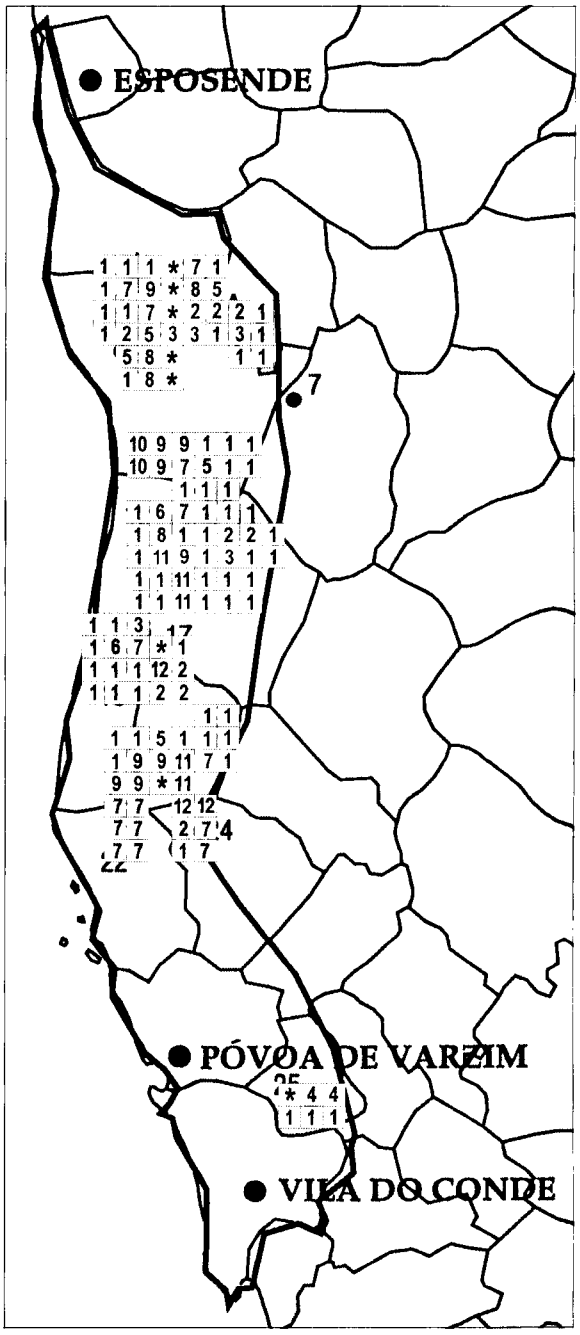


Fig. 4 – Geographical distribution of samples according to the classification generated by cluster analysis and used in LDA. * - denotes samples classified as outliers.

Even though, it must be emphasized that the average concentration by individual pesticide in class 1 (66 samples) and class 7 (15 samples) is always inferior to 0.1 μg L^{-1}, which corresponds to a low contamination level in 45% of all samples.

3.4. Pollution source identification by principal component analysis

Principal component analysis (PCA) is one of the most widely used chemometric techniques to seek for the relevant information in excessively obscured data structures. One of the applications where it proved very useful is the interpretation of water quality data (Bengraïne and Marhaba, 2003; Simeonov et al., 2003; Singh et al., 2004). The intrinsic dimensionality of environmental data often can be represented by a reduced number of factors that capture most of the inherent variance. Most importantly, the intimate sources of data variability often are not directly available for measurement because there are no specific sensors for them (Tauler, 2000). Thus, they must be highlighted from physico-chemical data through a specialized treatment. This goal is achieved by PCA transforming the original data in a new set of independent (uncorrelated) axes that renders the underlying factors more obvious (Singh et al., 2004).

In this study, principal components (PCs) were extracted as a contribution of the 11 pesticides we have been considering. Only factors exhibiting an eigenvalue above 1 were retained. Also, a Varimax rotation was performed to overcome the problem of variables loading on more than one of the PCs. The result is an increased chemical/ environmental significance of the PCs, thus improving the interpretability of the results. Five PCs were extracted which account for a total variance of 68%. The corresponding loadings matrix is given in Table 4. The PC1 (18% variance) receives a predominant loading from DEA and PPY. To understand the factor behind it we can search for the samples that contained simultaneously DEA and PPY. These were samples pertaining mainly to sites 12 and 17 which were dedicated to grow lettuce, brassicas and other vegetables where PPY finds great preference as herbicide. The coexistence of DEA residues indicates that ATR has been previously used and underwent degradation. However, ATR is not an herbicide of choice in those cultures and indeed it was never detected. In view of the above, the source might have been neighbouring cultivation fields that contributed DEA to the groundwater fluxes. Some degree of uncertainty remains since the homogenization of underground waters hampers a clearer explanation of this factor. PC2 (15% variance) receives a prominent simultaneous loading from the herbicides ATR and ALA. This is not particularly surprising since the active ingredients are found together in herbicidal formulations that are sold in massive quantities mainly for the control of weeds in maize cultivation reaching groundwater, as discussed in Section 3.1. The third PC (PC3-13%) can be unequivocally explained by the occurrence of the metabolite ENSS in the neighbourhood of places that received insecticide treatments with ENS.

Table 4
Rotated canonical function and main loadings (bold faced) of principal components in PCA (rotation method: Varimax with Kaiser normalization).

	Principal Components				
	PC1	**PC2**	**PC3**	**PC4**	**PC5**
Sums of squared loadings	1.985	1.674	1.454	1.372	1.024
% of variance	18.045	15.216	13.218	12.472	9.312
	Component loadings				
DEA	**0.994**	-0.012	0.002	-0.030	0.004
ATR	-0.018	**0.906**	-0.014	0.000	-0.007
LIN	0.029	0.143	0.059	**0.743**	0.173
PPY	**0.996**	0.011	0.012	0.004	0.011
ALA	0.017	**0.907**	-0.020	-0.005	-0.011
PEN	-0.033	0.010	-0.131	-0.126	-0.161
CLF	-0.029	-0.060	-0.151	**0.586**	0.090
PCY	-0.026	-0.012	0.006	0.010	**0.943**
ENS	0.002	-0.010	**0.821**	-0.164	0.106
DIE	-0.039	-0.079	0.230	**0.629**	-0.241
ENSS	-0.003	-0.018	**0.826**	0.193	-0.032

In waters, ENS detection is common with a higher contribution from the α-isomer than the β-isomer, and finally ENSS in the least concentration. The fourth PC (PC4-12%) receives loadings mainly from LIN, CLF and DIE. Although CLF has been losing importance as an insecticide in the national sales rank, in the ZV1 horticulture area CLF is a fairly selected insecticide, at it happens also to LIN. The former is sprayed to the plants while the latter is used as a soil insecticide, thus they can be used complementarily which explains their joint detection. DIE was widely detected in trace levels which allowed its association in PC4. The PC5 (9%) was discerned mainly due to the behaviour of PCY. This fungicide is used in selected goods (mainly strawberries and tomatoes) to prevent the growth of mould (*Botrytis* spp.) that would cause them to rot. Hence, it has a distinct behaviour to the pesticides applied to green vegetables. The remaining 32% of data variance could not be clearly interpreted. Several procedures in intensive horticulture can be responsible for a deviation from rigid patterns, as detailed elsewhere (Gonçalves et al., 2006). These are linked mainly to the great variability in horticultural practices and crops in a densely cultivated region. Specially if carried out on vulnerable areas, these conditions are favourable to the accumulation of a complex mixture of pesticides and degradation products in groundwater. Additionally, the mobility of pesticides in water media hampers the establishment of direct relations to the activities carried out at the surface, at a farm level. Even though, only PEN was not implicated in any distinctive data pattern identifiable by PCA.

4. Conclusions

Monitoring data on pesticide contamination of groundwaters from an intensive horticultural area in north Portugal have been presented. The major remarks arising from a comprehensive descriptive and multivariate statistical evaluation have been given. Twenty-two out of 42 searched pesticides were actually detected and quantitated. Our results deviate from the literature in the fact that a large number of pesticides of varied chemical families were found. Overall, 8 herbicides, 12 insecticides, 3 fungicides, 1 nematicide and 3 degradation products were detected. These include metalaxyl, benalaxyl, quinalphos, pirimicarb and prometryn that were only qualitatively detected and should be included in future analytical work. The most frequently detected pesticides were: LIN > ENSS > ENS > PEN. However, the predominance of quantitation above 0.1 $\mu g\ L^{-1}$ was: PEN > ENS > ENSS > ATR. As a whole, 45% of the samples exceeded the 0.1 $\mu g\ L^{-1}$ limit and 27% exceeded the 0.5 $\mu g\ L^{-1}$ limit. No one single pesticide violated the EU limit in more than 13.2% of the samples. Particular concern is due to the complex mixture of pesticides that accumulates in groundwater. Between 3 and 16 pesticides (average 6-10) were encountered in selected sampling sites during the survey period. A slight temporal trend in pesticide contamination was discernible but any systematic geographical variation was highlighted from multivariate analysis of the data. Five environmental and agrochemical management factors were proposed to explain 68% of the variability in pesticide distribution. The association ATR/ALA is logical due to their simultaneous application while ENS/ENSS are related substances formed upon metabolism of ENS. We must be aware, however, that due to limitations in the monitoring designs other pesticides might be present, for which no data is collected.

Acknowledgements

FCT- Fundação para Ciência e Tecnologia is greatly acknowledged for the Ph.D grant PRAXIS XXI/BD/21823/99. The authors thank the IAREN for technical and financial support. Acknowledgements are due to DRAEDM and to A. Matos, Região Agrária da Póvoa de Varzim, for his involvement in the collection of samples and insightful discussions regarding the interpretation of statistical results in light of the field use of pesticides.

References

Batista, S., Silva, E., Galhardo, S., Viana, P., Cerejeira, M.J., 2002. Evaluation of pesticide contamination of ground water in two agricultural areas of Portugal. International Journal of Environmental Analytical Chemistry 82, 601-609.

Batista, S., Cerejeira, M.J., Silva, E., Viana, P., Serôdio, L., 2004. Evaluation of pesticides and nitrates in groundwater of agricultural ecossystems in the period 1996-2000. Proceedings of the "7º Congresso da Água", Lisbon.

Barceló, D., Hennion, M-C., 1997. Trace determination of pesticides and their degradation products in water. Elsevier Science B. V, Amsterdan, The Netherlands, pp. 21-33.

Bengraïne, K., Marhaba, T., 2003. Using principal component analysis to monitor spatial and temporal changes in water quality. Journal of Hazardous Materials B100, 179-195.

Cerejeira, M.J., Viana, P., Batista, S., Pereira, T., Silva, E., Valério, M.J., Silva, A., Ferreira, M., Silva-Fernandes, A.M., 2003. Pesticides in Portuguese surface and ground waters. Water Research 37, 1055-1063.

EEA, 1999. Groundwater quality and quantity in Europe, by Scheidleder, A., Grath, J., Winkler, G., Stärk, U., Koreimann, C., Gmeiner, C., Nixon S., Casillas, J., Gravesen, P., Leonard, J., Elvira, M. European Environment Agency, Copenhagen, Denmark, 123 p.

EUREAU (2001). Keeping raw drinking water resources safe from pesticides. EUREAU position paper EU1-01-A56, 38 p.

Garcia, M.D.G., Galera, M.M., Martínez, D.B., Gallego, J.G., 2006. Determination of benzoylureas in ground water samples by fully automated on-line pre-concentration and liquid chromatography-fluorescence detection, Journal of Chromatography A 1103, 271-277.

Gonçalves, C., Alpendurada, M.F., 2002. Multiresidue method for the simultaneous determination of four groups of pesticides in ground and drinking waters, using solid-phase microextraction-gas chromatography with electron-capture and thermionic specific detection. Journal of Chromatography A 968, 177-190.

Gonçalves, C., Alpendurada, M.F., 2004. Solid-phase microextraction-gas chromatography (tandem) mass spectrometry as a tool for pesticide residue analysis in water samples at high selectivity and sensitivity with confirmation capabilities. Journal of Chromatography A 1026, 239-250.

Gonçalves, C., Esteves da Silva, J.C.G., Alpendurada, M.F., 2006. Chemometric interpretation of pesticide occurrence in soil samples from an intensive horticulture area in north Portugal. Analytica Chimica Acta 560, 164-171.

Guzzella, L., Pozzoni, F., Giuliano, G., 2006. Herbicide contamination in surficial groundwater in Northern Italy. Environmental Pollution 142, 344-353.

Hamilton, D.J., Ambrus, A., Dieterle, R.M., Felsot, A.S., Harris, C.A., Holland, P.T., Katayama, A., Kurihara, N., Linders, J., Unsworth, J., Wong, S.-S., 2003. Regulatory limits for pesticide residues in water. Pure and Applied Chemistry 75, 1123-1155.

Kamrin, M.A., 2000. Pesticides profiles: toxicity, environmental impact and fate. Lewis Publishers, CRC Press LLC, Boca Raton, FL, USA.

Lobo-Ferreira, J.P., Oliveira, M.M., Moinante, M.J., Theves, T., Diamantino, C., 1995. Study for the evaluation of the vulnerability of the reception capacity of coastal zone water resources in Portugal. The receiving water bodies: groundwater systems, Specific report R3.3, LNEC, Report 237/95 - GIAS, 585 pp., Laboratório Nacional de Engenharia Civil, Lisbon, Portugal.

Ma, W.T., Jiang, G., Cai, Z., 2005. Determination of atrazine and its deethylated degradation product in water and sediment by using gas chromatography/ion trap mass spectrometry. International Journal of Environmental Analytical Chemistry 85 1117-1125.

Papadopoulou-Mourkidou, E., Karpouzas, D.G., Patsias, J., Kotopoulou, A., Milothridou, A., Kintzikoglou, K., Vlachou, P., 2004. The potential of pesticides to contaminate the ground water resources of the Axios river basin in Macedonia, Northern Greece. Part I. Monitoring study in the north part of the basin. The Science of the Total Environment 321, 127-146.

Papastergiou A., Papadopoulou-Mourkidou, E., 2001. Occurrence and spatial and temporal distribution of pesticides in groundwater of major corn-growing areas of Greece. Environmental Science and Technology 325, 63-69.

Porazzi, E., Martinez, M.P., Fanelli, R., Benfenati, E., 2005. GC-MS analysis of dichlobenil and its metabolites in groundwater. Talanta 68, 146-154.

Sánchez-Camazano, M., Lorenzo, L.F., Sánchez-Martín, M.J., 2005. Atrazine and alachlor inputs to surface and ground waters in irrigated corn cultivation areas of Castilla-Leon region, Spain. Environmental Monitoring and Assessment 105, 11-24.

Silva, E., Batista, S., Viana, P., Antunes, P., Serôdio, L., Cardoso, A.T., Cerejeira, M.J., 2006. Pesticides and nitrates in groundwater from oriziculture areas of the "Baixo Sado" region (Portugal). International Journal of Environmental Analytical Chemistry 86, in press.

Simeonov, V., Stratis, J.A., Samara, C., Zachariadis, G., Voutsa, D., Anthemidis, A., Sofoniou, M., Kouimtzis, Th., 2003. Assessment of the surface water quality in Northern Greece. Water Research 37, 4119-4124.

Singh, K.P., Malik, A., Mohan, D., Sinha, S., 2004. Multivariate statistical techniques for the evaluation of spatial and temporal variations in water quality of Gomti river (India) – a case study. Water Research 38, 3980-3992.

Singh, K.P., Malik, A., Singh, V.K., Mohan, D., Sinha, S., 2005. Chemometric analysis of groundwater quality data of alluvial aquifer of Gangetic plain, North India. Analytica Chimica Acta 550, 82-91.

Squillace, P.J., Scott, J.C., Moran, M.J., Nolan, B.T., Kolpin, D.W., 2002. VOCs, pesticides, nitrate, and their mixtures in ground water used for drinking water in the United States. Environmental Science and Technology 36, 1923-1930.

Stephenson, G. R., 2003. Pesticide use and world food production. In: J. R. Coats, H. Yamamoto (Eds.), Environmental Fate and Effects of Pesticides, ACS Symposium series 853, American Chemical Society, Washington DC, USA, pp. 261-270.

Tauler, R., 2000. Interpretation of environmental data using chemometrics. In: D. Barceló - Sample Handling and Trace Analysis of Pollutants: Techniques, Applications and Quality Assurance. Elsevier Science B. V, Amsterdan, The Netherlands, pp. 689-736.

Tauler, R., Azevedo, D.A., Lacorte, S., Cepesdes, R., Viana, P., Barceló, D., 2001. Organic pollutants in surface waters from Portugal using chemometric interpretation. Environmental Technology 22, 1043-1054.

Tauler, R., Lacorte, S., Guillamón, S., Cespedes, R., Viana, P., Barceló, D., 2004. Chemometric modelling of main contamination sources in surface waters of Portugal. Environmental Toxicology and Chemistry 23, 565-575.

van Maanen, J.M.S., de Vaan, M.A.J., Veldstra, A.W.F., Hendrix, W.P.A.M., 2001. Pesticides and nitrate in groundwater and rainwater in the province of Limburg in The Netherlands. Environmental Monitoring and Assessment 72, 95-114.

Worral, F., Kolpin, D.W., 2004. Aquifer vulnerability to pesticide pollution – combining soil, land-use and aquifer properties with molecular descriptors. Journal of Hydrology 293, 191-204.

7.2 INTERPRETAÇÃO QUIMIOMÉTRICA DA OCORRÊNCIA DE PESTICIDAS EM SOLOS DE UMA ZONA DE HORTICULTURA INTENSIVA NO NORTE DE PORTUGAL

Com base na publicação:

Gonçalves, C., Esteves da Silva, J.C.G., Alpendurada, M.F. – Chemometric interpretation of pesticide occurrence in soil samples from an intensive horticulture area in north Portugal. Anal. Chim. Acta, 560 (2006) 164-171.

Os Anexos V e VI contêm informação adicional

Available online at www.sciencedirect.com
SCIENCE DIRECT
ELSEVIER
Analytica Chimica Acta 560 (2006) 164–171
ANALYTICA CHIMICA ACTA
www.elsevier.com/locate/aca

Chemometric interpretation of pesticide occurence in soil samples from an intensive horticulture area in north Portugal

C. Gonçalves [a], Joaquim C.G. Esteves da Silva [b], M.F. Alpendurada [a,c,*]

[a] *Laboratory of Hydrology, Faculty of Pharmacy, University of Porto, Rua Aníbal Cunha, 164 / 4050-047 Porto, Portugal*
[b] *Department of Chemistry, Faculty of Sciences, University of Porto, Rua do Campo Alegre, 687 / 4169-007 Porto, Portugal*
[c] *IAREN – Water Institute of the Northern Region, Rua Dr. Eduardo Torres, 229 / 4450-113 Matosinhos, Portugal*

Received 4 October 2005; received in revised form 18 November 2005; accepted 9 December 2005
Available online 19 January 2006

Abstract

An extensive monitoring programme of pesticides was carried out in soil samples from an intensive horticulture area in north of Portugal, putting into practice the needs for increased control of soil quality as far as organic pollution is concerned. The area under investigation was additionally defined as vulnerable to nitrates due to local soil and aquifer characteristics, which might be extended to pesticides contamination. Five sampling sites were selected and soils analysed at three depths in eight sampling campaigns, for the period of 2 years. A stepwise multivariate statistical approach was selected to uncover most relevant patterns inside a complex environmental data matrix. Cluster analysis was applied both to group pesticides and samples, giving a primary and unsupervised overlook of privileged relationships. Clusters of persistent pesticides and selected herbicides were identified, whereas sample classes were also formed and disposed geographically. Thirty eight percent of analysed soils samples fell into one class characterized by low contamination (class 1 in cluster analysis), which is entirely representative of the sampling site no. 1. Afterwards, linear discriminant analysis was applied to identify those pesticides, which had a higher impact in the definition of classes. Finally, factor analysis using a five component model was implemented in order to bring to light the constitution and data variance explained by each of the five main principal components, as well as, their relation to pest management practices. A factor was identified (PC1 – 22% variance) composed of chlorinated pesticides, which was representative of one of the investigated sites indicating its high contamination status. Qualitative main findings and class average concentration values were obtained through this multivariate statistical approach.
© 2005 Elsevier B.V. All rights reserved.

Keywords: Environmental monitoring; Soil; pesticides; Cluster analysis; Linear discriminant analysis; Factor analysis

1. Introduction

The distinctive feature of pesticides pollution is that extensive surface areas receive agrochemical treatments applied to soil or spayed over crop fields and hence they are deliberately released in the environment and available for contamination [1–3]. Furthermore, pesticides are toxic substances used for preventing, destroying or controlling any pest or unwanted plant or animal thus, often conceived to cause lethal effects [2]. The widespread detection of pesticides in the aquatic environment has forced the adoption of restrictive legislative measures, especially in the area of water policy. The potential for leaching and drainage of substances into the surface and groundwaters was mathematically expressed, amongst others models, by the DRASTIC aquifer vulnerability index, developed formerly by Aller et al. [4]. The soil dependence is therein represented by several parameters, one of them being soil type, weighed in the final index. Since the aquifer vulnerability to contamination will be different for different pollutants, the DRASTIC index for pesticide applications was also developed [5].

The uncontrolled use of pesticides in agricultural activities has degraded several soil functions including the soil's biological ability to remove other pollutants and resulted also in yield reduction in crops that follow in rotation due to phytotoxicity [6]. Soil compartment might also be regarded as a reservoir for many types of xenobiotics where various physicochemical transformation processes might take place. Adsorbed to soil particles or organic matter they may suffer transport, degradation or otherwise protection and retention for decades. Many examples can be found in the literature [7–10] where persistent organic

* Corresponding author. Tel.: +351 22 9364210; fax: +351 22 9364219.
E-mail address: mfalpendurada@iaren.pt (M.F. Alpendurada).

0003-2670/$ – see front matter © 2005 Elsevier B.V. All rights reserved.
doi:10.1016/j.aca.2005.12.021

pollutants including pesticides are slowly released from soils and similarly from sediments to the aquatic environment. Despite slow detoxification mechanisms occur in soil, simple retention might constitute a legacy of long-term threat to future generations.

Pesticide monitoring of ground- and surface-waters on a routine basis is enforced by EU Directives however, monitoring of agrochemicals in soils has been mostly a subject of investigation studies carried out by researchers' initiative, licensing of new substances or under the frame of EU founded projects. Over the last few years, discussions around Europe have taken place in the frame of Directive 91/414/EEC [11], concerning the environmental behaviour (persistence in soil) of pesticide residues, which has resulted in a guidance document on soil persistence [12].

We must consider that soil system is relatively static and mostly beyond human control, hence the application of precautionary measures has higher potential benefits compared to costly remediation acts. Assessment of soil quality, meant in general terms, is a huge task involving unlimited costs. A simpler soil quality assessment methodology is suggested by Zalidis et al. [6] to face expenditure problems, particularly in the Mediterranean region, which comprises a variety of managing techniques and crop, soil and climate conditions.

While reliable models and inventory of soil/water resources are not available, assessing the levels of pollutants in the soil is a means to gain understanding on natural mechanisms. The European Commission (EC) realises that preservation of soil quality is crucial for long-term sustainability. In this regard, stronger emphasis should be given to research, amongst which monitoring has a key role, in order to provide both an information basis and impact assessment of the implemented measures [3]. Centred on an intensive horticulture area in north of Portugal producing mainly vegetables but also maize and forage, a monitoring work was carried out intended to assess the pollution levels by pesticides in environmental waters and soils, during a 2-year period. The scope of this paper concerns the soil results. Multivariate statistical techniques have been shown to consist on powerful tools for data exploration and analysis when large data arrays are produced in the framework of environmental monitoring programmes [13–16]. The application of such tools is expected to help rationalize confused intrinsic associations within real data and give an insight on pertinent topics of pesticide behaviour in soil and complex interactions between these chemicals, the crops and edaphic factors. A preliminary report has previously been produced presenting descriptive statistics on the first half of the project [17] while the present study is aimed to provide the ultimate findings and conclusions through a comprehensive statistical data manipulation.

2. Experimental

2.1. Scope, location and characteristics of the study area

Since the publication of EC Directive 91/676/CEE Member States were compelled to study and identify areas under particular threat of contamination of underlying aquifers with nitrates of mainly agricultural origin. Such areas, termed vulnerable, should be subjected to more rational agricultural managing practices in order to reduce the risk of contamination or deteriorating a situation already installed [18–20]. Although the present directive concerns the pollution of waters by nitrates, it is admissible that the identified vulnerable zones present also high leaching potential for pesticides. Besides, this scenario is anticipated by the DRASTIC pesticide vulnerability index applied by Lobo-Ferreira et al. to Portuguese coastal areas [21], where the soil type parameter has the maximum weighing factor, whereas the EC puts also increasing emphasis on soil pollution.

The present study covers the vulnerable area no. 1, delimited by the Atlantic ocean on the west, IC1 highway (now A28) on the east, the river Cávado and river Ave on the north and south, respectively, with an enclosed area of 57.3 km^2. A map depicting the vulnerable area no. 1 situated in the littoral north of Portugal is presented in Fig. 1. This region is characterized by thick humbric regosols and non-humic psamitic regosols (haplic arenosols). Farther from the coastal line a change in soil type occurs to humic cambisols [21]. The textural characterization of five soil samples is shown elsewhere [17]. The soil profile is predominantly of sedimentary origin formed in the modern era and lays over the ancient massif formation composed mainly of schist, granite and quartzite. The soil surface has a very soft slope (<2%) overlaying a shallow aquifer located at <9.1 m depth [21]. A dry season can be distinguished from April to September and a wet season lasting approximately from October to March accounting for around 75% of total annual rainfall.

Five main agricultural systems can be identified in the study area: spring to summer intensive horticulture in the open air, autumn to winter intensive horticulture in the open air, all season intensive horticulture in greenhouses, maize and grass forage for cattle. Due to intensive use of the soil and the type of vegetables grown in the area, use of groundwater resources are essentially dedicated to irrigation, which raises serious concerns due to the leaching behaviour of ionic and polar compounds through this weak retention soil type.

2.2. Sampling and analysis of pesticide residues in soils

The monitoring programme discussed herein started in September 2001 and lasted for 2 years with sampling campaigns scheduled approximately every trimester, as follows: September 2001, February, April, July and November 2002 and March, July and October 2003. Five sampling points where selected, as shown in Fig. 1, to encompass different soil types and cultivated crops. In all locations, samples were collected at three soil depths: surface horizon, 10 and 20 cm, and processed separately. The collection procedure and sample pre-treatment were already described in a previous publication, which also reports the analytical methodology employed along the project [17]. Subsequently to the main sampling campaign, a supplementary sampling was performed in August 2004 with the aim to confirm previous findings using a more elaborated methodology. The former consisted on ultrasonic extraction of pesticide residues followed by gas chromatography–mass spectrometry (USE–GC–MS) [17] while the latter employed supercritical

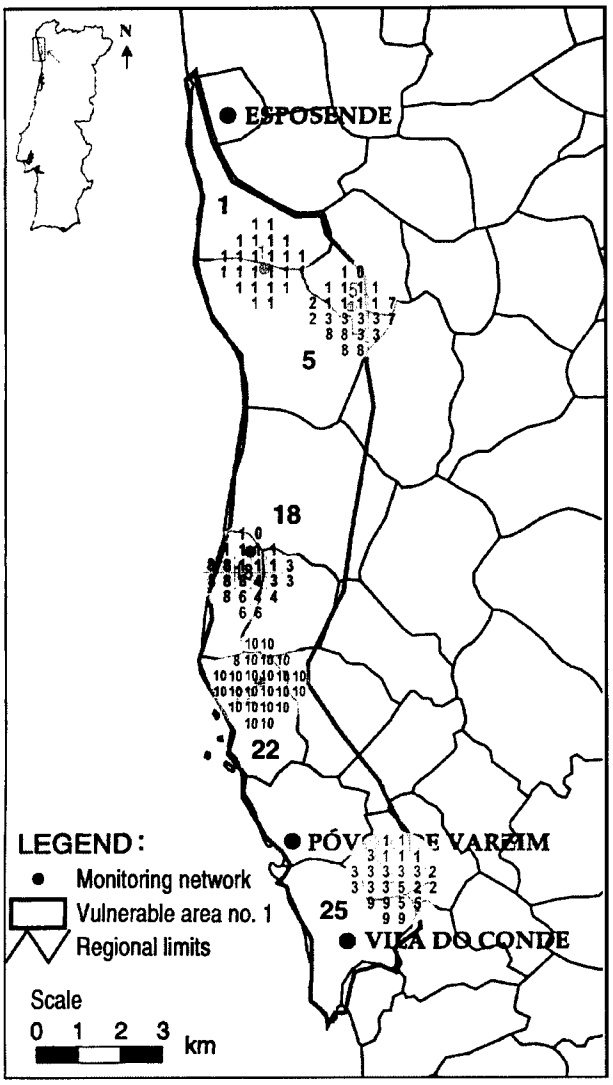


Fig. 1. Map of the vulnerable area no. 1, located in north of Portugal where the sampling points have been depicted along with the distribution of respective samples according to the agglomeration classes formed upon cluster analysis.

fluid extraction combined with gas chromatography–tandem mass spectrometry (SFE–GC–MS–MS) [22]. Both methods allowed the quantitation and confirmation of detected residues using either the full scan mass spectra or MS–MS spectra of pesticide molecules, respectively. The target list of pesticides comprising organochlorine (OCP), organophosphorous (OPP) and pyrethroid insecticides, triazine herbicides and miscellaneous compounds was also presented elsewhere [17] but the number of compounds was reduced in the supplementary sampling taking in consideration the previous knowledge of most prevalent pesticides, and method limitations. Recently created calibration plots were used in soil analyses of each sampling event, whereas quality control procedures including the analysis of blanks, control standards and sample replicates were included in each sample set.

2.3. Initial data arrangement and pre-treatment

Along the monitoring programme an environmental data array composed by results of 42 pesticides (the Z + E isomers of chlorfenvinphos and α + β isomers of endosulfan were added), analysed in five sampling points at three depths, prolonged for eight sampling campaigns was acquired, representing 120 soil samples. Analytical data was initially organized in data tables or matrices, each of them corresponding to one sampling event and later combined to compose a single data array for the entire monitoring project, after some data conversion. During the experimental procedure, whenever a measured concentration was above the method's quantitation limit (LOQ), the confirmation of the pesticide's identity was attempted in a second analysis by GC-MS, recording the full scan mass spectra with positives requiring a minimum spectral fit of 80. Data transformation for subsequent statistical calculation consisted on replacing not quantifiable results (below the LOQ) and quantitated but not confirmed pesticide results by zero. Only high confidence quantitative results were considered for statistical and descriptive analyses. Results for metolachlor were immediately discarded because this data series was incomplete; quantitative results were only acquired from July 2003 onwards although qualitative analysis have been carried out in the previous three samplings. In addition to the set of pesticides dealt hitherto, some others of diverse chemical families were identified, although not initially included in the analytical methods. This is the case of metalaxyl, benalaxyl, quinalphos and pirimicarb that were only recorded qualitatively and thus, not included in the present data treatment.

2.4. Chemometric approach

Environmental datasets are usually complex, bulky and noisy, containing a large amount of information with internal relationships among variables, often in a partially hidden structure. The goal of chemometric studies is to display the most significant patterns, looking for possible groupings and sources of data variation, as well as for their temporal and geographical distributions, through resolution and modelling of raw data [23]. After data conversion into a single matrix formed by concentration values for each combination of variables (41 pesticides) and cases (120 samples), a stepwise statistical approach was used employing the following exploratory techniques: cluster analysis, linear discriminant analysis (LDA) and factor analysis.

Firstly, an unsupervised technique was applied, cluster analysis, to discover natural groupings within real data, both in terms of pesticides similarity and samples similarity. Squared Euclidean distance was always used as the interval measure for clustering using distinct linkage methods: between groups linkage, within groups linkage and Ward's method. Raw data was computed after standardization based on *Z*-scores by variable. In a first attempt to group variables, a cluster could be formed by pesticides that were never detected in soil samples: dichlorvos, hexachlorobenzene, simazine, terbuthylazine, diazinon, fonofos, propyzamide, metribuzin, parathion-methyl, simetryn, heptachlor, fenitrothion, malathion, aldrin, parathion,

isodrin, heptachlor epoxide, chlordane, tetrachlorvinphos, fenamiphos, endrin, 4,4′-DDT, azinphos-methyl, λ-cyhalothrin, α-cypermethrin and deltamethrin. Since the allocation of information by these variables to the problem under study is scarce, they were also excluded from statistical analysis. The resulting working data matrix was thus reduced to dimensions 15 × 120.

Subsequently, LDA was applied with the objective to distinguish among variables those which have driven the formation of groups of closed related samples, as seen in cluster analysis. Finally, factor analysis was applied to reveal the nature of hypothetical factors that explain most of the data variance. Computation was based on the correlation matrix and two additional non-linear rotation methods, Varimax and Quartimax, were tested in order to improve the interpretability of the factors. All statistical manipulation and graphical display was performed using SPSS 13.0 for Windows (SPSS Inc., Chicago, IL, USA).

3. Results and discussion

3.1. Cluster analysis

Multivariate analysis provides powerful tools for modelling and interpretation of large environmental data sets obtained in extensive survey programmes. The actual trend, supported by scientific and political awareness, is to enlarge monitoring programmes of environmental pollutants, however human mind cannot easily handle multidimensionality hence, systematisation and graphical display of major remarks is highly desirable [23].

Since no natural grouping of samples based on a common characteristic was noticed, cluster analysis was performed in order to uncover eventual similarities on pesticide behaviour or affinities amongst soil samples. Fig. 2 presents the dendrogram obtained when clustering pesticides while the dendrogram displaying clusters of samples is not given due to its excessive dimensions. The later allowed establishing 10 groups of samples, which were considered when running supervised exploratory techniques. In both cases, variables and samples, the Ward's method of linkage provided easier interpretation of dendrograms conversely to the other methods, which did not generate clear groups.

From observation of Fig. 2, a group composed by ATR, DEA and ALA is clearly identified. This factual association seems logical since it includes two herbicidal active principles that are frequently formulated together (ATR and ALA) and used worldwide mainly for maize cultivation plus a degradation product of ATR, the desethylatrazine (DEA). Similar findings have been reported by other authors [23,24]. A second cluster includes the pesticides 4,4′-DDE, DIE, 4,4′-DDD and ENSS. Indeed, this group comprises mainly persistent pesticides and their degradation products that are still found as soil contaminants several decades after their use and withdrawal. ENSS appears associated in this class of compounds, although its shorter persistence in soils that can spread to months or years. Actually, this degradation product could be detected in several samples in the absence of the parent pesticide ENS, which shows up in the dendrogram at a longer distance, revealing its persistent nature. The remaining pesticides constitute a third cluster that is formed by a relatively heterogeneous group of substances routinely used as insecticides and herbicides in current intensive horticulture practices.

In the analysis of the dendrogram obtained by clustering samples (not shown) and using as criterion a rescaled distance cluster combine of 12, 10 classes have been produced (a class 0 was created that contains outlier samples). The distribution of samples by these classes is represented in Fig. 1. The distribution pattern clearly shows that site nos. 1 and 22 were characterized by a relatively homogeneous composition, both in time and space (different soil layers). As it will be discussed later, site 1 represents a low contamination area whereas site 22 represents a highly contaminated agricultural soil. Sampling sites 5, 18 and 25 were heterogeneous in time and/or space presenting pesticide

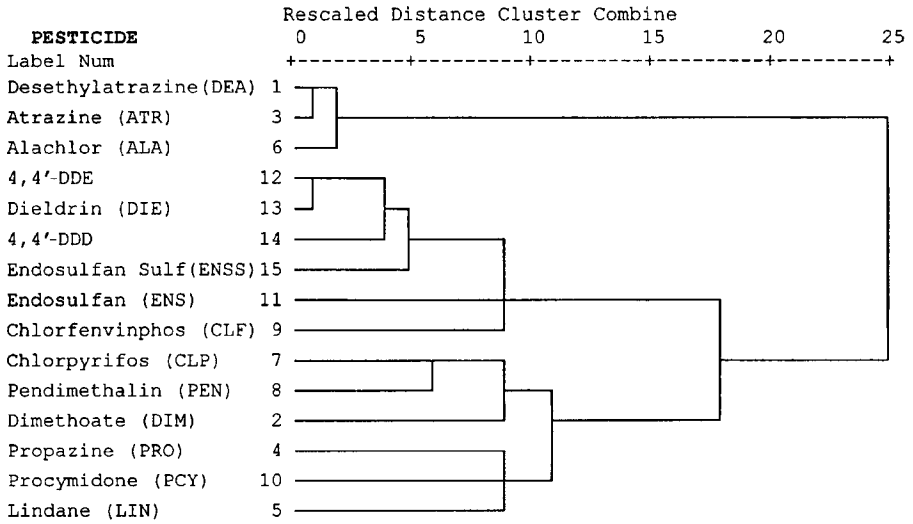


Fig. 2. Dendrogram produced by cluster analysis of variables (pesticides) using the Ward's method of linkage. The most cohesive cluster of not-detected pesticides is not shown.

Table 1
Average concentration values expressed in $\mu g\,kg^{-1}$ and respective standard deviation ( ) of pesticides included in each class, as assigned by cluster and discriminant analysis

	Class 1	Class 2	Class 3	Class 4	Class 5	Class 6	Class 7	Class 8	Class 9	Class 10
DEA	–	–	–	–	–	–	–	–	11.8 (0.7)	–
ATR		–	2.1 (1.8)	–	9.1 (4.3)	–	1.9 (1.3)	2.5 (5.1)	83.0 (4.6)	1.4 (3.9)
ALA	0.2 (0.8)	8.8 (3.2)	5.7 (5.0)	–	484.4 (385.8)	–	5.3 (4.5)	4.8 (8.0)	45150.1 (29899.8)	44.2 (133.8)
DIE	–	–	–	–	–	–	–	27.0 (89.7)	–	350.7 (120.6)
4,4′-DDE	–	–	–	1.8 (0.2)	–	–	–	1.1 (3.8)	–	17.9 (4.6)
4,4′-DDD	–	–	–	–	–	–	–	0.7 (2.2)	–	3.2 (3.1)
ENSS	–	–	1.3 (4.0)	–	–	–	79.4 (3.1)	76.7 (106.6)	–	83.9 (37.1)
ENS	–	–	0.8 (3.3)	–	–	–	41.3 (19.5)	40.7 (67.2)	–	47.2 (176.3)
CLF	–	–	–	–	–	–	–		–	0.2 (0.5)
CLP	0.3 (0.9)	0.3 (0.5)	0.5 (0.9)	1.2 (2.0)	–	14.7 (16.9)	0.6 (0.9)	19.0 (45.9)	–	3.6 (14.0)
PEN	1.2 (3.8)	–	2.6 (8.4)	63.4 (54.9)	–	709.9 (264.3)	–	629.9 (2081.6)	–	0.4 (0.9)
DIM	–	–	–	–	–	–	–	0.6 (2.1)	–	9.5 (23.5)
PRO	–	–	–	–	–	–	–	0.2 (0.6)	–	–
PCY	–	–	1.5 (3.6)	–	–	4.1 (7.1)	–	12.1 (40.1)	–	0.9 (3.0)
LIN	–	–	–	–	–	–	–	21.7 (30.1)	–	–

concentrations from low (class 1) to high levels (classes 8 and 9). A class membership due to seasonal fluctuation of pesticide levels could not be clearly perceived. Naturally, further statistical exploration needs to be envisaged to better characterize the conceptual reasons for the discrimination of samples between these classes. Hopefully, the findings described up to now can be confirmed and detailed in deep in further statistical examination.

3.2. Linear discriminant analysis

LDA has been used before to establish morphological rules in authenticity validation of olives used in oil production [25] as well as in spectral recognition of complex spectroscopic patterns and interpretation of environmental monitoring data [23], among many other useful applications. In this work, discriminant analysis was used to distinguish among pesticides which had a prominent role for the segregation of classes, as assigned in Fig. 1, and which contributed for the overall random noise in data. Accessorily, descriptive statistic parameters on a per class basis were easily obtained, as presented in Table 1. In order to assess the discriminating capacity of the variables, the Wilks' lambda and *F*-test parameters were obtained and presented in Table 2.

From Fig. 3, it results clear that classes which were assigned with higher number (8, 9 and 10) separate markedly from a group enclosed inside the rectangle, meaning that these classes contain the most dissimilar samples. Such fact can be explained by the occurrence of unusual pesticides or pesticide combinations (8, 10) or, on the other hand, by extremely high concentration values (9), as can be seen in Table 1. Interestingly, class 10 is fully concentrated in sampling site 22 revealing the high contamination status of this location over the time span of this project and depth in soil. In a quite different fashion, class 9 belongs entirely to sampling site 25, revealing a very high contamination episode distributed in soil depth but almost restricted to a sampling event. The typical combination of pesticides that discriminated class 9 is commercially available with herbicidal activity. The soil samples from site 1 fell entirely in class 1 which is characterized by low pesticide contamination, in agreement with the less intensive use of the soil but also do to its sandy composition bearing lower retention capacity of organic substances. Except site 22, which was already discussed, class 1 has also representatives in every other sites meaning that at some point these locations recovered from contamination loadings. A positive aspect to highlight is the presence of class 1 samples in 4 out of 5 sampling sites. With 46 members, this class comprises 38% of the analysed samples, which are characterized by a low contamination profile. The classes discussed until now, are located in the borders of the multivariate classification, whereas intermediate classes can be thought as having medium pesticide concentrations, accordingly.

The analysis of Table 2, where the discriminant performance of the variables is summarized, allows us to draw some comments. DEA has the highest discriminant capacity followed by ATR, probably because it was detected only in some selected samples where ATR contamination existed, either concomi-

Table 2
Significance of discriminant functions: Wilks' lambda and *F*-test of group means

	Wilks' lambda	*F*-test
DEA	**0.003**	**4616.169**
ATR	**0.028**	**412.715**
ALA	**0.254**	**35.204**
4,4′-DDE	**0.096**	**112.824**
DIE	**0.151**	**67.283**
4,4′-DDD	**0.585**	**8.528**
ENSS	**0.466**	**13.751**
ENS	0.935	0.827
CLF	0.892	1.449
CLP	0.873	1.744
PEN	0.894	1.420
DIM	0.881	1.623
PRO	0.917	1.088
PCY	0.922	1.013
LIN	**0.659**	**6.216**

In bold: statistically significant variables at $p = 0.05$.

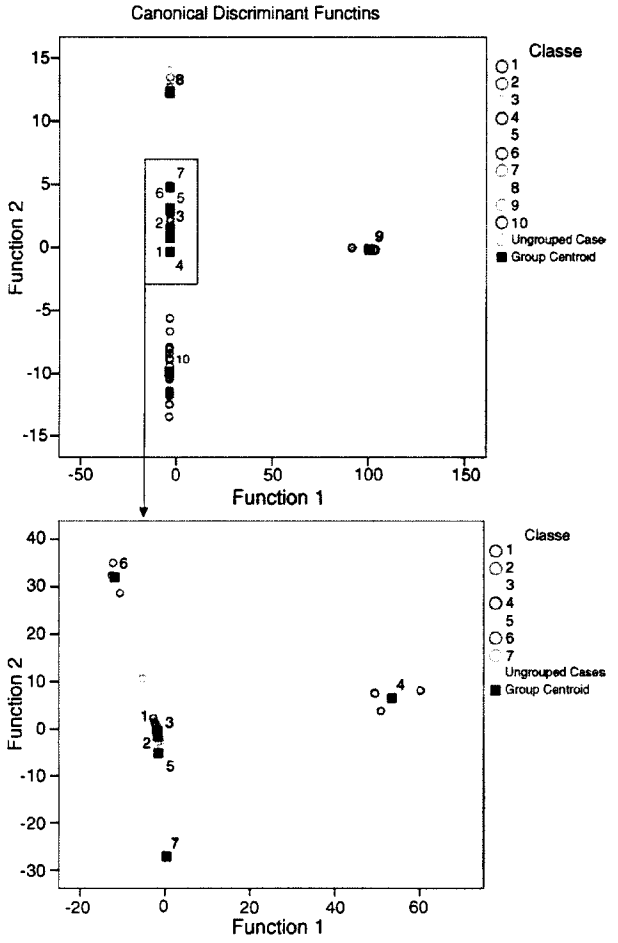


Fig. 3. Plot of samples as given by LDA after 10 classes have been settled. Only variables containing relevant information, as shown in Fig. 2, were considered for the discriminant functions. The zoomed figure (bottom) was obtained through an independent LDA of classes 1–7 in order to obtain a clear classification for these classes.

tantly or in a past event. In monitoring terms, we would say that ATR has a very restricted application to certain agricultural crops—maize cultivation. The comment applies with due adaptation to DEA. Then, we may find the so-called persistent pesticides that were detected in a specific location with a stable concentration and proportion among them, even after 2 years have passed. The discrimination capacity of the remaining pesticides was reduced or even non-significant. Pesticides such as CLP, PEN and DIM may find a wide range of applications thus, they were widespread in the region with no distinctive peculiarity.

3.3. Factor analysis

In order to further explore the environmental monitoring data, principal components were extracted from the multidimensional data matrix with the purpose to narrow the focus of our attention in main factors, should they be real or conceptual. By capturing data variance and reducing dimensionality, principal components analysis (PCA) aims to uncover a more fundamental set

Table 3
Rotated canonical function and principal loadings of main factors (in bold) in principal components analysis

	Principal components				
	1	2	3	4	5
DEA	−0.058	**0.983**	−0.009	0.007	0.003
ATR	−0.040	**0.979**	−0.039	−0.026	−0.015
ALA	−0.045	**0.945**	−0.004	0.007	0.006
4,4′-DDE	**0.927**	−0.036	−0.001	0.096	−0.027
DIE	**0.913**	−0.040	0.000	0.096	−0.028
4,4′-DDD	**0.809**	−0.017	0.066	0.301	0.119
ENSS	**0.787**	−0.049	−0.024	−0.241	0.028
ENS	0.449	0.014	−0.125	**−0.473**	0.153
CLF	0.327	−0.012	−0.028	**0.790**	0.005
CLP	0.067	−0.022	**0.802**	−0.014	−0.028
PEN	−0.093	−0.014	**0.764**	0.016	0.118
DIM	0.285	−0.024	0.294	−0.342	−0.326
PRO	−0.040	0.015	−0.115	−0.064	−0.228
PCY	−0.018	−0.047	0.020	0.073	**−0.486**
LIN	0.019	−0.051	−0.035	−0.041	**0.772**

Rotation method: Quartimax with Kaiser normalization.

of factors that accounts for the major patterns across all of the original variables [26]. The information carried by the original variables is projected onto a smaller number of underlying variables called principal components. PCA helps to find out in what respect one sample is different from another, which variables contribute most to this difference, and whether those variables contribute in the same way (i.e. are positively correlated) or inversely correlated. PCA is used whenever one wish to distinguish which variables carry significant information to describe data trends inside the system, from those variables that can be omitted without relevant loss of information.

After performing PCA analysis, the scree plot of eigenvalues indicated that 65% of the data variance could be explained by five main components. Afterwards, the scree plot becomes flat meaning that additional components contribute less to the overall data variance. A Quartimax rotated solution of main components was preferred to highlight most impacting variables inside each principal component. The rotated component matrix obtained is shown in Table 3. Principal component 1 (PC1) has an important loading from the group of persistent pesticides and respective degradation products: 4,4′-DDE, 4,4′-DDD, DIE and ENSS. This principal component that we shall call pesticide persistence accounted for 22% of the data variability and is related with class 10 that almost entirely represents site 22.

PC2 contains 19% of data variance and it has a clear main contribution from herbicides used worldwide to control weeds in maize cultivation. These pesticides are present in classes 3, 5, 7 and 9 that are spread through sites 5 and 25, which are indeed areas of maize cultivation in summer season. Although class 8 has a low average concentration of herbicides, these were never detected in site 18, unfortunately the classification strategy was less efficient to discriminate it. PC3 (9% variance) highlights the combination of the herbicide PEN and the insecticide CLP that had a high prevalence among soil samples. Such outcome could be derived from horticulture practices where soil is treated with the herbicide whereas vegetables receive an insec-

ticide against lice and caterpillar, as it is usually the case for carrot, beans, onion and cabbage cultures. PC4 (8% variance) indicates that ENS and CLF were not often found simultaneously in the same sample, by the contrary (opposite loading signals), which seems logical since they can be both used for similar purposes, bearing insecticide activity. Regarding PC5 (7% variance), one specific reason related to the local cultivations might be assigned to the divergent occurrence of LIN and PCY, since the main application of PCY is to strawberries and tomatoes where LIN is not an insecticide of choice to be used. The remaining 35% of data variance could not be clearly interpreted. Several procedures in intensive horticulture might be regarded as contributing to this observation: (i) individual or peculiar procedures followed by farmers in result of the large diversity of commercial formulations frequently used for the same crop; (ii) many vegetable cultures in small fields laying side by side; (iii) high rotation frequency of cultures—frequently unproductive cultures are replaced by others before completely grown; (iv) rapid disappearance of some pesticides after application. Even so, we must realise that pesticides contamination in soils is confined due to their reduced mobility, contrarily to the contamination of waters. Such chance, favours the heterogeneity of samples from different sites, i.e. variability among results, which is ultimately necessary for the discrimination of processes occurring in time or space due to natural or human intervention.

Overall, 15 pesticides and degradation products (see Fig. 2) appeared consistently as contaminants of soil samples and were subjected to a comprehensive statistical interpretation. In addition, metolachlor, metalaxyl, benalaxyl, quinalphos and pirimicarb were also present but in unknown amounts. The multiresidue method used for monitoring purposes covered around 70% of all pesticides with reported application in the area and amenable to GC analysis. Carbamates (e.g. propineb, mancozeb, ziram), phenylureas (e.g. linuron, metobromuron) and markedly polar pesticides like paraquat and glyphosate also applied in the area were left out since they are known to be better analysed by high performance liquid chromatography techniques [27]. Moreover, these chemical families have lower persistence potential and toxicity thus, they pose moderate environmental risk [28]. On the other hand, pesticides such as: chlorfenvinphos, quinalphos and procymidone were effectively detected, although there was no previous written notice of their use in the region. Regarding our previous report [17], the pesticide contamination pattern in soil was kept essentially the same, only propazine had not been detected. Site 22, the most contaminated one, showed similar concentrations as previously seen, namely with 4,4′-DDE, 4,4′-DDD and DIE which confirms their stability over a 2-year period. Exceptions were noted for DIM and PCY whose average concentration decreased while ALA increased.

To our knowledge no previous monitoring work of pesticides in soil have been carried out in Portugal while around Europe such studies are also not yet widely applied, the Mediterranean region being the preferential target for the existing reports [1,29,30]. Surface and ground waters have been almost exclusively the target of existing monitoring surveys [23,31–33]. Chemometric interpretation of monitoring data has been performed in a similar but not identical way in two of these studies [23,31]. Comparing the results obtained in this work with those carried out in water, the main remark is that OCPs were detected in considerable amounts with higher frequency probably due to their preferential adsorption to soil and low water solubility.

4. Conclusions

The chemometric characterization in this paper resulted quite successfully. Indeed, besides the regional classification of the soil pollutants under investigation, the main factors contributing to the pesticides distribution were identified. Pesticides data originated the following clusters: (i) an homogeneous group formed by all not reported pesticides, (ii) a group of persistent pesticides and (iii) a group of typical herbicides used in maize cultivation. Agglomeration of samples allowed classes to be formed, which were interpreted on a geographical distribution basis.

The application of LDA followed by factor analysis allowed to formulate the following conclusions: site 22 constituted itself in a single class which indicates that pesticides occurrence in these samples was steady over 2 years-time and uniform in depth. Such small variation of pesticides concentration, indicative of slow dissipation, reveals their persistent character. A group of chlorinated pesticides and degradation products discriminated this class and accounted for 22% of data variance. PC2 had a major loading of herbicides and respective degradation products, which were present in classes 3, 5, 7 and 9 located mainly in sites 5 and 25 where maize cultivation is indeed the major land use. The next major discriminating factor was primarily related to the association of PEN and CLP, which find frequent application in the production of vegetables. Remaining significant principal components and unexplained data variance can be interpreted by particular horticulture managing practices.

Whereas classes 8 and 10 include samples with the highest number of pesticides, class 9, fully represented in site 25, was the most massively contaminated, although almost restricted to one sampling event—September 2001. Overall data trends were highlighted with statistical assistance however, caution should be used when analysing class average concentration values, since it differs from site average concentrations.

Acknowledgements

FCT- Fundação para Ciência e Tecnologia is greatly acknowledged for the Ph.D. grant PRAXIS XXI/BD/21823/99. The authors thank the IAREN for technical and financial support. Acknowledgements are due to DRAEDM for the institutional support and A. Matos, Região Agrária da Póvoa de Varzim, for his involvement in the collection of samples and fruitful discussions in the interpretation of analytical and statistical results. We are also in debt to Prof. Veloso Gomes for supplying hydrogeological information.

References

[1] A. Belmonte Vega, A. Garrido Frenich, J.L. Martinez Vidal, Anal. Chim. Acta 538 (2005) 117.

[2] B. Gorlach, E. Interwies, Economic Assessment of Groundwater Protection: A Survey of the Literature. Final Report. European Commission Directorate General Environment, Brussels, Belgium, 2003.
[3] Communication from the Commission to the Council, the European Parliament, the Economic and Social Committee and the Committee of the Regions, "Towards a thematic strategy for soil protection", COM(2002) 179 final, Commission of the European Communities, Brussels, Belgium, 2002.
[4] L. Aller, T. Bennet, J.H. Lehr, R.J. Petty, DRASTIC: A Standardized System for Evaluating Groundwater Pollution Potential Using Hydrogeological Settings, USEPA report 60072-85/018, 1987.
[5] J.P. Lobo-Ferreira, The European Union experience on groundwater vulnerability assessment and mapping, in: Meeting of Experts on Coastal Development Issues in India and the South Asian Region, Goa, India, 1999.
[6] G. Zalidis, S. Stamatiadis, V. Takavakoglou, K. Eskridge, N. Misopolinos, Agric. Ecosyst. Environ. 88 (2002) 137.
[7] A.H. Hernández-Romero, C. Tovilla-Hernández, E.A. Malo, R. Bello-Mendonza, Mar. Pol. Bull. 48 (2004) 1130.
[8] J.W. Kelsey, B.D. Kotler, M. Alexander, Environ. Sci. Technol. 31 (1) (1997) 214.
[9] J.J.T.I. Boesten, Sci. Total Environ. (Suppl.) (1993) 397.
[10] P.B. Hatzinger, M. Alexander, Environ. Sci. Technol. 29 (2) (1995) 537.
[11] Council Directive 91/414/EEC of 15 July 1991 concerning the placing of plant protection products on the market, Official Journal of the European Communities L 230, 19.08.91, Annexes II and III, sections 7 and 9, respectively "Fate and behaviour in the environment", amended by Commission Directive 95/36/EC, Brussels, Belgium.
[12] Guidance Document on Persistence in Soil, Guidance Doc. No. 9188/VI/97-rev.8, European Commission, Directorate General for Agriculture, DG VI B II-1, 2000. Brussels, Belgium, 2000.
[13] M.E. Kotti, A.G. Vlessidis, N.C. Thanasoulias, N.P. Evmiridis, Water Resour. Manag. 19 (2005) 77.
[14] E.P.R. Gonçalves, H.M.V.M. Soares, R.A.R. Boaventura, A.A.S.C. Machado, J.C.G. Esteves da Silva, Sci. Total Environ. 142 (1994) 143.
[15] H.M.V.M. Soares, R.A.R. Boaventura, A.A.S.C. Machado, J.C.G. Esteves da Silva, Environ. Pollut. 105 (1999) 311.
[16] R. Aruga, D. Gastaldi, G. Negro, G. Ostacoli, Anal. Chim. Acta 310 (1995) 15.
[17] C. Gonçalves, M.F. Alpendurada, Talanta 65 (2005) 1179.
[18] Council Directive 91/676/EEC of 12th December 1991 concerning the protection of waters against pollution caused by nitrates of agricultural origin, Official Journal of the European Communities L 375, 31.12.91, Commission of the European Communities, Brussels, Belgium.
[19] Dec.-Lei no. 235/97, of 3rd of September, amended by Dec.-Lei no. 68/99, of 11th of March. In Diário da República 203/97 Série I-A, 03/09/1997, Lisbon, Portugal.
[20] Portaria 556/2003, Approves the action programme for the vulnerable zone no.1, constituted by the free aquifer between Esposende and Vila do Conde. In: Diário da República 159, Série I-B 12/07/2003, Lisbon, Portugal.
[21] J.P. Lobo-Ferreira, M.M. Oliveira, M.J. Moinante, T. Theves, C. Diamantino, Study For Evaluation of the Vulnerability of the Reception Capacity of Coastal Zone Water Resources in Portugal. The Receiving Water Bodies: Groundwater Systems, Specific Report R3.3, LNEC, Report 237/95—GIAS, Laboratório Nacional de Engenharia Civil, Lisbon, Portugal, 1995, 585 pp.
[22] C. Gonçalves, J.J. Carvalho, M.A. Azenha, M.F. Alpendurada, Empirical modelling of supercritcal fluid extraction of pesticide residues in soil by means of central composite design and analysis by gas chromatography–tandem mass spectrometry (SFE-GC-MS-MS), submitted for publication.
[23] R. Tauler, S. Lacorte, M. Guillamon, R. Cespedes, P. Viana, D. Barceló, Environ. Toxicol. Chem. 23 (3) (2004) 565.
[24] S. Gašic, M. Budimir, D. Boškovic, N. Neškovic, Atrazine residues in soil, surface and groundwaters in agriculture areas of Serbia, in: Proceedings of the 11th International Symposium on "Environmental Pollution and its impact on life in the Mediterranean region" C21, Limassol, Cyprus, October, 2001.
[25] P.B.M. Pinheiro, J.C.G. Esteves da Silva, Anal. Chim. Acta 544 (2005) 229.
[26] M.M. Morales, P. Marti, A. Llopis, L. Campos, S. Sagrado, Anal. Chim. Acta 394 (1999) 109.
[27] D. Barceló, M.-C. Hennion, Trace Determination of Pesticides and Their Degradation Products in Water, Elsevier Science BV, Amsterdam, The Netherlands, 1997.
[28] M.A. Kamrin, Pesticides Profiles: Toxicity, Environmental Impact and Fate, CRC Press LLC, Boca Raton, FL, USA, 2000.
[29] C. Sánchez-Brunete, B. Albero, J.L. Tadeo, J. Agric. Food Chem. 52 (2004) 1445.
[30] C. Sánchez-Brunete, R.A. Pérez, E. Miguel, J.L. Tadeo, J. Chromatogr. A 823 (1998) 17.
[31] R. Tauler, D.A. Azevedo, S. Lacorte, R. Cespedes, P. Viana, D. Barceló, Environ. Technol. 22 (2001) 1043.
[32] S. Lacorte, P. Viana, M. Guillamon, R. Tauler, T. Vinhas, D. Barceló, J. Environ. Monit. 3 (2001) 475.
[33] M.J. Cerejeira, P. Viana, S. Batista, T. Pereira, E. Silva, M.J. Valério, A. Silva, M. Ferreira, A.M. Silva-Fernandes, Water Res. 37 (2003) 1055.

Capítulo 8

ESTUDO DO COMPORTAMENTO E EFEITOS DOS PESTICIDAS NO AMBIENTE

8.1 DEGRADAÇÃO DO QUINALFOS EM ÁGUAS NATURAIS E SOLOS POR MEIO DE FOTÓLISE, EM CONDIÇÕES DE IRRADIAÇÃO SOLAR SIMULADA

Com base na publicação:

Gonçalves, C., Dimou, A., Sakkas, V., Alpendurada, M.F., Albanis, T.A. – Photolytic degradation of quinalphos in natural waters and on soil matrices under simulated solar irradiation. Chemosphere 64 (2006) 1375-1382.

O Anexo VII contém informação adicional

ELSEVIER

Chemosphere 64 (2006) 1375–1382

CHEMOSPHERE

www.elsevier.com/locate/chemosphere

Photolytic degradation of quinalphos in natural waters and on soil matrices under simulated solar irradiation

C. Gonçalves [a], A. Dimou [b], V. Sakkas [b,*], M.F. Alpendurada [a,c], T.A. Albanis [b]

[a] *Laboratory of Hydrology, Faculty of Pharmacy, University of Porto, Rua Aníbal Cunha 164, 4050-047 Porto, Portugal*
[b] *Laboratory of Industrial Chemistry, Department of Chemistry, University of Ioannina, 45110 Ioannina, Greece*
[c] *IAREN—Water Institute of the Northern Region, Rua Dr. Eduardo Torres 229, 4450-113 Matosinhos, Portugal*

Received 14 February 2005; received in revised form 2 December 2005; accepted 15 December 2005
Available online 15 February 2006

Abstract

The photochemical persistence of quinalphos, one of the most widely used organophosphorous insecticides, was investigated in a variety of environmental matrices such as natural waters and soils of different composition. Simulated solar irradiation was obtained using a xenon arc lamp (Suntest CPS+ apparatus) giving an irradiation intensity of 750 W m^{-2} equivalent to a light dose per hour of irradiation of 2700 kJ m^{-2}. The phototransformation rates were determined using solid-phase microextraction (SPME) and ultrasonic extraction (USE) coupled to GC-FTD, while the identification of photoproducts was carried out by GC–MS.

In water samples, the degradation kinetics followed a pseudo-first-order reaction and photolysis half-lives ranged between 11.6 and 19.0 h depending on the constitution of the irradiated media. Dissolved organic matter (DOM) has a predominant retarding effect, while nitrate ions accelerated the photodegradation kinetics. In soil samples, the degradation kinetics was monitored on 1 mm soil layer prepared on glass TLC plates. The kinetic behaviour of quinalphos was complex and characterized by a double step photoreaction, fast in the first 4 h of irradiation followed by a slow degradation rate up to 64 h. The photolysis half-life of quinalphos was shorter in sandy soil compared to the rest of the soil samples, varying between 16.9 and 47.5 h, and showing a strong dependence on the composition of the irradiated media. Among the transformation products formed mainly through photohydrolysis and photoisomerization processes, some photoproduct structures were proposed according to their mass spectral information.
© 2005 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Keywords: Quinalphos; Photolysis; Sunlight; Fate; Degradation products

1. Introduction

Organophosphorous pesticides (OPPs) are generally seen as safe chemicals for use on crops and animals due to their relatively fast degradation rates. However, they are also by far the most toxic to humans of all pesticides (Ragnarsdottir, 2000). Because of the magnitude of their application, often as replacement of the organochlorine pesticides, they are most frequently detected in the environment. OPPs have relatively high solubilities in water (quinalphos –17.8 mg l^{-1}, at 22–23 °C (Tomlin, 1999)), thus they are transported readily through soils and into groundwaters or surface waters (Ragnarsdottir, 2000). Actual dissipation rates may be dependent on a number of natural water conditions including pH, salinity, dissolved organic matter (DOM) and metals (Liu et al., 2001). In soil, many environmental factors may affect dissipation rates including soil type, moisture, organic matter, microbial activity, sunlight intensity, amenability to aeration as well as weather conditions (Hebert and Miller, 1990; Hultgren et al., 2002; Das et al., 2005). Pesticides may follow a range of dissipation pathways among which volatilization, hydrolysis, photolysis and biodegradation are the main processes. For some pesticides photolysis may be dominant on dry, sunlight-exposed surfaces, while other dissipation

* Corresponding author. Tel.: +30 26510 98363; fax: +30 26510 98795.
E-mail address: vsakkas@cc.uoi.gr (V. Sakkas).

0045-6535/$ - see front matter © 2005 Elsevier Ltd. All rights reserved.
doi:10.1016/j.chemosphere.2005.12.020

pathways can prevail under conditions found in deeper soil layers (Hebert and Miller, 1990; Dimou et al., 2004).

Chemical hydrolysis is considered the most important fate process for OPP dissolved in groundwaters (Ragnarsdottir, 2000). Biodegradation is the primary fate in soils but metabolism rates depend on many soil parameters and the depth at which the pesticide molecules are located (Das et al., 2005). Photolysis of pesticides can occur in surface waters, the atmosphere and on the surface of solids exposed to sunlight. Knowledge on the photochemical behaviour of pesticides is a key issue in terms of the formation and persistence of toxic transformation products. Phototransformation occurs when chemicals are irradiated by solar light having wavelengths >290 nm following a direct or indirect mechanism. Direct photolysis takes place if the chemical absorbs light and then undergoes a transformation reaction from an excited state, whereas in indirect photolysis naturally occurring substances may absorb sunlight energy which is then transferred to the chemical, to form free radicals or promote redox reactions that result in the transformation of the pollutant chemical (Ahel et al., 1994; Mill, 1999; Burrows et al., 2002; Sakkas et al., 2002a).

Not much information can be found on quinalphos's photoreactivity in environmental matrices, regardless the fact that OPPs family is one of the best studied. Modelling pesticide behaviour under laboratory conditions can be a useful tool to characterize this type of pollutants. Under actual environmental conditions, more variables come upon making it difficult to evaluate the relative importance of each fate process to the whole dissipation rate. Furthermore, useful information can be gathered on the rates and routes of dissipation enabling a better planning of field assays. In order to fill this lack of information, we report some important aspects on quinalphos degradation in a variety of experimental conditions under simulated solar irradiation. The aim of the present study is (i) to investigate the prime mechanisms involved in the fate and photolytic behaviour of quinalphos in natural waters as well as on soils and examine the effect of organic matter, nitrate ions and illumination depth on the degradation kinetics; (ii) isolate and characterize the intermediate products, which are produced during the phototransformation process.

2. Experimental

2.1. Chemicals and apparatus

Quinalphos high purity standard and sodium azide of analytical reagent grade were purchased from Riedel-de-Häen (Seelze, Germany). Humic acids (20% ash) were obtained from Fluka (Steinheim, Germany). Ethyl acetate and methanol were of Pestanal and ChromaSolv grade from Riedel-de-Häen and Merck (Darmstadt, Germany), respectively. 85 μm polyacrylate (PA) solid-phase microextraction (SPME) fibres, supplied from Supelco (Bellefonte, PA, USA), were conditioned overnight at 300 °C and used to monitor the degradation kinetics. Solid-phase extraction (SPE) was carried out on 47 mm styrenedivinylbenzene (SDB) extraction disks supplied from Empore 3M (Sant Paul, PA, USA) using a conventional filtration apparatus.

2.2. Kinetic studies

2.2.1. Irradiation and analysis of aqueous solutions

In order to determine the photochemical behaviour of quinalphos in aqueous media, natural waters of different composition (lake water and groundwater) as well as distilled water were irradiated. Moreover, artificial water solutions were prepared from native aquatic components such as humic acids and nitrate (20 mg l^{-1} each, in distilled water), that are known to dramatically influence the rates of photolysis of organic contaminants. Physicochemical properties of natural water samples are presented in Table 1. The tested groundwater has a high TOC value due to its origin from a low water table aquifer on sandy soil. Both natural and artificial water samples were spiked with quinalphos aqueous stock solution to give a concentration level of 1.0 μg l^{-1}. A sufficient aqueous solution volume was prepared in a 100 ml volumetric flask and homogenised by shaking and a few seconds in the ultrasonic bath. Fifty milliliters were used in the irradiation experiments whereas the remaining was stored in a vessel covered with aluminium foil and kept in the dark. Illumination experiments were carried out in 6.5 cm diameter cylindrical Duran glass UV-reactor by exposing the aqueous solutions of quinalphos. The light source was on the top of the reactor and an average irradiation intensity of 750 W m^{-2} was main-

Table 1
Physicochemical characteristics of natural water samples and soils used in the degradation studies of quinalphos in aqueous and soil-sorbed phase

Water and soil properties	pH	Conductivity (μS cm^{-1})	NO_3 (mg l^{-1})	NO_2^- (mg l^{-1})	TOC (mg l^{-1})	Humidity (%)	Organic matter (%)	Sand (%)	Clay (%)	Silt (%)
Distilled water	5.35	2.4	n.d.	n.d.	b.d.l.					
Groundwater (Póvoa de Varzim)	7.96	596	27.4	b.d.l.	16.1					
Lake water (Lake Pamvotis)	7.68	362	27.9	b.d.l.	12.8					
Sandy soil (Póvoa de Varzim)	7.84	0.36				0.12	0.67	92.1	6.7	1.2
Sandy loam soil (Santo Tirso)	5.28	0.70				1.12	5.09	50.2	38.3	11.5

n.d.—not determined.
b.d.l.—below detection limit.
TOC—total organic carbon.

tained throughout the experiments measured by internal radiometer. The corresponding light dose per hour of irradiation was 2700 kJ m^{-2}. The pesticide solution was magnetically stirred during the illumination period in the Suntest CPS+ (Heraeus, Hanau, Germany) apparatus equipped with a xenon arc lamp (1500 W) and special glass filters restricting transmission of light below 290 nm. The temperature of the samples was kept low and constant using a tap water cooling circuit to the walls of the reactor vessel. Each series of photodegradation experiments was conducted in triplicate and accompanied by dark reaction controls run concurrently to the phototransformation assay. At specific time intervals, 4 ml aliquots were withdrawn from the reactor and analyzed by SPME. This technique allows using small sample volumes, low concentration levels and avoiding matrix interference which is highly advantageous in this type of study (Sakkas et al., 2002b). Based on previous experience in the analysis of OPPs (Sakkas et al., 2002b; Gonçalves and Alpendurada, 2004) the following SPME conditions were adopted, using parathion at 1.0 μg l^{-1} as internal standard: extraction with an 85 μm polyacrylate fibre, by immersion in 4 ml stirred sample, during 20 min. An 85 μm PA fibre was chosen due to its robustness and less matrix effect on natural waters, although it was shown to be slightly less efficient than the 60 μm PDMS-DVB fibre. The method presented adequate precision (1.9% RSD) and calibration fit in the 0.1–1.0 μg l^{-1} range with a determination coefficient of 0.997.

2.2.2. Irradiation and analysis of soil samples

Irradiation of two soil samples of different textural classes was accomplished preparing thin soil layers on glass TLC plates as described elsewhere (Albanis et al., 2002; Dimou et al., 2004). The textural classes and physicochemical characteristics of the soils are given in Table 1. Briefly, a dry soil was used in the preparation of a slurry containing a nominal quinalphos concentration of 25 mg kg^{-1}, adding sodium azide (0.05%) to prevent microbial degradation. The ideal composition of the soil slurry was obtained using a spiking aqueous solution volume corresponding to 50% and 30% of the soil weight respectively for the sandy loam (SL) and sandy (S) soils. The soil paste was spread on two TLC (20 cm × 20 cm) glass plates using an apparatus adjusted to obtain a homogeneous 1 mm thick soil layer. The plates are dried at room temperature during 48 h. One of the plates was used for the irradiation experiments in the Suntest system while the other was used as a dark control protecting it from light with aluminium foil. Experiments were carried out in triplicate. The temperature inside the Suntest apparatus was controlled using a circulating water bath through the floor of the photolysis chamber and an air forced circuit. Samples for the determination of reaction kinetics were obtained by scrapping off, at various illumination times, 2 cm strips of the soil layer on the TLC plates, concomitantly for the photo- and dark experiment. Portions of soil were homogenised and 5 g aliquots were extracted with ethyl acetate as described elsewhere (Gonçalves and Alpendurada, 2005), using parathion as the internal standard in a concentration equivalent to 12.5 mg kg^{-1}. Extracts were filtered through anhydrous sodium sulfate, pooled and adjusted to a 20 ml volume and subsequently injected into the GC-FTD instrument.

2.2.3. Chromatographic conditions

Kinetic rates of photodegradation were followed by analysing both water and soil extracts (fibre desorption and 1 μl solvent injection, respectively) in a Shimadzu 14A gas chromatograph equipped with a ZB-5 column (30 m × 0.32 mm i.d. × 1 μm film thickness) (Zebron-Phenomenex, Torrance, CA, USA). Helium was used as both the carrier (1.5 ml min^{-1}) and the make-up gas (40 ml min^{-1}). The detector gases were hydrogen (4 ml min^{-1}) and air (120 ml min^{-1}), fitted with an ion source of alkali metal salt (Rb_2SO_4). The injector and detector temperatures were set to 240 °C and 300 °C, respectively. The following oven temperature programme was used throughout the study: initial temperature 150 °C (2 min), 150–210 °C (5 °C min^{-1}), 210 °C (11 min), 210–270 °C (20 °C min^{-1}).

2.3. Photolysis by-product studies

2.3.1. Irradiation and concentration of samples

Water samples for the identification of photolysis by-products from quinaphos were obtained by irradiation of 50 ml aqueous solutions of the pesticide for different exposure times: 0, 6, 12, 24 and 35 h. A sufficiently high concentration (10 mg l^{-1}) was used to allow the identification of minor phototransformation products. At the end of irradiation period samples were processed according to a well pre-established SPE methodology (Sakkas et al., 2002b). SDB extraction disks were selected as the sorbing phase since they provide good recoveries of medium polar products. The disks were conditioned, loaded with 50 ml of sample, dried and eluted. The eluates were combined and evaporated under a gentle stream of nitrogen to a final volume of 100 μl. Separation and identification of products was carried out by gas chromatography mass spectrometry (GC–MS).

The extracts remaining from the kinetic studies on soil (≈20 ml) were evaporated under a gentle stream of nitrogen to a final volume of 100 μl, in order to achieve the necessary concentration factor to identify minor reaction products. GC–MS chromatograms were obtained for the following irradiation periods: sandy loam soil—0, 32, 44 and 64 h; sandy soil—0 h, combined extracts at 2 + 4 + 8 + 12 h, combined 24 + 32 h and combined 44 + 64 h of irradiation.

2.3.2. Mass spectrometry analysis

Analysis of water and soil extracts was carried out in an Agilent 6890 (Palo Alto, CA, USA) gas chromatograph interfaced to an Agilent 5973N mass selective detector. The GC–MS system configuration and temperatures were

the same as previously described (Gonçalves and Alpendurada, 2005). One microliter of the concentrated extracts was injected in splitless mode, during 2.0 min. Potential degradation products present in the extracts were chromatographically resolved using the following oven temperature programme: initial temperature 40 °C (hold 5 min), increased at 5 °C min^{-1} to 210 °C (hold 2 min) and increased at 5 °C min^{-1} to 280 °C (hold 5 min). The MS was operated in electron impact mode and chromatographic data were acquired recording the full scan mass spectra in the range *m/z* 29–350. All GC–MS chromatograms were extensively searched for possible by-products arising from quinalphos's photolysis, using a set of indicative fragment ions related to the parent molecule (*m/z* 298, 270, 241, 193, 173, 157, 146, 129 and 118). Mass spectra corresponding to chromatographic peaks identified under these conditions were either searched against a Wiley 7.0 library reference data or the fragmentation pattern was directly interpreted.

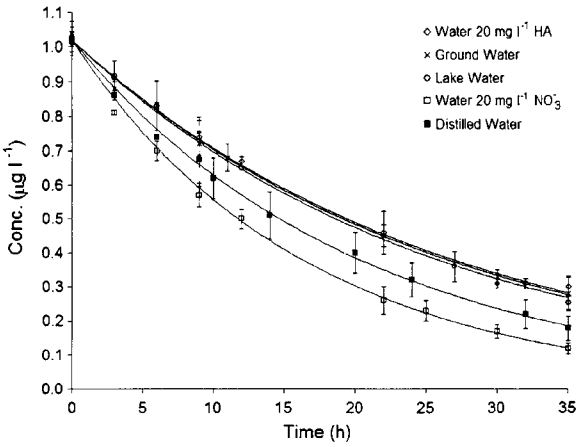


Fig. 1. Typical first-order degradation plots obtained in the photolysis of quinalphos in aqueous phase and under simulated solar irradiation conditions.

3. Results and discussion

3.1. Phototransformation kinetics in water

Studies were conducted to evaluate the rates of quinalphos's photolysis and the influence of natural water constituents that could accelerate or retard the photolytic process. In all cases, the degradation process appeared to fit well the first-order kinetic model. The estimated kinetic parameters are presented in Table 2, whereas degradation plots of quinalphos in the tested aqueous solutions are depicted in Fig. 1. Within the experimental error, no obvious degradation of quinalphos was observed in the dark during the experiments. This suggests that volatilisation and degradation due to hydrolysis or biodegradation are negligible. Half-lives of quinalphos's phototransformation ranged from 11.6 to 19.0 h depending on the water constitution. The photolysis of quinalphos in the natural waters was slower than in the distilled water. This phenomenon was directly related to the characteristics of the natural waters mainly in terms of dissolved organic matter and nitrate ions. These two naturally occurring constituents have been shown to be the primary species that affect the photochemical fate of a micropollutant in the environment. For this reason, it was our intention to see how each constituent (namely DOM and NO_3^-) affects the degradation kinetics of the target compound. Humic substances and nitrate ions are abundant water constituents capable of absorbing sunlight energy and promote indirect photochemical processes, via energy transfer and formation of active oxygen species (Fielding et al., 1992; Corin et al., 2000). Experiments with the same quinalphos concentration and humic acids at 20 mg l^{-1}, have shown an inhibition in the direct photolysis rate, compared to the distilled water. This retarded degradation rate could be attributed to the competitive light attenuation since organic matter absorbed most of the photons emitted, thereby slowing down direct photochemical reaction. Furthermore, a higher dissolved (DOM) and particulate organic matter content of the water samples corresponded to a higher degree of retardation. Such finding can be explained by sorption of the pesticide and migration into regions unavailable to photolysis or by quenching of the excited states of substrates by constituents of DOM in addition to the above referred effect. Being the primary light-absorbing species in surface water, DOM has been shown to either enhance (Larson and Weber, 1994; Sakkas et al., 2002c) or inhibit (Evgenidou and Fytianos, 2002; Dimou et al., 2004) the rate of photolysis. On the other hand, an acceleration in the reaction rate was observed when nitrate ions were present in the solution (20 mg l^{-1})

Table 2
Typical kinetic parameters of the first-order degradation model estimated for the photolysis of quinalphos in aqueous phase ($C_t = C_0 e^{-kt}$; C_t—concentration at time t, C_0—initial concentration, k—rate constant)

Water type	C_0 (µg l^{-1})	k_{app} (10^{-2} h^{-1})	k_{dark} (10^{-2} h^{-1})	$t_{1/2}$ (h)	Determination coefficients (r^2)
Distilled water	1.02	4.86 (4.62–5.09)[a]	0.03	14.35	0.998
Water 20 mg l^{-1} NO_3^-	1.02	6.07 (5.82–6.33)	0.09	11.59	0.998
Water 20 mg l^{-1} HA	1.02	3.67 (3.41–3.92)	0.03	19.04	0.992
Lake water	1.02	3.83 (3.72–3.94)	0.07	18.43	0.994
Groundwater	1.02	3.72 (3.47–3.96)	0.04	18.83	0.998

[a] The 95% confidence interval for k_{app} is given within parenthesis.

as illustrated in Fig. 1. Under these conditions an increase of the phototransformation rate by a factor of 1.2 was found compared to the distilled water, demonstrating a half-life of 11.6 h.

Summarizing, the photolytic fate of quinalphos in natural waters was primarily influenced by the presence of DOM, which was responsible for a decrease in the direct photochemical reaction due to an optical filter effect. Nevertheless, a sensitisation effect carried out by nitrate ions cannot be excluded, but it has not a predominant role.

3.2. Phototransformation kinetics in soil

Two soil samples of diverse physico-chemical properties containing quinalphos were submitted to irradiation in order to assess its photochemical behaviour on sorbed phase. Additionally, a 375 μm thick layer of SL soil, instead of 1 mm thickness, was prepared to have an indication of the soil depth effect on direct photolysis. The kinetic parameters obtained in such studies are presented in Table 3, whereas the corresponding kinetic plots are displayed in Fig. 2.

The photochemical behaviour of quinalphos in soil samples was characterized by the two step photoreaction (first-order equation) suggesting a biexponential decline model (Nose, 1987; Albanis et al., 2002; Frank et al., 2002). It is postulated that probably direct photolysis is prevalent in a first period (Photo 1) taking place on the upper layer of the soil, while in a second period (Photo 2) soil humic substances might be responsible for indirect photolysis, at deeper soil layers (Hebert and Miller, 1990; Albanis et al., 2002). The shape of the plots obtained for the various types of soil closely resembles the ideal depth-dependent relationship of direct photolysis rate in soils proposed by Hebert and Miller (1990). In this case, the photoprocess is represented by two curves with corresponding rate constants and initial concentration. Since the half-lives were attained in all cases in the Photo 2 step, a corrected rate constant was calculated by subtracting the rate constant due to hydrolysis, volatilisation, biodegradation and adsorption (dark experiment) to the rate constant of apparent photolysis (Photo 2). In the first hours of irradiation (Photo 1), a percent loss of quinalphos was 18% and 41% for the SL and S soils, respectively. After the changing point was reached the photolysis rate decreased significantly in Photo 2 step and a residual concentration was retained on soils for a long period of time, differing to a small extent to the dissipation rate found in darkness. If we consider that direct photolysis (dependent on the soil texture) is mainly responsible for Photo 1 step then, it seems logical that variation in the soil texture from SL to S has resulted in quite different direct photolysis rate constants of quinalphos. Conversely, rate constants for Photo 2 step (independent of soil texture) were similar for both soils. Indeed, the higher porosity of the sandy soil may explain the observed faster degradation rate as well as the higher amount of quinalphos degraded during the first hours of illumination. On the other hand, it is well accepted that higher amounts of organic matter present in soils, as it is the case of the SL soil, may be responsible for higher retention and protection of pesticides (Hebert and Miller, 1990; Albanis et al., 2002). Nevertheless, it has been reported that organic substances in soil like humic substances may be also capable of acting as sensitizers producing reactive intermediates contributing for the photolysis of pesticides via an indirect mechanism (Albanis et al., 2002). These reactive species would be responsible for the continuation of the photolytic process through diffusion in soil beyond the photolytic depth of soils. Direct photolysis has been estimated to be restricted to a superficial layer of 0.2–0.4 mm (Hebert and Miller, 1990) or until 0.5 mm (Graebing and Chib, 2004).

Table 3
Double first-order kinetic parameters (Photos 1 and 2) describing the photolysis of quinalphos in a sandy loam, sandy and sandy loam 375 μm in artificial sunlight exposed soil layers

Soil type		C_0 (mg kg^{-1}), y-intercept	k (10^{-2} h^{-1})	Determination coefficients (r^2)	$t_{1/2}$ (h)	Percentage loss Photo 1
Sandy loam soil	Photo 1	24.95	5.11	0.957	47.5	18%
	Photo 2	21.34[a]	1.44	0.976		
	Dark	24.5	0.31	0.771		
	Photo $2_{Correct}$		1.13			
Sandy soil	Photo 1	24.9	13.0	0.996	16.9	41%
	Photo 2	15.56[a]	1.83	0.956		
	Dark	24.5	0.51	0.877		
	Photo $2_{Correct}$		1.32			
Sandy loam 375 μm	Photo 1	24.81	20.0	0.998	16.1	41%
	Photo 2	15.07[a]	1.21	0.994		

Sandy loam soil—changing point Photo 1–Photo 2—4.25 h, $C_{0\ Photo\ 2}$— 20.34 mg kg^{-1}.
Sandy soil—changing point Photo 1–Photo 2—4.22 h, $C_{0\ Photo\ 2}$—14.72 mg kg^{-1}.
Sandy loam 375 μm—changing point Photo 1–Photo 2—2.65 h, $C_{0\ Photo\ 2}$—14.59 mg kg^{-1}.
[a] Please note that the y-intercept corresponds to C_0 value for the Photo 1 and dark curves, while the real C_0 value for the Photo 2 curve should be calculated at time 4.25, 4.22 and 2.65 h for the sandy loam, sand, and sandy loam 375 μm, respectively.

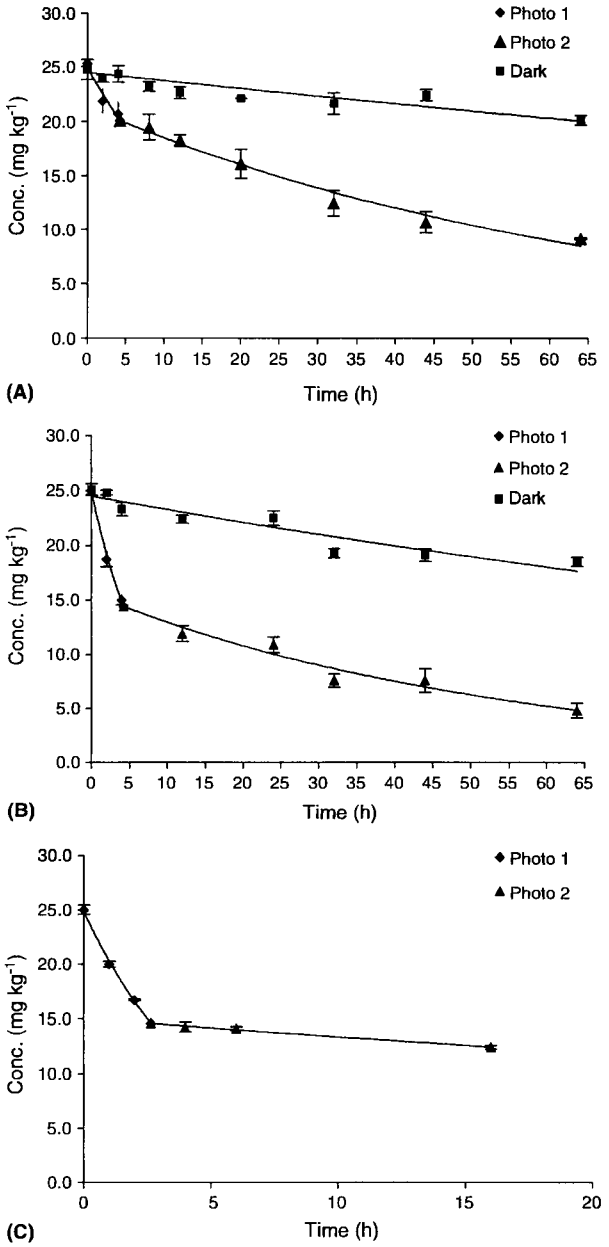


Fig. 2. Photochemical behaviour of quinalphos in soil and dissipation plots under simulated solar irradiation and darkness. A—SL soil, B—S soil, C—375 μm SL soil.

Interestingly, when a thinner SL soil layer (Fig. 2C) was used, the half life time of quinalphos decreased and the percent loss in Photo 1 period raised to a similar value as found in the S soil which is an evidence that quinalphos is shielded from photolysis at deeper soil layers. The calculation of the direct photolysis depth as proposed by Hebert and Miller (1990) gave values of 0.195 and 0.154 mm for the SL and 375 μm SL soils, respectively, due to their higher degree of compaction, when compared to a value of 0.434 mm for the S soil.

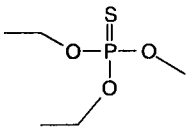
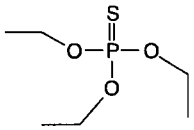
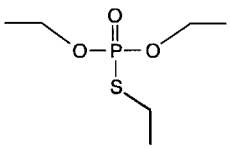
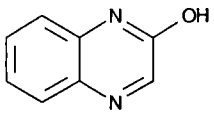
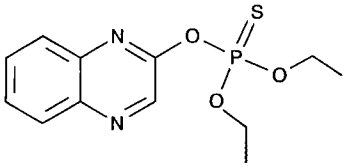
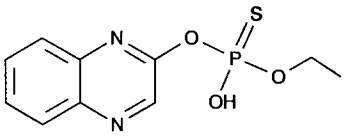
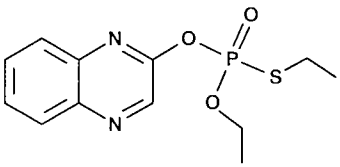
3.3. Phototransformation by-products

Only a few data are available regarding the isolation and identification of quinalphos's transformation products. Among these, Menon and Gopal (2003) and Babu et al. (1998) found that the principal metabolite formed in soils was 2-hydroxyquinoxaline. It was observed that this metabolite was formed through pH independent hydrolysis probably mediated by microbes, proceeding with further breakdown (Menon and Gopal, 2003) whereas 2-hydroxyquinoxaline was still present in significant amounts in soils after 20 days, in spite of complete degradation of the parent compound (Babu et al., 1998).

Following a SPE-GC–MS technique for irradiated water samples and sonication-GC–MS for soil samples, mass spectrum characteristics of tentative degradation products are presented in Table 4. The principal degradation products were formed from photohydrolysis of the O–P bond, which mainly generated compound (4) 2-hydroxyquinoxaline and trialkylphosphorothioates (1), (2) or trialkylthiophosphates (3), after molecular rearrangements. The formation of trialkylphosphorothioates has been previously reported (Chukwudebe et al., 1989; Burrows et al., 2002). Several authors achieved similar findings: Sakellarides et al. (2003) identified trialkylphosphorothioates from the phototransformation of methyl parathion, ethyl parathion and fenithothion (also Durand et al. (1994)); Konstantinou et al. (2001) reported measurable amounts of different trialkyl and dialkyl phosphorothioates during the photolytic degradation of dichlofenthion. Chukwudebe et al. (1989) produced a paper detailing the formation and toxicity of several trialkylphosphorothioates as phototransformation products of selected OPPs. *O,O*-diethyl-*O*-methylphosphorothioate was identified by GC–MS with high spectral fit (97%) and it was found as a major phototransformation product in soil samples. The same compound has been reported by Konstantinou et al. (2001) as a degradation product of dichlofenthion, an OPP similar to quinalphos.

Additionally, a chromatographic peak was found at higher retention time than quinalphos but with quite similar mass spectrum that we suppose to be formed from quinalphos upon O–S photoisomerization (compound 7), taking place only in water samples. A similar phototransformation mechanism has been described in the literature for methyl parathion, fenitrothion and dichlofenthion (Chukwudebe et al., 1989; Durand et al., 1994; Konstantinou et al., 2001; Sakellarides et al., 2003). 2-Hydroxyquinoxaline, *O,O′,S*-triethylthiophosphate and triethyl-phosphorothioate were found indistinctly in water and soil samples, while *O,O*-diethyl-*O*-methylphosphorothioate was found predominantly in soils. All the candidate degradation products referred hitherto were positively confirmed against a Wiley library with high spectral fit (>90%). Compound (6) was tentatively identified by interpretation of the mass spectrum. Although it seems likely the loss of an ethyl group from quinalphos giving rise to desethylquinalphos, its quantities were higher at the beginning of the

Table 4
Mass spectrum characteristics of tentative by-products as identified in photolysis studies carried out in water and soil matrices

Degradation product	R_t (min)[a]	M^+	Main fragment ions (*m/z*)
(1) *O,O*-diethyl-*O*-methylphosphorothioate 	16.4	**184**	156, 140, 129, 111, 107, 95, 79
(2) Triethylphosphorothioate 	18.3	**198**	170, 154, 143, 126, 121, 115
(3) *O,O',S*-triethylthiophosphate 	22.1	**198**	170, 154, 142, 138, 126, 109
(4) 2-Hydroxyquinoxaline 	32.5	**146**	118, 103, 91
(5) Quinalphos 	41.3	298	270, 241, 193, 173, 157, 146, 129, 118
(6) Desethylquinalphos 	43.2	270	241, 193, 178, 146, 129, 118
(7) Quinalphos *S*-ethyl isomer 	45.3	298	269, 241, 173, 157, 146, 129, 118

[a] R_t—retention time.

experiment (even at time 0). However, it was not initially present in quinalphos standard. This concentration pattern is not compatible with a photolysis product and it might have been formed by initial hydrolysis in water solution. Unlikely the reports of the formation of a quinoxaline-2-thiol metabolite in manured soils by Menon and Gopal (2003), such metabolite was not found in the present studies neither was the oxon-analogue of quinalphos. The formation of the latter is very detrimental under environmental conditions since it is well known that the oxygen analogues of OPPs are in general more toxic than the parent chemicals.

4. Conclusions

Quinalphos's kinetic behaviour in water can be described by the pseudo-first-order degradation model with half-life times varying from 11.6 to 19.0 h, under the

simulated solar irradiation conditions. In soil matrices, the two step pseudo-first-order photoreaction took place, fast in the first 4 h of irradiation, followed by a slow degradation rate up to 64 h and estimated half-lives ranged from 16.9 to 47.5 h, under artificial irradiation conditions. The soil depth available for direct photolysis was found to be less than 375 μm in SL soil. Due to a higher surface area exposed to irradiation and less organic matter, the degradation in sandy soil was faster than in less porous sandy loam soil. In both matrices, water and soil, organic matter provided a retarding effect on the photolysis rate. Such effect can be explained as competitive light absorption (optical filter) by water constituents, or adsorption and protection of pesticides on soil adsorbed phase. A slight sensitization effect was observed due to the presence of nitrate ions in water, however not to a great extent. The latter combined with the retardation effect of DOM in natural waters, indicate that probably quinalphos is not susceptible to indirect photolytic reactions in a significant extent under environmental conditions.

Several transformation products were formed in the photolytic process. In addition to 2-hydroxyquinoxaline, trialkylphosphorothioates, trialkylphosphates and quinalphos S-ethyl isomer were identified.

Acknowledgements

FCT—Fundação para Ciência e Tecnologia is greatly acknowledged for the Ph.D. grant PRAXIS XXI/BD/21823/99. The authors would like to thank the IAREN for technical and financial support as well as E.P.E.A. E.K-HRAKLEITOS grants supported by the Ministry of National Education and Religious Affairs. The editor and reviewers are thanked for their effort and contribution to the improvement of the paper content.

References

Ahel, M., Scully Jr., F.E., Hoigni, J., Giger, W., 1994. Photochemical degradation of nonylphenol and nonylphenol polyethoxylates in natural waters. Chemosphere 28, 1361–1368.

Albanis, T.A., Bochicchio, D., Bufo, S.A., Cospito, I., D'Auria, M., Lekka, M., Scrano, L., 2002. Surface adsorption and photo-reactivity of sulfonylurea herbicides. Int. J. Environ. Anal. Chem. 82, 561–569.

Babu, G.V.A.K., Reddy, B.R., Narasimha, G., Sethunathar, N., 1998. Persistence of quinalphos and occurrence of its primary metabolite in soils. B. Environ. Contam. Toxicol. 60, 724–731.

Burrows, H.D., Canle, L.M., Santaballa, J.A., Steenken, S., 2002. Reaction pathways and mechanisms of photodegradation of pesticides. J. Photochem. Photobiol. B 67, 71–108.

Chukwudebe, A., March, R.B., Othman, M., Fukuto, T.R., 1989. Formation of trialkylphosphorothioate esters from organophosphorous insecticides after exposure to either ultraviolet light or sunlight. J. Agric. Food Chem. 37, 539–545.

Corin, N.S., Backlund, P.H., Kulovaara, M.A.M., 2000. Photolysis of the resin acid dehydroabietic acid in water. Environ. Sci. Technol. 34, 2231–2236.

Das, A.C., Chakravarty, A., Sen, G., Sukul, P., Mukherjee, D., 2005. A comparative study on the dissipation and microbial metabolism of organophosphate and carbamate insecticides in orchaqualf and fluvaquent soils of West Bengal. Chemosphere 58, 579–584.

Dimou, A.D., Sakkas, V.A., Albanis, T.A., 2004. Photodegradation of trifluralin in natural waters and soils: degradation kinetics and influence of organic matter. Int. J. Environ. Anal. Chem. 84, 173–182.

Durand, G., Abad, J.L., Sanchez-Baeza, F., Messeguer, A., Barcelo, D., 1994. Unequivocal identification of compounds formed in the photodegradation of fenitrothion in water/methanol and proposal of selected transformation pathways. J. Agric. Food Chem. 42, 814–821.

Evgenidou, E., Fytianos, K., 2002. Photodegradation of triazine herbicides in aqueous solutions and natural waters. J. Agric. Food Chem. 50, 6423–6427.

Fielding, M., Barceló, D., Helweg, A., Galassi, S., Torstensson, L., van Zoonen, P., Wolter, R., Angeletti, A., 1992. Pesticides in ground and drinking water, water pollution research report 27, in: Commission of the European Communities, Brussels, p. 16.

Frank, M.P., Graebing, P., Chib, J.S., 2002. Effect of soil moisture and sample depth on pesticide photolysis. J. Agric. Food Chem. 50, 2607–2614.

Gonçalves, C., Alpendurada, M.F., 2004. Solid-phase microextraction-gas chromatography-(tandem) mass spectrometry as a tool for pesticide residue analysis in water samples at high sensitivity and selectivity with confirmation capabilities. J. Chromatogr. A 1026, 239–250.

Gonçalves, C., Alpendurada, M.F., 2005. Assessment of pesticide contamination in soil samples from an intensive horticulture area using ultrasonic extraction and gas chromatography–mass spectrometry. Talanta 65, 1179–1189.

Graebing, P., Chib, J.S., 2004. Soil photolysis in a moisture- and temperature-controlled environment. 2 Insecticides. J. Agric. Food Chem. 52, 2606–2614.

Hebert, V.R., Miller, G.C., 1990. Depth dependence of direct and indirect photolysis on soil surfaces. J. Agric. Food Chem. 38, 913–918.

Hultgren, R.P., Hudson, R.J.M., Sims, G.K., 2002. Effects of soil pH and soil water content on prosulfuron dissipation. J. Agric. Food Chem. 50, 3236–3243.

Konstantinou, I.K., Sakellarides, T.M., Sakkas, V.A., Albanis, T.A., 2001. Photocatalytic degradation of selected *s*-triazine herbicides and organophosphorous insecticides over aqueous TiO_2 suspensions. Environ. Sci. Technol. 35, 398–405.

Larson, R.A., Weber, E.J., 1994. In: Reaction Mechanisms in Environmental Organic Chemistry. CRC Press, Boca Raton, FL, pp. 359–413.

Liu, B., McConnell, L.L., Torrents, A., 2001. Hydrolysis of chlorpyrifos in natural waters of the Chesapeake Bay. Chemosphere 44, 1315–1323.

Menon, P., Gopal, M., 2003. Dissipation of ^{14}C carbaryl and quinalphos in soil under a groundnut crop (*Arachis hypogaea* L.) in semi-arid India. Chemosphere 53, 1023–1031.

Mill, T., 1999. Predicting photoreaction rates in surface waters. Chemosphere 38, 1379–1390.

Nose, K., 1987. A multi-site decay model of pesticide in soil. J. Pestic. Sci. 12, 505–508.

Ragnarsdottir, K.V., 2000. Environmental fate and toxicology of organophosphate pesticides. J. Geol. Soc. London 157, 859–876.

Sakellarides, T.M., Siskos, M.G., Albanis, T.A., 2003. Photodegradation of selected organophosphorous insecticides under sunlight in different natural waters and soils. Int. J. Environ. Anal. Chem. 83, 33–50.

Sakkas, V.A., Lambropoulou, D.A., Albanis, T.A., 2002a. Study of chlorothalonil photodegradation in natural waters and in the presence of humic substances. Chemosphere 48, 939–945.

Sakkas, V.A., Lambropoulou, D.A., Sakellarides, T.M., Albanis, T.A., 2002b. Application of solid-phase microextraction for monitoring the photocatalytic decomposition of fenthion and parathion in aqueous TiO_2 suspensions. Anal. Chim. Acta 467, 233–243.

Sakkas, V.A., Konstantinou, I.K., Albanis, T.A., 2002c. Aquatic phototransformation study of the antifouling agent Sea-Nine 211: identification of byproducts and reaction pathway by gas chromatography–mass spectrometry. J Chromatogr. A 959, 215–227.

Tomlin, C.D.S., 1999–2000. The e-Pesticide Manual, 11th edition, Version 1.1, British Crop Protection Council, UK.

8.2 AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE DE ALGUNS PESTICIDAS UTILIZANDO UM BIOSSENSOR ELECTROQUÍMICO CONTENDO A *PSEUDOMONAS PUTIDA* E UM ENSAIO DE INIBIÇÃO DA BIOLUMINESCÊNCIA COM O *VIBRIO FISCHERI*

Com base na publicação:

Farré, M., Gonçalves, C., Lacorte, S., Barceló, D., Alpendurada, M.F. – Pesticide toxicity assessment using an electrochemical biosensor with *Pseudomonas putida* and a bioluminescence inhibition assay with *Vibrio fischeri*. Anal. Bioanal. Chem. 373 (2002) 696-703

Anal Bioanal Chem (2002) 373:696–703
DOI 10.1007/s00216-002-1313-z

SPECIAL ISSUE PAPER

M. Farré · C. Gonçalves · S. Lacorte · D. Barceló
M. F. Alpendurada

Pesticide toxicity assessment using an electrochemical biosensor with *Pseudomonas putida* and a bioluminescence inhibition assay with *Vibrio fischeri*

Received: 5 December 2001 / Revised: 11 February 2002 / Accepted: 11 April 2002 / Published online: 4 July 2002
© Springer-Verlag 2002

Abstract Two different toxicity tests, an electrochemical biosensor Cellsense and a bioluminescence inhibition assay ToxAlert were performed in order to establish and compare the acute toxicity responses of different types of raw and spiked water for a selected group of pesticides. The selected compounds were endosulfan, chlorfenvinphos, dimethoate, fenamiphos, ametryn, deltamethrin and α-cypermethrin; all of them are used in large quantities for agricultural purposes. In the first step, the study of the toxicity responses for each individual pesticide with Milli-Q water was carried out. Next, the toxic responses of different mixtures of these pesticides in different water matrices, i.e., Milli-Q water, surface water, groundwater and wastewater were studied in order to evaluate (i) device advantages and limitations for the toxicity evaluation of real environmental samples, (ii) antagonistic or synergistic effects and (iii) the influence of the water matrices. The survey of pesticides in real samples was carried out using a combined method involving both chemical analysis and toxicity bioassays. Chemical analysis involved the use of solid-phase micro-extraction (SPME) followed by gas chromatography with electron capture detection (GC/ECD) or thermoionic specific detection (GC/TSD) with mass spectrometric confirmation (GC/MS).

Introduction

Tons of pesticides are produced and used every year for control of pests, and in agriculture and horticulture. Wastewater from greenhouses and runoff from agricultural land can reach and contaminate rivers, lakes and groundwater. Pesticides and other organic pollutants have been detected in receiving bodies of water, at µg/L levels. However, one of the limitations of chemical analysis is that when used alone, it does not provide an entire response of the effects organic pollutants may have on the environment. Therefore, its use in conjunction with techniques that can measure biological effects, such as toxicity tests, is highly recommended [1,2] in order to establish risk assessment practices. The present paper reports on a combined method using toxicity tests and chemical analysis, in order to evaluate the occurrence and aquatic toxic impact of a selected group of pesticides of different chemical families. This protocol has been applied to different types of water to evaluate the performance of both toxicological and analytical methods.

The compounds studied were organochlorine, organophosphorus, a triazine, and pyrethroid pesticides, all of them of widespread use in many countries. The pesticides fenamiphos, chlorfenvinphos and endosulfan are very toxic to mammals and are classified by the Environmental Protection Agency (EPA) as restricted use pesticides (RUP) or class I, whereas dimethoate, deltamethrin and cypermethrin are moderately toxic to mammals, i.e. EPA toxicity class II. Ametryn is an unrestricted pesticide, toxicity class III, that means slightly toxic [3].It is relatively nontoxic to mammals and fish [4] but highly toxic to crustaceans and mollusks [5]. From the selected compounds, chlorfenvinphos and endosulfan are priority pollutants included in the new Framework Directive on Pollution of the European Union, and in 1984 endosulfan was classified as a hazardous chemical by the World Heath Organization (WHO) [6]. Its use as an insecticide in a wide variety of food crops including fruits, vegetables and cereals has somewhat increased recently due to decline in the use of other insecticides such as endrin. During 1999, 85 t of this compound were applied in Portugal alone. In many countries the use of endosulfan is restricted due to acute toxicity towards aquatic animals [7] and has been replaced by organophosphorus pesticides. Among the most common ones, chlorfenvinphos and dimethoate are widely used as insecticides and acaricides whereas fenamiphos is one of

M. Farré · S. Lacorte (✉) · D. Barceló
Department of Environmental Chemistry, IIQAB-CSIC,
Jordi Girona 18-26, 08034 Barcelona, Spain
e-mail: slbqam@cid.csic.es

C. Gonçalves · M.F. Alpendurada
Laboratory of Hydrology, Faculty of Pharmacy,
University of Porto/R. Anibal Cunha 164,
4050-047 Porto, Portugal

the most prominent nematicide. About 7 t of chlorfenvinphos and 68 t of dimethoate were applied in Portugal during 1999. The group of organophosphate compounds are nowadays the most widely used group of insecticides in the world, especially in developing countries because they are cheaper than the newer alternatives like synthetic pyrethroids.

As many other triazines, ametryn is a selective herbicide used on corn and potatoes for general weed control. The main problem presented for this pesticide is its persistence in groundwater. It moves both vertically and laterally in soil due to its high water solubility. It may leach as a result of high rainfall, floods, and furrow irrigation [8]. In general, the widespread application of s-triazine herbicides often leads to their presence in fresh water [9,10] and marine coastal environments [11].

Two synthetic pyrethroids were included in the present work, deltamethrin and α-cypermethrin. The synthetic pyrethroids are widely used for control of public-health pest, household insects, insects on crops and animal ectoparasites, etc., because of their general low toxicity to birds and mammals. Cypermethrin has become one of the most important insecticides in wide-scale use. Nevertheless, it is highly toxic to fish and aquatic invertebrates. The 50% lethal concentration (LC_{50}) (96 h) for cypermethrin in rainbow trout is 0.0082 mg/L and in bluegill sunfish 0.0018 mg/L [12]. The 50% effective concentration (EC_{50}) in *Daphnia magna*, a freshwater crustacean, is 0.0002 mg/L [10]. Under normal environmental temperatures and pH, cypermethryn is stable to hydrolysis, with a half-life greater than 50 days and to photodegradation, with half-life greater than 100 days [13], and it is more persistent in anaerobic conditions, such as occurs in groundwater. Like cypermethrin and other pyrethroids, the use of deltamethrin increases every year, in particular in developed countries for agricultural, public health and livestock applications, but it is highly toxic to fish under laboratory conditions and has a high impact on aquatic fauna, particularly on crustacean.

All these compounds are present alone or as complex mixtures with other compounds in different types of water , according to the formulations or uses. Therefore, the first step of this work was the toxicity evaluation of each of the selected pesticides by studying toxic responses, defined by the EC_{50} and the toxicity units (TU). In order to do this, two different systems Cellsense and ToxAlert100 were compared using different test species, *Pseudomonas putida* immobilized on screen printed electrodes and *Vibrio fischeri*, respectively. Next, the toxic responses of mixtures of these pesticides were evaluated by both tests in different water matrices such as, Milli-Q water, surface water, groundwater and wastewater in order to evaluate the limitations of the toxicity tests for the analysis of environmental samples. At the same time, antagonistic or synergistic effects between different mixtures of pesticides and the influence of the water matrices were evaluated. All studies involving pesticide determination in surface, ground and wastewater samples were performed by a combined method involving toxicity evaluation and chemical analysis based on solid-phase micro-extraction (SPME) coupled with gas chromatography with electron capture detection (GC/ECD) or thermoionic specific detection (GC/TSD), with mass spectrometric confirmation (GC/MS).

This work is part of the Toxicity Identification Evaluation (TIE) Program that has been developed at our Department, intended to combine effect-related assays with chemical analysis. The final goal is to establish correlations between toxicity values and specific pollutants. To our knowledge, such a study on real environmental waters has not been previously performed.

Experimental

Chemical and reagents

Pure pesticides were supplied by Riedel-de-Haën (Seelze, Germany). Individual standard stock solutions at a concentration about 1000 mg/L were prepared in methanol, that is the solvent recommended for use with toxicity tests and can be tolerated by the bacteria at a max. conc. of 10%. All solvents used were of LiChrosolv gradient grade purchased from Merck KGaA (Darmstadt, Germany). Ultrapure Milli Q water (Millipore SA, Molsheim, France) and NaCl of analytical reagent grade from Panreac (Barcelona, Spain) were used to prepare a 0.85% saline solution for Cellsense experiments. *Pseudomonas putida* (ST02/I.NB/280300) biosensors and freeze-dried substrate were obtained from Terra Nova Systems, (Cambridge, UK). Liquid-dried photo-bacteria reagent *Vibrio fischeri* NRRL B-111 77 was kindly supplied by Merck KGaA (Darmstadt, Germany).

Toxicity tests

Two types of acute toxicity measurements based on the use of bacteria as a test species were used to assess the toxic effect of selected pesticides. Cellsense is an amperometric biosensor [14] which measures the electrical current produced by the bacteria's electron transport chain, the current generated being proportional to the level of metabolic activity of the cells. An electron mediator is added to the sample in order to provide a current flow between the bacterial cells immobilized on a screen-printed electrode and the transducer. This device is able to give a continuous signal monitored at very short time intervals over a chosen length of time. The toxicity of the standard/sample is determined by measuring the degree of inhibition of the biosensor signal after a fixed time of exposure, with respect to the control biosensor. Different bacterial species can be immobilized on the electrodes. Further details and operation of the equipment can be found elsewhere [14,15]. In this work we used *P. putida* as the biological component, described for the first time by M. Farré et al. [16], and all toxicity measurements refer to a 30 min exposure.

The second type of acute toxicity measurements were based on the bioluminescence inhibition of *Vibrio fischeri* NRRL B-111 77 by means of the ToxAlert 100 system from Merck. This is a well-established test extensively described in the literature [17, 18,19] and similar in principle to the better-known Microtox test. Toxic substances will cause changes in cell structures and/or metabolic pathways of marine *V. fischeri*, which are rapidly reflected in a decrease of bioluminescence. Inhibition due to the toxic effect of the sample is calculated against the response given by a saline control solution, which accounts for natural decrease in light. Data were collected after 15 and 30 min exposure times.

In all cases, individual pesticides were diluted in methanol first and working solutions between 0.3 and 14 mg/L were prepared in HPLC water in order not to exceed the maximum allowed percentage of methanol (10%). The inhibition curve of each individual compound was fitted determining the inhibition produced over a wide range of concentrations. The EC_{50} of each substance can then be determined along with TUs of standard substances, calculated according to the formula of Sprague and Ramsay (1965) [20]:

$$TUs = (EC_{50})^{-1} \times 100 \quad (1)$$

Chromatographic analysis

Determination of pesticides in water samples was performed by SPME using a 60 μm PDMS/DVB-coated fiber, coupled with GC/ECD and GC/TSD. Extractions were achieved by immersion of the fiber in 3 mL of sample, with permanent stirring at 60 °C. Neither pH adjustment nor ionic strength correction was needed. Analytes were allowed to adsorb onto the fiber for 60 min, and afterwards desorbed in the hot injection port of the gas chromatograph, for 5 min.

Chromatographic analyses were carried out in a Varian 3400 CX (Walnut Creek, USA) gas chromatograph. The injector and detector temperatures were set at 250 and 310°C isothermal, respectively. All compounds were resolved in a MDN-5 column (30 m×0.32 mm id×0.25 μm film) (Supelco, Bellefonte, USA) using helium as the carrier gas and detected either by ECD or TSD operating at 3.2 A intensity. An adjustable splitter (SGE Europe Ltd., Milton Keynes, UK) was inserted at the column exit in order to divert about a tenth of the effluent flow to ECD and the remaining to TSD. This instrumental configuration was optimized for the determination of 34 pesticides in a single 30-min chromatographic run following a single extraction procedure.

Confirmatory analysis was performed in a Varian Saturn 2000 GC/MS equipped with a CPSil 8 CB low bleed MS column (30 m×0.25 mm id×0.25 μm film) (Varian Chrompack Int., Middelburg, Netherlands). Following a previous extraction and concentration procedure according to the same SPME protocol described above, chromatographic separation took place and mass spectrometric data were acquired in full scan mode for spectra analysis.

Study of matrix effect

Water samples with different organic carbon content, namely surface water from the river Llobregat (TOC of 29.7 mg/L), groundwater from a well in Barcelona (TOC 2.0 mg/L) and WWTP effluent (treated wastewater) from Igualada (Spain) (TOC 230.3 mg/L) were chemically characterized using SPME and GC-ECD, and GC-MS, as described. These natural and spiked water samples were used to determine possible matrix effect with both Cellsense and ToxAlert. The spiking experiments were carried out with different mixtures in order to obtain the following final concentrations in each type of water. Mixture M1: 1.5 mg/L endosulfan, 14 mg/L dimethoate, 8 mg/L fenamiphos and 5 mg/L ametryn. Mixture M2: 1.5 mg/L endosulfan, 14 mg/L dimethoate, 8 mg/L fenamiphos, 5 mg/L ametryn and 5 mg/L chlorfenvinphos, and mixture M3: 0.364 mg/L endosulfan, 0.364 mg/L dimethoate, 0.364 mg/L fenamiphos and 0.364 mg/L ametryn.

Groundwater assessment

Five groundwater samples from Póvoa de Varzim, an area of intensive agriculture in Portugal, were collected by pumping water from a well. The wells were from 4 to 10 m in depth. These samples were analyzed following the analytical protocol indicated above and their acute toxicity was assessed in terms of ToxAlert and Cellsense analysis.

3. Results and discussion

ToxAlert 100 and Cellsense performance

The use of luminescent bacteria as a toxicity test species presents many advantages such as, rapid, simple, sensitive and cost-effective analysis, however, some disadvantages and some particular characteristics must be mentioned. For the good performance of the luminescence assay (ToxAlert), a filtration step is necessary prior to every test, and it must work in 2% saline solution in order to maintain the osmotic pressure of *V. fischeri*. As a consequence of salinity, the insolubility of some organic substances are enhanced producing turbid solutions. In these cases, the luminometer's measure is lower than the luminescence produced by *V. fischeri*, because photons are partially dispersed when they interact with colloids. This was inconvenient for synthetic pyrethroids because the more concentrated solutions exhibited significant turbidity. In addition, precaution has to be taken with the solvent used and its concentration in the solution. The maximum percent of methanol accepted for the test is 10%.

As regards to Cellsense, the bacterial biosensor, it allows the use of different test species to investigate specific groups of toxins, and proper selection of the organism is essential. Some bacteria species are especially sensitive to specific groups of substances, nevertheless the same species can present high resistance to others sub-

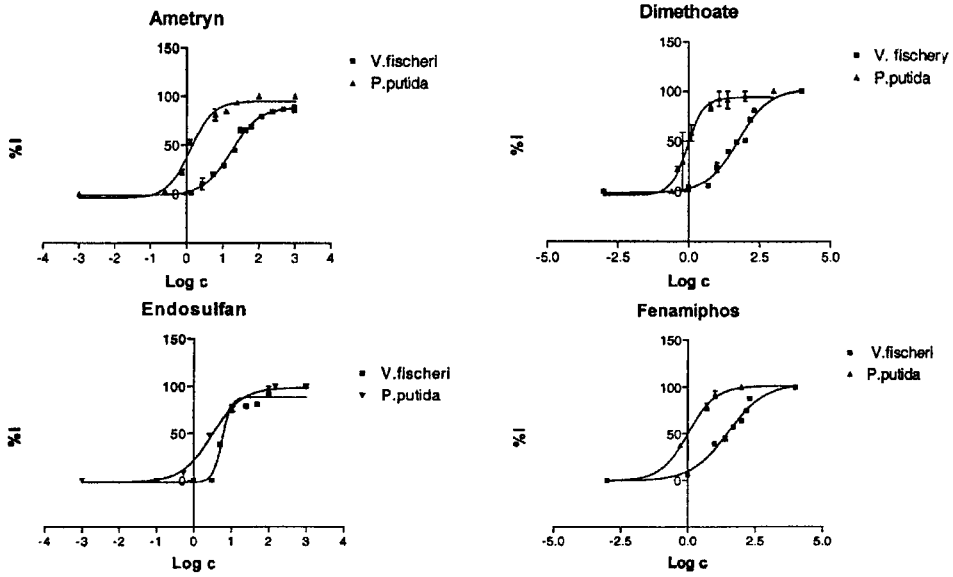


Fig. 1 *Pseudomonas putida* and *Vibrio fischeri* inhibition curves for standard substances after 30 min exposure. The curves show the percent of inhibition vs. the logarithm concentration (c), expressed in µg/ml

stances. Measurements using the Cellsense system are not disrupted by turbidity, even when measuring suspensions, which is an advantage, especially for wastewater samples. On the other hand, the measurable solutions must be free of particles, which can precipitate on the electrode or electrochemical active sites.

Taking into consideration the precautionary actions mentioned above, Fig. 1 shows the inhibition curves obtained by Cellsense and ToxAlert 100 for four selected pesticides after a 30-min exposure time. It can be observed that *P. putida* was more rapidly saturated than *V. fischeri*, indicating a smaller linear range, but *P. putida* was much more sensitive to the compounds studied. Table 1 indicates the EC_{50}, TU, goodness of fit (R^2), standard deviation (Sy, x) and the theoretical equations corresponding to the fitted curves, for *V. fischeri* and *P. putida* after 30 min exposure. As regards to the quality parameters indicated in Table 1, the toxicity responses using ToxAlert 100 and *V. fischeri* showed high reproducibility with a standard deviation of 8.8%, while this value for Cellsense was 19.9%. For the selected pesticides, *P. putida* gave values ranging between 2.8 and 113 TUs, whereas, for *V. fischeri* the TUs were between 0.9 and 18. With *V. fisheri*, the highest TU corresponded to endosulfan, followed by ametryn, indicating high acute toxicity. As expected, the pyrethroids presented the lowest values, a result which was corroborated by the Cellsense analysis. The low acute toxicity of pyrethroids supports their safer use in more and more applications, especially domestic ones. Using Cellsense, the compounds which showed the highest toxicity were the organophosphorus pesticides due to inhibition of the cellular response. However, the organophosphorus pesticide chlorfenvinphos could not be measured using the bacterial biosensor Cellsense due to the fact that this compound is electrochemically active. Chlorfenvinphos acts as a redox substance interfering in the electronic interchange between the mediator and the transducer producing an over signal and in such cases, inhibition cannot be measured. In mixtures containing this kind of compound the inhibition measured will be lower than the real value. This constitutes a limitation of the system and it is necessary to use electrodes without bacteria immobilized on them in order to check if a substance, real sample, or mixture is electrochemically active. For this reason, chlorfenvinphos was eliminated from the mixtures tested using Cellsense.

Matrix effect

Subsequently, the toxic responses using both systems for four different water matrices, Milli-Q, groundwater, river water and a wastewater effluent from a wastewater treatment plant (WWTP) was determined. The toxicity values are reported in Table 2, expressed as %I of these water samples. Chemical analysis of these water samples was also performed, and compounds encountered and their concentration are also indicated in Table 2. Milli-Q and groundwater samples were non-toxic, with inhibition values lower than 10% and the results were similar for both systems. Nevertheless, river water contained 0.15 µg/L diazinon which was not detected by the toxicity tests. In contrast, raw wastewater showed inhibition using both systems (18.2% with ToxAlert 100 and 15% with Cellsense). This increase in toxicity was attributed to the presence of 0.19 and 0.74 µg/L diazinon and fenitrothion, as confirmed with chemical analysis. The higher value with ToxAlert 100 could be partially influenced by the slight yellow color of the wastewater effluent.

These 4 different types of water were then spiked with the mixtures M1, M2 and M3 in order to evaluate the matrix effect using ToxAlert 100 and Cellsense (only M3). By performing the analysis with spiked water, two different phenomena were observed: on one hand, the inhibition of mixtures of pesticides was lower, in all types of

Table 1 50% Effective concentration (EC_{50}), toxicity units (TU), goodness of fit (R^2), standard deviation (Sy.x) and theoretical equations corresponding fitted curves for *V. fischeri* and for *P. putida* after 30 min exposure time

Compound	ToxAlert 100 *V. fischeri*					Cellsense *P. putida*				
	EC_{50} (µg/ml)	TU	R^2	$S_{y.x}$	Equation	EC_{50} (µg/ml)	TU	R^2	$S_{y.x}$	Equation
Ametryn	18.64	5.4	0.984	4.24	$\%I=-1.8030+(94.482/[1+10^{(1.270-LogC)1.270}])$	1.00	45.3	0.988	6.40	$\%I=-1.9306+(94.5500/[1+10^{(0.00119-LogC)0.7017}])$
Chlorfenvinphos	24.59	4.1	0.994	3.13	$\%I=1.2211+(103.3184/[1+10^{(1.3907-LogC)0.9501}])$	—	—	—	—	—
Cypermethrin	110.36	0.91	0.9596	8.82	$\%I=-0.6063+(102.2582/[1+10^{(2.0428-LogC)1.7789}])$	36.1	2.8	0.913	11.89	$\%I=0.0738+(104.1865/[1+10^{(1.5579-LogC)9.3358}])$
Deltamethrin	100.84	0.99	0.9748	7.54	$\%I=-0.7164+(100.5356/[1+10^{(2.0036-LogC)2.3450}])$	28.0	3.6	0.964	17.58	$\%I=4.2458+(102.0965/[1+10^{(1.4465-LogC)6.2783}])$
Dimethoate	55.46	1.8	0.9723	6.11	$\%I=-1.2716+(103.5049/[1+10^{(1.744-LogC)0.7854}])$	0.888	113	0.869	19.89	$\%I=-2.0323+(94.9771/[1+10^{(-0.08545-LogC)2.4511}])$
Endosulfan	5.63	17.8	0.9760	7.16	$\%I=-2.1418+(90.8013/[1+10^{(0.7503-LogC)1.9110}])$	3.38	29.6	0.993	7.01	$\%I=-1.8042+(103.8334/[1+10^{(0.5304-LogC)1.0073}])$
Fenamiphos	31.63	3.2	0.9791	5.12	$\%I=-0.3604+(104.3080/[1+10^{(1.5001-LogC)0.6352}])$	0.928	109	0.997	4.74	$\%I=-0.0806+(102.6248/[1+10^{(-0.0145-LogC)0.9287}])$

Table 2 Toxicity values expressed as %I for four different water matrices using ToxAlert 100 with *V. fischeri* and Cellsense with *P. putida*. Chemical identification of pesticides was performed with solid-phase micro-extraction (SPME) followed by gas chromatography with electron capture detection (GC/ECD) or thermoionic specific detection (GC/TSD) with mass spectrometric confirmation (GC/MS). n.d.=not detected

Compound	ToxAlert 100 *V. fischeri* %I	Cellsense *P. putida* %I	Chemical characterization (µg/L)
Milli-Q	<5	<10	n.d.
Groundwater	<5	<10	n.d.
River water	<5	<10	0.15 Diazinon
Wastewater	18.2	15	0.19 Diazinon, 0.74 Fenitrothion

water, than the inhibition expected as a result of the compounded individual toxicity values (additive approach). On the other hand, the inhibition of spiked wastewater was similar to other types of water, despite the fact that the wastewater itself had an initial inhibition of 18%.

In Fig. 2, the bioluminescence obtained in raw and spiked water together with the bioluminescence percentage considering a simple additive approach are represented. In all cases, the standard deviation was below 10% for *V. fischeri* and below 20% for *P. putida*. With ToxAlert 100, according to the additive approach with the sigmoid equations adjusted for each substance, the percentage of bioluminescence inhibition predicted for mixture M1 was 73% and 92% for M2. When comparing the measured percentage of inhibition of spiked water and the theoretically calculated value considering the additive approach, in all cases lower values were encountered. This indicates an antagonistic effect between these pesticides caused by associations between pesticide molecules which decrease their bioavailability. This effect rises in M2 where the total concentration of pesticides was higher and the polarity of the mixture was lower. However for Milli-Q and groundwater, the toxicity increased when the number of pesticides in the mixture was increased (from M1 to M2), indicating that for water free of interferences, the test can identify differences of concentration of 28 to 33 mg/L. However, this increase in toxicity was not observed when analyzing spiked river and wastewater with the same mixtures. This difference can be explained by the matrix effect due to the organic material in the water, where pesticides, often with a high K_{ow} (e.g. endosulfan has a log K_{ow} 4.7), are adsorbed on the particulate matter and their availability is therefore decreased. This effect was more evident in the case of wastewater, where the percentage of inhibition of spiked water with M1 and M2 was similar to the rest of spiked water samples and lower than expected (fenitrothion and diazinon were present in this water), indicating a matrix contribution to the toxicity values. This is due to the fact that ToxAlert is a spectrometric measurement where the water type can influence its sensitivity.

A parallel experiment was carried out using Cellsense and *P. putida*, the results are shown in Fig. 3. A mixture

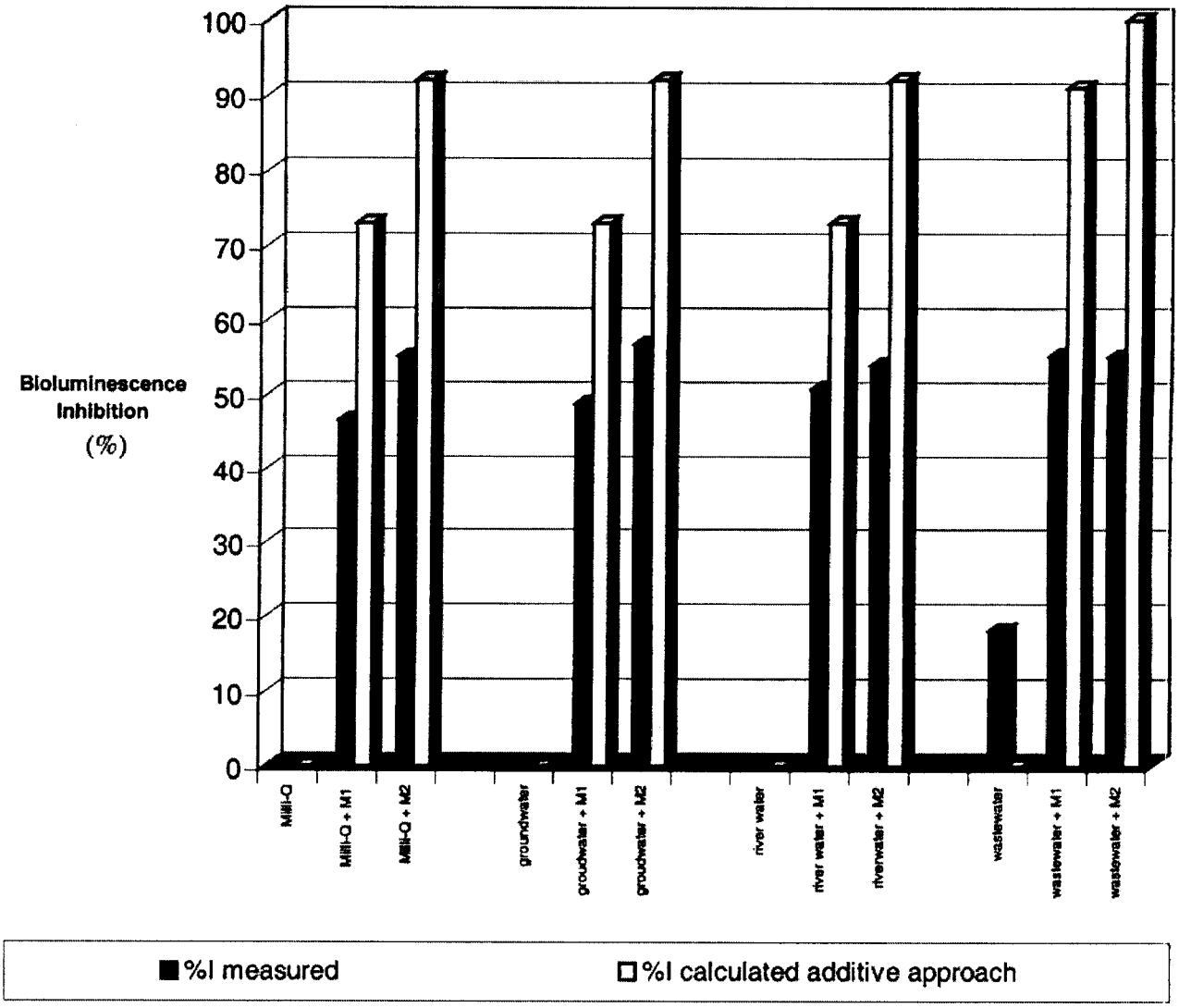


Fig. 2 Toxicity expressed as percentage of bioluminescence inhibition of *Vibrio fischeri* for four different types of water, without spiking and spiked with pesticide mixtures M1 and M2. The measured results are presented together with the calculated toxicity values according to an additive approach which considers the individual pesticides involved and the initial toxicity of the water

M3 containing endosulfan, dimethoate, fenamiphos, and ametryn as for M1 but at much lower concentrations was used to spike the water matrices, in order to obtain suitable percentages of inhibition calculated for Cellsense and *P. putida*. Contrary to what was found with ToxAlert, in this experiment the theoretical and measured percentages of inhibition were not significantly different, especially for water with low carbon content, and no antagonistic effects were found. For Milli-Q, groundwater and surface water, a slightly higher measured inhibition compared to theoretical was found. This was attributed to the fact that at this low concentration there are no associations between pesticide molecules in water free of interferences and they do not affect the toxicity measurement causing antagonistic effects. It has to be pointed out that using this system, a total pesticide concentration in the low mg/L range could be detected. However, in the case of wastewater, the raw water itself presented 15% inhibition, caused as mentioned by the presence of fenitrothion and diazinon. In this case, the measured concentration was lower than the theoretical concentration, similarly to what was found with ToxAlert, indicating a certain matrix effect due to the high total organic carbon (230 mg/L) of this effluent that hid the toxicity assignment of wastewater even though Cellsense is an electrochemical sensor not influenced, in principle, by turbidity.

Real samples

Finally, chemical characterization along with toxicity tests were applied for the assessment of groundwater from agricultural areas. The results are reported in Table 3, where it can be observed that chlorfenvinfos was found in two samples at levels of 0.2 and 0.3 μg/L while endosul-

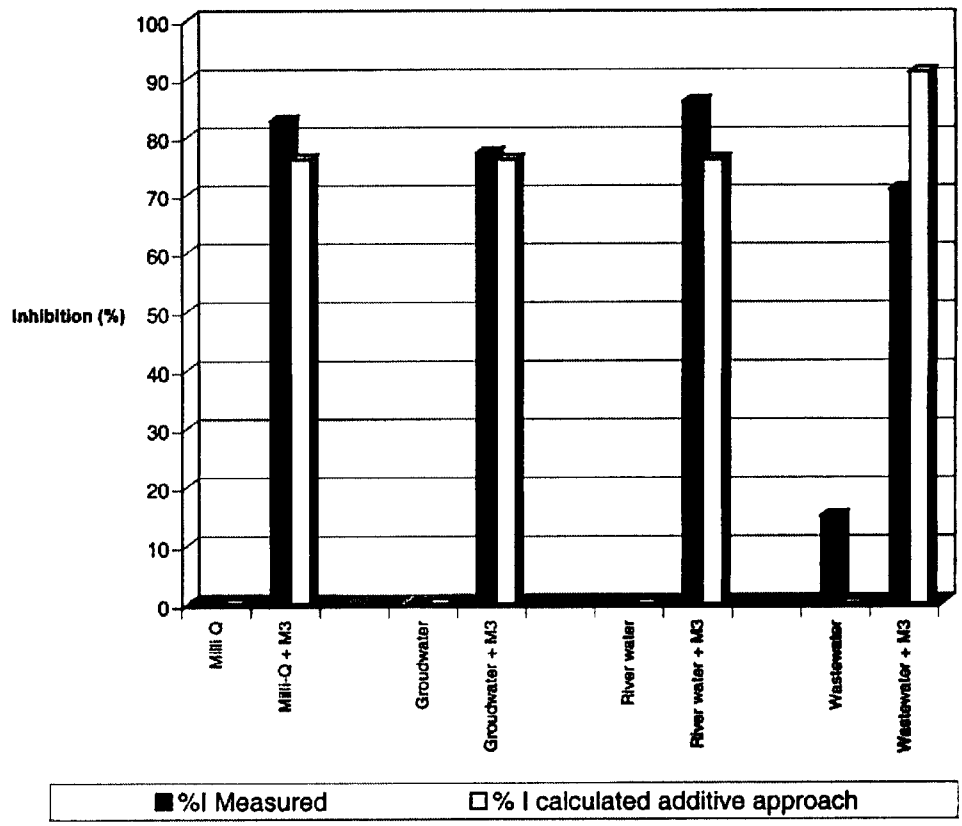


Fig. 3 Toxicity expressed as percentage of *Pseudomonas putida* inhibition for four different types of water, without spiking and spiked with pesticide mixture M3. The measured results are presented together with the calculated toxicity values according to an additive approach which considers the individual pesticides involved and the initial toxicity of the water

Table 3 Toxicity results expressed as percent of bioluminescence inhibition and results for groundwater samples analyzed by (SPME/GC/ECD) or (TSD) (< value means less than LOQ)

Sample	Toxicity % inhibition	Ametryn µg/l	Chlorfenvinphos µg/l	α-Cypermethrin µg/l	Deltamethrin µg/l	Dimethoate µg/l	endosulfan µg/l	fenamiphos µg/l
Sample 1	<20	<LOQ	<0.030	<0.090	<0.100	<1.2	<0.006	<0.018
Sample 2	<20	<LOQ	**0.303**	<0.090	<0.100	<1.2	**0.013**	<0.018
Sample 3	<20	<LOQ	**0.242**	<0.090	<0.100	<1.2	**0.007**	<0.018
Sample 4	<20	<LOQ	<0.030	<0.090	<0.100	<1.2	**0.117**	<0.018
Sample 5	<20	<LOQ	<0.030	<0.090	<0.100	<1.2	**0.034**	<0.018

LOQ limit of quantification

fan, still used in Portugal, was found in four wells out of the five analyzed, at levels between 0.007 and 0.12 µg/L. These levels are of relevance taking into consideration that groundwater is used in most instances for irrigation purposes, as well as for drinking water supplies. However, all these samples were non-toxic with the toxicity systems used, although target pesticides were present in µg/L concentrations. This indicates that these low concentrations are not detected with toxicological tests and sample preconcentration would be needed.

4. Conclusions

A combined strategy using toxicity bioassays and chemical analysis based on SPME-GC-ECD/TSD and GC-MS was applied to determine the capabilities, limitations and performance of two different assays, applied to real environmental samples. Organochlorine, organophosphorous, triazine, and pyrethroids pesticides, commonly detected in environmental waters, were determined using Cellsense with *Pseudomonas putida*, as test species and ToxAlert 100 with *Vibrio fischeri*, a standardized organism for toxicity assays. The inhibition curves using both test organisms were fitted for every pesticide and the EC_{50} and the TU values were determined. Compounds which exhibited low TU were the pyrethroids, while endosulfan was highly toxic to *V. fischeri* and the organophosphorus pesticides for *P. putida*. Mixtures with high concentrations (total 30 mg/L pesticides) exhibited a lower response attributed to antagonistic effects, especially when using ToxAlert. This effect was more relevant when analyzing

wastewater, where pesticides can be adsorbed onto particulate matter of the sample. For Milli-Q, ground and surface water, no matrix effect was found and the % inhibition correlated well with the amount of pesticide in the samples. In the case of wastewater, toxicity tests permitted detection of total pesticide concentrations of 0.9 µg/L. However, real groundwater which in general presents a lower pesticide concentration exhibited no toxicity, despite the fact that chlorfenvinphos and endosulfan were detected at levels between 0.007 and 0.3 µg/L. Therefore, the use of toxicity tests is highly recommended for screening of organic pollutants in "charged" water matrices but should always be accompanied with chemical characterization, in order to avoid false negatives. The application of batteries of toxicity tests are needed instead of assays with a single species and they are especially useful when matrix effects are important and chemical analysis is limited by interference. Future work will involve the use of other test species to enhance sensitivity.

Acknowledgements This work has been supported by the Quality of Life and Management of Living Resources European Union Program (Evaluation/Validation of Novel Biosensors in Real Environmental and Food Samples, Contract No. QLK-CT2000-01311) and Bilateral Cooperation between Spain and Portugal on "Determination of pesticides and degradation products in water samples using automated methods and biosensors" (ICCTI/CSIC Program 2001, Process 423/Spain). C. Gonçalves thanks a PhD grant from FCT- Fundação para a Ciência e Tecnologia with reference PRAXIS XXI/BD/21823/99. We thank IAREN for technical and financial support. We thank Merck for supplying ToxAlert 100 and the bioluminescence bacterial reagent.

References

1. Toussaint MW, Shedd TR, Van der Schailie WH, Leather GR (1995) Toxicol Chem 14: 907–915
2. Van Coillie R, Bermingham N, Blaise C, Vezeau R, Lakshminayana JSS (1989) Integrated ecotoxicological evaluation of effluents from dump sites. In: Niagru JO, Lakshminarayana JSS (eds) Aquatic toxicology and water quality management. Wiley, New York, USA, pp 161–191
3. Meister RT (1992) Farm chemicals handbook. Meister, Willoughby, Ohio, USA
4. The Agrochemicals Handbook, 3rd edn(1994) Royal Society of Chemistry Information Systems. Unwin Brothers, Surrey, UK
5. Briggs SA (1992) Basic guide to pesticides: their characteristics and hazards. Hemisphere Publishing, Washington, D.C., USA, pp 8–9
6. WHO (1984) Endosulfan. International programme on chemical safety: Environmental Health Criteria 40. World Health Organization, Geneva
7. Naqvi SM, Vaishnavi C (1993) Comp Biochem Physiol 105C: 347–361
8. U.S. Environmental Protection Agency (1989) Health advisory summary: Ametryn. U.S. EPA, Washington, D.C., USA
9. Bacci EA, Renzoni C, Gaggi D, Calamari A, Franchi M, Vighi A, Severi A (1989) Agric Ecosyst Environ 27:513–522
10. Pereira WE, Rostad CE (1990) Environ Sci Technol 24:1400–1406
11. Readman WJ, Albanis TA, Barceló D, Galassi S, Tronczynski J, Gabrielides GP (1993) Mar Pollut Bull 26:613–619
12. Bradbury SP, Coats, JR (1989) Environ Toxicol Chem 8:373–380
13. U.S. Environmental Protection Agency (1989) Pesticides Fact Sheet Number 199: Cypermethrin. Office of Pesticides and Toxic Substances, Washington, D.C.,.USA, pp 2–9
14. Farré M, Pasini O, Alonso MC, Castillo M, Barceló D (2001) Anal Chim Acta 426:155-165
15. Evans MR, Jordinson GM, Rawson DM, Rogerson JG (1998) Pestic Sci 54: 447–451
16. Farré M, Barceló D (2001) Fresenius J Anal Chem 371: 467–473
17. Farré M, Garcia MJ, Tirapu L, Ginebreda A, Barceló D (2001) Anal Chim Acta 427: 181–189
18. Farré M, Garcia MJ, Catillo M, Riu J, Barceló D (2001) J Environ Monit 3: 232–237
19. Perez S, Farré M, Garcia MJ, Barceló D (2001) Chemosphere 45: 705–712
20. Sprague JB, Ramsay BA (1965) J Fish Res 22: 425–432

Capítulo 9

CONCLUSÕES FINAIS

A Zona Vulnerável n.º 1 é uma extensa área litoral localizada no norte de Portugal onde se desenvolve uma actividade agrícola intensiva, com frequente recurso a fertilizantes e pesticidas. Sendo esta, já de si, uma zona vulnerável do ponto de vista hidrogeológico e estando abrangida por legislação europeia e nacional relativa à contaminação das águas subterrâneas, justifica-se inteiramente a monitorização de pesticidas e seus produtos de degradação em matrizes de água subterrânea e de solo. Esta necessidade constituiu numa boa oportunidade para o desenvolvimento de métodos analíticos adaptados à determinação de pesticidas em matrizes ambientais através da utilização de técnicas avançadas de extracção, concentração e análise, reunindo características de simplicidade, automatização e ausência/redução do uso de solventes orgânicos. Para melhor entender o comportamento dos pesticidas no ambiente, impõe-se também o estudo dos seus mecanismos de dissipação, por exemplo através de fotólise, bem como o impacto ecotoxicológico que podem causar.

Os estudos desenvolvidos com vista à optimização e validação de métodos analíticos para a determinação de pesticidas em águas permitiram extrair as seguintes conclusões:

- a fibra de SPME constituída pelo adsorvente PDMS-DVB com 60 μm de espessura revelou-se a mais apropriada para a extracção de um conjunto de 36 pesticidas. Para além da natureza da fase adsorvente e da espessura, foram identificados outros aspectos relacionados com a sua estrutura (sub-camadas polares, volume e superfície) que permitem explicar a melhor eficiência de extracção da fibra PDMS-DVB de 60 μm para compostos mediamente polares, comparativamente às fibras PDMS-DVB de 65 μm e "Stableflex".

- a fibra de PDMS-DVB 60 μm foi posteriormente comparada com outros tipos de fibras de SPME (PDMS, PA e CW-DVB) tendo-se verificado que, efectivamente, constitui a fibra com a capacidade de extracção mais adequada para a análise simultânea de pesticidas (36) pertencentes a 4 famílias químicas (OCPs, OPPs, piretróides e triazinas). A sua eficiência superior na extracção de pesticidas com polaridades muito distintas pode ser atribuída ao carácter bipolar do adsorvente. Após a optimização de vários parâmetros que afectam a

eficiência da SPME (temperatura, pH, força iónica, etc.), a sua associação com o sistema GC-ECD-TSD (análise simultânea nos dois detectores) permitiu obter limites de detecção para os OCPs entre 1-10 ng L^{-1}, para os OPPs entre 1-30 ng L^{-1}, para os piretróides entre 20-30 ng L^{-1} e para as triazinas entre 8-50 ng L^{-1}. Este método combina a elevada selectividade da SPME com a alta sensibilidade e selectividade do sistema GC-ECD-TSD, correspondendo à necessidade de métodos multiresíduo para monitorizar inúmeros pesticidas usados em horticultura intensiva. Este sistema beneficia de baixos custos de montagem e operação; contudo, obriga a uma segunda análise através de espectrometria de massa para efectuar a confirmação dos pesticidas quantificados.

- em alternativa, foram validados métodos de GC-MS baseados no mesmo protocolo de SPME, referido acima. Este sistema permitiu aumentar o número de pesticidas pesquisados (44); contudo, quando se pretende explorar a máxima sensibilidade de detecção (modo μSIS) torna-se igualmente necessária uma segunda análise de confirmação através dos espectros de massa (modo "scan"). O modo de operação em MS-MS oferece vantagens assinaláveis: tipicamente, LODs < 10 ng L^{-1}, e em alguns casos, LODs < 1 ng L^{-1}; em geral, a precisão traduziu-se num RSD <10%. O sistema SPME-GC-MS-MS reúne grandes vantagens em termos de selectividade, sensibilidade e precisão, com os correspondentes benefícios na identificação, quantificação e confirmação inequívoca dos pesticidas presentes em amostras ambientais. A confiança nos resultados analíticos sofreu um incremento; contudo, neste caso, o número de pesticidas analisados foi menor (17) e dirigido aos analitos mais frequentes nas amostras alvo. Os vários métodos analíticos utilizados permitiram iniciar o trabalho de monitorização com uma perspectiva mais alargada, focando progressivamente a pesquisa nos pesticidas mais relevantes, obtendo para eles resultados de maior qualidade.

Os estudos efectuados com vista ao desenvolvimento de métodos analíticos para a determinação de pesticidas em solos conduziram às seguintes conclusões:

- a extracção por ultra-sons é uma boa alternativa quando se impõe a implementação de um método para a análise de múltiplos resíduos de pesticidas em solos com reduzido esforço de optimização. Na validação exaustiva a que a técnica foi submetida, em associação com GC-MS, mostrou ser uma metodologia bastante eficiente (recuperações: 70-118%), muito precisa (RSD <15%) e de excelente sensibilidade (LODs: 0,05-7,0 μg kg^{-1}), permitindo efectuar a análise de 44 pesticidas em solos com elevada produtividade, de forma económica e com reduzido gasto de solventes, embora não seja automatizada. O método dispõe de LODs suficientemente baixos para a execução de estudos de comportamento dos pesticidas e

monitorização ambiental, que superam os necessários para declarar os solos contaminados. Recomenda-se a utilização de padrões de calibração em matriz equiparada à das amostras.

- na optimização da SFE, a metodologia de superfícies de resposta permitiu efectuar um estudo mais rápido das variáveis que influenciam a extracção de pesticidas em solos, avaliar a intensidade dos efeitos dessas variáveis e a sua interacção, e ainda, deduzir os parâmetros óptimos para a totalidade dos pesticidas ou seus subgrupos. A temperatura e a pressão do fluido supercrítico são determinantes na extracção de OCPs e pesticidas apolares, enquanto a percentagem do modificador é preponderante na extracção de triazinas, OPPs polares e produtos de degradação, tendo-se provado a sua significância estatística. A extracção por SFE é rápida, não tendo o tempo de extracção um efeito com grande significado estatístico. A associação da extracção por SFE com a análise por GC-MS-MS eleva significativamente a selectividade possuindo uma excelente capacidade de quantificação e confirmação de resíduos de pesticidas em solos, o que simplifica grandemente o trabalho analítico e aumenta a confiança nos resultados. A precisão (RSD <15,7%), a eficiência de extracção (recuperações: 80,4-106,5%) e a sensibilidade (LODs: 0,1-3,7 $\mu g\ kg^{-1}$) são equivalentes às obtidas com USE-GC-MS. Contudo, é possível efectuar a confirmação inequívoca (MS-MS) de concentrações vestigiárias na mesma análise, para além de ser um método automatizado e com reduzido consumo de solventes orgânicos, portanto mais benigno para o ambiente.

De seguida, apresentam-se as principais conclusões que decorrem da aplicação dos métodos desenvolvidos à análise de águas subterrâneas e solos provenientes de uma zona de horticultura intensiva, designada "Zona Vulnerável n.º 1", em 8 amostragens, durante 2 anos:

- dos 42 pesticidas pesquisados nas amostras de água, apenas 22 foram quantificados. Os pesticidas mais ubiquitários na ZV1 foram: lindano, pendimetalina, endossulfão sulfato e endossulfão, enquanto os pesticidas que excederam com maior frequência o limite de 0,1 $\mu g\ L^{-1}$ foram: pendimetalina, endossulfão, endossulfão sulfato e atrazina. Este limite foi excedido em 45% das amostras de água subterrânea mas nenhum pesticida individualmente excedeu os 13,2%. Os pesticidas metribuzina, dimetoato e atrazina atingiram concentrações muito elevadas na água ($\geq$42 $\mu g\ L^{-1}$); no entanto, a concentração mediana da generalidade dos pesticidas foi inferior a 0,1 $\mu g\ L^{-1}$. O endossulfão sulfato e a desetilatrazina foram encontrados com alta frequência e em concentrações elevadas. Em geral, os resultados obtidos nesta monitorização estão em concordância com outros estudos existentes na literatura. Deve salientar-se, no entanto, o problema colocado pela presença simultânea de um número elevado de pesticidas nas águas subterrâneas (frequentemente superior a 3) que

deriva do carácter intensivo da horticultura local. A análise estatística quimiométrica dos resultados originou a formação de 5 componentes principais que explicam 68% da variância nesses resultados. A atrazina e o alacloro evidenciaram uma distribuição similar dado constituírem uma mistura herbicida muito usada, enquanto que a associação endossulfão/endossulfão sulfato decorre do processo de degradação do primeiro. A poluição presente nas águas da ZV1 é difusa, sem um padrão de distribuição geográfica bem marcado, o que se deve a alguma uniformidade de culturas e práticas fitossanitárias na região, bem como à homogeneização dos poluentes no aquífero.

- 16 dos 42 pesticidas pesquisados nos solos foram efectivamente quantificados. Os pesticidas mais frequentes nos solos foram: alacloro, clorpirifos, endossulfão sulfato e atrazina. O local 22 foi o mais contaminado, em termos da quantidade e do número de pesticidas, caracterizando-se por uma grande constância dos valores ao longo do tempo e na profundidade do solo. É de salientar, a presença dos pesticidas persistentes: dieldrina (346 $\mu g\ kg^{-1}$), 4,4'-DDE e 4,4'-DDD. O ponto 1 foi o menos contaminado, quer tal seja devido ao baixo uso de pesticidas quer à baixa retenção no solo arenoso. Os resultados foram posteriormente confirmados numa amostragem suplementar, através da aplicação de um método analítico avançado com base em SFE-GC-MS-MS. A análise dos componentes principais permitiu atribuir a distribuição dos pesticidas nos solos a 5 factores, entre eles: pesticidas persistentes, herbicidas usados na cultura do milho e, herbicidas e insecticidas usados em culturas hortícolas. A distribuição geográfica dos pesticidas no solo relaciona-se com o tipo de culturas praticadas em cada local.

Os estudos de fotodegradação do quinalfos em águas e solos permitiram determinar a cinética e os produtos de degradação, em condições de irradiação solar simulada:

- em águas sintéticas, a fotólise do quinalfos é acelerada pela presença de iões nitrato ($t_{1/2}$– 11,6 h) e retardada pela presença de matéria orgânica dissolvida ($t_{1/2}$ – 19,0 h). Em águas naturais, a matéria orgânica exerce um efeito predominante, retardando a fotólise do quinalfos ($t_{1/2}$ – 18,4-18,8 h). No solo, o quinalfos sofre fotólise segundo um processo em duas fases com cinética de aparente ordem 1 – inicialmente mais rápida, à superfície, e de seguida mais lenta, nas camadas inferiores. Num solo franco-arenoso, a fotodegradação do quinalfos é mais lenta ($t_{1/2}$ – 47,5 h) do que num solo arenoso ($t_{1/2}$ – 16,9 h), devido à maior compactação desse solo e ao maior conteúdo em matéria orgânica, que assim contribuem para a protecção do pesticida. Os produtos de degradação 2-hidroxiquinoxalina, O,O',S-trietiltiofosfato e trietilfosforotioato formam-se por fotohidrólise do quinalfos quer em águas

quer em solos, enquanto o produto de isomerização O-S (quinalfos-S-etilo) se forma apenas em meio aquoso e o O,O-dietil-O-metilfosforotioato sobretudo nos solos.

Dos estudos de toxicidade de vários pesticidas usando biossensores pode concluir-se que:

- a bactéria *P. putida*, usada no biossensor Cellsense, é mais sensível à acção tóxica dos pesticidas do que o *V. fischeri*, usado no biossensor ToxAlert, no entanto este último produz resultados mais reprodutíveis. O pesticida mais tóxico para o *V. fischeri* foi o endossulfão (EC_{50} – 5,6 mg L^{-1}), seguido da ametrina e OPPs, enquanto para a *P. putida* foram os OPPs (EC_{50} – 0,9 mg L^{-1}). Os piretróides evidenciaram baixa toxicidade aguda nos dois ensaios. As misturas de pesticidas testadas exerceram um efeito tóxico sobre o *V. fischeri* inferior ao previsto segundo um mecanismo aditivo. Em matrizes reais com elevado conteúdo em matéria orgânica a toxicidade dos pesticidas foi ainda menor, devido à diminuição da biodisponibilidade do agente tóxico por ligação à matéria orgânica dissolvida e particulada. As concentrações de pesticidas existentes em amostras de água subterrânea (até 0,3 μg L^{-1}) não geraram qualquer toxicidade aguda sobre o *V. fischeri*. Destes estudos evidencia-se a utilidade dos ensaios de toxicidade em conjunto com a análise físico-química na previsão do efeito dos pesticidas em matrizes ambientais.

Os estudos desenvolvidos na ZV1 permitiram caracterizar o estado de contaminação das águas subterrâneas e dos solos com pesticidas, incluindo a identificação das substâncias mais frequentes, os seus níveis de concentração, a distribuição geográfica e a variação sazonal. Os pesticidas: metalaxil, benalaxil, pirimicarbe e quinalfos foram identificados, mas não quantificados, em amostras de água subterrânea e de solo, pelo que se justifica a sua inclusão em futuros programas de monitorização. Nas águas, deve ponderar-se ainda a pesquisa de prometrina. Perfigura-se como sendo importante o estudo da relação entre a contaminação das águas e dos solos com pesticidas, bem como a relação destas com outros indicadores de poluição agrícola (por exemplo nitratos) para o qual os resultados aqui apresentados podem ser de grande utilidade.

No que concerne à monitorização de pesticidas, o trabalho analítico é inesgotável, dado o aparecimento contínuo de novas moléculas que obrigam à actualização das metodologias analíticas, de forma a poder avaliar o impacto da sua utilização na qualidade das águas e dos solos. A tendência actual de síntese de novos pesticidas caracteriza-se pela produção de moléculas mais polares, que colocam dificuldades analíticas acrescidas, não esquecendo a necessidade do estudo dos produtos de degradação, muitas vezes mais tóxicos que o

pesticida original. A utilização de métodos de cromatografia líquida para a pesquisa desses pesticidas, paralelamente à lista de substâncias detectadas neste estudo, poderá revelar a presença de outros contaminantes em matrizes ambientais da ZV1. Conforme se verificou, o lindano, a atrazina, o endossulfão e os respectivos produtos de degradação são contaminantes muito frequentes na ZV1, pelo que se afigura interessante o estudo da evolução que os seus níveis de concentração irão sofrer em resultado da interdição desses pesticidas, já em vigor.

ANEXO I – CLASSIFICAÇÃO TOXICOLÓGICA DE DIVERSOS PESTICIDAS

Classificação toxicológica dos pesticidas com interesse para este trabalho de monitorização ambiental e para a área alvo do estudo (ZV1), abrangendo também outros pesticidas importantes no contexto nacional, segundo a publicação da DGPC de 2005 (5).
A classificação segue os critérios definidos pela OMS em "The WHO recommended classification of pesticides by hazard and guidelines to classification 2004" (24).

Nome comum	Número CAS	Estado físico	Uso	LD_{50} mg kg^{-1}	Classe OMS
2,4-D	94-75-7	S	H	375	II
4,4'-DDE	72-55-9				Prod. degradação
4,4'-DDD	72-54-8				Obsoleto
4,4'-DDT	50-29-3	S	I	113	II
Acefato	30560-19-1	S	I	945	III
Alacloro	15972-60-8	S	H	930	III
Aldrina	309-00-2				Obsoleto
α-Cipermetrina	67375-30-8	S	I	c79 *	II
Amitraze	33089-61-1	S	AC	800	III
Amitrol	61-82-5	S	H	5000	p.p.
Atrazina	1912-24-9	S	H	c2000	p.p.
Azinfos-etilo	2642-71-9	S	I	12	Ib
Azinfos-metilo	86-50-0	S	I	16	Ib
Bacillus thuringiensis	68038-71-1	S	I	>4000	p.p.
Benalaxil	71626-11-4	S	F	c4200	p.p.
Benomil	17804-35-2	S	F	>10000	p.p.
Bromoxinil	1689-84-5	S	H	190	II
Captana	133-06-2	S	F	9000	p.p.
Carbaril	63-25-2	S	I	c300	II
Carbendazina	10605-21-7	S	F	>10000	p.p.
Carbofurão	1563-66-2	S	I	8	Ib
Ciflutrina	68359-37-5	S	I	c250	II
Cialotrina	68085-85-8	O	Ix	c144	II
Cihexaestanho	13121-70-5	S	AC	540	III
Cimoxanil	57966-95-7	S	F	1196	III
Cipermetrina	52315-07-8	L	I	c250	II
Ciromazina	66215-27-8	S	L	3300	p.p.
Clordano	57-74-9	L	I	460	II
Clorfenvinfos	470-90-6	L	I	31	Ib
Cloridazão	1698-60-8	S	H	2420	p.p.
Clorpirifos	2921-88-2	S	I	135	II
Clortalonil	1897-45-6	S	F	>10000	p.p.
Clortolurão	15545-48-9	S	H	>10000	p.p.
Cobre (oxicloreto)	1332-40-7	S	F	1440	III
Cobre (sulfato)	7758-98-7	S	F	300	II
Deltametrina	52918-63-5	S	I	c135	II
Diazinão	333-41-5	L	I	1000	II
Diclorvos	62-73-7	L	I	56	Ib
Dicofol	115-32-2	S	AC	c690	III
Dieldrina	60-57-1				Obsoleto
Dimetoato	60-51-5	S	I	c150	II
Dinocape	39300-45-3	S	AC, F	98	III
Diurão	330-54-1	S	H	3400	p.p.
Dodina	2439-10-3	S	F	1000	III

Endossulfão	115-29-7	S	I	80	II
Endossulfão sulfato	7421-93-4				Prod. degradação
Endrina	72-20-8				Obsoleto
Endrina aldeído	7421-93-4				Prod. degradação
Enxofre	7704-34-9	S	F, I	>3000	p.p.
EPTC	759-94-4	L	H	1652	II
Fenamifos	2222-92-6	S	N	15	1b
Fenarimol	60168-88-9	S	F	2500	p.p.
Fenitrotião	122-14-5	L	I	503	II
Fentião	55-38-9	L	I, L	D586	II
Fluazifope-butilo	83066-88-0	L	H	2451	III
Folpete	133-07-3	S	F	>10000	p.p.
Fonofos	944-22-9				Obsoleto
Fosetil-Alumínio	15845-66-2	S	F	5800	p.p.
Fosmete	732-11-6	S	I,AC	113	II
Glifosato	1071-83-6	S	H	4230	p.p.
Glufosinato	53369-07-6	S	H	1625	III
Heptacloro	76-44-8				Obsoleto
Heptacloro epóxido	1024-57-3				Prod. degradação
Hexaclorobenzeno	118-74-1	S	FST	D10000	Ia
Hexaconazole	79983-71-4	S	F	2180	p.p.
Iprodiona	36734-19-7	S	F	3500	p.p.
Isodrina	465-73-6				Obsoleto
Isoproturão	34123-59-6	S	H	1800	III
lambda-Cialotrina	2164-08-1	S	I	56	II
Lindano	58-89-9	S	I	88	II
Linurão	330-55-2	S	H	4000	p.p.
Malatião	121-75-5	L	I	c2100	III
Mancozebe	8018-01-7	S	F	>8000	p.p.
MCPA	94-74-6	S	H	700	III
Metabenztiazurão	18691-97-9	S	H	>2500	p.p.
Metalaxil	57837-19-1	S	F	670	III
Metamitrão	41394-05-02	S	H	1183	III
Metame-sódio	137-42-8	S	F-S	285	II
Metidatião	950-37-8	L	I	25	Ib
Metiocarbe	2032-65-7	S	I	20	Ib
Metobromurão	3060-89-7	S	H	2500	p.p.
Metolacloro	51218-45-2	L	H	2780	III
Metomil	16752-77-5	S	I	17	Ib
Metribuzina	21087-64-9	S	H	322	II
Molinato	2212-67-1	L	H	720	II
Monolinurão	1746-81-2	S	H	2250	p.p.
Ofurace	58810-48-3	S	F	2600	p.p.
Oxifluorfeno	42874-03-3	S	H	>5000	p.p.
Paraquato	1910-42-5	S	H	150	II
Paratião-etilo	56-38-2	L	I	13	Ia
Paratião-metilo	298-00-0	L	I	14	Ia
Pendimetalina	487-42-1	S	H	1050	III
Permetrina	52645-53-1	L	I	c500	II
Piretrinas	8003-34-7	L	I	500-1000	II
Pirimicarbe	23103-98-2	S	AP	147	II
Procimidona	32809-16-8	S	F	68000	p.p.
Prometrina	7287-19-6	S	H	3150	p.p.

Propamocarbe (hidrocloreto)	24579-73-5	S	F	8600	p.p.
Propanil	709-98-8	S	H	c1400	III
Propazina	139-40-2	S	H	>5000	p.p.
Propinebe	12071-83-9	S	H	8500	p.p.
Propizamida	23950-58-5	S	H	5620	p.p.
Quinalfos	13593-03-8	S	I	62	II
Rotenona	83-79-4	S	I	132-1500	II
Simazina	122-34-9	S	H	>5000	p.p.
Simetrina	1014-70-6	S	H	1830	III
Terbutilazina	5915-41-3	S	H	2160	p.p.
Tetraclorvinfos	22248-79-9	S	I	4000	p.p.
Tetradifão	116-29-0	S	AC	>10000	p.p.
Tirame	137-26-8	S	F	560	III
Triclopir	55335-06-3	S	H	710	III
Trifluralina	1582-09-8	S	H	>10000	p.p.
Zirame	137-30-4	S	F	1400	III

Abreviaturas:
S-sólido, L-líquido, O-oleoso, H - herbicida, I - insecticida, F - fungicida, AC - acaricida, Ix - ixodicida, N - nematodicida, L - larvicida, FST - fungicida para tratamento de sementes, -S – para aplicação no solo, AP – aficida, D – por absorção dérmica. A classe p.p. (pouco provável) engloba todas as substâncias activas cujo risco de ocorrência de toxicidade aguda é pouco provável em condições normais de utilização.
* nestes casos, os LD_{50} encontrados na literatura variam numa gama mais alargada que o normal, por vezes devido à diferente composição em isómeros.

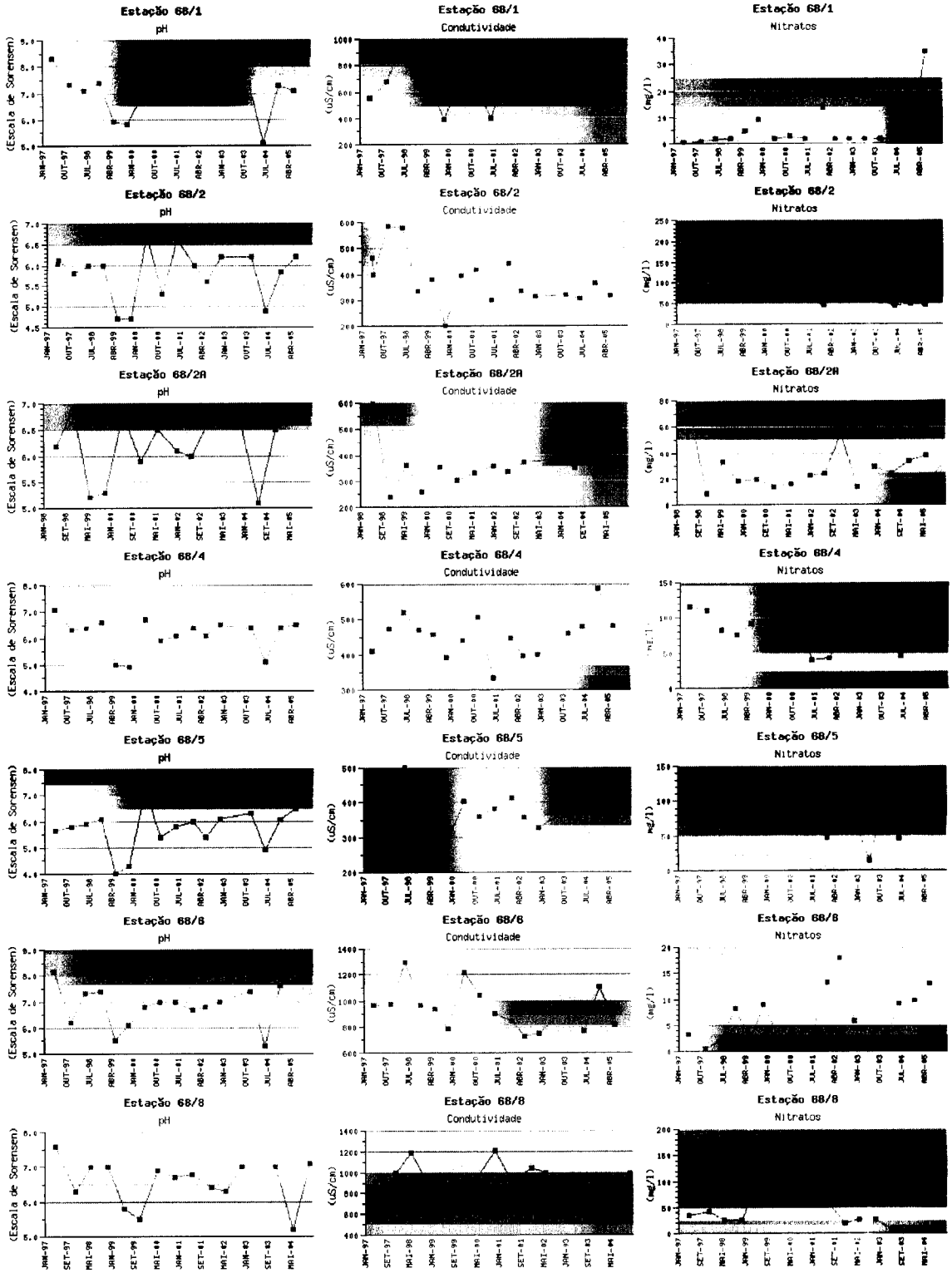
ANEXO II – PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS DE VÁRIOS PESTICIDAS

Pesticida	MW	Fórmula	Log P (K_{ow})	Solubilidade na água	K_{oc} (mLg^{-1})	$T_{1/2}$ (dias)	GUS
4,4'-DDD	318	$C_{14}H_{10}Cl_4$					
4,4'-DDE	316	$C_{14}H_8Cl_4$					
4,4'-DDT	354,5	$C_{14}H_9Cl_5$	4,0-6,1	Praticam. insolúvel			
Alacloro	269,8	$C_{14}H_{20}ClNO_2$	3,09	242 mg L^{-1} (25°C)	120	18	2,4
Aldrina	364,9	$C_{12}H_8Cl_6$	5,6-7,4	0,027 mg L^{-1} (27°C)	5000	365	
Atrazina	215,7	$C_8H_{14}ClN_5$	2,5 (25°C)	33 mg L^{-1} (pH 7, 22°C)	39-173	50	3,24
Azinfos-metilo	317,3	$C_{10}H_{12}N_3O_3PS_2$	2,96	28 mg L^{-1} (20°C)	1465	52	1,43
Benalaxil	325,4	$C_{20}H_{23}NO_3$	3,54 (20°C)	28,6 mg L^{-1} (20°C)	2728-7173		
λ-Cialotrina	449,9	$C_{23}H_{19}ClF_3NO_3$	6,8 (20°C)	0,004 μg L^{-1} (20°C)			
α-Cipermetrina	416,3	$C_{22}H_{19}Cl_2NO_3$	6,6	0,004 mg L^{-1} (pH 7)	100000	30	
Clordano	409,8	$C_{10}H_6Cl_8$	5,16-6,0	0,1 mg L^{-1} (25°C)			
Clorfenvinfos	359,6	$C_{12}H_{14}Cl_3O_4P$	3,85	145 mg L^{-1} (23°C)			
Clorpirifos	350,6	$C_9H_{11}Cl_3NO_3PS$	4,7	1,4 mg L^{-1} (25°C)	4981	94	2,57
Deltametrina	505,2	$C_{22}H_{19}Br_2NO_3$	4,6 (25°C)	<0,2 μg L^{-1} (25°C)	$4,6x10^5$-$1,63x10^7$		
Diazinão	304,3	$C_{12}H_{21}N_2O_3PS$	3,30	60 mg L^{-1} (20°C)	332 mg/g	23	2,13
Diclorvos	221,0	$C_4H_7Cl_2O_4P$	1,9	18 g L^{-1} (25 °C)			
Dieldrina	378	$C_{12}H_8Cl_6O$	60-57-1				
Dimetoato	229,3	$C_5H_{12}NO_3PS_2$	0,704	23,3 g L^{-1} (pH 5, 20°C)	16,3-51,9	7	
Endossulfão I	406,9	$C_9H_6Cl_6O_3S$	4,74 (pH 5)	0,32 mg L^{-1} (22°C)	3000-20000	30-70	
Endossulfão II	406,9	$C_9H_6Cl_6O_3S$	4,79 (pH 5)	0,33 mg L^{-1} (22°C)	3000-20000	30-70	
Endossulf.sulfato	420	$C_9H_6Cl_6O_4S$					
Endrina	380,9	$C_{12}H_8Cl_6O$	4,56-5,20	0,23 mg L^{-1} (20-25°C)	10000	4300	
Endrina aldeído	378	$C_{12}H_8Cl_6O$					
Fenamifos	303,4	$C_{13}H_{22}NO_3PS$	3,3 (20°C)	0,4 g L^{-1} (20°C)			
Fenitrotião	277,2	$C_9H_{12}NO_5PS$	3,5 (20°C)	21 mg L^{-1} (20°C)			
Fonofos	246,3	$C_{10}H_{15}OPS_2$	3,94	13 mg L^{-1} (22°C)	870	40	
HCB	284,8	C_6Cl_6	5,44-6,18	Praticam. insolúvel			
Heptacloro	373,3	$C_{10}H_5Cl_7$	5,44-6,18	56 μg L^{-1} (25-29°C)			
Heptacloro epóx.	386	$C_{10}H_5Cl_7O$					
Isodrina	364,9	$C_{12}H_8Cl_6$					
Lindano	290,8	$C_6H_6Cl_6$		7,3 mg L^{-1} (25°C)	1100	100	
Malatião	330,3	$C_{10}H_{19}O_6PS_2$	2,75	145 mg L^{-1} (25°C)	1800	1	
Metalaxil	279,3	$C_{15}H_{21}NO_4$	1,75 (25°C)	8,4 g L^{-1} (20°C)	30-300	22-48	
Metribuzina	214,3	$C_8H_{14}N_4OS$	1,6 (pH 5,6)	1,05 g L^{-1} (20°C)			
Paratião-etilo	291,3	$C_{10}H_{14}NO_5PS$	3,83	11 mg L^{-1} (20°C)	5000	14	
Paratião-metilo	263,2	$C_8H_{10}NO_5PS$	3,0	55 mg L^{-1} (20°C)	236	18,5	2,06
Pendimetalina	281,3	$C_{13}H_{19}N_3O_4$	5,18	0,3 mg L^{-1} (20°C)			
Pirimicarbe	238,3	$C_{11}H_{18}N_4O_2$	1,7	3,0 g L^{-1} (pH 7, 20°C)	741	108	2,30
Procimidona	284,1	$C_{13}H_{11}Cl_2NO_2$	3,14 (26°C)	4,5 mg L^{-1} (25°C)			
Prometrina	241,4	$C_{10}H_{19}N_5S$	3,1	33 mg L^{-1} (25°C)	258	41	2,56
Propazina	229,7	$C_9H_{16}ClN_5$		5,0 mg L^{-1} (25°C)	154	135	
Propizamida	256,1	$C_{12}H_{11}Cl_2NO$	3,1–3,2	15 mg L^{-1} (25°C)	800	25	2,23
Quinalfos	298,3	$C_{12}H_{15}N_2O_3PS$	4,44 (23°C)	17,8 mg L^{-1} (22-23 °C)			
Simazina	201,7	$C_7H_{12}ClN_5$	2,1 (25°C)	6,2 mg L^{-1} (pH 7, 20°C)	160	59	3,43
Simetrina	213,3	$C_8H_{15}N_5S$	2,6	400 mg L^{-1} (20°C)			
Terbutilazina	229,7	$C_9H_{16}ClN_5$	3,21	8,5 mg L^{-1} (pH 7, 20°C)	162-278	30-60	3,11
Tetraclorvinfos	366,0	$C_{10}H_9Cl_4O_4P$		11 mg L^{-1} (20°C)			

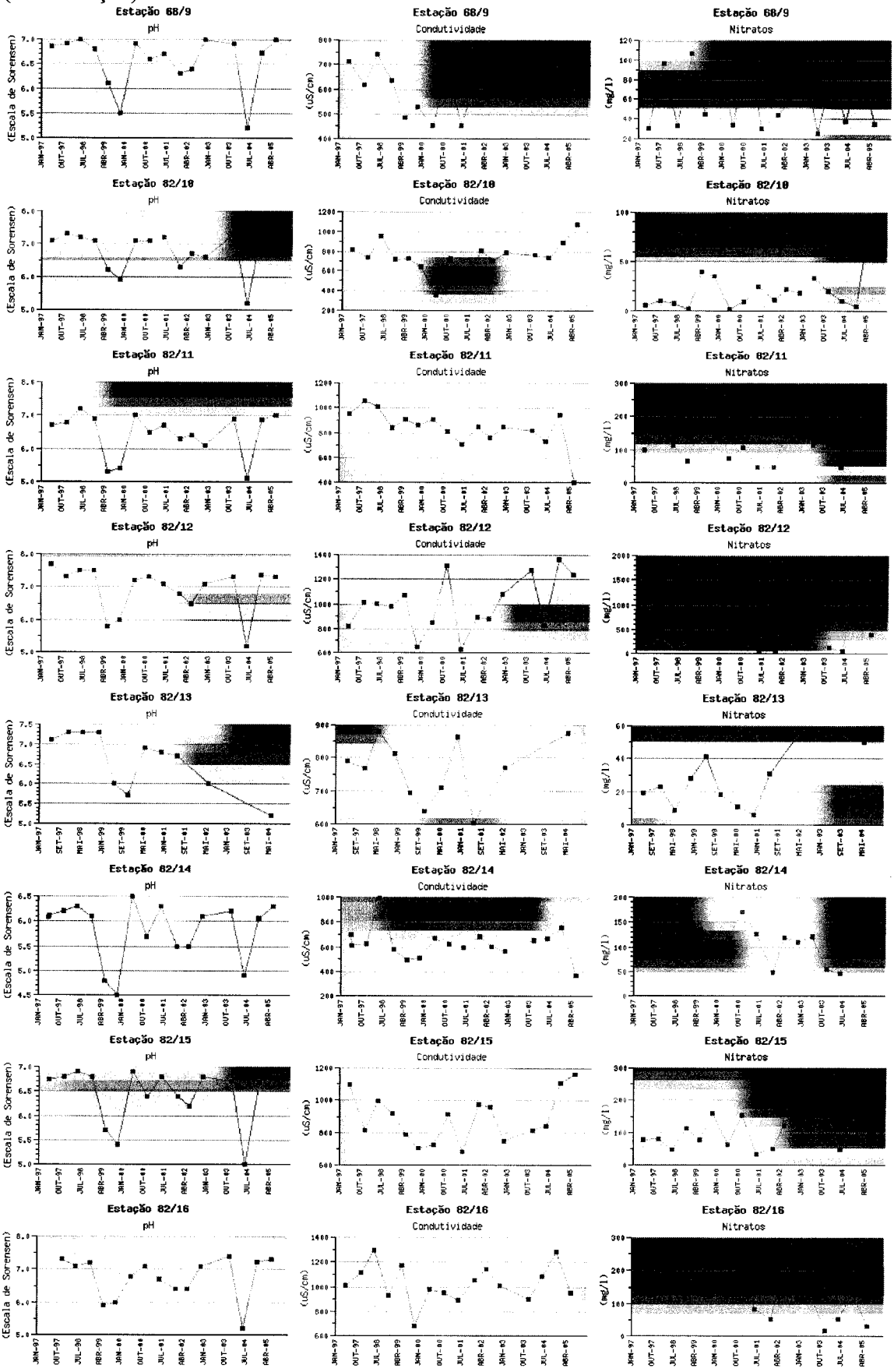
Extraído de: Tomlin, C.D.S. – The e-Pesticide Manual. 11th ed., BCPC, UK, 1999-2000 e Barceló, D., Hennion, M-C. - Trace determination of pesticides and their degradation products in water. Elsevier Science, Amsterdão, Holanda, 1997.

ANEXO III – COMPOSIÇÃO DAS ÁGUAS SUBTERRÂNEAS NA ZV1

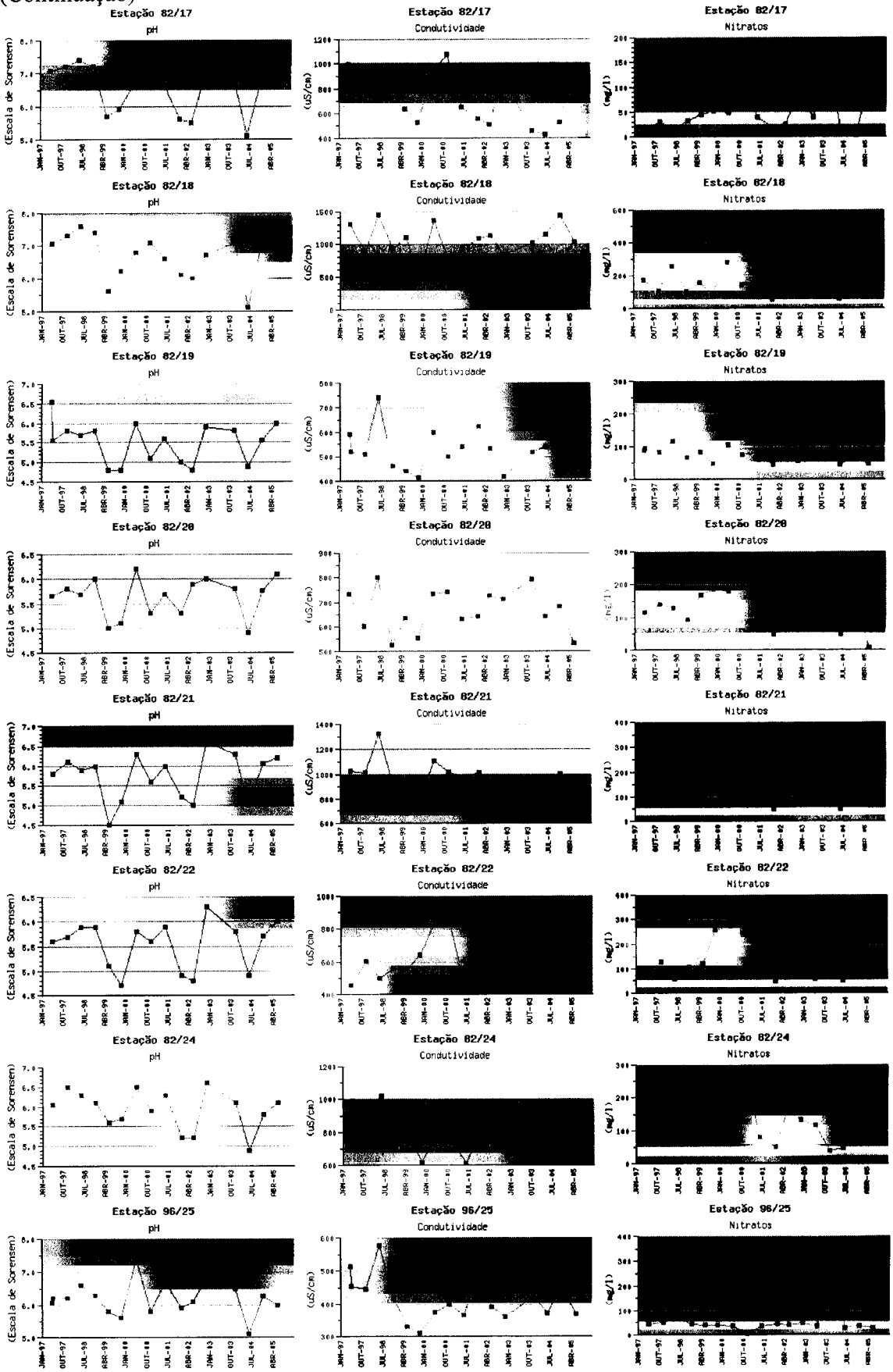
Evolução dos valores de pH, condutividade e nitratos nas águas subterrâneas da ZV1, no período entre Janeiro de 1997 e Abril de 2005. Informação disponível no SNIRH (11).



(Continuação)



(Continuação)



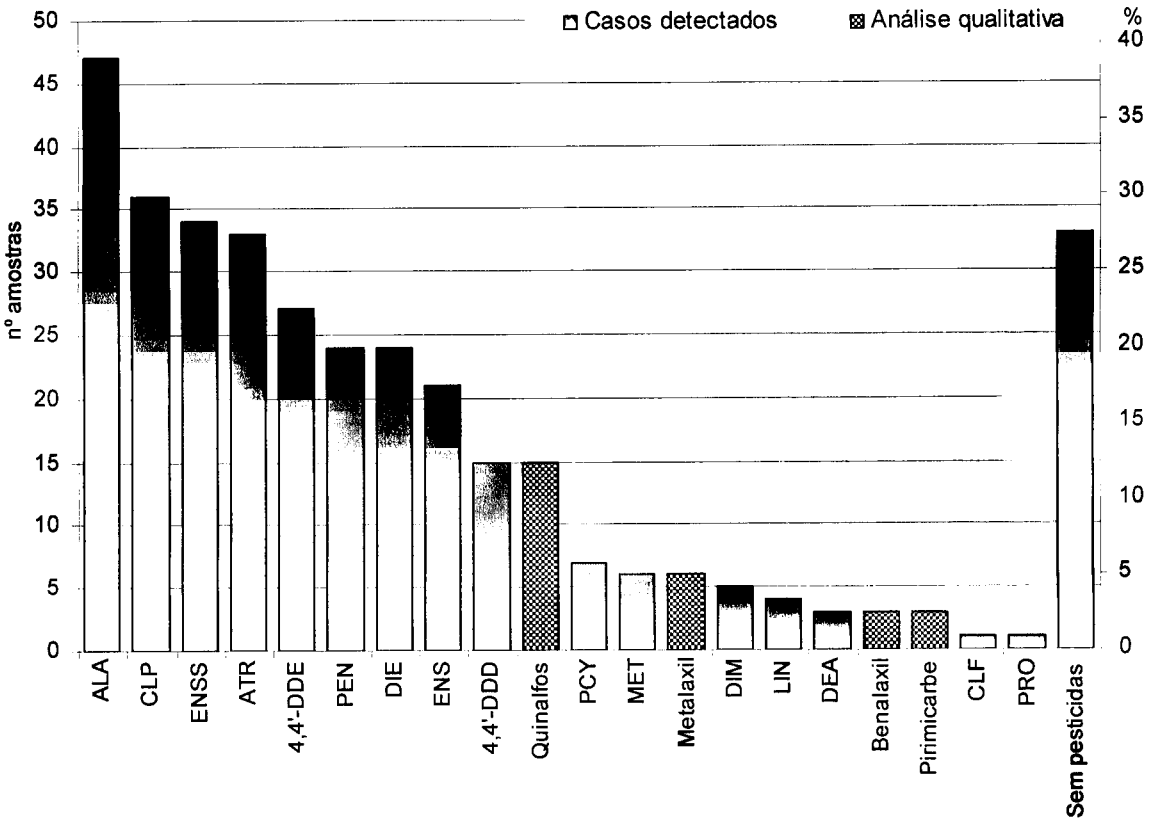
ANEXO IV – CONCENTRAÇÃO DE PESTICIDAS NAS ÁGUAS SUBTERRÂNEAS

Gamas de concentração de pesticidas detectados nas águas ($\mu g\ L^{-1}$) e número de amostras ( ).

Ponto 1	ENS: 0,004 - 0,010 (2)	**Ponto 14**	**Ponto 20**
LIN: 0,004 - 0,007 (3)	DDE: 0,006 (1)	LIN: 0,003 (1)	DEA: 0,733 (1)
CLP: 0,011 (1)	ENSS: 0,004 - 0,045 (4)	PEN: 0,010 - 0,013 (2)	ATR: 0,015 - 0,863 (4)
PEN: 0,010 - 0,011 (2)	CYP: 0,052 - 1,349 (3)	ENS: 0,011 (1)	LIN: 0,005 - 0,171 (8)
CLF: 0,011 - 0,261 (2)	**Ponto 8**	DIE: 0,006 (1)	PPY: 0,009 - 0,443 (2)
DIE: 0,032 (1)	LIN: 0,009 - 0,120 (7)	ENSS: 0,021 (1)	MTB: 280,7 (1)
ENSS: 0,002 (1)	CLP: 0,518 (1)	**Ponto 15**	ALA: 0,010 - 0,034 (4)
Ponto 2	PEN: 0,038 - 0,081 (4)	LIN: 0,002 - 0,143 (7)	CLP: 0,004 - 0,030 (2)
ATR: 0,047 - 1,243 (2)	CLF: 0,173 - 0,426 (7)	PPY: 0,027 (1)	PAR: 0,010 (1)
LIN: 0,002 - 0,054 (3)	PCY: 0,029 - 0,039 (2)	CLP: 0,007 (1)	PEN: 0,009 - 0,048 (5)
ALA: 0,004 - 0,542 (5)	ENS: 0,003 - 1,490 (7)	PEN: 0,018 - 0,212 (6)	CLF: 0,755 (1)
CLP: 0,007 - 0,034 (2)	DIE: 0,004 - 0,101 (5)	CLF: 0,009 (2)	PCY: 0,021 - 10,98 (6)
PEN: 0,008 - 6,103 (6)	ENSS: 0,009 - 0,830 (7)	PCY: 0,017 (1)	ENS: 0,010 - 0,647 (6)
CLF: 0,018 - 0,041 (2)	**Ponto 9**	ENS: 0,030 - 0,065 (2)	DIE: 0,002 - 0,018 (4)
DIE: 0,009 - 0,021 (4)	ATR: 0,046 - 0,674 (2)	ENSS: 0,003 (1)	ENSS: 0,006 - 0,160 (7)
Ponto 2A	LIN: 0,002 - 0,004 (3)	**Ponto 16**	CYH: 0,059 (1)
ATR: 0,074 (1)	MET: 0,014 - 0,029 (3)	DEA: 0,280 - 1,444 (2)	MET: 0,041 - 0,128 (2)
LIN: 0,003 - 0,013 (2)	**Ponto 10**	LIN: 0,003 - 0,020 (4)	**Ponto 21**
CLP: 0,003 - 0,006 (2)	ATR: 0,041 - 0,052 (2)	PPY: 0,454 (1)	LIN: 0,002 - 0,004 (2)
PEN: 0,016 - 0,276 (5)	LIN: 0,002 - 0,010 (5)	CLP: 0,005 (1)	CLP: 0,003 (1)
PCY: 0,027 (1)	ALA: 0,005 (2)	PEN: 0,011 - 0,013 (2)	CLF: 0,009 - 1,040 (5)
ENS: 0,016 - 4,205 (7)	PEN: 0,008 - 0,420 (2)	ENS: 0,018 - 0,477 (2)	PCY: 0,015 - 0,040 (4)
DIE: 0,004 - 0,009 (2)	ENS: 0,003 - 0,017 (3)	FEM: 0,246 (1)	ENS: 0,006 - 0,019 (4)
ENSS: 0,040 - 0,144 (7)	DIE: 0,026 (1)	DIE: 0,033 (1)	DIE: 0,005 (1)
Ponto 4	ENSS: 0,007 - 0,046 (4)	ENSS: 0,009 - 0,018 (3)	ENSS: 0,008 - 0,034 (7)
ATR: 0,024 - 0,430 (5)	MET: 0,007 - 0,118 (2)	**Ponto 17**	**Ponto 22**
LIN: 0,004 - 0,010 (3)	**Ponto 11**	DEA: 0,146 - 33,57 (5)	ATR: 0,037 - 0,389 (3)
ALA: 0,015 - 0,021 (2)	LIN: 0,003 - 0,181 (7)	LIN: 0,002 - 0,026 (5)	LIN: 0,002 - 0,578 (5)
CLP: 0,584 (1)	ALA: 0,004 (1)	PPY: 0,004 - 2,870 (4)	ALA: 0,007 - 0,012 (3)
PAR: 0,034 (1)	CLP: 0,008 (1)	ALA: 0,002 (1)	DDE: 0,003 (1)
PEN: 0,018 - 0,260 (5)	PEN: 0,009 - 0,083 (3)	PAR: 0,018 (1)	DIE: 0,016 - 0,061 (8)
ENS: 0,010 - 0,063 (6)	CLF: 0,011 - 0,242 (3)	PEN: 0,011 - 0,106 (4)	ENSS: 0,006 - 0,024 (5)
DIE: 0,068 (1)	ENS: 0,006 - 0,592 (7)	PCY: 0,050 - 0,113 (2)	**Ponto 24**
ENSS: 0,004 - 0,124 (6)	ENSS: 0,006 - 0,235 (7)	ENS: 0,049 - 1,749 (8)	ATR: 0,043 (1)
MET: 0,066 - 1,634 (3)	**Ponto 12**	ENSS:0,009 - 0,920 (7)	LIN: 0,002 - 0,006 (4)
Ponto 5	DEA: 0,466 - 1,293 (3)	**Ponto 18**	ALA: 0,002 - 0,020 (2)
ATR: 0,018 - 0,028 (2)	LIN: 0,002 - 0,065 (6)	LIN: 0,005 - 0,561 (7)	CLP: 0,297 (1)
LIN: 0,004 (1)	PPY: 0,022 - 0,306 (4)	CLP: 0,004 (1)	CLF: 0,014 (1)
PEN: 0,008 - 0,019 (3)	ALA: 0,008 - 9,280 (3)	PEN: 0,008 - 0,506 (6)	PCY: 0,039 - 0,143 (4)
ENS: 0,014 - 0,335 (3)	CLP: 0,088 - 0,134 (2)	PCY: 0,016 - 0,219 (4)	ENS: 0,010 - 0,674 (8)
ENSS: 0,005 - 0,063 (2)	PEN: 0,021 - 18,265 (5)	**Ponto 19**	DIE: 0,004 - 0,029 (8)
Ponto 6	ENS: 0,069 (1)	LIN: 0,004 (1)	ENSS: 0,015 - 0,611 (8)
DEA: 0,139 (1)	DIE: 0,004 - 0,011 (3)	ALA: 0,003 (1)	**Ponto 25**
DIM: 48,5 - 114,39 (2)	MET: 0,007 (1)	PAR: 0,078 (1)	ATR: 0,055 - 42,32 (7)
ATR: 0,049 - 37,85 (6)	**Ponto 13**	PEN: 0,011 (1)	TER: 0,155 (1)
LIN: 0,002 - 0,047 (8)	ATR: 0,094 (1)	CLF: 0,008 (1)	LIN: 0,004 - 0,017 (2)
DIA: 0,013 (1)	LIN: 0,001 - 0,007 (2)	ENS: 0,004 (1)	DIA: 0,092 (1)
PPY: 0,003 - 0,026 (4)	CLF: 0,009 - 0,209 (2)	DIE: 0,015 (1)	PPY: 0,004 (1)
ALA: 0,013 - 0,077 (2)	PCY: 0,028 - 0,157 (3)	ENSS: 0,004 (1)	ALA: 0,026 - 18,089 (6)
CLP: 0,021 - 0,120 (4)	DIE: 0,005 - 0,006 (3)		ENS: 0,004 (1)
PEN: 0,015 - 7,48 (6)			ENSS: 0,015 (1)
CLF: 0,030 - 0,049 (3)			CYP: 0,309 (1)
PCY: 0,025 - 0,460 (5)			

ANEXO V – FREQUÊNCIA DE DETECÇÃO DE PESTICIDAS NOS SOLOS

Frequência de detecção de pesticidas em amostras de solo (nº de amostras contaminadas e %) num total de 120 amostras analisadas.



Número de amostras (N) de solo não contaminadas, amostras contaminadas com pesticidas até 100 µg kg^{-1} e acima desse valor.

Pesticidas	<LOQ (%)	LOQ<N≤100 µg kg^{-1} (%)	>100 µg kg^{-1} (%)
DEA	117 (98)	3 (2,5)	0
DIM	115 (96)	5 (4,2)	0
ATR	87 (72,5)	33 (27,5)	0
PRO	119 (99)	1 (0,8)	0
LIN	116 (97)	4 (3,3)	0
ALA	73 (61)	38 (31,7)	9 (7,5)
CLP	84 (70)	35 (29,2)	1 (0,8)
PEN	96 (80)	18 (15)	6 (5,0)
CLF	119 (99,2)	1 (0,8)	0
PCY	113 (94)	6 (5)	1 (0,8)
ENS	99 (83)	18 (15)	3 (2,5)
4,4'-DDE	93 (78)	27 (22,5)	0
DIE	96 (80)	0	24 (20)
4,4'-DDD	105 (88)	15 (12,5)	0
ENSS	86 (72)	21 (17,5)	13 (10,8)
MET	24 (80)	5 (16,7)	1 (3,3)

ANEXO VI – CONCENTRAÇÃO DE PESTICIDAS NOS SOLOS

Gamas de concentração de pesticidas encontrados nos solos ($\mu g\ kg^{-1}$) e número de amostras contaminadas ( ).

Ponto 1 (superfície)	Ponto 1 (10 cm)	Ponto 1 (20 cm)	Ponto 1 (conc. média)
ALA: 3,05 (1)			ALA: 3,05 (1)
Ponto 5 (superfície)	**Ponto 5 (10 cm)**	**Ponto 5 (20 cm)**	**Ponto 5 (conc. média)**
ATR: 1,93 - 17 (6)	ATR: 0,99 - 2,83 (4)	ATR: 0,93 - 1,04 (2)	ATR: 3,44 (12)
PRO: 2,20 (1)			PRO: 2,02 (1)
ALA: 2,66 - 26,1 (7)	ALA: 2,15 - 10,7 (6)	ALA: 1,78 - 11,6 (4)	ALA: 7,94 (17)
CLP: 1,14 - 2,37 (5)	CLP: 0,19 - 1,56 (4)	CLP: 0,23 - 2,04 (3)	CLP: 1,36 (12)
ENS: 87,9 - 197 (3)	ENS: 27,5 - 55,0 (2)	ENS: 13,9 (1)	ENS: 84,2 (6)
ENSS: 20,3 - 281 (4)	ENSS: 1,72 - 81,6 (4)	ENSS: 7,61 - 16,9 (2)	ENSS: 87,7 (10)
MET: 86,7 - 1170 (2)	MET: 19,6 - 35,2 (2)	MET: 4,54 - 23,3 (2)	MET: 223 (6)
Ponto 18 (superfície)	**Ponto 18 (10 cm)**	**Ponto 18 (20 cm)**	**Ponto 18 (conc. média)**
DIM: 7,06 (1)			DIM: 7,06 (1)
LIN: 22,3 (1)	LIN: 31,0 (1)	LIN: 60,0 (1)	LIN: 37,8 (3)
CLP: 0,88 - 53,3 (6)	CLP: 0,57 - 149 (6)	CLP: 0,38 - 5,26 (6)	CLP: 15,1 (18)
PEN: 3,14 - 6910 (7)	PEN: 2,86 - 55,1 (7)	PEN: 2,17 - 232 (6)	PEN: 479 (20)
PCY: 12,2 - 133 (2)	PCY: 8,56 - 11,8 (2)	PCY: 7,11 (1)	PCY: 34,5 (5)
4,4'-DDE: 1,65 (1)	4,4'-DDE: 1,66 - 1,99 (2)		4,4'-DDE: 1,77 (3)
Ponto 22 (superfície)	**Ponto 22 (10 cm)**	**Ponto 22 (20 cm)**	**Ponto 22 (conc. média)**
DIM: 44,8 - 95,6 (2)	DIM: 42,7 (1)	DIM: 35,4 (1)	DIM: 54,6 (4)
ATR: 6,65 - 17,8 (2)	ATR: 0,83 - 3,19 (2)	ATR: 3,77 (1)	ATR: 6,45 (5)
LIN: 58,3 (1)			LIN: 58,3 (1)
ALA: 2,05 - 545 (4)	ALA: 7,98 - 20,6 (3)	ALA: 1,88 - 36,4 (2)	ALA:113 (9)
CLP: 0,9 - 67,3 (2)	CLP: 0,50 - 6,12 (2)	CLP: 1,72 - 7,22 (2)	CLP: 14,0 (6)
PEN: 1,62 - 2,91 (2)	PEN: 1,98 (1)	PEN: 2,57 (1)	PEN: 2,27 (4)
	CLF: 1,35 (1)		CLF: 1,35 (1)
PCY: 11,6 (1)	PCY: 9,14 (1)		PCY: 10,4 (2)
ENS: 18,2 - 852 (5)	ENS: 11,5 - 45,9 (5)	ENS: 7,12 - 22,4 (5)	ENS: 77,9 (15)
4,4'-DDE: 7,12 - 24,6 (8)	4,4'-DDE: 11,2 - 24,0 (8)	4,4'-DDE: 10,6 - 21,4 (8)	4,4'-DDE: 17,6 (24)
DIE: 133 - 611 (8)	DIE: 255 - 493 (8)	DIE: 147 - 611 (8)	DIE: 346 (24)
4,4'-DDD: 2,38 - 9,22 (5)	4,4'-DDD: 2,08 - 8,37 (5)	4,4'-DDD: 2,97 - 6,79 (5)	4,4'-DDD: 5,17 (15)
ENSS: 40,0 - 156 (8)	ENSS: 25,4 - 149 (8)	ENSS: 19,7 - 125 (8)	ENSS: 85,7 (24)
Ponto 25 (superfície)	**Ponto 25 (10 cm)**	**Ponto 25 (20 cm)**	**Ponto 25 (conc. média)**
DEA: 12,2 (1)	DEA: 3,7 - 12,2 (2)		DEA: 8,90 (3)
ATR: 2,51 - 85,4 (6)	ATR: 1,47 - 85,0 (5)	ATR: 1,07 - 85,4 (5)	ATR: 16,7 (16)
ALA: 5,91 - 60100 (7)	ALA: 1,89 - 8341 (7)	ALA: 1,22 - 2985 (6)	ALA: 3663 (20)

Pesticidas presentes em maior quantidade nas 16 amostras de solo mais contaminadas (60,2-0,501 mg kg^{-1})

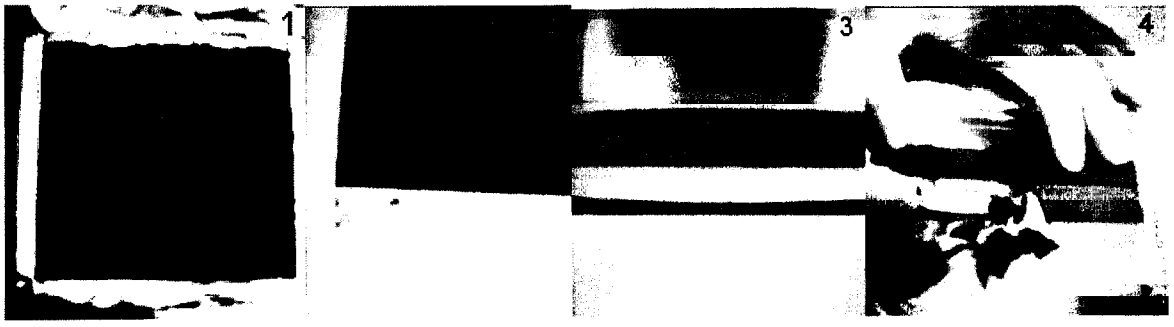
Data/ponto	Pesticidas maioritários	Data/ponto	Pesticidas maioritários
1) Set 01 - 25	ALA	9) Jul 02 - 22	DIE + ENSS
2) Abr 02 - 18	PEN	10) Nov 02 – 18	PEN
3) Out 03 - 22	ALA + PEN + DIE	11) Nov 02 - 22	DIE + ENSS
4) Jul 03 - 5	MET	12) Fev 02 - 22	DIE + ENSS
5) Mar 03 - 18	PEN	13) Mar 03 - 22	DIE + ENSS
6) Fev 02 - 25	ALA	14) Out 03 - 22	ALA + PEN + DIE
7) Jul 03 - 22	ALA + DIE	15) Jul 02 - 5	PEN + ENSS
8) Nov 02 - 22	DIE + ENSS	16) Jul 02 - 18	PEN

ANEXO VII – FIGURAS ILUSTRATIVAS DOS ENSAIOS DE FOTÓLISE

Figuras ilustrativas dos ensaios de fotólise do quinalfos em águas e solos efectuados em condições de irradiação artificial no aparelho Suntest.



Ensaio de fotólise do quinalfos em água.
Pormenor do reactor e da câmara de irradiação



Ensaio de fotólise do quinalfos em solo.
Passo 1 – Preparação da camada de solo com 1 mm de espessura sobre uma placa de vidro.
Passo 2 – Destacamento de uma faixa de solo com 2 cm no início do ensaio (t=0 min.)
Passo 3 – Pormenor da camada de solo com 1 mm de espessura
Passo 4 – Destacamento de faixas de solo com 2 cm após cada período de irradiação para posterior homogeneização e análise.

FACULDAD ... D ... PORT ... BIBLIOTECA

DESENVOLVIMENTO DE MÉTODOS ANALÍTICOS AVANÇADOS PARA A AVALIAÇÃO DA CONTAMINAÇÃO COM PESTICIDAS NA ÁREA DE PROTECÇÃO DO AQUÍFERO LIVRE ENTRE ESPOSENDE E VILA DO CONDE
Carlos Manuel Oliveira Gonçalves
F.S. 464 | Ano: 2006 | 25 Exemplares (1ª Edição) | Produção Gráfica: AJNet | www.ajnet.net