TMUP
156
2008

Pedro Nuno Ribeiro Rodrigues

Quantificação de poluentes orgânicos persistentes organoclorados em sedimentos e investigação *ex-situ* do papel da planta *Halimione portulacoides* na respectiva biorem[illegible]ação

QD130
RODp Q
2008

Departamento de Química
Faculdade de Ciências da Universidade do Porto
Julho / 2008

Biblioteca
Faculdade de Ciências
Universidade do Porto
D000119885

Pedro Nuno Ribeiro Rodrigues

Quantificação de poluentes orgânicos persistentes organoclorados em sedimentos e investigação *ex-situ* do papel da planta *Halimione portulacoides* na respectiva bioremediação

U.PORTO

FACULDADE DE CIÊNCIAS
UNIVERSIDADE DO PORTO

Departamento de Química
Faculdade de Ciências da Universidade do Porto
Julho / 2008

Pedro Nuno Ribeiro Rodrigues

Quantificação de poluentes orgânicos persistentes organoclorados em sedimentos e investigação *ex-situ* do papel da planta *Halimione portulacoides* na respectiva bioremediação

Tese submetida à Faculdade de Ciências da Universidade do Porto para a obtenção do grau de Mestre em Química

Versão de acordo com as sugestões do Júri.
Maria dos Dores Ribeiro de Silva
31/Julho/2008

UNIVERSIDADE DO PORTO
BIBLIOTECA
Sala
Coloc. TMUP-156
N.º 10064
Depart. Química

Departamento de Química
Faculdade de Ciências da Universidade do Porto
Julho / 2008

U.PORTO

DECLARAÇÃO

NOME

Pedro Nuno Ribeiro Rodrigues

BI OU PASSAPORTE (SE ESTRANGEIRO) | TELEMÓVEL | E-MAIL

12721326 | 917903530 | pedronrodrigues@gmail.com

NÚMERO DE ESTUDANTE U.PORTO

070373111

DOUTORAMENTO [ ] MESTRADO [X] DATA DE CONCLUSÃO 24 de Julho de 2008

RAMO/ESPECIALIDADE

Química

TÍTULO

Quantificação de poluentes orgânicos persistentes organoclorados em sedimentos e investigação in-situ do papel da planta Halimione portulacoides na respectiva biorremediação

ORIENTADOR (ES)

Professora Dra. Maria Teresa Vasconcelos

Declaro, para os devidos efeitos, que concedo gratuitamente à Universidade do Porto, para além do título e resumo por mim disponibilizados, autorização para arquivar e tornar acessível aos interessados, nomeadamente através do seu repositório institucional, o trabalho supra-identificado, que disponibilizo no formato e nas condições abaixo indicadas.
A subscrição da presente declaração não implica a renúncia à titularidade dos direitos de autor a direito de usar a obra em trabalhos futuros, os quais são pertença do seu criador intelectual.

ASSINALAR AS OPÇÕES APLICÁVEIS EM 1, 2 E 3.

1. TIPO DE DIVULGAÇÃO	2. ÂMBITO DE DIVULGAÇÃO	3. FORMATO DO FICHEIRO
[X] TOTAL	[X] NA UNIVERSIDADE DO PORTO	[ ] PAPEL
[ ] PARCIAL	[ ] GERAL	[X] DIGITAL (CD/ DVD)

OBSERVAÇÕES (*)

DATA 31/07/2008 ASSINATURA Pedro Nuno Ribeiro Rodrigues

Resumo

Os pesticidas organoclorados (OCPs) integram os poluentes orgânicos persistentes semi-voláteis (POPs) que apresentam efeitos nocivos potenciais sobre o ambiente. Como a maioria dos POPs, os OCPs são lipofílicos, persistentes em vários meios e podem ser transportados ao longo de grandes distâncias para regiões onde estes nunca foram usados. Como os OCPs podem ser introduzidos no ambiente aquático e acumulados em sedimentos por várias vias, os níveis de OCP em sedimentos devem ser determinados e controlados sempre que possível.

Análise de OCPs implica a extracção destes compostos dos sedimentos, o que é difícil devido à sua forte interacção entre os OCPs e os diferentes constituintes dos sedimentos, em particular resíduos orgânicos.

Neste trabalho começou por ser optimizado um método envolvendo uma combinação de extracção assistida por microondas, microextracção em fase sólida em headspace (HS – SPME), cromatografia gasosa com detecção por captura electrónica (GC-ECD) com completa automação do processo de extracção e injecção de amostra, que aumenta o precisão do processo. Quando se revelou necessário para minimizar efeitos de matriz, o processo incluiu um passo de eliminação de enxofre interferente e usou-se o método de adição de padrão para calibração. A validação do método foi efectuada pela análise de doze OCPs em sedimentos de referência com valores certificados: (a) Metranal™ 16, da Analytika Ltd. (Prague, Czech Republic); e (b) CNS300-04-100 da Resource Technology Corporation (Salisbury, United Kingdom).

O método, revelou-se eficiente, relativamente simples e rápido, e foi usado para determinação de resíduos de OCPs em dois estudos diferentes. O primeiro consistiu na investigação da capacidade da planta *Halimione portulacoides* para rizoremediação, e outro consistiu na caracterização dos níveis de OCPs em sedimentos de diversas zonas da costa portuguesa.

Abstract

Organochlorine pesticides (OCPs) integrate the semi volatile persistent organic compounds (POPs) that exhibit potentially harmful effects to the environment. As most of the POPs, OCPs are lipophilic, persist in various media and some can be transported over long distances to regions where they have never been used. As OCPs can be introduced into the aquatic environment and accumulated in sediments by several pathways, levels of OCPs in sediments should be determined and controlled whenever possible.

Analysis of OCPs implicates extraction of these compounds from the sediment, which is difficult owing to strong interaction among OCPs and different constituents of the sediments, particularly organic content.

In this work a method involving a combination of microwave assisted extraction, headspace solid-phase microextraction (HS-SPME) gas chromatography with electron capture detection with complete automation of the extraction and sample injection procedure, which increases the sample throughput, was optimized. To minimize matrix effects, a step for elimination of sulphur interference was included when required and standard addition was used for calibration purpose. Method validation was performed by means of analysis of ten OCPs in reference sediments with certified values: (a) Metranal^{TM} 16, from Analytika Ltd. (Prague, Czech Republic); and (b) CNS300-04-100 from Resource Technology Corporation (Salisbury, United Kingdom).

The method resulted effective, relatively simple and fast, and it was used for determination of OCPs residues in two different studies. The aim of the first one was to investigate the capacity of one plant, *Halimione portulacoides*, for rizoremediation of OCPs in sediment from Lisnave, Sado estuary. The other one consisted of the characterization of OCPs levels in sediments of eleven sites of several coastal areas in Portugal.

Résumé

Les pesticides organochlorés (OCPs) font partie des polluants organiques persistants (POPs) semi-volatils qui ont le potentiel des effets nocifs sur l'environnement. Comme la plupart des POPs, les OCPs sont lipophiles, persistant dans différents compartiments de l'environnement, et peuvent être transportés sur de longues distances dans des régions où ils n'ont jamais été utilisés. Comme les OCPs peuvent être introduits dans le milieu aquatique et s'accumulent dans les sédiments par diverses voies, les niveaux des OCPs dans les sédiments doivent être déterminés et contrôlés.

L'analyse des OCPs implique l'extraction de ces composés de sédiments, ce qui est difficile en raison de leur forte interaction avec des différents constituants des sédiments, en particulier avec la matière organiques.

Ce travail présente une méthode qui consiste à utilise une extraction sous champs micro-onde suivi d'une microextraction en phase solide «head-space», chromatographie en phase gazeuse et détection à capture d'électrons. Les procédé est complètement automatisé ce qui augment sa efficacité. Lorsqu'il est nécessaire de réduire au minimum les effets de matrice, le processus comprend une étape de l'élimination du soufre. La méthode d'ajouts dosés a été utilisée pour l'étalonnage. La méthode a été validée par l'analyse de dix OCPs dans des sédiments de référence certifiés: (a) Metranal^{TM} 16, Analytika Ltd. (Prague, Czech Republic) et (b) CNS300-04-100 de Resource Technology Corporation (Salisbury, United Kingdom).

La méthode est efficace, relativement simple et rapide, et elle a été utilisée pour la détermination de résidus des OCPs dans deux études différentes. L'objectif de la première était d'étudier la capacité d'une plante, *Halimione portulacoides*, pour rizorémédiation des OCPs dans les sédiments de Lisnave, estuaire de Sado. L'autre consistait en la caractérisation des niveaux des OCPs dans les sédiments de onze sites de plusieurs zones côtières au Portugal.

Índice

Página

CAPÍTULO 1

INTRODUÇÃO **2**

1.1. Relevância ambiental do ambiente estuarino **3**

1.2. Pesticidas organoclorados **5**

1.2.1. Características e aplicações **5**

1.2.1.1. Aldrina e dieldrina **5**

1.2.1.2. DDT, DDE e DDD **6**

1.2.1.3. Endosulfano **7**

1.2.1.4. Endrina **7**

1.2.1.5. Heptacloro e Heptacloro epóxido **8**

1.2.1.6. Hexaclorociclohexano **9**

1.2.1.7. Metoxicloro **9**

1.2.2. Ambiente **10**

1.2.2.1. Aldrina e dieldrina **10**

1.2.2.2. DDT, DDE e DDD **10**

1.2.2.3. Endosulfano **11**

1.2.2.4. Endrina **11**

1.2.2.5. Heptacloro e Heptacloro epóxido **11**

1.2.2.6. Hexaclorociclohexano **12**

1.2.2.7. Metoxicloro **12**

1.2.3. Toxicidade **12**

1.2.3.1. Aldrina e dieldrina **12**

1.2.3.2. DDT, DDE e DDD **13**

1.2.3.3. Endosulfano **13**

1.2.3.4. Endrina **14**

1.2.3.5. Heptacloro e Heptacloro epóxido **14**

1.2.3.6. Hexaclorociclohexano **14**

1.2.3.7. Metoxicloro **15**

1.3. Métodos de Determinação de OCPs **16**

1.3.1. Extracção assistida por microondas (MAE) **16**

1.3.2. Microextracção em fase sólida em *headspace* **17**

1.3.3. Cromatografia gasosa com detecção por espectrometria de massa e por captura electrónica **18**

1.4. Rizoremediação **19**

1.5. Objectivos do trabalho **21**

CAPITULO 2

PARTE EXPERIMENTAL **23**

2.1. Trabalho de campo **23**

2.1.1 Investigação *ex-situ* da capacidade da *Halimione portulacoides* para rizoremediação **23**

2.1.2. Caracterização dos níveis de OCPs em diversas zonas costeiras **24**

2.2. Preparação do sedimento sara análises **25**

2.3. Reagentes e soluções **25**

2.4. Equipamento e material **26**

2.5. Procedimento analítico **27**

CAPITULO 3

RESULTADOS E DISCUSSÃO **30**

3.1. Características do método analítico e sua validação **30**

3.2. Investigação da capacidade da *Halimione portulacoides* para rizoremediação de OCP **34**

3.3. Determinação dos níveis de OCPs em diversas zonas costeiras portuguesas **36**

CAPITULO 4

CONCLUSÕES **42**

BIBLIOGRAFIA **43**

Índice de Figuras

Página

Figura 1 – Fórmulas de estrutura da aldrina (esquerda) e dieldrina (direita) **6**

Figura 2 – Fórmulas de estrutura do DDT (cima esquerda), DDE (cima direita) e DDD (baixo) **7**

Figura 3 – Fórmula de estrutura do endossulfano **7**

Figura 4 – Fórmula de estrutura da endrina **8**

Figura 5 – Fórmulas de estrutura do heptacloro (esquerda) e heptacloro epóxido (direita) **8**

Figura 6 – Fórmula de estrutura do hexaclorociclohexano **9**

Figura 7 – Fórmula de estrutura do metoxicloro **10**

Figura 8 – Locais utilizados no estudo *ex-situ* – Estuário de rio Sado **21**

Figura 9 – Locais de recolha dos sedimentos e respectivas coordenadas **22**

Figura 10 – Resultados típicos obtidos para OCPs numa amostra real de sedimento usando GC-ECD. **30**

Figura 11 – Concentração de OCPs (valores médios ± desvios padrão, n=4, em ng g^{-1}), observadas em sedimento da zona da Lisnave inicial (P0) (Fevereiro de 2007) e das mangas retiradas da Comporta no mês de Novembro de 2007. **32**

Índice de Tabelas

Página

Tabela 1 – Condições usadas em SPME para determinação de OCPs **28**

Tabela 2 – Condições de operação dos GC-ECD e GC-MS para determinação de OCPs **28**

Tabela 3 – Resultados obtidos para sedimentos de referência certificados **30**

Tabela 4 – Características do método optimizado para determinação, por GC-ECD, de OCPs em sedimentos estuarinos **31**

Tabela 5 – Características dos locais de amostragem e dos sedimentos amostrados **36**

Tabela 6 – Níveis de OCPs (valores médios ± desvios padrão, n=4, expresso em ng por grama de sedimento seco) determinados, por GC-ECD, em 2007-2008 em diferentes zonas costeiras portugueses **37**

Tabela 7 – Níveis de OCPs (expresso em ng por grama de sedimento seco) observados em diferentes solos de zonas costeiras portugueses **40**

CAPÍTULO 1

INTRODUÇÃO

Capítulo 1

Introdução

Os sedimentos são usualmente tidos como sendo um esgoto para os poluentes orgânicos persistentes, POPs, descarregados no ambiente. O sedimento é caracterizado como uma matriz de materiais que engloba detritos, partículas inorgânicas e orgânicas, e é relativamente heterogénea em termos de características físicas, químicas e biológicas. Sendo este um dos principais reservatórios de poluentes ambientais, representam uma fonte de contaminação secundária, a partir da qual os resíduos podem ser libertados para a coluna de água, para a atmosfera, águas subterrâneas e organismos vivos, e devido a este facto, são um dos melhores meios para monitorização a longo prazo de muitos poluentes[1,2].

Os POPs são espécies químicas resistentes à degradação fotoquímica, biológica e química por períodos de tempo muito alargados[1]. Devido à sua persistência ambiental, os POPs são distribuídos globalmente no nosso planeta via mecanismos de transporte atmosféricos, sendo encontrados mesmo para regiões polares remotas onde estes nunca foram usados. A fracção maioritária dos POPs libertada mundialmente para o ambiente global é originária das regiões asiáticas[3]. Nas secções seguintes tratar-se-á de alguns POPs que foram objecto de estudo deste trabalho.

1.1. Relevância ambiental do ambiente estuarino

Os estuários são zonas muito importantes, visto conterem um ecossistema muito particular, como seguidamente é explicitado[4]. O estuário de um rio é a área da bacia hidrográfica correspondente ao troço final que está sujeito ao fluxo bidiário das marés. Estende-se desde a foz até ao limite das águas salobras. Dada a complexidade ecológica e geomorfológica de muitos estuários é frequente o uso do termo "sistema estuarino". A mistura da água salgada do mar com a água doce fluvial e a fraca corrente das marés nas zonas protegidas dos estuários permite a deposição de sedimentos finos e a formação de lodaçais e bancos arenosos e/ou vasoso, submersos durante a preia-mar.

Para além de extensas áreas desprovidas de vegetação, nos estuários é frequente encontrar comunidades de plantas vasculares halófilas ou sub-halófilas, constituindo sapais. De referir que as comunidades de sapal de uma forma geral têm naturalmente uma grande resiliência e resistência à perturbação. A reconstituição da dinâmica sedimentar primitiva, o controlo das fontes de poluição e a reposição dos padrões de perturbação primitivos são normalmente suficientes para uma rápida restauração.

A erosão associada aos sistemas agropastoris tradicionais teve um efeito favorável na área de ocupação deste habitat. Esta tendência milenar inverteu-se recentemente com o abandono agrícola.

Os estuários são frequentes no Superdistrito Miniense Litoral (Província Cantabro-Atlântica) (rios Ave, Cávado, Lima e Minho) e na Província Gaditano-Onubo-Algarvia (rios Mondego, Tejo, Sado, Mira, Guadiana, ribeira de Aljezur, rias de Alvor e Formosa). Em Portugal, a fronteira entre os estuários atlânticos e mediterrânicos situa-se no estuário do rio Mondego.

Os estuários do Norte de Portugal são naturalmente de pequena dimensão, estreitos e no mesmo sentido do talvegue (linha que segue a parte mais baixa do leito de um rio e onde a corrente é mais rápida). A sul do Mondego, inclusive, os estuários são geralmente de maior dimensão e de maior complexidade geomorfológica e ecológica. Ao contrário do que acontece no Norte, caracterizam-se pela presença de extensas e complexas reentrâncias, abrigadas das correntes fluviais e mareais mais fortes.

Os sapais desenvolvem-se sobre lodaçais onde as correntes são incapazes de transportar a totalidade dos sedimentos que acarretam. A estabilização do substrato de sapal

inicia-se com a floculação dos sedimentos finos pela acção do cloreto de sódio da água do mar.

Estuários mediterrânicos

Os estuários mediterrânicos estendem-se por toda a costa Sul, Sudoeste e Centro-Oeste de Portugal até ao estuário do Mondego (*inclusive*).

A construção de portos (e de outras estruturas relacionadas com o transporte marítimo) no interior dos sapais (e.g. Lisboa, Setúbal, Faro, Alvor) conduziu a uma redução da extensão dos estuários e ao desaparecimento completo da vegetação de sapal nos locais onde foram edificados.

Os estuários mediterrânicos, e respectivos sapais, sofreram um impacto da acção humana francamente inferior à dos estuários atlânticos. A dimensão destes estuários, o facto dos seus sapais e lodaçais serem mais movediços, de mais difícil conversão à agricultura (menor pluviosidade, com uma menos eficiente lavagem dos sais) e de se situarem, em muitos casos, longe da barra, protegeram um significativa porção da vegetação vascular halófila estuarina da destruição física directa causada pelas obras portuárias.

Estuários atlânticos

Nos sapais eurossiberianos está ausente o sapal externo alto colonizado por espécies adaptadas a teores muito elevados e variáveis de sais no solo.

Os estuários temperados foram severamente modificados por acção antrópica, inclusivamente alguns totalmente artificializados (e.g. foz do rio Leça). A vegetação de sapal destes pequenos estuários foi profundamente alterada por obras portuárias (e.g. rios Lima e Douro), pela expansão urbana (e.g. foz dos rios Ave, Cávado, Lima e Minho), pela construção de estradas e caminhos (e.g. estuário do rio Minho), extracção de areias (e.g. rios Lima e Douro), etc.

1.2. Pesticidas organoclorados

Os pesticidas organoclorados (OCPs) foram e ainda são usados na agricultura com o propósito de prevenir, repelir e mitigar efeitos de pestes e desta maneira aumentar a produtividade agrícola, melhoria na qualidade do produto colhido e decréscimo da incidência de doenças propagadas por insectos[5].

São lipofilicos (alto coeficiente de partição octanol-água K_{ow}) e hidrofóbicos (baixa solubilidade em água), tendo tendência a bioacumular nos tecidos adiposos, e consequentemente levando à sua bioconcentração/biomagnificação ao longo da cadeia alimentar envolvendo uma larga escala de níveis tróficos, principalmente nos ecossistemas aquáticos[1,6]. São estáveis a nível químico e biológico e bastante tóxicos.

Estas características fizeram com que estes fossem rotulados de perigos ambientais, pois geram riscos crescentes para a saúde humana e para um vasto número de organismos marinhos, tais como, efeitos adversos no sistema endócrino (disrupção de funções hormonais), cancros e ainda efeitos crónico-tóxicos[2,3,7,8]. Como consequência, alguns (aldrina, DDT, dieldrina, endrina)[9] foram banidos na maioria dos países desde os anos 1970s (alguns deles também se encontram incluídos na Convenção de Estocolmo como o DDT), mas muitos países em desenvolvimento ainda usam OCPs para fins de saúde pública, agrícolas e industriais, por causa do seu baixo custo e versatilidade[1,5].

1.2.1. Características e aplicações

1.2.1.1. Aldrina e dieldrina [10]

A aldrina e a dieldrina são insecticidas com estrutura química similar (Fig. 1). São apresentados em conjunto devido ao facto da aldrina se decompor rapidamente em dieldrina, tanto no corpo como no ambiente. A aldrina e dieldrina puras são pós brancos com um odor químico suave. Os pós comerciais menos puros apresentam uma coloração bronzeada. Nenhuma das substâncias ocorre naturalmente no ambiente.

Desde os anos 1950s até 1970s, a aldrina e a dieldrina foram vastamente usadas como pesticidas para colheitas, como milho e algodão. Por causa de preocupações acerca dos danos para o ambiente e potencialmente para a saúde humana, a EPA baniu todo o uso de aldrina e

dieldrina em 1974, excepto para controlo de térmitas. Em 1987, a EPA baniu totalmente o uso destes compostos.

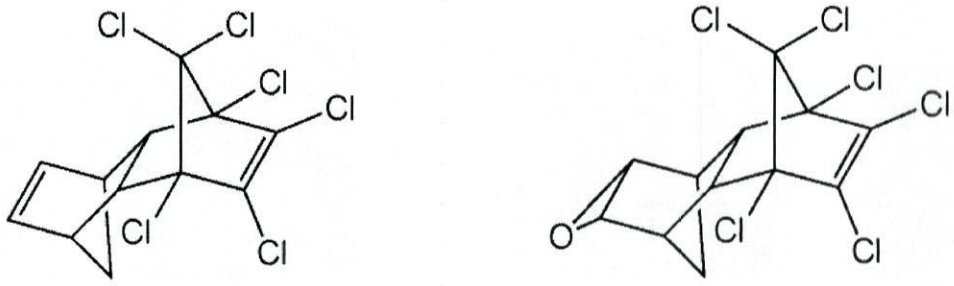
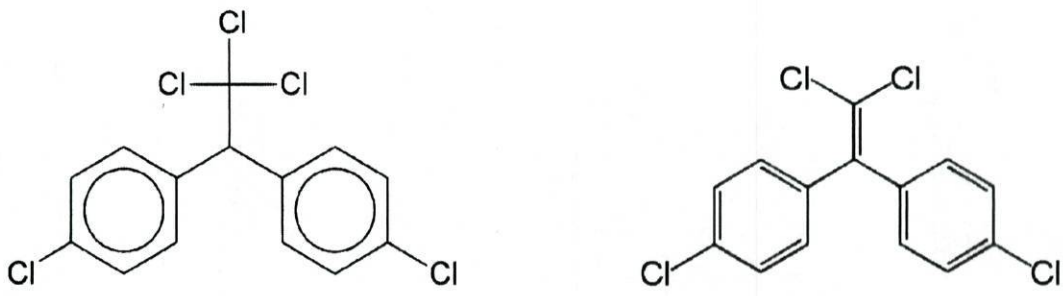


Figura 1 – Fórmulas de estrutura da aldrina (esquerda) e dieldrina (direita).

1.2.1.2. DDT, DDE e DDD [11]

O DDT (diclorodifeniltricloroetano) (Fig. 2) foi um pesticida outrora vastamente usado para o controlo de insectos na agricultura e insectos que transportam doenças como a malária. O DDT é branco, um sólido cristalino sem sabor ou cheiro. O seu uso nos Estados Unidos foi banido em 1972 por causa dos danos que causava a vida selvagem, mas ainda é usado em alguns países.

O DDE (diclorodifenildicloroetileno) e o DDD (diclorodifenildicloroetano) são químicos similares (Fig. 2) ao DDT que contaminam preparações comerciais do DDT. O DDE não tem qualquer uso comercial. O DDD foi também usado para matar pestes, mas o seu uso foi também banido. Uma forma de DDD tem sido usada medicamente para tratar cancros nas glândulas suprarenais.



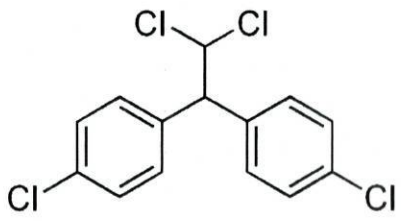


Figura 2 – Fórmulas de estrutura do DDT (cima esquerda), DDE (cima direita) e DDD (baixo).

1.2.1.3. Endossulfano [12]

O endossulfano é um pesticida e apresenta-se na forma sólida (Fig. 3), que pode aparecer sob a forma de cristais ou flocos, e tem uma coloração entre o creme e o castanho. Tem um odor como a turpertina, mas não inflama. Não ocorre naturalmente no ambiente.

O endossulfano é usado para o controlo de insectos em colheitas comestíveis e não-comestíveis, e também como um conservante de madeiras.

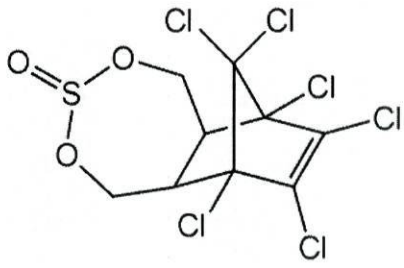


Figura 3 – Fórmula de estrutura do endossulfano.

1.2.1.4. Endrina [13]

A endrina é uma substância sólida (Fig. 4), branca, e quase sem cheiro que foi usada como pesticida para controlar insectos, roedores e aves. A endrina não tem sido produzida ou vendida para uso geral nos Estados Unidos desde 1986.

Pouco se sabe sobre as propriedades da endrina aldeido (uma impureza ou produto de degradação da endrina) e da endrina cetona (um produto da endrina quando esta é exposta a luz).

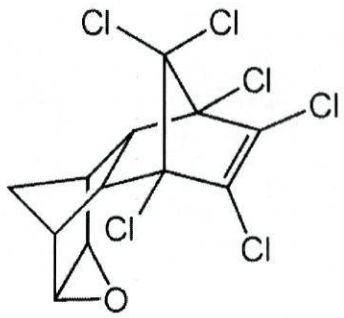


Figura 4 – Fórmula de estrutura da endrina.

1.2.1.5. Heptacloro e heptacloro epóxido [14]

O heptacloro é um químico manufacturado (Fig. 5) e não ocorre naturalmente. Puro, o heptacloro é um pó branco que cheira a cânfora. Quando apresenta um grau de pureza inferior

apresenta uma coloração bronzeada. Como nomes de marca incluem-se Heptagran®, Basaklor®, Drinox®, Soleptax®, Termide®, Gold Crest H-60®, e Velsicol 104®.

O heptacloro foi muito usado no passado para matar insectos em casas, outros edifícios e colheitas. Estes usos pararam em 1988. Correntemente só pode ser usado para o controlo de formigas vermelhas em transformadores de potência subterrâneos.

O heptacloro epóxido (Fig. 5) também é um pó branco. A decomposição bacteriana e animal do heptacloro dão origem ao heptacloro epóxido. O epóxido é mais provável de ser encontrado no ambiente que o heptacloro.

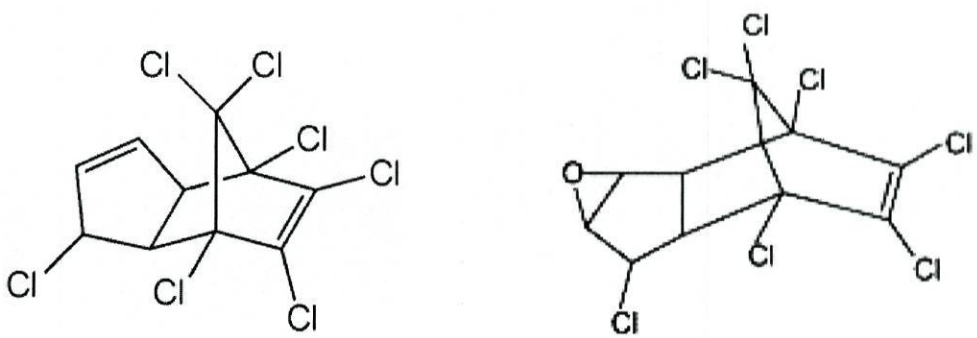


Figura 5 – Fórmulas de estrutura do heptacloro (esquerda) e heptacloro epóxido (direita).

1.2.1.6. Hexaclorociclohexano [15]

O hexaclorociclohexano (HCH) é um químico manufacturado (Fig. 6) que existe em oito formas químicas, chamadas isómeros. Uma destas formas, o gama-HCH (ou γ-HCH, comummente conhecido como lindano) é produzido e usado como um insecticida em frutos, vegetais, colheitas florestais. É um sólido branco que pode evaporar como um vapor incolor com um odor ligeiramente rançoso. Está também disponível como receita (loção, creme ou champô) para tratar piolhos e sarna. O lindano não tem sido produzido nos Estados Unidos desde 1976, mas é importado para uso como insecticida.

O HCH de classe-técnica foi usado como um insecticida nos Estados Unidos e continha tipicamente 10-15% de γ-HCH bem como as formas alfa (α), beta (β), delta (δ) e épsilon (ε) de HCH. Virtualmente todas as propriedades insecticidas residem no γ-HCH. O HCH de classe-técnica não tem sido produzido ou usado nos Estados Unidos à mais de 20 anos.

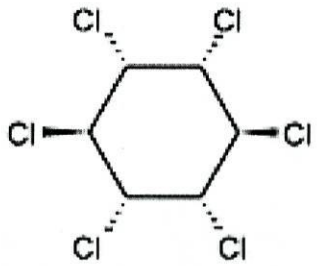


Figura 6 – Fórmula de estrutura do hexaclorociclohexano.

1.2.1.7. Metoxicloro [16]

O metoxicloro (Fig. 7), tal como o heptacloro, é um químico manufacturado que não ocorre naturalmente no ambiente. O metoxicloro puro é um pó de cor amarelo pálido com um odor ligeiramente frutado ou rançoso. É também conhecido como DMDT, Marlate® ou Metox®.

O metoxicloro é usado como insecticida contra moscas, mosquitos, baratas e muitos outros insectos. É usado em colheitas agrícolas e gado, celeiros, locais de armazenamento de grão, jardins e animais de estimação.

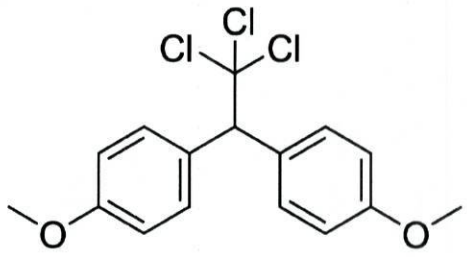


Figura 7 – Fórmula de estrutura do metoxicloro.

1.2.2. Ambiente

1.2.2.1. Aldrina e dieldrina [10]

A aldrina devido ao efeito de radiação solar e de bactérias é degradada ao seu produto dieldrina, por isso esta é encontrada em maior quantidade no ambiente. Estes dois compostos ligam-se fortemente ao solo e evaporam lentamente, e a degradação da dieldrina no solo, e mesmo em águas, é bastante lenta.

As plantas muitas vezes assimilam e acumulam estes compostos através do solo, e caso esta seja assimilada sob a forma de aldrina rapidamente é degradada no seu interior. O mesmo se sucede com os animais que a ingerem. O local de acumulação destes compostos nas plantas e animais são as folhas e os tecidos gordos, respectivamente.

1.2.2.2. DDT, DDE e DDD [11]

O DDT entrou no ambiente aquando do seu uso como pesticida, e ainda entra devido ao seu uso noutros países menos desenvolvidos. Os seus metabolitos, DDE e DDD, entram no ambiente como contaminantes ou produtos de degradação deste. Estes três compostos na atmosfera são rapidamente degradados por efeito da radiação solar, e metade do que nela se encontra é degradado em cerca de 2 dias.

Aderem fortemente ao solo, e a maioria do DDT no solo é lentamente degradado a DDE e DDD por efeito de microoganismos. O tempo de semi-vida do DDT é de cerca de 2-15 anos, dependendo do tipo de solo. Visto serem hidrofóbicos, só uma pequena quantidade é

que se infiltra no solo e passa aos lençóis de água. Tal como a aldrina e dieldrina, o DDT, e especialmente o DDE, sofrem acumulação nos tecidos das plantas e nos tecidos gordos de peixes, aves e outros animais.

1.2.2.3. Endossulfano [12]

O endossulfano entra para a atmosfera, águas e solos aquando da sua manufacturação e uso. É usualmente usado como insecticida em colheitas, e visto ser lançado sob a forma de aerossóis, pode viajar longas distâncias antes de aterrar nas colheitas, em solos ou águas. Nas colheitas a sua degradação leva cerca de poucas semanas, mas nos solos adere às partículas deste e leva anos a degradar-se completamente.

Também é um composto que não se dissolve facilmente na água, e em águas superficiais encontra-se ligado a partículas a flutuar ou ligado ao sedimento.

1.2.2.4. Endrina [13]

A endrina tem sido encontrada em águas subterrâneas e superficiais mas em baixos níveis devido ao facto de ser um composto hidrofóbico, e por isso é mais provável ser encontrado nos sedimentos de rios, lagos e outros corpos de água. Geralmente não é encontrada na atmosfera, excepto quando era aplicada aos campos para fins agrícolas.

A persistência da endrina no ambiente depende bastante das condições do local. Algumas estimativas indicam que a endrina pode perdurar nos solos mais de 10 anos. Pode ser degradada por exposição a altas temperaturas ou radiação luminosa para formar principalmente endrina cetona e endrina aldeído.

Não se sabe o que acontece à endrina aldeído ou endrina cetona quando são libertadas para o ambiente. Contudo, a quantidade de endrina que se degrada a endrina aldeído ou endrina cetona é muito baixa.

1.2.2.5. Heptacloro e heptacloro epóxido [14]

O heptacloro e o heptacloro epóxido, como todos os OCPs anteriores, também são hidrofóbicos, sendo e heptacloro dos dois o mais insolúvel. Por esta razão aderem fácil e fortemente às partículas do solo e evaporam muito lentamente. Estes podem perdurar no solo e nas águas por vários anos.

As plantas conseguem assimilar o heptacloro e heptacloro epóxido do solo, sendo depois bioacumulados nos tecidos destas.

1.2.2.6. Hexaclorociclohexano [15]

Os componentes do HCH de qualidade técnica têm sido encontrados em solos e águas superficiais perto de locais de resíduos perigosos. Na atmosfera as diferentes formas de HCH podem existir como vapores ou ligadas a pequenas partículas como poeiras. As partículas podem ser removidas do ar por chuvas ou degradadas por outros compostos presentes na atmosfera. Os HCH podem permanecer na atmosfera durante lagos períodos de tempo e viajar grandes distâncias.

Nos solos, sedimentos e águas o HCH é degradado a substâncias menos tóxicas por algas, fungos e bactérias, mas o processo pode levar muito tempo.

1.2.2.7. Metoxicloro [16]

A maioria do metoxicloro entra no ambiente aquando da aplicação em colheitas agrícolas, em florestas e em gado. Aquele que é libertado para a atmosfera eventualmente acaba por assentar no solo. Tal como os outros, é hidrofóbico e uma vez presente em corpos de água adere aos sedimentos. Na atmosfera, águas e solos degrada-se lentamente, o que pode levar vários meses, por efeito de radiação solar e microorganismos.

Alguns produtos de degradação do metoxicloro podem ser tão perigosos quanto este. Usualmente este poluente não tem tendência a bioacumular ao longo da cadeia alimentar.

1.2.3. Toxicidade

1.2.3.1. Aldrina e dieldrina [10]

Pessoas que ingeriram intencional ou acidentalmente grandes quantidades de aldrina ou dieldrina sofreram convulsões e algumas morreram. Efeitos na saúde podem também ocorrer após um longo período de exposição a pequenas quantidades, visto estes compostos se bioconcentrarem no corpo humano.

Alguns trabalhadores expostos a níveis moderados, presentes no ar, durante longos períodos de tempo sofreram dores de cabeça, tonturas, irritabilidade, vómitos e movimentos musculares incontrolados. Porém quando esses trabalhadores foram retirados do local de exposição rapidamente recuperaram da maioria destes efeitos.

Animais expostos a grandes quantidades de aldrina e dieldrina também sofreram efeitos no sistema nervoso. Nos animais, a exposição a baixos níveis durante longos períodos

de tempo também afectam o fígado e reduzem a sua capacidade para lutar contra infecções. Estudos em animais deram resultados inconclusivos quanto ao factos de estes dois compostos afectarem o sistema reprodutor dos animais ou danificar o esperma. Relativamente a efeitos em humanos ainda nada se sabe.

A aldrina e a dieldrina mostraram poder causar cancro no fígado de ratos. A EPA determinou que a aldrina e dieldrina são prováveis carcinogénicos.

1.2.3.2. DDT, DDE e DDD [11]

O DDT afecta o sistema nervoso. Pessoas que acidentalmente ingeriram grandes quantidades de DDT tornaram-se excitáveis e tiveram tremores. Estes efeitos desapareceram após a exposição ter parado. Nenhum efeito foi evidenciado em pessoas que tomaram pequenas doses de DDT, por cápsulas, durante 18 meses. Um estudo em humanos mostrou que mulheres que tinham altas quantidades de DDE no seu leite eram impedidas de alimentar os seus bebés durante o mesmo tempo que aqueles que continham menor quantidade de DDE no seu leite. Outro estudo em humanos mostrou que mulheres com grande quantidade de DDE no leite tinham a hipótese acrescida de ter bebés prematuros.

Nos animais, exposição de curto prazo a grandes quantidades de DDT em comidas afectavam o sistema nervoso, enquanto que exposição a longo prazo a pequenas quantidades de DDT ou seus metabolitos poderiam também ter efeitos a nível da reprodução.

Os estudos levados a cabo em trabalhadores expostos a DDT não mostraram o aumento da incidência de cancro. Estudos em animais aos quais foram dados alimentos com DDT evidenciaram que este pode causar cancro no fígado. A EPA considerou o DDT e seus metabolitos como possíveis carcinogénicos.

1.2.3.3. Endossulfano[12]

O endossulfano afecta o sistema nervoso central impedindo-o de funcionar correctamente. Efeitos como hiperactividade, náuseas, vertigens, dores de cabeça ou convulsões foram observados em adultos expostos a altas doses. Graves envenenamentos por endossulfano pode mesmo resultar em morte.

Estudos dos efeitos do endossulfano em animais sugerem que a exposição a longo prazo pode também danificar os rins e fígado, e pode possivelmente afectar as defesas do organismo para combater infecções. Contudo, não se sabe se estes efeitos também ocorrem nos humanos.

1.2.3.4. Endrina [13]

A exposição a endrina pode causar vários efeitos negativos incluindo morte e graves problemas no sistema nervoso central (cérebro e espinal medula). A ingestão de grandes quantidades de endrina pode causar convulsões e morte em poucos minutos ou horas. Os sintomas que podem resultar do envenenamento por endrina são dores de cabeça, vertigens, nervosismo, confusão, náuseas, vómitos e convulsões.

Efeitos a longo prazo na saúde não têm sido notados em trabalhadores que foram expostos a endrina, por inalação ou manuseamento.

Estudos em animais confirmaram que o alvo principal da endrina é o sistema nervoso central. Deficiência nos nascimentos, especialmente má formação óssea, foi notada em alguns estudos com animais.

1.2.3.5. Heptacloro e heptacloro epóxido [14]

Não existe informação de confiança quanto aos efeitos destes compostos na saúde humana. Em animais, a ingestão de heptacloro causa danos no fígado, excitabilidade e decréscimo de fertilidade. Os efeitos tornam-se bem piores quando os níveis de exposição aumentam ou a exposição dura várias semanas. Apesar da informação sobre o heptacloro expóxido ser reduzida, é provável que efeitos semelhantes sejam observados visto serem compostos parecidos.

A exposição prolongada a heptacloro resultou no aparecimento de tumores em animais, e por isso a EPA também considerou este composto como um provável carcinogénico para humanos.

1.2.3.6. Hexaclorociclohexano [15]

Trabalhadores que têm respirado ar contaminado durante a manufactura dos pesticidas, incluindo γ-HCH, tiveram problemas sanguíneos, vertigens e mudanças nos níveis das hormonas. Algumas pessoas que ingeriram grandes quantidades sofreram morte.

Animais alimentados com γ- e α-HCH sofreram convulsões, e animais alimentados com β-HCH entraram em coma. Todos os isómeros produzem efeitos adversos nos rins e fígado. Aqueles que foram alimentados com γ-HCH sofreram uma redução na sua capacidade para o organismos combater as infecções, e ainda foram verificados efeitos nos ovários e testículos naqueles aos quais foram dados γ-HCH ou β-HCH.

A administração por via oral por largos períodos de tempo de α-HCH, β-HCH, γ-HCH ou HCH de qualidade técnica em roedores de laboratório originou cancro no fígado. A EPA determinou que seria seguro considerar o lindano (γ-HCH) como carcinogénico. Também classificou o HCH de qualidade técnica e α-HCH como prováveis carcinogénicos humanos, o β-HCH como possível carcinogénico humano e o δ- e o ε-HCH como não sendo carcinogénicos.

1.2.3.7. Metoxicloro [16]

Existe pouca informação sobre como o metoxicloro afecta a saúde humana. Animais expostos a altas quantidades de metoxicloro sofreram tremores e convulsões. Devido ao facto do metoxicloro ser rapidamente degradado no corpo, não é provável que um humano experimente estes efeitos a não ser que seja exposto a níveis altos.

Estudos em animais mostraram que a exposição a metoxicloro por alimento e água prejudica os ovários, útero e ciclo reprodutivo nas fêmeas, e os testículos e próstata nos machos, o que faz com que haja um decréscimo de fertilidade nos dois sexos. Estes efeitos podem ocorrer tanto em animais adultos como em desenvolvimento, e também ocorrem após inalação ou contacto.

Estes efeitos são causados pelos produtos de degradação do metoxicloro, os quais agem como hormonas naturais. Estes efeitos não são conhecidos em humanos mas podem ocorrer.

A maioria da informação disponível sobre estudos efectuados em animais sugerem que o metoxicloro não causa cancro, por isso a EPA classificou-o como não sendo carcinogénico.

Devido à grande estabilidade de todos estes OCPs, e seus metabolitos, ainda podem ser encontrados no ambiente, nomeadamente em águas superficiais, solos, rios e sedimentos. Nestas matrizes os OCPs encontram-se associados a componentes orgânicos e tecidos biológicos em sistemas aquáticos [1,8].

Contaminações por pesticidas têm sido monitorizadas em sedimentos estuarinos e costeiros praticamente por todo o mundo, com particular incidência nos países asiáticos, tais como, Vietname e China, indicando uma possível presença de fontes significativas destes poluentes nessa região[17-19].

1.3. Métodos de Determinação de OCPs

Nos últimos anos foram feitos esforços notáveis para o estabelecimento de métodos analíticos sensíveis e confiáveis que permitem a determinação simultânea de resíduos de diferentes OCPs, e que são mais expeditos do que os métodos tradicionais que utilizaram a clássica extracção por Soxhlet. No presente trabalho usou-se extracção assistida por microondas (MAE) para remoção dos POPs do sedimento, e a microextracção em fase sólida (SPME) para pré-concentração e injecção num cromatógrafo gasosa (GC). Seguidamente, descreve-se resumidamente cada um dos passos do método.

1.3.1. Extracção assistida por microondas (MAE)

Tem sido desenvolvida intensa actividade de investigação com vista à utilização da energia de microondas para a extracção de poluentes de amostras ambientais ao longo da última década para posterior análise[20].

A MAE tem a vantagem de requerer volumes de solvente baixos e curtos períodos de extracção. A metodologia de MAE é baseada na energia da radiação não-ionizante da zona das microondas para causar alterações nos estados de energia rotacional molecular em líquidos com dipolo permanente, levando a um rápido aquecimento do solvente e da amostra, mas não induzindo mudanças na estrutura molecular[21,22].

Neste tipo de estudo a solução extractora foi sempre um solvente orgânico com alguma polaridade, como, por exemplo, metanol, acetona ou acetonitrilo[22].

A MAE tem provado que pode substituir as metodologias de extracção convencionais, com eficiência superior à extracção por Soxhlet para compostos polares. Esta metodologia tem sido aplicada a diferentes compostos, tais como, insecticidas organoclorados, hidrocarbonetos aromáticos polinucleados, metilmercurio, etc., com excelentes resultados.

1.3.2. Microextracção em fase sólida em *headspace*

A SPME é um procedimento de extracção executado previamente à análise por GC.

A SPME consiste na extracção, geralmente com pré-concentração do analito, directamente da amostra gasosa, líquida ou sólida (pouco vulgar), numa camada polimérica que está a revestir uma fina fibra de sílica fundida, ou mais recentemente também ligas metálicas. A técnica permite numa extracção automatizada, significativamente mais rápida, simples e fácil que as técnicas de extracção tradicionais[6,23].

O dispositivo básico de SPME consiste em dois componentes principais: a seringa e a fibra. A seringa serve como suporte (*holder*) para a fibra a qual inclui uma agulha que protege uma fibra, que consiste num bastão de fibra óptica, ou liga metálica, no qual uma parte é sílica fundida, com diâmetro e comprimento que podem variar, de acordo com o fim para qual seja utilizada[7]. A fibra está revestida com uma fina camada de polímero, que no presente estudo foi de polidimetilsiloxano – PDMS. Com esta técnica, a extracção do analito a partir da amostra pode ser realizada directamente em solução líquida ou através de *headspace* (fase gasosa situada por cima da amostra liquida ou sólida em sistema fechado)[24] permitindo a absorção dos analitos de acordo com a sua afinidade para o revestimento da fibra. Os analitos são termicamente desorvidos da fibra no injector do cromatógrafo gasoso, que se encontra a uma temperatura alta, e são subsequentemente analisados[7].

Recentemente, a SPME em *headspace* (HS-SPME) tem sido usada para determinação de OCPs e outros compostos orgânicos em diferentes matrizes, tais como águas, solos e amostras de fluidos biológicos[25]. O uso de *headspace* é recomendado quando o efeito da matriz pode afectar a determinação analítica, pois a HS-SPME apresenta uma vantagem significativa em termos de selectividade, visto só os compostos orgânicos voláteis e semi-voláteis poderem atingir concentrações apreciáveis no *headspace*. Por esta razão o HS-SPME origina sinais de fundo mais baixos que o modo de SPME imersão directo[25,26].

A SPME conjuga as seguintes vantagens: (i) elimina por completo os solventes na preparação da amostra para análise, (ii) reduz grandemente sinais do branco, (iii) reduz o tempo de extracção, (iv) permite obter bons resultados sobre um grande intervalo de concentrações, (v) não requer a remoção completa do analito da matriz liquida, e (vi) pode ser facilmente automatizado[27]. Tem demonstrado ser adequada para a análise ambiental residual e uma alternativa poderosa às extracções clássicas[6].

1.3.3. Cromatografia gasosa com detecção por espectrometria de massa e por captura electrónica

A cromatografia gasosa, GC, foi uma das primeiras técnicas de separação a ser desenvolvida e até aos dias de hoje não perdeu eminência. A popularidade da GC é baseada na combinação favorável de selectividade e resolução altas, boa exactidão e precisão, aplicabilidade a uma gama de concentrações e alta sensibilidade.

A actualidade da GC reflecte-se na sua adaptação a análises de campo e no desenvolvimento de novas tecnologias, tais como, GC de alta rapidez (HSGC) e cromatografia multidimensional abrangente (GC x GC), a qual aumenta grandemente a capacidade de separação do sistema cromatográfico[28].

Variados tipo de detecções podem ser acoplados a esta técnica cromatográfica, mas neste trabalho usou-se a detecção por captura electrónica (ECD) para quantificação dos pesticidas, após identificação dos analitos por espectrometria de massa (MS). A detecção por MS permite, em geral, limites de detecção mais baixos, mas o ECD ainda é uma ferramenta amplamente usada para análises ambientais, especialmente para fins de monitorização[6]. A detecção por ECD é porém mais sensível que a MS para compostos organoclorados e por isso foi a escolhida para realizar a maior parte do presente trabalho analítico.

1.4. Rizoremediação

A introdução de tóxicos químicos antropogénicos no ambiente, e a massiva relocalização de substâncias residuais em diferentes compartimentos ambientais (solos, águas subterrâneas, e atmosfera) têm resultado numa grande pressão sobre a capacidade de auto-limpeza dos ecossistemas. Presentemente, esforços estão a ser levados a cabo em vários países quer para controlar a libertação de poluentes quer para remediar os que já se encontram disseminados no ambiente[29]. Todas as tecnologias envolvem custo de capital, de mão-de-obra e de operação.

Consequentemente, estão em curso programas de investigação para desenvolver abordagens económica e ecologicamente vantajosas para tratar grandes volumes de recursos naturais poluídos, designadamente solos, águas e pântanos. A remediação biológica designada por rizoremediação é uma tecnologia emergente que utiliza a simbiose entre plantas vasculares e microrganismos que vivem na vizinhança das raízes ou rizosfera para promover a remoção, transformação, ou acumulação nas plantas de poluentes do solo, sedimento e águas. A rizoremediação tem potencial para o tratamento de numerosas classes de poluentes, incluindo hidrocarbonetos do petróleo, solventes clorados, pesticidas, explosivos, metais pesados e radionuclídeos, e lixiviados de aterros.

Entre os fenómenos que ocorrem na zona envolvente das raízes das plantas e que estarão envolvidos na rizoremediação incluem-se os seguintes[26,30-32]: (1) modificação das propriedades físicas e químicas dos locais poluídos; (2) libertação de exsudatos pelas raízes, que aumentam o carbono orgânico e a biodisponibilidade de nutrientes para os microorganismos remediadores; (3) melhoria da oxigenação do meio pela libertação directa de oxigénio para a zona das raízes, bem como o aumento da porosidade das zonas superiores no caso de solo; (4) intercepção e retardação do movimento dos poluentes na zona em questão; (5) diminuição da migração vertical e lateral dos poluentes para águas subterrâneas. Em muitos estudos de remediação, a rizoremediação é vista como um passo "polidor" final após um tratamento inicial de outra natureza para reduzir níveis de poluição muito altos. Contudo, quando os contaminantes estão em baixa concentração, a rizoremediação por si só pode ser a estratégia de remediação mais económica e eficiente.

A rizoremediação *in situ* envolve a colocação de plantas remediadoras em águas, solos ou sedimentos poluídos, ou em solo ou sedimento que está em contacto com águas subterrâneas. Neste trabalho averiguou-se a capacidade da planta *Halimione portulacoides*

para remover OCPs de sedimentos contaminados provenientes da zona da Lisnave no estuário do rio Sado.

1.5. Objectivo do trabalho

Este trabalho teve como primeiro objectivo avaliar o desempenho de um método analítico por GC-ECD para determinação de OCPs em sedimentos estuarinos.

Uma vez concretizado esse objectivo, o método foi aplicado à detecção dos níveis de OCPs em sedimentos superficiais de 11 locais em zonas costeiras portuguesas distribuídas do norte ao sul do país.

Foi também averiguada a capacidade da planta *Halimione portulacoides* para reduzir a contaminação por OCPs de sedimento na Lisnave, estuário do rio Sado, muito poluído por substâncias químicas de natureza variada.

CAPITULO 2

PARTE EXPERIMENTAL

Capítulo 2

Parte Experimental

2.1. Trabalho de campo

2.1.1. Investigação *ex-situ* da capacidade da *Halimione portulacoides* para rizoremediação

O trabalho de campo em que uma parte deste estudo entroncou começou em Fevereiro de 2007, quando sedimento poluído da zona da Lisnave no estuário de rio Sado foi recolhido para caixas de plástico revestidas interiormente a alumínio, para impedir a contaminações (contaminações por tributilestanho, visto este ser um estabilizante do PVC, material presente na composição da caixa. Isto porque estes sedimentos também foram usados para determinação de butilestanhos) e transportados para a zona da Comporta, um local alegadamente menos contaminado localizado na margem sul do estuário do Sado (Fig. 1).

Figura 8 – Locais utilizados no estudo *ex-situ* – Estuário de rio Sado

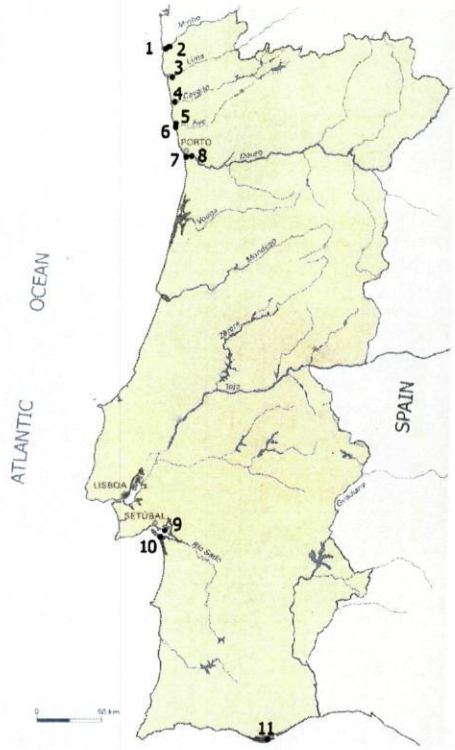
Exemplares de *Halimione portulacoides* cultivadas em ambiente controlado, no Instituto de Oceanografia da Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa, foram usadas para esta experiência. Na Comporta o sedimento foi homogeneizado e colocado dentro de

mangas de nylon, abertas nos dois extremos. Em cada manga colocaram-se cinco plantas saudáveis. Mangas com sedimento mas sem plantas foram também enterradas para servir de controlo. Para enterrar as mangas fizeram-se previamente diversos buracos (*ca.* 15×15×25 cm) com uma pá. As mangas foram enterradas a 10 cm de profundidade, de maneira a imitar o melhor possível o habitat natural da *Halimione portulacoides*.

Aquando do transplante, recolheu-se sedimento da Lisnave para análise da concentração inicial de OCPs. No mês de Novembro de 2007 as mangas com planta e sem planta foram recolhidas para sacos plásticos e armazenados a 4 ºC ao abrigo da luz. O conteúdo de cada manga, após a determinação da biomassa foi dividido em quatro partes iguais para análise subsequentes, de diferentes poluentes, em particular OCPs. Estas amostras foram armazenadas no congelador a -20 ºC até serem utilizadas.

2.1.2. Caracterização dos níveis de OCPs em diversas zonas costeiras

O procedimento de recolha de sedimento no trabalho de campo relativo à caracterização ambiental, em zonas estuarinas, relativamente a OCPs, decorreu de modo semelhante aquele descrito anteriormente. Em todos os locais de recolha de sedimento (Fig. 2), o sedimento foi recolhido, para sacos de plásticos de polietileno e guardados numa arca térmica, para evitar possível degradações por efeito da luz. Posteriormente, as amostras foram armazenadas no congelador a -20 ºC até serem utilizadas.



Local[a]	Coordenadas
1- Minho montante	41.7319 N; 8.8286 W
2- Minho jusante	41.8680 N; 8.8477 W
3- Lima	41.6855 N; 8.8209 W
4- Cávado	41.5228 N; 8.7846 W
5- Ave montante	41.3494 N; 8.7408 W
6- Ave estaleiro	41.3408 N; 8.7416 W
7- Douro sapal	41.1416 N; 8.6630 W
8- Douro marina	41.1438 N; 8.5794 W
9- Sado, Lisnave	38.4879 N; 8.7912 W
10- Sado, Comporta	38.4425 N; 8.8312 W
11- Ria Formosa, Marim	37.0300 N; 7.8172 W

Figura 9 – Locais de recolha dos sedimentos e respectivas coordenadas.

2.2. Preparação do sedimento para análise

Para o respectivo processamento, o sedimento foi retirado do congelador e deixado no saco a temperatura ambiente, de um dia para o outro, para descongelar. As raízes, pequenas pedras e outro material foram separados do sedimento por meio peneiros e com o auxílio de água desionizada e colocados em tabuleiros isentos de policloreto de vinilo, PVC, à temperatura ambiente para secar. Após secagem o sedimento foi triturado e homogeneizado usando um moinho de bolas (Fritsch, modelo Pulverisette 6).

2.3. Reagentes e soluções

Os solventes e reagentes usado foram de qualidade analítica, a não ser que algo em contrário seja dito. O Metanol, Chromasolv® para HPLC, foi obtido da Sigma-Aldrich (Darmstadt, Germany). A água usada durante o trabalho era desionizada e passada numa coluna com carvão activado, apresentando condutividade < 0.1 $\mu S\ cm^{-1}$. O cobre em pó (pureza 99.7%) usado para a remoção de enxofre foi obtido da Merck (Darmstadt, Germany). O cloreto de sódio (pureza 99.5%) também foi da Merck. Uma mistura de 18 OCPs (HCHs, aldrina, dieldrina, endrina, endrina cetona, endrina aldeido, endossulfano I (α), endossulfano II (β), endossulfano sulfato, 4,4'-DDT, 4,4'-DDD, 4,4'-DDE, heptacloro, heptacloro epóxido e metoxicloro) em tolueno:hexano (1:1) com a concentração de 2000 $mg\ L^{-1}$, da Supelco (Bellefonte, PA, USA), foi usada para preparar soluções padrão de partida, por diluição com metanol. Estas soluções foram armazenadas no frigorífico a 4° C. As soluções de pesticidas para análise foram preparadas diariamente através de diluições apropriadas com água. Sedimentos de referência Metranal™ 16, da Analytika Ltd. (Prague, Czech Republic), e CNS300-04-100 da Resource Technology Corporation (Salisbury, United Kingdom) foram usados para a validação do método.

Em GC-ECD usou-se uma mistura de hélio (99.9999%) e azoto (99.999%), na proporção de 1:5, fornecidos pela Air Liquide e em GC-MS apenas hélio da mesma qualidade já referida.

2.4. Equipamento e material

As pesagens de sedimento e de NaCl, este para efeitos de *salting out*, foram efectuadas numa balança analítica METTLER TOLEDO AG 245, e nas medições de volumes usaram-se micropipetas GILSON (20 µL, 100 µL, 1000 µL, 5000 µL e 10 mL). Para a extracção dos analitos a partir do sedimento usou-se um sistema de microondas de laboratório Ethos 1 Milestone (Sorisole, Italy), com vasos de extracção de Teflon. Os frascos de vidro (22 mL e 40 mL) usados na extracção eram da SUPELCO, selados com tampas contendo septos de politetrafluoretileno (PTFE), SUPELCO. Usou-se ainda uma centrífuga Mixtasel (Selecta, Barcelona, Spain), para separar o sedimento do sobrenadante após a extracção, e um banho ultrasónico (HF-frequency: 50 kHz) (Sonorex TK30, Bandelin, Gmbh Co. KG, Berlin) para fazer a remoção do enxofre por acção do cobre activado. Para a preparação das soluções usaram-se balões volumétricos de vidro de classe A (5 mL, 10 mL, 15mL ou 20 mL). Os frascos de 20 mL usados para análise, eram da SUPELCO, selados com tampas magnéticas de 18 mm, também da SUPELCO, apropriadas para amostrador automático.

A análise foi efectuada por HS-SPME, usando uma fibra com revestimento de polidimetilsiloxano (PDMS) com 100 µm de espessura da SUPELCO (Bellefonte, PA, USA), seguida de cromatografia gasosa, em equipamento da Varian CP-3800, provido com uma porta de injector *split/splitless* e de uma coluna capilar cromatográfica CP-SIL8CB LowBleed/MS 60 m x 0,250 mm, (0,25 µm de espessura de filme) VARIAN e com SPME *liner* (0.8 µm) e um sistema *microseal septum* (Merlin, Half Moon Bay, CA). O GC dispunha de detecção por captura electrónica (ECD) e ionização de chama (FID) em simultâneo. Na análise efectuada por GC-MS usou-se um espectrómetro de massa Varian Saturn 2000 acoplado a um cromatógrafo gasoso Varian 3900 com as mesmas características do anterior. O processo de HS-SPME decorreu com completa automação, usando um amostrador automático (CTC Analytics, Combi Pal model).

2.5. Procedimento analítico

Uma massa de 2 – 10 g de sedimento era introduzida num vaso de extracção de Teflon juntamente com 10,00 mL de solução extractora metanol. Após ser devidamente fechado, o vaso era colocado no rotor do sistema de micro-ondas, com outro vaso diametralmente oposto, por norma o vaso de controlo, que possuía a sonda de temperatura, contendo 10,00 mL de solução extractora (para manter o equilíbrio). A extracção era iniciada com um programa de 1 h, onde nos primeiros 2 min a temperatura subia até aos 100 °C onde permanece por mais 18 min. Após os 20 min iniciais, o aquecimento cessava e dava-se início a uma ventilação do sistema durante 40 min. A solução resultante era transferida para um frasco de 22 mL e centrifugado a 3500 rpm durante 10 min. Caso se viesse a constatar durante a análise contaminação por enxofre na amostra era necessário a preparação e tratamento com cobre activado[33]. Para tal introduzia-se 2 g de cobre em pó num gobelé juntamente com 8 mL de uma solução 6 M de HCl, que ficava a reagir durante 2 min. De seguida, lavava-se o cobre quatro vezes com água desionizada, duas vezes com metanol e por fim duas vezes com acetona, e deixava-se a secar. O sobrenadante da amostra, previamente centrifugado, era transferido para um frasco de 40 mL e era adicionado a este cobre activado até a saturação (a cor negra indicava a presença de enxofre; quando esta passava a tijolo a solução encontrava-se saturada). O frasco era colocado num banho com ultra-som durante 1 h a reagir para a completa eliminação do enxofre, e no fim, novamente, centrifugado a 3500 rpm durante 10 min. Alíquotas do sobrenadante (100 μL) eram depois retiradas e colocadas em frascos de 20 mL, contendo já 2 g previamente pesadas de cloreto de sódio, juntamente diferentes volumes de solução padrão de OCPs de 10 $\mu g\ L^{-1}$. Ao conteúdo dos frascos era depois adicionada água desionizada, até perfazer um volume igual a 10 mL. A solução de padrão de OCPs era preparada a partir doutra de concentração 200 $\mu g\ L^{-1}$. Os frascos eram colocados no amostrador automático para posterior análise por HS-SPME seguida de GC-ECD, segundo o método de adição de padrão atendendo à matriz complexa do sedimento. As análises efectuadas por GC-MS decorreram nas mesmas condições que aquela usadas para a determinação por GC-ECD.

Brancos eram efectuados com as amostras todos os dias de trabalho. As análises foram sempre efectuadas em triplicado.

As condições utilizadas no procedimento analítico encontram-se listadas na Tabela 1 (condições da SPME) e Tabela 2 (condições do GC-ECD e GC-MS).

Tabela 1: Condições usadas em SPME para determinação de OCPs

Modo de extracção	*Headspace* (HS)
Tipo de fibra	PDMS 100 µm espessura de filme
Salting out	2 g NaCl
Tempo de pré-incubação	10 min
Temperatura de pré-incubação	80 °C
Rotação pré-incubação	500 rpm[a]
Tempo de extracção	60 min
Temperatura de extracção	80 °C
Rotação extracção	250 rpm[a]

[a] rotações por minuto

Tabela 2: Condições de operação dos GC-ECD e GC-MS* para determinação de OCPs

Injecção	*Splitless* (7 min)
Temperatura do Injector	250°C
Fluxo	He/N_2 (1:5), 1,5 mL min^{-1}
Programa de temperaturas	40 °C (5 min) + 30 °C min^{-1} até aos 160 °C + 5 °C min^{-1} até aos 275 °C + 30 °C min^{-1} até aos 300 °C (3 min)
Temperatura do detector ECD	320°C

* Na GC-MS o fluxo era de 1,0 mL min^{-1} e o gás arrastador era He

Procedimentos Diários

Todo o material usado neste trabalho, quer nos estudos laboratoriais quer nos de campo, foram previamente descontaminados. Para tal o material foi primeiramente lavado com Tipol, passado por água, colocado numa solução aquosa de ácido nítrico a 20% durante a noite, passado por água outra vez, depois por água desionizada e finalmente por metanol.

As fibras de SPME têm uma duração média de 200 utilizações. Antes de usar uma fibra nova, ela era condicionada no injector a 250 °C durante 60 min, de acordo com as indicações do fabricante. Por rotina no início de cada análise a fibra e a coluna eram ambas condicionadas durante 30 min a 250 °C e depois era traçado um cromatograma para verificar o estado de limpeza sistema. Antes do uso dos septos para vedar os frascos durante a extracção, estes eram condicionados também, colocando-os no forno do cromatógrafo a 250 °C durante 1 h.

CAPITULO 3

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Capítulo 3

Resultados e Discussão

3.1. Características do método analítico e sua validação

Numa primeira fase foi necessário validar o método para determinação dos OCPs em sedimento por GC-ECD. O método por GC-MS já tinha sido optimizado anteriormente[34]. Para tal usaram-se os tempos de retenção previamente determinados[34] e as condições experimentais descritas nas Tabelas 1 e 2. O procedimento de extracção já havia sido optimizado anteriormente, por ser coincidente com o usado em GC-MS[34].

Para avaliar a exactidão do método foram analisados os sedimentos certificados Metranal™ 16 e CRM CNS300-04-100. Os valores obtidos, apresentados na Tabela 3, evidenciaram exactidão aceitável para todos os compostos para os quais se dispunha de valores certificados.

Tabela 3 – Resultados obtidos para sedimentos de referência certificados

OCP	Metranal 16 Valores de referência / ng g^{-1}	Metranal 16 [a] / ng g^{-1}	CNS300-04-100 Valores de referência / ng g^{-1}	CNS300-04-100 [a] / ng g^{-1}
α-lindano	16,4 ± 3,2	17 ± 3	284 ± 69,8	288 ± 37
γ-lindano	44,4 ± 8,0	43 ± 7	363 ± 83,7	323 ± 57
Heptacloro		39 ± 6	398 ± 107	461 ± 75
Aldrina		3,1 ± 0,3	125 ± 27,9	95 ± 14
Heptacloro epóxido		10 ± 1	49,2 ± 15,3	46 ± 3
DDE	38,5 ± 7,5	41 ± 2	299 ± 54,7	286 ± 20
Dieldrina	45,0 ± 9,0	48 ± 7	370 ± 77,0	361 ± 41
Endrina	19,1 ± 3,8	20 ± 3	370 ± 101	395 ± 46
DDD	38,7 ± 7,5	39 ± 2	287 ± 33,4	277 ± 30
DDT	82,9 ± 16,0	79 ± 10		

[a] Média e desvio padrão (n=6) expresso em massa de OCP por grama de sedimento seco

Limites de detecção e de quantificação

Determinaram-se os limites de detecção (LOD) e de quantificação (LOQ) do método, quer para soluções aquosas quer para amostras de sedimentos, com base na quantificação do sinal do branco, visto ser este o sinal mais baixo que é possível detectar. Os resultados obtidos são apresentados na Tabela 4.

Tabela 4 – Características do método optimizado para determinação, por GC-ECD, de OCP em sedimentos estuarinos.

OCP	Resposta linear[a] $R^2 \geq 0,99$	Resposta linear[b] $R^2 \geq 0,99$	LOD / ng g^{-1}	LOQ / ng g^{-1}	Repetibilidade (%)	Reprodutibilidade (%)	RSD[c] (%)
α-lindano	4 - 300	0,20 - 102	0,09	0,20	6	13	13
γ-lindano	1 - 200	0,06 - 255	0,05	0,06	18	*	18
Heptacloro	10 - 150	0,51 - 255	0,26	0,51	8	15	16
Aldrina	2 - 100	0,10 - 55	0,04	0,10	4	15	15
Heptacloro Epóxido	3 - 100	0,15 - 25	0,06	0,15	5	5	6
DDE	0,7 - 100	0,03 - 28	0,02	0,03	2	7	7
Dieldrina	2 - 100	0,12 - 31	0,05	0,12	5	11	11
Endrina	0,2 - 300	0,01 - 53	0,01	0,01	7	11	12
DDD	1 - 150	0,07 - 53	0,03	0,07	8	10	11
DDT	0,8 - 150	0,04 - 110	0,02	0,04	11	*	9

[a] em solução aquosa, expresso em ng de OCP por litro de solução
[b] em sedimento, expresso em ng de OCP por grama de sedimento seco
[c] RSD foi calculado como $s_{tot} = (s^2_{repetibilidade}/n + s^2_{reprodutibilidade})^{1/2}$ de acordo com[35]
LOD – limite de detecção; LOQ – limite de quantificação; RDS – desvio padrão relativo
* não foi possível distinguir repetibilidade de reprodutibilidade

Os limites de detecção, LODs, obtidos com este método foram da ordem das ng g^{-1}. Para a maioria dos compostos os LODs foram inferiores a outros fornecidos por métodos publicados que envolviam MAE combinada com SPME em *headspace* e GC-MS/MS para solos[36] ou sedimentos[37].

Esta melhoria nos LODs (e LOQs) deveu-se sobretudo a maior sensibilidade do detector usado, ECD, para compostos que contêm átomos bastante electronegativos[38], como é o caso dos compostos organoclorados.

Intervalo de resposta linear

O intervalo de linearidade para cada um dos OCPs foi estudado por meio de dopagem de soluções aquosas e amostras reais de sedimento com quantidades de padrão de OCPs sucessivamente crescentes até se deixar de observar resposta linear ($R^2 < 0,99$). Os resultados foram incluídos na tabela 4. Os intervalos mais amplos foram valores entre 0,2 – 300 ng/L em solução aquosa, e 0,06 – 255 ng/g para sedimento, mas variavam com a natureza dos OCPs.

Precisão do método

Usando sedimento de referência certificado, realizaram-se ensaios de repetibilidade e de reprodutibilidade segundo as recomendações de *International Union of Pure and Applied*

Chemistry (IUPAC)[35]. Os resultados obtidos (incluídos na tabela 4) mostraram que os desvios padrão relativos (RSD) foram de 18% ou inferiores, dependendo dos compostos.

No seu conjunto os resultados deste estudo demonstraram que o método era aplicável e adequado à análise quantitativa de OCPs em sedimentos. Além disso, constatou-se que a boa capacidade extractiva da SPME conjugada com a elevada selectividade, a átomos com elevada afinidade electrónica, da detecção por ECD, tornam este método muito eficiente para análises quantitativas de organoclorados em sedimentos, sendo conveniente, no entanto, que a identificação dos compostos possa ser confirmada por GC-MS.

Aplicação do método à determinação de OCPs em sedimentos estuarinos

O método foi então aplicado a determinação de OCPs em diversas amostras de sedimentos estuarinos. A fig. 3 mostra, a titulo ilustrativo, um cromatograma para OCPs de sedimento da zona da Lisnave, estuário do Sado.

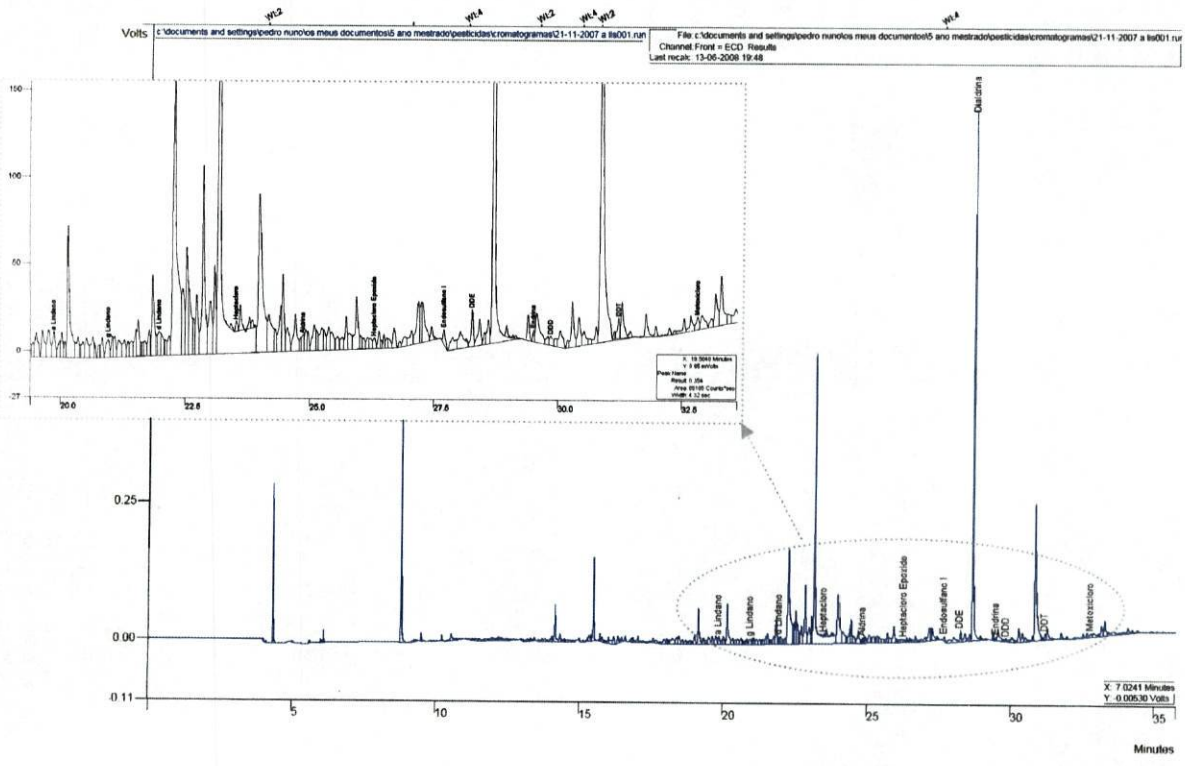


Figura 10 – Resultados típicos obtidos para OCPs numa amostra real de sedimento usando GC-ECD.

Embora no cromatograma da fig. 3 apareçam também picos de espécies não identificadas, nele se pode ver, um número elevado de sinais quantificáveis correspondentes a OCPs.

3.2. Investigação da capacidade de Halimione portulacoides para rizoremediação de OCPs

A zona da Lisnave, no estuário do rio Sado, está bastante poluída por diversas classes de poluentes, nomeadamente, POPs e metais pesados.

No âmbito de um projecto em curso, estudou-se neste trabalho o potencial remediador de uma planta, a *Halimione portulacoides*, que é abundante em diversos sapais estuarinos em Portugal. O estudo foi realizado *ex-situ*, no mesmo estuário, mas numa zona menos contaminada, a Comporta (ver fig. 2, atrás). Concretamente, recolheu-se sedimento da zona da Lisnave e analisou-se a sua composição inicial e após estar cerca de nove meses inserido na zona da Comporta. Aí esteve enterrado, dentro de mangas (para permitir a circulação da água das marés) para onde foram transplantadas *Halimione portulacoides* (cinco pés por manga). Em algumas mangas não foram colocadas plantas para servir de controlo. No final do estudo retirou-se o sedimento das mangas a analisou-se o respectivo teor em OCPs. Os resultados são apresentados na fig. 4.

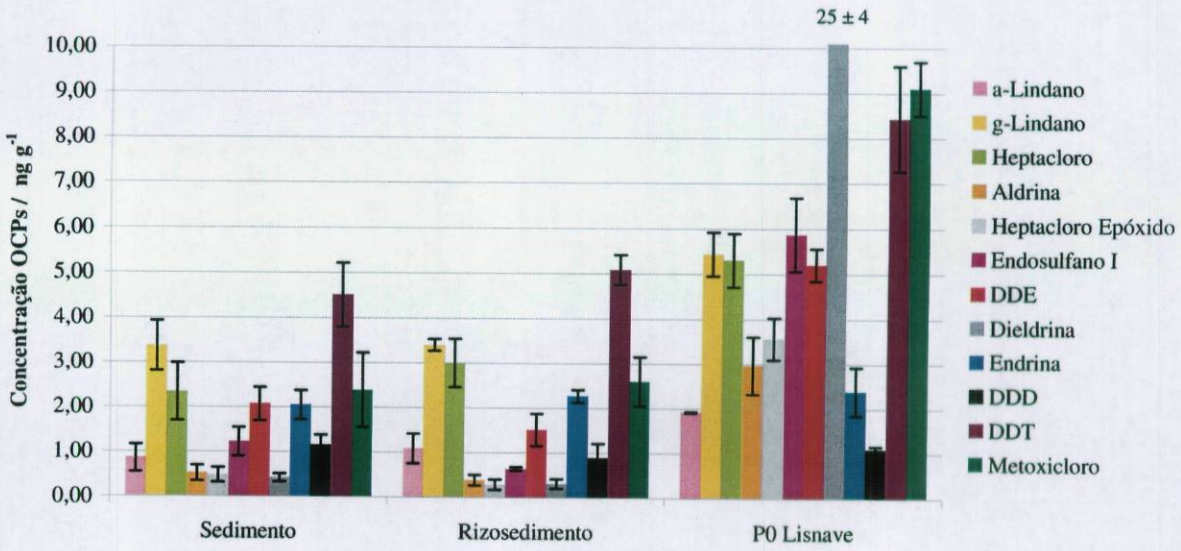


Figura 11 – Concentração de OCPs (valores médios ± desvios padrão, n=4, em ng g^{-1}), observadas em sedimento da zona da Lisnave inicial (P0) (Fevereiro de 2007) e das mangas retiradas da Comporta no mês de Novembro de 2007.

A figura mostra que houve um decréscimo significativo e acentuado nos níveis de OCPs, tanto no sedimento como no rizosedimento (sedimento na vizinhança das raízes) durante o período de estudo.

Porém, os níveis foram estatisticamente iguais no sedimento das mangas que tinham plantas e no das mangas sem plantas, o que levou a concluir que a *Halimione portulacoides* não contribuiu significativamente para a degradação dos OCPs. Assim sendo, a redução de níveis observada deveu-se à degradação natural (por acção microbiológica) e/ou à mobilização de OCPs por acção da água da chuva e das marés.

Portanto, este estudo mostrou que a *Halimione portulacoides* não potenciou a remediação de OCPs nos sedimentos da Lisnave. Como o sedimento da Lisnave é muito poluído, a ineficiência registada pode ser genuína, isto é, a planta não ser adequada para rizoremediação de OCPs, ou pode ter sido causada por falta de microoganismos remediadores (parâmetro que ainda não foi medido e que está a cargo de outra equipa associada ao projecto em curso). Sabe-se que o sedimento tem também, por exemplo, metais pesados e organoestanhos, que poderão ser tóxicos para os microoganismos. Estes aspectos estão ainda a ser investigados.

3.3. Determinação dos níveis de OCPs em diversas zonas costeiras portuguesas

As informações sobre os níveis de OCPs nos estuários e outras zonas costeiras portuguesas são escassas[39,40].

Neste estudo analisaram-se sedimentos de onze zonas costeiras, cuja localização e principais actividades estão resumidas na tabela 5. Na selecção dos locais pesou decisivamente a existência de condições logísticas para a realização das amostragens, como foi o caso da maioria dos locais que a norte, locais de fácil deslocação, enquanto que outros, como por exemplo, o local Marim na Ria Formosa, foi amostrado pelo grupo Instituto de Investigação das Pescas e do Mar.

O alcance desta amostragem pretendeu caracterizar uma área restrita, onde esta era efectuada. Estes pontos foram escolhidos com prévio conhecimento da área a amostrar, como possível área contaminada, devido ao facto das actividades nelas desempenhadas.

Tabela 5 – Características dos locais de amostragem e dos sedimentos amostrados

Local[a]	Actividades	Fracção de partículas < 0,063 mm (%)	Matéria Orgânica (%)
1- Minho montante*	Indústria, agricultura	15	8 ± 1
2- Minho jusante*	Indústria, agricultura, tráfego marítimo	19	4,7 ± 0,5
3- Lima	Estaleiro, marina, porto marítimo	9	5,3 ± 0,1
4- Cávado	Agricultura	67	11,4 ± 0,7
5- Ave montante*	Agricultura	20	14 ± 2
6- Ave estaleiro	Estaleiro	1	0,6 ± 0,1
7- Douro sapal	Tráfego marítimo	18	10,7 ± 0,1
8- Douro marina	Efluentes, marina	7	1,6 ± 0,1
9- Sado, Lisnave	Estaleiro, indústria	99	9,2 ± 0,2
10- Sado, Comporta	Agricultura	97	12,1 ± 0,4
11- Ria Formosa, Marim	Agricultura	3	5,8 ± 1,1

[a] ver Fig. 2

* Denominação usada para distinção dos sedimentos, mas que não caracteriza toda a área.

Os níveis de OCPs observados nos diferentes locais estudados são apresentados na tabela 6.

Tabela 6 – Níveis de OCPs (valores médios ± desvios padrão, n=4, expresso em ng por grama de sedimento seco) determinados, por GC-ECD, em 2007-2008 em diferentes zonas costeiras portugueses

Local[a]	α-Lindano	γ-Lindano	Heptacloro	Aldrina	Heptacloro epóxido	Endossulfano I	DDE	Dieldrina	Endrina	DDD	DDT	Metoxicloro
1- Minho montante	1,9 ± 0,2	2,3 ± 0,3	3,7 ± 0,4 [b]	0,29 ± 0,01 [b]	0,18 ± 0,02	1,26 ± 0,03	1,25 ± 0,06 [b]	0,9 ± 0,1	1,5 ± 0,3 [b]	2,6 ± 0,2 [b]	2,0 ± 0,3	2,0 ± 0,2
2- Minho jusante	2,9 ± 0,4 [b]	2,3 ± 0,1	1,9 ± 0,1 [b]	0,08 ± 0,01	0,23 ± 0,04 b	1,1 ± 0,2	0,35 ± 0,05 [b]	0,73 ± 0,07 [b]	1,2 ± 0,2	0,42 ± 0,04 [b]	1,44 ± 0,07	1,2 ± 0,04
3- Lima	2,1 ± 0,2 [b]	1,1 ± 0,2 [b]	2,9 ± 0,4 [b]	0,42 ± 0,02	0,25 ± 0,02 b	0,68 ± 0,04	0,25 ± 0,03 [b]	0,26 ± 0,05 [b]	0,63 ± 0,03 [b]	0,29 ± 0,05 [b]	0,27 ± 0,03 [b]	1,0 ± 0,1 [b]
4- Cávado	2,6 ± 0,4	2,8 ± 0,4	1,6 ± 0,3	0,70 ± 0,04 [b]	0,40 ± 0,09	2,0 ± 0,3	1,7 ± 0,1 [b]	2,6 ± 0,2 [b]	2,6 ± 0,3 [b]	2,1 ± 0,3 [b]	4,3 ± 0,8	2,9 ± 0,1
5- Ave montante	3,4 ± 0,2	2,5 ± 0,2	1,0 ± 0,1	2,5 ± 0,1	0,26 ± 0,05 b	1,13 ± 0,08	2,0 ± 0,2 [b]	5,9 ± 0,4 [b]	0,22 ± 0,07 [b]	0,58 ± 0,06	11,4 ± 0,5	2,2 ± 0,2
6- Ave estaleiro	1,7 ± 0,2 [b]	2,66 ± 0,08	1,8 ± 0,1	0,57 ± 0,01	0,23 ± 0,01	0,92 ± 0,04	0,19 ± 0,01 [b]	1,2 ± 0,2	1,3 ± 0,3	0,30 ± 0,06	0,23 ± 0,03	0,28 ± 0,03
7- Douro sapal	1,00 ± 0,06 [b]	1,3 ± 0,2	1,06 ± 0,04 [b]	0,16 ± 0,02 [b]	0,25 ± 0,04	1,00 ± 0,08	0,28 ± 0,06 [b]	0,73 ± 0,07 [b]	2,6 ± 0,3 [b]	0,50 ± 0,07 [b]	0,9 ± 0,1 [b]	0,86 ± 0,02 [b]
8- Douro marina	2,8 ± 0,2 [b]	2,1 ± 0,5	1,3 ± 0,1 [b]	0,28 ± 0,03 [b]	0,38 ± 0,03 b	0,71 ± 0,09	1,34 ± 0,02 [b]	1,7 ± 0,2	4,5 ± 0,5	0,34 ± 0,06 [b]	3,4 ± 0,2 [b]	3,2 ± 0,4
9- Sado, Lisnave	1,92 ± 0,01	5,4 ± 0,5	5,3 ± 0,6 [b]	3,0 ± 0,6 [b]	3,6 ± 0,5	5,9 ± 0,8	5,2 ± 0,3 [b]	26 ± 4 [b]	2,4 ± 0,5 [b]	1,10 ± 0,07 [b]	8 ± 1	9,1 ± 0,6
10- Sado, Comporta	2,8 ± 0,1	13 ± 1 [b]	3,6 ± 0,4 [b]	0,25 ± 0,05 [b]	0,43 ± 0,07	0,69 ± 0,07	1,1 ± 0,1 [b]	1,3 ± 0,1 [b]	3,2 ± 0,6	1,5 ± 0,1	3,9 ± 0,8	5,5 ± 0,4 [b]
11- Ria Formosa, Marim	3,52 ± 0,08	3,4 ± 0,4	5,6 ± 0,3	1,14 ± 0,03	0,09 ± 0,01	2,39 ± 0,06 [b]	0,34 ± 0,01 [b]	0,9 ± 0,1 [b]	0,64 ± 0,02 [b]	1,2 ± 0,1 [b]	0,5 ± 0,1	2,5 ± 0,3
Valores Guias de Qualidade de Sedimento[41,42]												
ERL[c]	0,32[d]	-	-	-	-	2,2	0,02	0,02	2	1,6	-	
ERM[e]	1,0[d]	-	-	-	-	27	8	8	20	46	-	

[a] ver Fig. 2 ; [b] Identificados por GC-MS
[c] Effects range-low
[d] referente a lindanos totais
[e] Effects range-median

Todas as amostras revelaram valores quantificáveis de doze OCPs. De notar, no entanto, que nem todos os OCPs detectados e quantificados por GC-ECD foram detectados, e logo identificados, por GC-MS. Porém, como os limites de detecção deste último método (determinação por GC-MS em *full scan*) eram em geral, mais elevados, considerou-se que se deveriam manter na tabela 6 todos os resultados obtidos por GC-ECD, embora sob reserva, porque há elevadas probabilidades de que os resultados tenham significado real. A ausência poderá dever-se apenas ao facto dos níveis reais não serem detectáveis pela técnica. De referir que se encontram publicados em revistas cientificas de qualidade níveis de OCPs (e bifenilos policlorados) determinados exclusivamente por GC-ECD[6,8], tendo os mesmos sido validados por análise, com sucesso, de sedimentos de referência com concentrações de OCPs certificadas, validação também realizada neste estudo. Como, porém, as matrizes dos sedimentos de referência e dos sedimentos reais analisados não são necessariamente iguais, poderão eventualmente ocorrer interferências nas determinações dos sedimentos reais que possam mascarar os resultados.

O valor máximo encontrado para um OCP foi de 26 ng g^{-1}, para a dieldrina, e foi observado no Estuário do Sado, na Lisnave. Porém, iões característicos deste composto não foram detectados por MS, por isso, não se pode afirmar categoricamente a sua presença ou se se tratará de outro composto halogenado que apresente o mesmo tempo de retenção da dieldrina. A Lisnave foi, de um modo geral o local mais poluído por OCPs, isto é, aquele que apresentou níveis de OCPs mais elevados. Com excepção deste local e da Comporta, ambos no estuário do Sado, no geral, todos os outros locais apresentaram níveis inferiores a 4 ng g^{-1} para os diversos OCPs.

No estuário de Minho embora haja actividade agrícola relativamente próxima, os valores observados foram relativamente baixos. Para isso pode ter contribuído o tipo de sedimentos que é muito arenoso, portanto pobre em matéria orgânica, o que limitará a acumulação de OCPs.

O estuário do Lima apresentou também níveis relativamente baixos de OCPs, o que se deverá ao desuso de tais compostos e ao facto do sedimento ser também arenoso.

Os estuários dos rios Cávado e do rio Ave junto ao estaleiro apresentarem valores de OCPs relativamente baixos. No local Ave montante os níveis de dieldrina e DDT foram um pouco superiores, 5,9 e 11,4 ng g^{-1}. Nesse local a percentagem de matéria particulada fina é maior e consequentemente os valores de matéria orgânica também, o que facilita a adsorção

de OCPs. De referir que em solos agrícolas da zona costeira entre Cavado e Ave foram encontrados níveis relativamente elevados de OCPs[39] (ver tabela 7).

O rio Douro, que tem sido considerado poluído por metais e contaminantes orgânicos[43], apresenta níveis da mesma ordem de grandeza dos observados nos outros estuários. Fazendo uma comparação directa entre os dois locais de amostragem estudados neste rio, verificou-se que junto à marina os valores foram ligeiramente superiores aos observados no sapal. No local marina, onde existe uma marina recentemente construída, é local de confluência de dois rios que apresentavam elevados níveis de contaminação, Tinto e Torto. O outro local, sapal, encontra-se junto à foz do Douro e o facto de se encontrar mais sujeito ao efeito das marés e mais afastado de áreas agrícolas é compatível com a ocorrência de níveis mais baixos.

Na ria Formosa, o panorama foi semelhante ao dos outros locais referidos com a excepção de um valor superior de heptacloro, 5,6 ng g^{-1}.

Nas zonas da Lisnave e da Comporta, os níveis foram mais elevados principalmente para os compostos γ-lindano (e dieldrina). No entanto situam-se no estuário do Sado, uma reserva natural classificada pelo Instituto de Conservação da Natureza, como sendo uma área protegida. De notar que apresentam as percentagens de matéria particulada fina (< 0,063 mm) mais elevadas de todos os 11 locais, e próximas de 100 %, o que favorece a acumulação de compostos orgânicos.

Não se dispondo de valores de OCPs em sedimento para comparação compilaram-se na tabela 7 níveis de OCPs, determinados em estudos publicados[39,40], efectuados também em zonas costeiras de Portugal, mas em solos. Em solos entre Ave e Cávado foram encontrados níveis bastantes elevados particularmente para dieldrina[39].

Para além deste trabalho, muito recentemente Villaverde *et al*[40], publicaram valores para lindano bastante elevados (tabela 7).

Tabela 7 – Níveis de OCPs (expresso em ng por grama de sedimento seco) observados em diferentes solos de zonas costeiras portugueses

Local de amostragem	Ano de amostragem	Lindano	Endossulfano I	DDE	Dieldrina	DDD	Referência
Entre rios Ave e Cávado	2004	58,3	61,3	22,5	435,3	9,2	39
Lima	2007	276	-	-	-	-	40
Douro	2007	392	-	-	-	-	40
Sado-Costa	2007	450	-	-	-	-	40
Ria Formosa	2007	86,6	-	-	-	-	40

Para avaliar a toxicidade dos sedimentos estudados, no que respeita a OCPs, consultaram-se guias disponíveis de qualidade se sedimento[41,42]. Os valores de ERL, "*effects range low*", e de ERM, "*effects range medium*", foram acrescentados à tabela 6. Quando os níveis observados são <ERLs, os efeitos nocivos esperados são raros, para níveis compreendidos entre ERLs e ERMs, esperam-se efeitos nocivos ocasionais, e para níveis ≥ERMs, os efeitos nocivos são observados frequentemente.

A tabela 6 mostra que os níveis de lindano foram superiores ao ERM, em todos os locais de amostragem, o que indica que a comunidade que habita estes ecossistemas poderá sofrer efeitos adversos associados a esse poluente. Para DDE todos os valores encontrados foram inferiores aos respectivos ERL excepto na Lisnave, Sado, que caiu entre ERL e ERM. Para endrina, todos os valores medidos foram superiores a ERL e inferires a ERM, o mesmo aconteceu para dieldrina, excepto na Lisnave, que excedeu ERM. Para DDD apenas no estuário do rio Minho, local montante e no estuário do rio Cávado foram encontrados níveis entre ERL e ERM, todos os restantes foram inferiores a ERL. Quanto ao DDT, a maioria dos locais apresentou valores entre ERL e ERM, estando abaixo do ERL os casos do Lima, Ave estaleiro, Douro sapal e Ria Formosa, Marim.

Portanto, embora os valores de OCPs encontrados tenham sido relativamente baixos, a generalidade dos locais amostrados apresentam algum risco relativamente à exposição a OCPs.

CAPITULO 4

CONCLUSÕES

Capítulo 4

Conclusões

Neste estudo foi possível validar um método por HS-SPME-GC-ECD para determinação de OCPs em sedimentos, tendo-se constatado que o método é muito expedito e eficiente e tem LOQs bastante baixos, o que é devido à conjugação da elevada capacidade da extracção da SPME em *headspace* com a sensibilidade de GC-ECD para este tipo de compostos.

Quanto ao potencial das *Halimione portulacoides* para remediação de OCPs, observou-se que esta não exerceu qualquer efeito significativo na qualidade de sedimento da Lisnave. Trata-se de um sedimento muito poluído, inclusivamente por metais pesados, que são geralmente tóxicos para microoganismos. Assim sendo, não se pode inferir dos resultados obtidos se a rizoremediação falhou por incapacidade genuína da planta para potenciar a remediação biológica ou pelo facto de não existirem em grande número microorganismos decompositores que normalmente estabelecem sinergias com as plantas originando rizodegradação. Este aspecto está ainda a ser investigado.

Efectuou-se também a caracterização de níveis de OCPs em diferentes zonas costeiras portuguesas, o que constituiu um estudo pioneiro dado a escassez de dados disponíveis na literatura. Foi possível quantificar 12 OCPs (α-lindano, γ-lindano, heptacloro, aldrina, heptacloro epóxido, endossulfano I, DDE, dieldrina, endrina, DDD, DDT e metoxicloro) em 11 locais, situados nos estuários dos rios Minho, Lima, Cávado, Ave, Douro e Sado, e em Marim, na Ria Formosa. Os níveis de OCPs foram relativamente baixos, da ordem de algumas unidades ou décimas de nanogramas por grama de sedimento seco. No entanto, de acordo com valores guia de qualidade de sedimento, foram encontrados níveis de risco relativamente elevados (> ERM) para lindano, em todos os locais e dieldrina na Lisnave, estuário do rio Sado. Em numerosos casos foi encontrada possibilidade de ocorrência ocasional de efeitos nocivos (ERL < níveis < ERM), bem como situações em que os efeitos nocivos serão raros (< ERL).

BIBLIOGRAFIA

1 M.C. Vagi, A.S. Petsas, M.N. Kostopoulou, M.K. Karamanoli, T.D. Lekkas; *Determination of organochlorine pesticides in marine sediments samples using ultrasonic solvent extraction followed by GC/ECD*; Desalination, 210, 2007, 146–156

2 B. Bhattacharya, S. K. Sarkar, N. Mukherjee; *Organochlorine pesticide residues in sediments of a tropical mangrove estuary, India: implications for monitoring*; Environment International, 29, 2003, 587– 592

3 O. Wurl, J. P. Obbard; *Organochlorine pesticides, polychlorinated biphenyls and polybrominated diphenyl ethers in Singapore coastal marine sediments*; Chemosphere, 58, 2005, 925–933

4 Plano sectorial da Rede Natura 2000; habitats naturais; Instituto da Conservação da Natureza; Estuários, www.icn.pt/psrn2000/caracterizacao_valores_naturais/habitats/1130.pdf, 01/07/2008

5 M. Barriada-Pereira, M. J. González-Castro, S. Muniategui-Lorenzo, P. López-Mahía, D. Prada-Rodríguez, E. Fernández-Fernández; *Organochlorine pesticides accumulation and degradation products in vegetation samples of a contaminated area in Galicia (NW Spain)*; Chemosphere, 58, 2005, 1571–1578

6 J. L. Raposo, N. Ré-Poppi; *Determination of organochlorine pesticides in ground water samples using solid-phase microextraction by gas chromatography-electron capture detection*; Talanta, 72, 2007, 1833–1841

7 S. Magdic, J. B. Pawliszyn; *Analysis of organochlorine pesticides using solid-phase microextraction*; Journal of Chromatography A, 723, 1996, 111-122

8 A. Tor, M. E. Aydin, S. Özcan; *Ultrasonic solvent extraction of organochlorine pesticides from soil*; Analytica Chimica Acta, 559, 2006, 173–180

9 http://www.epa.gov/oppfead1/international/piclist.htm, 01/07/2008.

10 Public Health Statement, Agency for Toxic Substances and Disease Registry, Aldrin and Dieldrin, CAS # 309-00-2 and 60-57-1, September 2002

11 Public Health Statement, Agency for Toxic Substances and Disease Registry, DDT, DDE, and DDD, CAS # 50-29-3, 72-55-9, 72-54-8, September 2002

12 Public Health Statement, Agency for Toxic Substances and Disease Registry, Endosulfan, CAS # 33213-65-9, February 2001

13 Public Health Statement, Agency for Toxic Substances and Disease Registry, Endrin, CAS # 72-20-8, September 1997

14 Public Health Statement, Agency for Toxic Substances and Disease Registry, Heptachlor and Heptachlor Epoxide, CAS # 76-44-8 and 1024-57-3, August 2007

15 Public Health Statement, Agency for Toxic Substances and Disease Registry, Hexachlorocyclohexane, CAS # 608-73-1, August 2005

16 Public Health Statement, Agency for Toxic Substances and Disease Registry, Methoxychlor, CAS # 72-43-5, September 2002

17 D.D. Nhan, N.M. Am, F.P. Carvalho, J.P. Vieneuve and C. Cattini, *Organochlorine pesticides and PCBs along the coast of north Vietnam,* Science of the Total Environment, 237/238, 1999, 363–371.

18 H. Hong, W. Chen, L. Xu, Z. Wang and L. Zhang, *Distribution and fate of organochlorine pollutants in the Pearl River Estuary*, Marine Pollution Bulletin, 39, 1999, 376–382.

19 Z. Zhang, J. Huang, G. Yu and H. Hong, *Occurrence of PAHs, PCBs and organochlorine pesticides in the Tongui River of Beijing, China.* Environmental Pollution, 130, 2004, 249–261.

20 Y. Y. Shu, S. S. Wang, M. Tardif, Y. Huang; *Analysis of polychlorinated biphenyls in aqueous samples by microwave-assisted headspace solid-phase microextraction*; Journal of Chromatography A, 1008, 2003, 1–12

21 S. Sporring, S. Bøwadt, B. Svensmark, E. Björklund; *Comprehensive comparison of classic Soxhlet extraction with Soxtec extraction, ultrasonication extraction, supercritical fluid extraction, microwave assisted extraction and accelerated solvent extraction for the determination of polychlorinated biphenyls in soil*; Journal of Chromatography A, 1090, 2005, 1–9

22 A. E. Fernández, Z. S. Ferrera, J. J. S. Rodriguez; *Application of microwave-assisted extraction using micellar media to the determination of polychlorinated biphenyls in marine sediments,* Analytica Chimica Acta, 433 (2001) 237–244

23 J. Muñoz, J.R. Baena, M. Gallego, M. Valcárcel, *Speciation of butyltin compounds in marine sediments by preconcentration on C60 and gas chromatography–mass spectrometry* Journal of Chromatography A, 1023, 2004, 175.

24 M. G. Ikonomou, M. P. Fernandez, T. He, D. Cullon, *Gas chromatography–high-resolution mass spectrometry based method for the simultaneous determination of nine organotin compounds in water, sediment and tissue*, Journal of Chromatography A, 1023, 2004, 175–181.

25 A. Derouiche, M. R. Driss, J. P. Morizur, M. H. Taphanel; *Simultaneous analysis of polychlorinated biphenyls and organochlorine pesticides in water by headspace solid-phase microextraction with gas chromatography–tandem mass spectrometry*; Journal of Chromatography A, 1138, 2007, 231–243

26 J. L. Schnoor, L. A. Licht, S. C. McCutcheon, N. L. Wolfe, L. H. Carreira, *Phytoremediation of organic and nutrient contaminants*. Environmental Science and Technology, 29, 1995, 318 – 323

27 R. Rial-Otero, E.M. Gaspar, I. Moura, J.L. Capelo; *Chromatographic-based methods for pesticide determination in honey: An overview*, Talanta, 71, 2007, 503–514

28 F.J. Santos, M.T. Galceran; *The application of gas chromatography to environmental analysis*; Trends in Analytical Chemistry, 21, 2002, 672-685

29 E. P. H. Best, M. E. Zappi, H. L. Fredrickson, S. L. Sprecher, S. L. Larson, M. Ochman, *Screening of aquatic and wetland plant species for phytoremediation of explosivescontaminated groundwater for the Iowa Army Ammuntion Plant*, Annals of the New York Academy of Sciences, 829, 1997, 179–194.

30 S. Paterson, D. Mackay, D. Tam, W.Y. Shiu, *Uptake of organic chemicals by plants: a review of processes, correlations and models*, Chemosphere, 21, 1990, 297–331.

31 Shimp, J.F., Tracy, J.C., Davis, L.C., Lee, E., Huang, W., Erickson, L.E., Schnoor, J.L., *Beneficial effects of plants in the remediation of soil and groundwater contaminated with organic materials,* Critical Reviews in Environmental Science and Technology, 23, 1993, 41–77.

32 M. E. Watanabe, *Phytoremediation on the brink of commercialization*, Environmental Science and Technology, 31, 1997, 182 –186.

33 B. Pan, W. X. Liu, Z. Shi, J. Cao, W. R. Shen, B. P. Qing, R. Sun, S. Tao, *Sample Purification for Analysis of Organochlorine Pesticides in Sediment and Fish Muscle,* Journal of Environmental Science and Health - Part B Pesticides, Food Contaminants, and Agricultural Wastes, 39, 2004, 353–365.

34 P. N. Carvalho, P. N. R. Rodrigues, F. Alves, R. Evangelista, M. C. P. Basto, M. T. S. D. Vasconcelos, *An expeditious method for the determination of organochlorine pesticides residues in estuarine sediments using microwave assisted pre-extraction and automated headspace solid-phase microextraction coupled to gas chromatography-mass spectrometry*, doi:10.1016/j.talanta.2008.05.035

35 M. Thompson, S. L. R. Ellison, R. Wood, *Harmonized guidelines for single-laboratory validation of methods of analysis (IUPAC Technical Report),* Pure and Applied Chemistry, 74, 2002, 835.

36 S. M. Chang, R. A. Doong, *Concentration and fate of persistent organochlorine pesticides in estuarine sediments using headspace solid-phase microextraction*, Chemosphere, 62, 2006, 1869–1878

37. P. Herbert, S. Morais, P. Paíga, A. Alves, L. Santos, *Development and validation of a novel method for the analysis of chlorinated pesticides in soils using microwave-assisted extraction–headspace solid phase microextraction and gas chromatography–tandem mass spectrometry*, Analytical and Bioanalytical Chemistry, 384, 2006, 810–816

38 E. Kenndler; *Gas Chromatography*; Institute for Analytical Chemistry, University of Vienna; 2004

39 C. Gonçalves, M. F. Alpendurada, *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.

40 J. Villaverde, A. Hildebrandt, E. Martínez, S. Lacorte, E. Morillo, C. Maqueda, P. Viana, D. Barceló, *Priority pesticides and their degradation products in river sediments from Portugal*, Science Of The Total Environment, 390, 2008, 507 – 513

41 S. McCready, G. F. Birch, E. R. Long, G. Spyrakis, C. R. Greely; *An Evaluation of Australian Sediment Quality Guidelines*; Archives of Environmental Contamination and Toxicology, 50, 2006, 306–315

42 SQuiRTs NOAA; Screening quick reference tables; National Oceanic and Atmospheric Administration; February 2004

43 C. Ribeiro, M. E. Tiritan, E. Rocha, M. J. Rocha. *Seasonal and Spatial Distribution of Several Endocrine-Disrupting Compounds in the Douro River Estuary, Portugal*. Archives of Environmental Contamination and Toxicology, 2008; in press.