

Agradecimentos:

À Doutora Valentina, agradeço todo o apoio e orientação que disponibilizou na realização deste trabalho. Nada disto teria sido possível sem a sua ajuda.

Agradecimento a Virgínia, minha co-orientadora por toda a paciência e conhecimentos que partilhou comigo mesmo quando não tinha tempo para tal.

Agradeço o apoio prestado pela Doutora Catarina Mansilha.

Agradeço todo o apoio e simpatia prestada pela Professora Doutora Cristina Delerue-Matos.

A todos os colegas do GRAQ que sempre mostraram simpatia e me ajudaram a ultrapassar as longas horas de laboratório que foram necessárias, nomeadamente à Paulinha, Ana, Sónia e Susana.

A todos os meus colegas de uma maneira ou de outra estiveram sempre presentes e me apoiaram, em especial aos meus amigos Isabel, Sílvias e Camilo muito obrigado por todo o vosso apoio e ajuda.

À minha família, muito obrigado pelo total apoio e por não me terem tirado tempo, que eu tanto precisava para a realização deste trabalho.

A todos os que não ajudando também não atrapalharam... Muito obrigado.

“ Posso ter defeitos, viver ansiosa e ficar irritada algumas vezes, mas não esqueço que a minha vida é a maior empresa do mundo. E que posso evitar que ela vá à falência. Ser feliz é reconhecer que vale a pena viver, apesar de todos os desafios, incompreensões e períodos de crise. Ser feliz é deixar de ser vítima dos problemas e tornar-se um autor da própria história. [...]. É ter coragem para ouvir um “não”. É ter segurança para receber uma crítica”

Fernando Pessoa (adaptado)

Resumo

Da crescente necessidade de alimentos e da necessidade de travar a destruição de culturas por animais e insectos foram sintetizados os pesticidas.

Por entre uma vasta gama de pesticidas alguns são desreguladores endócrinos o que se traduz num perigo para a saúde humana pois pode despoletar alterações nos seres vivos mesmo em concentrações muito baixas.

Devido a diversos factores nomeadamente a lixiviação, ventos e outros agentes ambientais assim como a presença de terrenos agrícolas junto a diversos rios, estes encontram-se contaminados com pesticidas desreguladores endócrinos.

O objectivo deste trabalho foi avaliar quais os pesticidas desreguladores endócrinos presentes nas águas de rios da região Norte.

Neste trabalho utilizou-se a técnica de microextração em fase sólida recorrendo a uma fibra de PDMS (100 µm). Para tal as condições de optimização foram testadas nomeadamente a quantidade de NaCl, quantidade de metanol, temperatura do injectador e tempo de exposição.

Os parâmetros obtidos óptimos foram 0 % de NaCl, tempo de exposição de 45 min, temperatura do injectador de 260 °C e 2,5 % de metanol.

Conseguiu-se a separação de todos os pesticidas desreguladores endócrinos com a seguinte programação temperaturas: inicio a 60°C por um minuto seguido de um aumento de 20 °C/min até aos 200 °C onde permanece por um minuto e de seguida um aumento de 5 °C/min até aos 245 °C onde permanece por 40 min.

Fizeram-se curvas de calibração entre 0,01 µg/L e 10 µg/L. Constatou-se no entanto uma falta de reprodutibilidade entre as injeções utilizando esta técnica.

Os rios analisados foram o Rio Douro, Rio Tâmega, Ria de Aveiro, Rio Lima, Rio Minho, Rio Sousa, Rio Águeda, Rio Cávado e Rio Leça.

No Rio Tâmega foram encontrados os seguintes pesticidas: diazinão, α -HCH, β -HCH, δ -HCH, lindano, HCB, simazina/ atrazina, vinclozolina, alacloro, 2,4-D, malatião, aldrina, bifentrina, metoxicloro e fenvalerato.

No rio Douro estão presentes HCB, simazina/ atrazina, vinclozolina, 2,4-D, malatião, aldrina, fenvalerato e deltametrina.

No rio Lima encontra-se diazinão, α -HCH, δ -HCH, 2,4-D, HCB, vinclozolina, lindano, simazina/atrazina, alacloro, malatião, aldrina, fenvalerato e deltametrina.

No rio Sousa os pesticidas encontrados foram: diazinão, HCB, aldrina, α -HCH, β -HCH, δ -HCH, lindano, simazina/ atrazina, 2,4-D, cipermetrina, alacloro, fenvalerato e malatião.

No rio Cávado estão presentes o diazinão, α -HCH, β -HCH, δ -HCH, lindano, HCB, 2,4-D, malatião, metoxicloro, cipermetrina e o fenvalerato.

Na ria de Aveiro encontrou-se o diazinão, α -HCH, β -HCH, δ -HCH, lindano, HCB, simazina/atrazina, 2,4-D, Malatião e aldrina.

No rio Águeda estão presentes o diazinão, HCB, 2,4-D, aldrina e malatião. E por último no rio Leça esta presente o diazinão, 2,4-D, alacloro, malatião, aldrina, cipermetrina e fenvalerato.

A importância deste trabalho reside na demonstração da presença destes pesticidas, desreguladores endócrinos nas águas superficiais da região Norte.

Abstract

The growing need for food and halting the destruction of crops by insects and animals were created to pesticides.

Among a wide range, some pesticides are endocrine disrupter which translates into a hazard to human health because it can trigger changes in living things even at very low concentrations.

By several factors including leaching, winds and others environmental agents and also the presence of farmland along the rivers, they are contaminated with various endocrine disruptores.

The goal of this study was to know which EDs are in the waters of rivers of the North region. In this work was used the technique of solid phase microextraction using a PDMS fiber (100 μm). The conditions were tested including the amount of NaCl concentration of methanol, injector temperature and exposure time. The optimal parameters obtained were 0% NaCl, exposure time of 45 min, injector temperature 260° C and 2.5% methanol.

The separation of all pesticides EDs was obtained with the following schedule temperatures, beginning at 60 ° C for one minute followed by an increase of 20° C / min up to 200° C where it stays for a minute and then an increase of 5° C / min up to 245° C where it stays for 40 min.

The limits of detection were between 0, 01 $\mu\text{g/L}$ to 10 $\mu\text{g/L}$.

The rivers studied were the Douro, Tâmega, Cávado, Ria de Aveiro, Lima, Minho, Sousa, Águeda, and river Leça.

In Rio Tâmega found the following pesticides: diazinon, α -HCH, β -HCH, δ -HCH, lindane, HCB, simazine / atrazine, vinclozolin, alachlor, 2,4-D, malathion, aldrin, bifenthrin, fenvalerate and methoxychlor .

In the Douro River HCB were detected, simazine / atrazine, vinclozolin, 2,4-D, malathion, aldrin, fenvalerate and deltamethrin.

On the River Lima were find diazinon, α -HCH, δ -HCH, 2,4-D, HCB, vinclozolin, lindane, simazine / atrazine, alachlor, malathion, aldrin, fenvalerate and deltamethrin.

At the River Sousa the EDC detected were: diazinon, HCB, aldrin, α -HCH, β -HCH, δ -HCH, lindane, simazine / atrazine, 2,4-D, cypermethrin, alachlor, malathion and fenvalerate.

Are present in the river Cávado the follow diazinon, α -HCH, β -HCH, δ -HCH, lindane, HCB, 2,4-D, malathion, methoxychlor, cypermethrin and fenvalerate.

In Ria de Aveiro met the diazinon, α -HCH, β -HCH, δ -HCH, lindane, HCB, simazine / atrazine, 2,4-D, malathion and aldrin.

In the river Águeda were detected diazinon, HCB, 2,4-D, aldrin and malathion.

And in the Leça river were detected diazinon, 2,4-D, alachlor, malathion, aldrin, fenvalerate and cypermethrin.

The importance of this work lies in the clear demonstration of the presence of these pesticides, endocrine disruptors in high amounts in surface waters of the North.

Abreviaturas

DEs- desreguladores endócrinos

DGADR- Direcção Geral da Agricultura e Desenvolvimento Rural

EPA- Agência de Protecção Ambiental

GC-MS- Cromatografia gasosa com detector de espectrometria de massas

GLC- cromatografia gás líquido

GSC- cromatografia gás sólido

LLE- Extracção líquido líquido

o,p'-DDT- Diclorodifeniltricloroetano

p,p'-DDD- Diclorodifenilcloroetileno

p,p'-DDE- Diclorodifenildicloroetileno

PA- poliacrilato

PDMS- polidimetilsiloxano

SPE- Extracção em fase sólida

SPME- Microextracção em fase sólida

ÍNDICE

1. INTRODUÇÃO	1
1.1 Enquadramento do trabalho	1
1.2. Água.....	3
1.3. Pesticidas	4
1.4. Desreguladores Endócrinos.....	7
1.5. Legislação	16
1.6. Métodos analíticos	18
1.6.1. Métodos de extracção	18
1.6.1.1 Microextracção em fase sólida	19
1.6.2. Cromatografia gasosa	24
1.6.2.1 Injectores de amostra	25
1.6.2.2 Colunas.....	26
1.6.2.3 Fases estacionárias.....	26
1.6.2.4 Detectores	26
1.6.2.5 Detector de espectrometria de massas.....	27
2. MATERIAIS E MÉTODOS.....	29
2.1 Reagentes e consumíveis.....	29
2.2 Equipamentos	31
2.3 Preparação de soluções padrão.....	31
2.4 Amostragem e preparação de amostra	32
2.5 Procedimento analítico	33
2.5.1 Procedimento de extracção	33
2.5.1.1 Optimização dos parâmetros.....	34
2.5.1.2 Obtenção das curvas de calibração.....	35
2.5.2 Análise cromatográfica.....	35

2.6 Preparação das amostras	36
3. DISCUSSÃO E RESULTADOS	39
3.1 Análise cromatográfica	39
3.2 Optimização da fibra	40
3.2.1 Efeito da concentração salina	40
3.2.2 Efeito da temperatura	41
3.2.3 Efeito da quantidade de metanol	42
3.2.4 Efeito do tempo de exposição	43
3.2.5 Efeito do pH	44
3.3 Curvas de calibração	44
3.4. Pesticidas nas águas dos rios da região Norte Portugal	45
3.4.1 Rio Tâmega	47
3.4.2 Rio Douro	48
3.4.3 Rio Lima	49
3.4.4 Rio Sousa	50
3.4.5 Ria de Aveiro	51
3.4.6 Rio Águeda	52
3.4.7 Rio Minho	53
3.4.8 Rio Cávado	53
3.4.9 Rio Leça	54
3.4.10 Análise global	55
4 CONCLUSÕES	61
5. PERSPECTIVA DE TRABALHOS FUTUROS	63
6 BIBLIOGRAFIA	65
7 ANEXOS	75

Índice de figuras:

Figura 1.1 Rio Douro.....	3
Figura 1.2 Esquema do material usado em SPE	19
Figura 1.3 Esquema representativo da adsorção dos compostos na fibra e posterior dessorção no injecto do cromatógrafo.....	21
Figura 1.4 Esquema de um equipamento de cromatografia gasosa.....	25
Figura 2.1 Cromatógrafo GC-MS da Thermo usado na realização do trabalho.....	31
Figura 2.2 Mapa representativo dos locais de colheita de amostras.....	33
Figura 2.3 Fibra na etapa de adsorção.....	33
Figura 2.4 Adsorção dos analitos na fibra e posterior dessorção no equipamento.....	34
Figura 3.1 Representação das áreas médias obtidas dos pesticidas em estudo com a variação da quantidade de cloreto de sódio adicionada à amostra.....	39
Figura 3.2 Representação das áreas médias obtidas dos pesticidas em estudo com a variação da temperatura do injecto.....	40
Figura 3.3 Representação das áreas médias obtidas dos pesticidas em estudo com a variação da quantidade de metanol adicionado.....	41
Figura 3.4 Representação das áreas médias obtidas dos pesticidas em estudo com a variação do tempo de exposição.....	42
Figura 3.5 Cromatograma obtido em modo SRM para a concentração de 0,05 µg/L de cada pesticida.....	43
Figura 3.6 Pico cromatográfico em SIM e espectro de massas obtido na pesquisa do alacloro na água do rio Tâmega.....	47
Figura 3.7 Pico cromatográfico em SRM e espectro de massa obtido na pesquisa do malatião nas águas do rio Douro.....	48
Figura 3.8 Pico cromatográfico em SRM e espectro de massas obtido na pesquisa do 2,4-D na água do rio Lima.....	49

Figura 3.9 Pico cromatográfico em SIM e espectro de massas obtido na pesquisa do malatião na água do rio Sousa.....	50
Figura 3.10 Pico cromatográfico em SIM e espectro de massas obtido na pesquisa do malatião na água da ria de Aveiro.....	51
Figura 3.11 Pico cromatográfico em SIM e espectro de massas obtido na pesquisa do HCB na água do rio Águeda.....	51
Figura 3.12 Pico cromatográfico em SIM e espectro de massas obtido na pesquisa das triazinas na água do rio Minho.....	52
Figura 3.13 Pico cromatográfico em SRM e espectro de massas obtido na pesquisa do metoxicloro na água do rio Cávado.....	53
Figura 3.14 Pico cromatográfico em SRM e espectro de massas obtido na pesquisa do Alacloro na água do rio Leça.....	54
Figura 3.15 Percentagens de ocorrências dos pesticidas pesquisados.....	55
Figura 3.16 Número de pesticidas presentes nos respectivos rios.....	56

Índice de tabelas

Tabela 1.1- Lista de Pesticidas a pesquisar nas águas de Portugal (adaptado do Ministério da Agricultura, do Desenvolvimento Rural e das Pescas, Julho de 2009)	5
Tabela 1.2- Listagem dos Pesticidas considerados Desreguladores Endócrinos ou potenciais desreguladores endócrinos que não são restritos nem proibidos pela União Europeia	9
Tabela 1.3- Listagem de Pesticidas e suas constantes de solubilidade, fórmula química, massa molecular e família/classe a que correspondem.....	10
Tabela 1.4- Valores limites de pesticidas em águas superficiais interiores e outras águas superficiais.....	17
Tabela 1.5- Tipo de Fibras disponíveis para SPME e parâmetros de utilização dessas fibras.....	20
Tabela 2.1 Pesticidas utilizados, marca, grau de pureza.....	30
Tabela 2.2 Locais da recolha da água e temperaturas.....	32
Tabela 2.3 Segmentos usados e respectivos intervalos de tempo e iões de quantificação pesquisados.....	36
Tabela 3.1 Pesticidas, seus iões de quantificação e tempos de retenção.....	37
Tabela 3.2 Valores obtidos de declive e ordenada na origem para cada recta de calibração, razão sinal ruído e limites de detecção e quantificação obtidos pela razão sinal/ruído.....	44
Tabela 3.3- Listagem dos pesticidas encontrados nos rios e sua classificação de acordo com a família e classe química.....	58

1.INTRODUÇÃO

1.1 Enquadramento do trabalho

A associação entre os relatos de contaminação química do ambiente e o aparecimento de doenças, alterações reprodutivas e morte de animais selvagens começou a tomar forma por volta de 1947 ainda que de uma forma embrionária. Em 1960, nos Grandes Lagos (EUA), verificou-se que alguns peixes apresentaram alterações reprodutivas. Posteriormente, na Califórnia, observaram-se peixes com tumores, o que veio alertar ainda mais a comunidade científica da relação entre a exposição a substâncias e o aparecimento de doenças. ^[1,3]

O crescente número de casos de alterações do desenvolvimento de certas espécies aquáticas, começou a associar-se com a contaminação de rios, lagos, efluentes e esgotos provenientes de indústrias, fábricas de produtos químicos e produtos utilizados na agricultura. ^[1]

Tornou-se óbvio que certas indústrias e produtos químicos de uso essencialmente agrícola podem estar na causa do desenvolvimento de várias anomalias em animais. Este fenómeno foi referido pela escritora Rachel Carson em 1962 no livro “Silent Spring” e que relatou receios de efeitos semelhantes em seres humanos. ^[1,2]

Com várias evidências e dada a incidência das deformações em animais, o uso agrícola do DDT e de PCBs foi proibido em 1973 nos Estados Unidos da América. ^[1]

No entanto novos casos de perturbações surgiram ao longo das décadas seguintes devido à persistência de químicos proibidos, como por exemplo os pesticidas organoclorados que têm um tempo de semi-vida de 57 anos, bem como a produção de novos compostos químicos. ^[1]

Entretanto em 1980 após um acidente industrial local seguido de um escoamento de produtos químicos ligados à agricultura local, incluindo o DDT, verificou-se uma diminuição do pénis nos jacarés do lago de Apopka e outras alterações relacionadas com a reprodução. ^[1]

Já em 1991 na conferência de Wingspread, em Racine, Wisconsin, foi discutida a questão do elevado número de produtos químicos sintéticos que eram libertados para o meio ambiente bem como o seu potencial de alterar o sistema endócrino de seres vivos. ^[1,2] Nesta reunião científica foi anunciada formalmente a possibilidade destes produtos químicos estarem a provocar efeitos secundários.

Tornou-se evidente que com o uso recorrente a pesticidas, as espécies foram-se tornando cada vez mais resistentes o que obriga a um aumento do uso e, por consequência, uma maior contaminação do solo e ambiente.

Por outro lado a presença de pesticidas no solo apresenta diversos inconvenientes já que na grande parte deles o tempo médio de vida é bastante longo. A acção do vento, da água e lixiviação promove efeitos de propagação, podendo atingir águas superficiais e subterrâneas. As águas de rios e ribeiros poderão ser uma fonte importante de contaminação de terrenos, sedimentos, e seres vivos, já que através do percurso que o rio possa fazer poderá ir contaminando a quando da sua passagem. Estas contaminações continuadas ao longo do tempo permitem que ocorra bioacumulação e os níveis de um determinado composto possam aumentar para um valor bastante elevado na cadeia trófica.

Diversos estudos foram realizados quer em águas subterrâneas, quer em águas superficiais no nosso país. Alpendurada *et al* publicaram um estudo que descreve a presença de diversos pesticidas nas águas subterrâneas da região de Esposende, Norte de Portugal, nomeadamente: o lindano, endossulfão, pendimetalina, dieldrina, atrazina, alacloro, procimidona, desetilatraxina, metolacoloro, pirimicarbe, cipermetrina, dimetoato, diazinão, cloropirifos, metalaxil, entre outros. Nesta abordagem, confirma-se a presença destes compostos sendo que alguns se encontram em quantidades bastante superiores aos permitidos por lei para águas de consumo. ^[5]

No entanto, em águas superficiais, em estudos realizados no rio Arachthos na Grécia por D. A. Lambropoulou *et al*, também encontraram pesticidas, entre eles: a dieldrina, endrina, linurão, aldrina, metoxicloro, permetrina, cipermetrina, dimetoato, fenvalerato e lindano. ^[6]

Ao longo dos anos a preocupação referente à necessidade destes estudos tem vindo a ser cada vez maior e embora a maioria dos pesticidas encontrados tenham sido proibidos a verdade é que ainda se encontram nas águas e a sua bioacumulação para os seres vivos continua a ter lugar.

A identificação destes compostos em águas é o primeiro passo para que se perceber de que modo e quanto estamos expostos a estes compostos.

O principal objectivo deste trabalho residiu na detecção destes compostos em águas usando para tal uma técnica rápida e capaz de trazer mais-valias à extracção devido ao seu baixo uso de solvente e posterior facilidade de trabalho.

1.2. Água

Os rios e ribeiros desde sempre foram um dos mais importantes recursos para a sobrevivência da humanidade. São eles que nos fornecem a maior parte da água que consumimos e que usamos na confecção dos nossos alimentos, na higiene e na rega de terrenos agrícolas. Além destes factores os rios são bastante importantes como vias de circulação, fonte de produção de energia e fonte de alimentos pois é o habitat de uma grande variedade de animais.

Como a água é um recurso natural imprescindível à vida do homem, é de grande importância preservar com qualidade qualquer fonte de água, seja rio, ribeiro, mar ou até mesmo um riacho.

Na zona do grande Porto, toda a população é abastecida por água proveniente do Rio Douro, é na zona de Crestuma Lever que se situa a ETA que é responsável pelo tratamento de água para cerca de milhão e meio de habitantes.



Figura 1. 1 Rio Douro

Os mecanismos de tratamento de água não eliminam na totalidade o teor de pesticidas. Eles apenas garantem que a água chega às nossas torneiras dentro dos parâmetros físico-químicos e microbiológicos estabelecidos por lei (Decreto-lei nº 306/2007 de 27 de Agosto). De acordo com o mesmo Decreto-lei ao dia 31 de Julho de cada ano a DGADR, Direcção Geral de Agricultura e Desenvolvimento Rural, publica os pesticidas que cada entidade gestora deverá pesquisar no ano seguinte.^[7,8]

1.3.Pesticidas

De acordo com a EPA um pesticida pode ser definido como sendo uma substância ou mistura de substâncias com capacidade de prevenir, destruir, repelir ou atenuar qualquer peste. Os pesticidas podem ser agrupados pela sua função, nomeadamente, algicidas, fungicidas, acaricidas, insecticidas, herbicidas, etc. Além disso, podem ser incluídas nesta categoria as substâncias desfolhantes, dessecantes ou reguladoras do crescimento de insectos ou plantas. ^[9]

Em 1938 Paul Muller anunciou a síntese do DDT e ganhou o prémio Nobel em 1948 pela descoberta daquilo que seria o “pesticida milagroso”. Quando Rachel Carson escreveu o livro “ Silent Spring” em 1962, as pessoas não tinham consciência dos riscos a que estavam expostos e também dos riscos que oferecem os pesticidas. Estes produtos eram usados para garantir uma alta produção de alimentos e isenção de pragas. ^[2]

Por meados da década de 70, descobriu-se que os pesticidas não garantiam a total eliminação das pragas pois estas começaram a ganhar resistência. Mas foi principalmente a partir da obra de Carson que a sociedade e os governos de diversos países começaram a adoptar medidas que viriam a restringir o uso de alguns pesticidas, bem como o seu fabrico e armazenamento. ^[4]

Actualmente são conhecidos cerca de 8500 formulações comerciais, incluindo cerca de 900 substâncias activas listadas no Manual de Pesticidas. ^[10]

Os pesticidas são então compostos orgânicos empregues essencialmente em actividades agrícolas que possuem geralmente alta toxicidade e são apontados como sendo causadores de muitos danos à saúde humana, à flora e à fauna. Quando em contacto com o solo, os pesticidas sofrem um processo de degradação, dependendo das características do solo, nomeadamente: conteúdo em matéria orgânica, pH e o estado nutricional sendo também dependente das condições climáticas que controlam a sua temperatura e a sua humidade. ^[11,12]

De acordo com o Ministério da Agricultura, do Desenvolvimento Rural e das pescas o uso dos pesticidas não é constante ao longo do ano, sendo estes aplicados em alturas específicas consoante a plantação e zona em questão. Esta entidade orienta sobre quais os pesticidas a pesquisar em águas e em que zonas de acordo com as pragas que tenham surgido e com os pesticidas que o Ministério tenha aconselhado aos agricultores. Na Tabela 1.1 reúne-se uma lista de pesticidas a pesquisar nas águas em todas as regiões de Portugal continental em 2010. ^[8]

Tabela 1.1- Lista de Pesticidas a pesquisar nas águas de Portugal (adaptado do Ministério da Agricultura , do Desenvolvimento Rural e das Pescas, Julho de 2009)

	Zona Norte	Zona Centro	Zona de Lisboa e Vale do Tejo	Zona do Alentejo	Zona do Algarve
Lista de substâncias activas a pesquisar nas águas	2,4-D, alacloro, atrazina, bentazona, captana, cimoxanil, dimetoato, diurão, linurão, S-metolacloro e terbutilazina	Alacloro, atrazina, bentazona, cimoxanil, dimetoato, diurão, linurão, metalaxil, MCPA, metribuzina, molinato, propanil, S-metolacloro, terbutilazina e triclopir	2,4-D, alacloro, amitrol, atrazina, bentazona, cimoxanil, dimetoato, diurão, linurão, MCPA, metalaxil, molinato, propanil, S-metolacloro, tebucozanol, terbutilazina e triclopir	MCPA, clorotolurão, glufosinato de amónio, terbutilazina, cimoxanil, linurão, metalaxil, cloropirifos, dimetoato, propanil, tebucozanol, alacloro, atrazina, bentazona, diurão, molinato e S-metolacloro	Cimoxanil, dimetoato, diurão, linurão, terbutilazina,

A zona do Algarve e a zona Norte são as regiões onde o número de pesticidas a pesquisar nas águas é menor, com 5 e 11 pesticidas respectivamente. O dimetoato, linurão, cimoxanil, diurão e terbutilazina são pesticidas presentes nas listas de todas as zonas de Portugal continental.

Os pesticidas podem ser classificados de acordo com a sua família química ou a espécie que pretendem atingir. Para além destas duas formas ainda podem agrupar-se de acordo com o modo de actuação do pesticida que pode ser sistémico ou por contacto caso penetram no interior da planta ou não.

Estes compostos são libertados para o ambiente quer durante a sua utilização, quer durante a produção, transporte e manuseamento. Estes, poderão ser incorporados nas plantas, passar para a atmosfera por volatilização, ficar retidos no solo onde por lixiviação poderão atingir águas subterrâneas, rios e mares. ^[13, 10]

Neste trabalho demos especial relevo aos diversos pesticidas que são simultaneamente desreguladores endócrinos alguns dos quais estão proibidos em muitos países mas persistem no ambiente. ^[14, 10]

A presença destes compostos em alimentos pode ter duas fontes: resultar do tratamento do produto agrícola ou ser devido a contaminação ambiental (água, solos ou vento). ^[13]

Dentro da família dos pesticidas organoclorados, essencialmente insecticidas e acaricidas, estes podem ser encontrados em vários compartimentos ambientais. Possuem elevada toxicidade, lipofilicidade e persistência e a sua produção e utilização tem vindo a ser proibida um pouco por toda a Europa. Uma das características mais notórias destes compostos é que podem acumular-se em diversos tecidos biológicos, o que leva a que ocorra bioacumulação. No entanto, e apesar de o seu uso ter vindo a ser proibido, isto não garante que não sejam ainda utilizados e produzidos. Mesmo no caso de já não serem utilizados, devido à sua elevada persistência e consequente bioacumulação, ainda persistem e são detectados. ^[14,15,16]

Quanto aos organofosforados, são essencialmente insecticidas e têm vindo a ser usados em substituição dos anteriores, nos países onde já estão a cair em desuso. Embora estes compostos sejam menos persistentes, a maioria possui uma elevada toxicidade e, em alguns casos, manifestam-se bastante instáveis. ^[17,18]

No que diz respeito aos piretróides estes são pesticidas não sistémicos, basicamente usados como insecticidas e acaricidas, pouco tóxicos para os mamíferos e de rápida

degradação. O principal motivo para o qual apresentam esta última propriedade é por se tratar de ésteres facilmente degradados pela luz e por esterases. [19, 20, 21]

1.4. Desreguladores Endócrinos

Os desreguladores endócrinos (DEs) foram definidos pela Agência de Protecção Ambiental (EPA) como sendo compostos químicos capazes de interferir com o sistema endócrino. Estes compostos, que são por definição um agente exógeno, interferem com a síntese, secreção, transporte, ligação, acção e eliminação de hormonas naturais no corpo, responsáveis pela manutenção da homeostasia, reprodução, desenvolvimento e comportamento. Os efeitos sentidos variam de acordo com a idade, sexo, o tipo de organismo exposto e características genéticas. [11, 22]

Cada órgão que compõe o sistema endócrino apresenta uma característica fundamental que é a de segregar hormonas específicas com a principal função de efeito regulador em outros órgãos que se encontram à distância. Os órgãos que cumprem tal função são as glândulas de secreção interna.

As hormonas após serem produzidas entram na corrente sanguínea e percorrem todo o organismo até chegarem ao órgão alvo. Tais órgãos incluem o pâncreas, testículos, ovários, glândulas supra-renais, tiróide entre outros. O hipotálamo, centro nervoso situado abaixo do cérebro, faz constante controlo das quantidades das diferentes hormonas circulantes. Estas hormonas controlam o funcionamento não só do sistema reprodutor mas da saúde como um todo, coordenando as acções de órgãos e tecidos. [1,11, 22]

Os desreguladores endócrinos actuam no corpo humano, substituindo as hormonas, bloqueando a sua acção natural e podem aumentar ou diminuir a quantidade original de hormonas, alterando a sua função endócrina.

Durante anos o nosso organismo sofreu acção e adaptou-se a desreguladores naturais presentes em vegetais, plantas, cereais, temperos e frutas. Contudo, estes compostos não conseguem acumular-se no nosso organismo e são excretados de forma natural. [1,21, 22]

Os DEs podem ser compostos orgânicos ou inorgânicos, sintéticos ou naturais que apresentam uma grande diversidade química estrutural.

Muitas destas substâncias são persistentes no meio ambiente, acumulando-se no solo e rios e são facilmente transportados a longas distâncias por forças da natureza. Alguns acumulam-se ao longo da cadeia trófica e constituem grande risco à saúde dos seres vivos que se localizam no topo da cadeia alimentar como o homem. O seu uso tanto pode ser em

áreas urbanas ou rurais e podem aparecer como resíduos ou subprodutos derivados de usos industriais diversos. Podem também ser encontrados em depósitos de lixo, contaminando o solo, lençóis freáticos, queima de resíduos hospitalares e industriais. [11, 22]

Os primeiros relatos de substâncias químicas consideradas desreguladores endócrinos remetem para o dietilestilbestrol, medicamento usado por mulheres entre os anos 50 e 70 que apresentou resultados desastrosos nomeadamente o cancro na vagina, deformações irreversíveis no útero e a infertilidade na descendência feminina.

O risco da contaminação das águas subterrâneas resulta da infiltração das águas pluviais através de aterros sanitários e de percolação de áreas agrícolas.

Na tabela 1.2 apresenta-se alguns dos pesticidas referenciados como desreguladores endócrinos segundo o Comunicado da Comunidade Europeia (Com (1999) 706).

Tabela 1.2- Listagem dos Pesticidas considerados Desreguladores Endócrinos ou potenciais desreguladores endócrinos que não são restritos nem proibidos pela União Europeia

Pesticidas			
2,4-D	Acetocloro	Alacloro	Aldrina
Amitrol	Atrazina	Carbendazima	Clordano
Diazinão	Dicofol	DDT	Dieldrina
Dimetoato	Diurão	Endossulfão	Endrina
HCH	Heptacloro	Iprodiona	Kepone
Lindano	Linurão	Malatiao	Manebe
Metam	Mirex	Metilbromide	Metilparatião
Nitrofenol	Oxiclordano	Paratião	Fotomirex
Procloraz	Propanil	Simazina	Tirame
Toxafeno	Triadimefão	Vinclozolina	Zinebe
Ziram			

* Adaptado do comunicado da comissão para o conselho e parlamento europeu (COM(1999)706)

A Tabela 1.3 resume a informação associada a alguns pesticidas decretados como desreguladores endócrinos tais como a constante de solubilidade, fórmula química, massa molecular, família e classe do pesticida e a respectiva estrutura química.

Tabela 1.3- Listagem de Pesticidas e suas constantes de solubilidade, fórmula química, massa molecular e família/classe a que correspondem

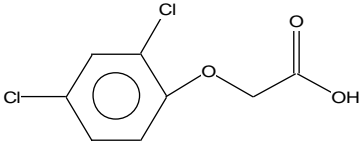
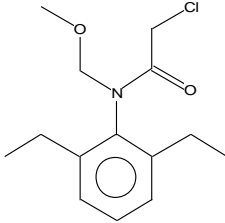
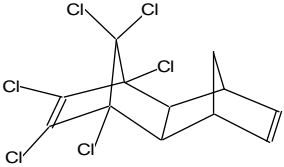
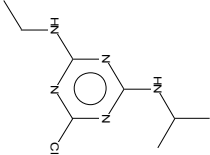
Pesticida	Fórmula química	K _{ow}	Solubilidade em água (mg/L)	Massa molecular	Família/ Classe	Estrutura
2,4-D	C ₈ H ₆ Cl ₂ O ₃	2,58-2,83	311	221	Herbicida/ organoclorado (esterfenólico)	
Alacloro	C ₁₄ H ₂₀ ClNO ₂	3,09	242	269,8	Herbicida/ organoclorado	
Aldrina	C ₁₂ H ₈ Cl ₆	7,4	<50	364,91	Insecticida/ organoclorado	
Atrazina	C ₈ H ₁₄ ClN ₅	2,5	33	215,7	Herbicida/ triazina	

Tabela 1.3 (continuação)- Listagem de Pesticidas e suas constantes de solubilidade, fórmula química, massa molecular e família/classe a que correspondem

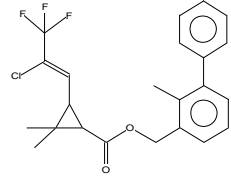
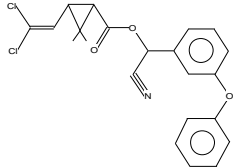
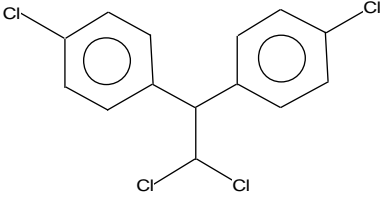
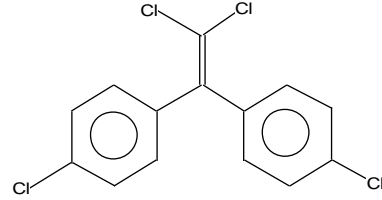
Pesticida	Formula química	K _{ow}	Solubilidade em água (mg/L)	Massa molecular	Família/ Classe	Estrutura
Bifentrina	C ₂₃ H ₂₂ ClF ₃ O ₂	>6	0,1	422,9	Insecticida, formicida, acaricida /piretróide	
Cipermetrina	C ₂₂ H ₁₉ Cl ₂ NO ₃	6,94	0,01	416,3	Insecticida/ piretróide	
p,p'-DDD	C ₁₄ H ₁₀ Cl ₄	6,02	0,09	320,04	Insecticida/ organoclorado	
p,p'-DDE	(ClC ₆ H ₄) ₂ C=CCl ₂	5,70	0,12	318,03	Insecticida/ organoclorado	

Tabela 1.3 (continuação)- Listagem de Pesticidas e suas constantes de solubilidade, fórmula química, massa molecular e família/classe a que correspondem

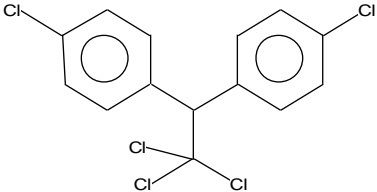
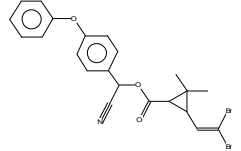
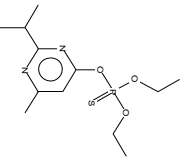
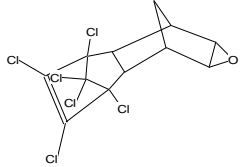
Pesticida	Formula química	K _{ow}	Solubilidade em água (mg/L)	Massa molecular	Família/ Classe	Estrutura
o,p'-DDT	C ₁₄ H ₉ Cl ₅	5,75	0,025	354,5	Insecticida/ organoclorado	
Deltametrina	C ₂₂ H ₁₉ Br ₂ NO ₃	4,6	<2x10 ⁻⁴	505,21	Insecticida/ piretróide	
Diazinão	C ₁₂ H ₂₁ N ₂ O ₃ PS	3,3	60	304,3	Insecticida/ organofosforado	
Dieldrina	C ₁₂ H ₈ Cl ₆ O	6,2	0,1	380,91	Insecticida/ organoclorado	

Tabela 1.3 (continuação) - Listagem de Pesticidas e suas constantes de solubilidade, fórmula química, massa molecular e família/classe a que correspondem

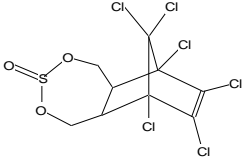
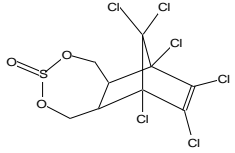
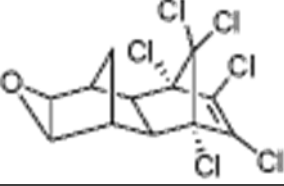
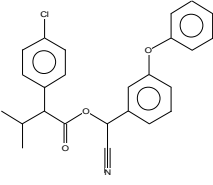
Pesticida	Formula química	K _{ow}	Solubilidade em água (mg/L)	Massa molecular	Família/ Classe	Estrutura
α-Endossulfão	C ₉ H ₆ Cl ₆ O ₃ S	4,74	0,32	406,93	Insecticida, acaricida/ organoclorado	
β-Endossulfão	C ₉ H ₆ Cl ₆ O ₃ S	4,79	0,33	406,93	Insecticida, acaricida/ organoclorado	
Endrina	C ₁₂ H ₈ Cl ₆ O	5,34	0,23	380,91	Insecticida / organoclorado	
Fenvalerato	C ₂₅ H ₂₂ ClNO ₃	5,01	<1x10 ⁻²	419,9	Insecticida / piretróide	

Tabela 1.3 (continuação) - Listagem de Pesticidas e suas constantes de solubilidade, fórmula química, massa molecular e família/classe a que correspondem

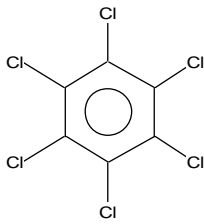
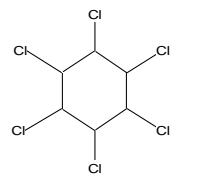
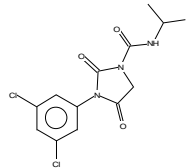
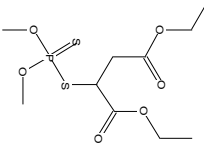
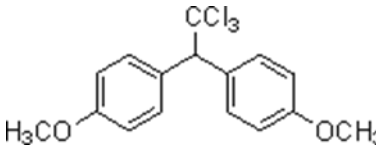
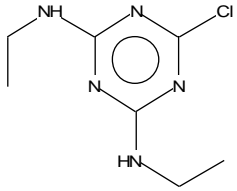
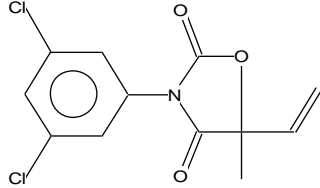
Pesticida	Formula química	K _{ow}	Solubilidade e em água (mg/L)	Massa molecular	Família/ Classe	Estrutura
HCB	C ₆ Cl ₆	6,42	Insolúvel	284,8	Fungicida / organoclorado	
HCH	C ₆ H ₆ Cl ₆	3,80	7,3	290,8	Insecticida / organoclorado	
Iprodiona	C ₁₃ H ₁₃ Cl ₂ N ₃ O ₃	3,00	13	330,2	Fungicida / organoclorado	
Malatião	C ₁₀ H ₁₉ O ₆ PS ₂	2,75	145	330,3	Insecticida / organofosforado	

Tabela 1.3 (continuação) - Listagem de Pesticidas e suas constantes de solubilidade, fórmula química, massa molecular e família/classe a que correspondem

Pesticida	Formula química	K_{ow}	Solubilidade em água (mg/L)	Massa molecular	Família/ Classe	Estrutura
Metoxicloro	$C_{16}H_{15}Cl_3O_2$	4,30	0,1	345,7	Insecticida / organoclorado	
Simazina	$C_7H_{12}ClN_5$	2,10	6,2	201,7	Herbicida / triazina	
Vinclozolina	$C_{12}H_9Cl_2NO_3$	3,00	2,6	286,1	Fungicida / organoclorado	

1.5. Legislação

A União Europeia adoptou várias medidas para reduzir os riscos associados à utilização dos pesticidas.

Os países da Comunidade Europeia consideram que a concentração máxima admissível de um pesticida individual na água potável é de 0,1 µg/L sem, no entanto, ultrapassar os 0,5 µg/L quando se considera a soma de todos os pesticidas. Limites semelhantes também têm vindo a ser adoptados por outros países, nomeadamente Estados Unidos e Canadá.

A directiva 2008/105/CE do parlamento Europeu e do Conselho de 16 de Dezembro de 2008 relativa a normas de qualidade ambiental no domínio da política da água que altera e subsequentemente revoga as Directivas 82/176/CEE, 83/156/CEE, 84/491/CEE e 86/280/CEE do Conselho, e que altera a directiva 2000/60/CE faz referência a normas de qualidade ambiental para substâncias prioritárias e para outros poluentes que inclui alguns valores tabelados para pesticidas considerados desreguladores endócrinos.

Apresentam-se na Tabela 1.7 valores referentes às concentrações máximas permitidas em águas superficiais referentes a alguns pesticidas. Estes valores correspondem médias anuais e valores médios anuais.

Tabela 1.4 Valores limite de pesticidas em águas superficiais interiores e outras águas superficiais.

Pesticida	Concentração máxima admissível (µg/L)		Concentração máxima (média anual) (µg/L)	
	Águas de superfície interiores	Outras águas de superfície	Águas de superfície interiores	Outras águas de superfície
Alacloro	0,7	0,7	0,3	0,3
Atrazina	2,0	2,0	0,6	0,6
Aldrina	Não aplicável	Não aplicável	$\Sigma=0,01$	$\Sigma=0,005$
Dieldrina				
Endrina				
DDT total	Não aplicável	Não aplicável	0,01	0,01
Endossulfão	0,01	0,004	0,005	0,0005
HCB	0,05	0,05	0,01	0,01
HCH	0,04	0,02	0,02	0,002
Simazina	4	4	1	1

* adaptado da Directiva 2008/105/CE do Parlamento Europeu e do Conselho de 16 de Dezembro de 2008.

1.6. Métodos analíticos

1.6.1. Métodos de extracção

Para analisar DEs em amostras de águas, é necessário proceder em primeiro lugar à extracção dos analitos dessas águas. A utilização de alguns destes métodos requer que após a extracção da amostra esta seja purificada e isso acarreta muitas vezes perda de amostra e aumento dos custos. Diferentes tipos de extracção têm vindo a ser desenvolvidos para diferentes analitos com o intuito de obter métodos cada vez mais eficazes, “amigos” do ambiente em que o uso de solventes é consideravelmente menor ou mesmo nulo, menos laboriosos o que se traduz em menor tempo de operação e menor número de operações necessárias e que apresentem elevadas recuperações. De entre vários tipos de extracção é possível distinguir alguns como sendo os mais importantes em termos de utilização.

Extracção com solventes orgânicos (LLE) é uma técnica que consiste num método de separar compostos baseados nas solubilidades diferentes de dois líquidos imiscíveis em que normalmente um deles é a água e o outro é um solvente orgânico. Apresenta diversas vantagens como, por exemplo, a possibilidade de utilização de solventes com boa capacidade de extracção, com possibilidade de realização à temperatura ambiente e a possibilidade de controlar diversos parâmetros, nomeadamente o pH, força iónica e temperatura. No entanto, também apresenta desvantagens tais como o uso de grandes quantidades de solvente orgânico e o facto de gerar produtos intermediários, o que implica o uso de um outro processo para libertar o soluto. ^[25,26]

De forma a minimizar o uso de solventes surgiram as técnicas de SPE e dispersão em fase sólida. Estas duas foram preferidas à LLE porque, de maneira geral, o volume de solventes pode ser consideravelmente reduzido.

A extracção em fase sólida (SPE) é um processo de extracção de amostra cada vez mais útil e consiste no uso de uma fase sólida e uma líquida para isolar uma ou várias substâncias de uma solução. É usada regra geral para limpeza de amostras antes de usar um determinado método analítico de quantificação de substância(s) na amostra. A extracção em fase sólida usa o mesmo tipo de fases estacionárias que são utilizadas em colunas de cromatografia líquida. A fase estacionária pode estar contida numa coluna de vidro, plástico ou num disco de sílica. A SPE apresenta, em comparação com a LLE, bastantes vantagens nomeadamente: diminuição do consumo de solventes orgânicos, ausência de formação de emulsões, boa selectividade, recuperações elevadas que se poderão aproximar dos 100 %, rapidez, menos laborioso, e facilidade de automatização recorrendo a um sistema “manifold”

(Figura 1.2). Esta mesma ainda permite que, após a retenção dos analitos na fase estacionária, a amostra seja guardada e usada num outro período de tempo sem comprometer a maioria dos compostos. [25, 27]



Figura 1. 2 Esquema do material usado em SPE

1.6.1.1 Microextração em fase sólida

A microextração em fase sólida (SPME) foi criada por Pawliszyn com o intuito de simplificar a etapa de preparação de amostras, diminuindo o tempo envolvido nas análises. Os testes iniciais foram publicados no final dos anos 80, nos quais foram utilizadas pequenas secções de fibra óptica de sílica fundida, algumas recobertas com um líquido polimérico ou com um material sólido adsorvente e outras sem qualquer revestimento. O desenvolvimento desta técnica intensificou-se a partir da introdução da fibra no interior de uma agulha adaptada numa micro-seringa, o que facilitou bastante a colheita nos analitos. Neste método de extração é usado uma fibra recoberta por um polímero, para concentrar compostos orgânicos voláteis e semi-voláteis, que numa única etapa extrai, concentra e injecta a amostra, sem qualquer necessidade de utilização de solventes. [31, 32,33] A SPME permite a redução do tempo de extração, dos custos envolvidos do volume de amostra e também que seja atingido um limite de detecção bastante baixo. [31,33,34]

Na sua configuração normalmente usada, o dispositivo comercial consiste numa fibra de sílica, fundida com 1 cm de comprimento e poucos micrómetros de diâmetro, inserida na agulha oca da seringa. [31,32]

Existem filmes poliméricos distintos utilizados em SPME, cuja escolha destes, depende de alguns factores como sendo a polaridade dos componentes a extrair e a capacidade de retenção necessária. Esta fibra pode ser de diversos materiais, com diferentes afinidades relativamente aos compostos. A eficiência de extração é determinada pelas propriedades

dos compostos (polaridade e volatilidade), tempo e temperatura de extracção, propriedades da fibra (espessura, material e polaridade), pH e força iónica da amostra. ^[29] Na Tabela 1.4, encontram-se os tipos de fibra disponibilizados comercialmente, a sua espessura e tipo de filme.

Tabela 1.5 Tipo de Fibras disponíveis para SPME e parâmetros de utilização dessas fibras.

Tipo de Fibra	espessura do filme	pH	Temperatura máxima	temperatura de operação recomendada	temperatura de condicionamento	tempo de condicionamento
PDMS	100	2-10	280	200-280	250	0.5
PDMS	30	2-11	280	200-280	250	0.5
PDMS	7	2-11	340	220-320	320	1
PDMS/DVB	65	2-11	270	200-270	250	0.5
Polyacrylate	85	2-11	320	220-300	280	1
Carboxen/PDMS	75	2-11	320	250-310	300	1
PEG	60	2-9	250	200-250	240	0.5
DVB/CAR/PDMS	50/30	2-11	270	230-270	270	1
Carbopack™ Z	15	2-10	340	250-340	320	0.5
Carbowax®/DVB	70	2-9	250	200-240	230	0.5

* Adaptado do manual da fibra da Supelco®

A fibra é colocada em contacto com a solução contendo os analitos, sob agitação constante, durante um dado período de tempo que deve ser optimizado. Após a adsorção dos analitos, o “holder” contendo a fibra é inserido no injector do cromatógrafo onde ocorre a dessorção dos mesmos. Os analitos são transportados pelo gás de arraste, para a coluna cromatográfica e posteriormente detectados pelo detector. Na Figura 1.3 , encontra-se representado a adsorção dos analitos e a posterior dessorção dos mesmos no injector do cromatógrafo.

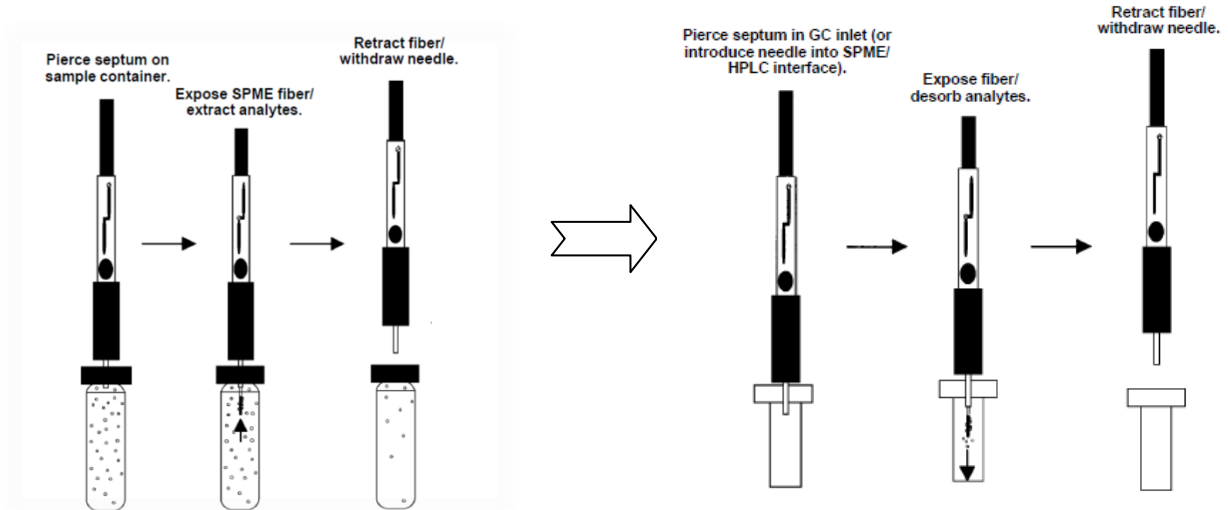


Figura 1. 3 Esquema representativo da adsorção dos compostos na fibra e posterior dessorção no injector do cromatógrafo

A SPME baseia-se no equilíbrio da concentração do analito a extrair da amostra e na fase extractiva. Após a exposição da fibra, os compostos começam a migrar da matriz para a fibra e o final deste processo é considerado, quando o analito atinge a concentração de equilíbrio entre fases. Após este instante, a quantidade de analito permanece constante ao longo do tempo.

A utilização da SPME pode ser feita de duas formas quanto ao uso da fibra de SPME: uso directo, que compreende o equilíbrio entre duas fases; e uso em “headspace”, que ocorre em três fases: a fase extractiva, a amostra líquida e a fase de vapor. A opção por um destes dois métodos depende do tipo de amostra e das características dos analitos. [28, 30]

Em seguida, a seringa é introduzida no injector do cromatógrafo, ficando exposta a acção do calor, os analitos sofrem dessorção e o processo de separação/quantificação toma início. [30,31]

Para uma extracção por imersão directa, a quantidade extraída em fase estacionária, no equilíbrio, será dada pela seguinte equação. [31]

$$n_s = \frac{KV_s V_{aq} C_{aq}^0}{KV_s + V_{aq}} \quad (1)$$

Onde n_s representa o número de moles extraídas pela fibra, K a constante de distribuição fibra/amostra, V_{aq} e V_s o volume de solução e de fase estacionária, respectivamente, e C_{aq}^0 a concentração inicial de um dado componente na amostra inicial. Esta equação está limitada ao uso apenas de fases poliméricas líquidas, no caso de fases poliméricas sólidas, a teoria desta equação é apenas aplicada para baixas concentrações e cuja área superficial seja proporcional ao volume do filme polimérico. O processo de extracção pode ser interrompido antes de o equilíbrio ser alcançado, no entanto e nestas condições o método não garante a reprodutibilidade de resultados. Quando um dado volume de solução a extrair é elevado, a equação poderá ser simplificada para:

$$n_s = KV_s C_{aq}^0$$

(2)

Neste caso, verifica-se que, a quantidade extraída é independente do volume da amostra e proporcional à concentração de analito na matriz. ^[31]

Esta equação permite verificar a existência de uma relação linear, entre a quantidade de analito extraída e a sua concentração inicial, permitindo assim, quantificar a amostra. Por análise desta equação, pode-se constatar que à medida que o volume da amostra aumenta também o número de moles extraído aumenta, até que o volume da amostra se torna significativamente superior ao produto da constante de distribuição pelo volume do revestimento (capacidade da fibra: $V_f K_{fs} \ll V_s$). ^[31,32]

A cinética de extracção é controlada pela capacidade e rapidez de difusão dos compostos presentes em solução. Uma rápida extracção pode ser garantida em amostras com uma agitação elevada e amostras gasosas, nas quais os coeficientes de difusão são bastantes elevados. No caso do uso de amostras líquidas, mostra-se necessário que a agitação seja mais forte e que o tempo requerido para a extracção seja bem superior ao das amostras gasosas, para que haja um equilíbrio entre as fases e uma perfeita difusão, que muitas vezes é dificultada pela camada ou barreira de água que circunda a fibra.

O tempo necessário para que o equilíbrio se atinja, é maior quanto maior for a constante de distribuição do analito (K_{fs}), pois maior quantidade de analito tem que atravessar a camada de água para atingir a fibra. ^[30,35,37]

O primeiro passo, consiste na escolha da fibra tendo em conta a polaridade dos compostos a analisar (Tabela 1.4). Por exemplo a fibra de polidimetilsiloxano (PDMS) é uma fibra com afinidade para compostos apolares adequada por isso para pesticidas apolares, como os

organoclorados, alguns organofosforados e piretróides. No caso da fibra de poliacrilato (PA), esta é mais apropriada para compostos polares como é o caso das triazinas. [32, 33, 34]

A adsorção é também influenciada pela espessura do revestimento, em que a quantidade extraída aumenta com a espessura, se bem que o equilíbrio seja mais facilmente atingido para espessuras mais finas. No caso de haver grande quantidade de compostos numa solução, é aconselhado o uso de uma fibra com maior espessura de filme.

A técnica de SPME poderá ser otimizada de forma a obter melhores limites de detecção, melhor reprodutibilidade e resultados mais concordantes para tal, devesse ser estudado os efeitos produzidos por cada parâmetro e avaliando a eficácia de extracção da fibra. [30,35,37]

A temperatura a que decorre a extracção é um dos factores que pode influenciar o rendimento. Se por um lado aumenta a difusividade dos compostos através das fases, o que fará diminuir o tempo necessário para se atingir o equilíbrio, por outro lado a temperatura afecta de forma directa a constante de partição. Este parâmetro é crítico especialmente quando a adsorção ocorre em “headspace”, pois o aumento da temperatura leva ao aumento da concentração dos compostos mais voláteis na fase gasosa. No entanto, o uso de temperaturas elevadas pode originar degradação de compostos.

O tempo de extracção define o tempo necessário para que ocorra o equilíbrio entre as diferentes fases. O tempo de equilíbrio é, de modo geral, inversamente proporcional ao coeficiente de difusividade, o que quer dizer que será mais elevado quando se usam compostos com altas massas moleculares. Há que ter em atenção na determinação do tempo óptimo de extracção, que poderá levar a análises demasiado extensas e que poderão permitir a degradação dos compostos mais instáveis. [30,35,37]

A presença de um electrólito no sistema, pode influenciar o equilíbrio de duas maneiras, alterando as propriedades da interface ou diminuindo a solubilidade dos compostos orgânicos na fase aquosa (principalmente aqueles que apresentam maior solubilidade em água), este efeito pode ser chamado de “salting out”. Para a SPME, a adição de sal pode conduzir à diminuição da eficiência de extracção, quando a solubilidade dos compostos não se altera, já que os coeficientes de partição dependem dos valores das actividades. Quando se usa valores de sais elevados, ou seja, valores elevados de força iónica, podem diminuir os coeficientes de actividade de alguns compostos a analisar. Desta forma, o efeito da adição de sais depende do composto a analisar e também da matriz onde se encontra. Na adição de sal, há que ter em conta que se poderá formar em torno da fibra uma fina camada de sal que fará com que esta perca eficiência. [30,35,37]

O pH deverá ser ajustado de forma a favorecer a extracção dos compostos, dependendo do pKa de cada analito e nunca deverá ser um valor fora do intervalo que cada fibra permite (ver Tabela 4). Para valores elevados de pH, a velocidade de hidrólise pode ser elevada como também pode melhorar a extracção de alguns compostos. A matriz deveser acidificada, quando os analitos são ácidos, e quando estes são básicos, deveser alcalinizada. O tipo de ácido ou base a usar, deveser estar de acordo com o modo em que a extracção é feita, sendo que para “headspace” o ácido ou a base deveser não volátil, e no caso de ocorrer por imersão directa, estes deverão ser voláteis de forma a não danificar a fibra. [52]

A agitação deverá ter sempre um valor constante e sempre que possível, deverá ser optimizado. Esta influencia a eficiência de extracção promovendo uma maior ou menor velocidade de transferência de massa e influenciando o tempo de extracção necessário.

No injectador do cromatógrafo, a temperatura e o tempo que a fibra permanece no injectador, deverá ser tomada em consideração pois têm que garantir a total transferência dos analitos, para o equipamento e também a reprodutibilidade do método. Para tempos demasiado curtos ou temperaturas demasiado baixas pode a fibra não ficar livre de analitos na sua totalidade levando a que ocorra um fenómeno vulgarmente designado de efeito memória, que origina problemas na quantificação da amostra e falsos resultados.

A SPME, ao contrário de muitas técnicas, permite que sejam efectuadas análises em campo em que a fibra pode ser exposta ao ar, poços, lagos ou rios, evitando a recolha de amostras para análise em frascos.

A técnica de extracção SPME foi a escolhida para este trabalho, pelo volume reduzido de amostra a utilizar, ausência de solventes orgânicos e pelos bons resultados a nível de recuperações.

1.6.2. Cromatografia gasosa

A cromatografia constitui uma análise instrumental que permite a separação dos compostos químicos de uma amostra. Todas as técnicas cromatográficas envolvem o transporte mediante uma fase móvel através de uma fase estacionária. [30,35,37]

Na cromatografia gasosa a fase móvel é um gás. Dentro desta técnica podemos fazer uma distinção tendo em conta o estado físico da fase estacionária, podendo ser gás líquido (GLC) e gás-sólido (GSC) e a amostra é transportada por uma corrente de gás inerte, através de uma coluna sob uma pressão controlada. [38,39]

Os parâmetros cromatográficos nomeadamente o tipo de fase estacionária, o programa de temperaturas do forno e até mesmo o fluxo do gás de arraste pode ser otimizado de acordo com o tipo de analito. Como as propriedades diferem de analito para analito as condições cromatográficas deverão ser as melhores para a maioria dos mesmos. [38,39]

O cromatógrafo de fase gasosa é composto por: cilindro de gás de arraste, regulador de pressão, forno termostaticado, injector de amostra, coluna, detector, medidor de fluxo e registador.

A Figura 1.4 mostra precisamente a ordem e a constituição dos elementos que constituem um cromatógrafo gasoso.

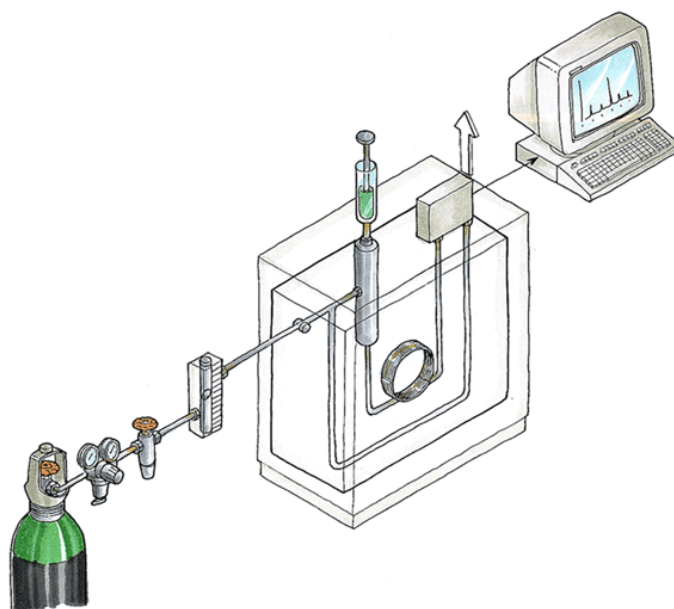


Figura 1. 4 Esquema de um equipamento de cromatografia gasosa

O gás usado no transporte é escolhido tendo em conta o tipo detector. A amostra é introduzida no equipamento, arrastada com a ajuda do gás de arraste, ao atravessar a coluna os seus componentes são separados. O gás é analisado por um detector cujo sinal de saída é dado pelo registador.

1.6.2.1 Injectores de amostra

A amostra pode ser inserida através de um septo, uma válvula directamente no topo da coluna, ou também poderá ser numa câmara de injeção que seja atravessada pelo gás de

arraste e aquecida a uma temperatura superior ao ponto de ebulição do composto menos volátil da amostra o que promove uma vaporização instantânea e segue depois para a coluna. ^[38,39]

Pode, no entanto, ser adaptado um injector automático que é programado e que permite o controlo tanto do volume de amostra como da amostra a injectar. Este possui uma agulha que injecta a quantidade pretendida e no meio de injeções efectua limpezas que eliminam, ou ajudam a eliminar, possíveis contaminações.

1.6.2.2 Colunas

As colunas podem ser de empacotamento ou capilares. As colunas de empacotamento podem ser de metal (aço, cobre, alumínio) ou vidro. As colunas capilares são normalmente de sílica e permitem um comprimento médio de 30 m aumentando a resolução da análise.

1.6.2.3 Fases estacionárias

A fase estacionária poderá variar de acordo com a polaridade e selectividade da fase líquida. À temperatura de operação a fase líquida deve apresentar uma tensão de vapor relativamente baixa mas no entanto são usualmente usados líquidos de elevados pontos de ebulição. ^[38,39]

1.6.2.4 Detectores

Os diferentes tipos de detectores podem ser classificados segundo quatro critérios: gerais ou selectivos, diferenciais ou integrais (cumulativos), destrutivos ou não destrutivos e sensíveis à concentração ou à massa.

Um detector geralmente mede uma propriedade física global do efluente da coluna enquanto um selectivo mede apenas uma propriedade específica da coluna. ^[38,39]

A diferença entre um detector destrutivo e um não destrutivo está no facto que no primeiro a detecção ser acompanhada de modificações irreversíveis enquanto no outro isso não ocorre.

No caso de detectores sensíveis à concentração ou apenas à massa, a diferença está em que o primeiro responde à concentração da substância detectada no efluente enquanto o outro responde ao total de substâncias detectadas e/ou a velocidade de introdução desta no elemento sensível.

Um dos detectores mais importantes no que diz respeito à identificação de compostos é a espectrometria de massa. ^[38,39]

Esta técnica, que pode ser também chamada de espectrofotometria de pesos moleculares, é sem dúvida a técnica cromatográfica que ocupa um lugar de prestígio a nível de detecção de compostos, visto possuir uma boa sensibilidade e limites de detecção impressionáveis para um sem número de aplicações. Esta técnica de determinação de pesos moleculares é designada por espectrofotometria de massa ou de peso molecular. ^[38,39]

No funcionamento de um detector de massa a primeira etapa que ocorre é a produção de iões do composto em fase gasosa em que o ião produzido vem a sofrer várias fragmentações. Os iões que poderão ser produzidos têm diferentes propriedades químicas e podem também sofrer fragmentações consecutivas. A separação no detector ocorrerá pela razão de massa/carga sendo em proporção a sua abundância. ^[38,39]

Para o funcionamento de um espectrofotómetro de massa as condições obrigam a que este funcione sob um elevado vácuo permitindo assim, que os iões atinjam o detector sem que ocorram colisões com outros gases que possam estar presentes e que poderiam provocar um desvio da trajectória dos mesmos.

1.6.2.5 Detector de espectrometria de massas.

Os detectores de espectrometria de massa podem ser quadropólos, analisadores por tempo de voo ou de armadilha de iões (“ion trap” do inglês), entre outros.

Na armadilha de iões, os iões ficam retidos numa armadilha e são libertos de acordo com a sua massa, o que vira a traduzir-se num espectro de massas. Uma vez que os iões se repelem entre si quando se encontram na armadilha, isto traduz-se numa expansão das trajectórias descritas pelos iões ao longo do tempo. Para que as trajectórias não sejam demasiadamente extensas os iões permanecem na armadilha, na presença de hélio a uma pressão suficiente para que seja retirado o excesso de energia dos mesmos. Depois de libertos da armadilha os iões alcançam o detector onde este irá responder com um sinal mensurável. ^[38,39] De certa forma, a armadilha de iões é assim chamada porque actua como um filtro de massas, capturando os iões por períodos de tempo relativamente longos. Após captura é produzido um espectro de massas convencional. A armadilha ou captura de iões consiste geralmente em três eléctrodos, um eléctrodo anel com uma superfície hiperbólica interior e dois eléctrodos “endcap” com superfície hiperbólica em cada extremidade. ^[38,39]

A armadilha de iões é por vezes considerada com uma variante do espectrofotómetro quádruplo já que a aparência e funcionamento dos dois estão relacionados. No entanto a armadilha de iões é potencialmente muito mais versátil e tem sem dúvida melhor potencial de desenvolvimento. ^[38,39]

O eléctrodo de anel é operado com um campo sinusoidal de frequência de rádio enquanto os outros são operados de diferentes formas podendo ser com potencial de terra ou com qualquer tensão DC ou AC. ^[38,39]

O resultado deste detector é um espectro de massa, isto é, temos a informação da razão massa/carga dos iões obtidos na fragmentação do nosso analito. Podemos posteriormente comparar esse espectro dentro de bibliotecas de espectros para identificação do nosso analito.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Reagentes e consumíveis

Na preparação das soluções foi usado metanol e n-hexano da Merck com um grau de pureza de 99,9%. A água usada foi água ultrapura retirada de um sistema Simplicity 185 Mili Q da marca Millipore cuja resistividade apresentava um valor de 18,2 M Ω .cm.

A fibra usada, de 100 μ m de PDMS, e o suporte (“holder” manual) usado para a fibra foram adquiridos à Supelco®.

Os viais de vidro usados tinham uma capacidade de 20 mL.

O cloreto de sódio (NaCl) usado era da marca Panreac e de pureza 99,5%.

Os pesticidas usados na preparação das soluções e as respectivas marcas estão descritos na Tabela 2.1.

Tabela 2.1 Pesticidas utilizados, marca, grau de pureza

Pesticida	Marca	Grau de Pureza (%)
2,4-D	Pestanal Fluka	98,6
Alacloro	Pestanal Riedel-de Haën	99,9
Aldrina	Pestanal Fluka	95,8
Atrazina	Dr. Ehrenstorfer Gmbh	99,0
Bifentrina	ChemService	98,0
Cipermetrina	Pestanal Riedel-de Haën	99,6
DDD	Supelco	98,0
DDE	ChemService	99,5
DDT	Supelco	98,8
Deltametrina	Pestanal Riedel-de Haën	99,9
Diazinão	Pestanal Riedel-de Haën	99,0
Dieldrina	Pestanal Fluka	97,9
α-Endossulfão	Supelco
β-Endossulfão	Supelco
Endrina	Singma Aldrich	99,1
Fenvalerato	Pestanal Riedel-de Haën	99,0
HCH	Pestanal Riedel-de Haën	99,8
Hexaclorobenzeno	Sigma Aldrin	99,0
Iprodiona	Pestanal Riedel-de Haën	99,9
Malatião	Pestanal Riedel-de Haën	97,3
Metoxicloro	Supelco	98,7
Simazina	Pestanal Fluka	99
Vinclozolin	Pestanal Fluka	99,5

2.2 Equipamentos

As análises cromatográficas foram realizadas num equipamento de cromatografia gasosa GC-MS da Thermo GC Ultra equipado com um detector MS Polaris Q e um injector automático (Figura 2.2). A separação cromatográfica foi realizada numa coluna Zebron ZB-ZLB (30m x 0,25 mm x 0,25 μ m) em que o Hélio a 1 mL/ min foi o gás de arraste.

O agitador usado foi um Multistirred 15 da Velp Scientifica.

Balança utilizada é da marca Metter Toledo com a precisão de 0,00001 g

Para homogeneizar as soluções foi usado um Vortex de marca Nahita 681/5 e o para a determinação de pH foi usado pH Meter GLP 22.



Figura 2. 1 Cromatógrafo GC-MS da Thermo usado na realização do trabalho

2.3 Preparação de soluções padrão

As soluções padrão de cada pesticida foram preparadas por pesagem rigorosa de cada um e de acordo com a sua solubilidade, diluídas em metanol ou n-hexano (Anexo A1)

A partir das soluções padrão foram feitas duas soluções mãe, uma em n-hexano com 18 pesticidas e outra em metanol com 5 pesticidas, de concentração 10 mg/L. A partir das soluções mãe de 10 mg/L foram feitas diluições de 1 μ g/L, 50 μ g/L e 1000 μ g/L. Nas medições de volume foram usadas micropipetas com capacidade de 10 μ L, 20 μ L, 100 μ L e 5000 μ L da marca Gilson e Eppendorf.

Para a recta de calibração foram preparadas 10 soluções padrão de concentração 0,01; 0,05; 0,1; 0,2; 0,3; 0,5; 1; 3; 5 e 10 μ g/L, as primeiras 4 soluções foram preparadas a partir da solução diluída de 1 μ g/L, e as restantes da solução diluída de 50 μ g/L.

A solução diluída de 1000 µg/L foi utilizada para a realização dos testes de optimização da fibra.

2.4 Amostragem e preparação de amostra

Os rios analisados foram os seguintes: Rio Douro, Rio Lima, Rio Leça, Rio Cávado, Ria de Aveiro, Rio Minho, Rio Tâmega, Rio Sousa e Rio Águeda.

Na recolha de amostra, quando não foi possível recolher uma amostra no centro do rio, recolheu-se das duas margens. Os dados referentes aos locais escolhidos para a recolha das amostras nomeadamente; temperatura no momento da colheita e datas de amostragem encontram-se na Tabela 2.2.

As amostras foram recolhidas em frascos de vidro de 1 L aos quais se adicionou 10 µL de ácido acético glacial. As amostras foram mantidas a -20°C até à sua análise.

Tabela 2.2 Locais da recolha da água e temperaturas

Designação da amostra	Local de recolha	Data de recolha	Temperatura da água (°C)
Ria de Aveiro Norte	Lat:40°38'48.12"N; Long:8°44'58.73"W	27/06/2010	26
Ria de Aveiro Sul	Lat:40°38'27.22"N; Long:8°45'0.72"W	27/06/2010	26
Rio Minho Norte	Lat:41°56'28.09"N; Long:8°45'2.65"W	05/06/2010	25
Rio Minho Sul	Lat:41°56'30.96"N; Long:8°44'44.40"W	05/06/2010	25
Rio Douro Norte	Lat:41°08'42.40"N; Long:8°38'42.77"W	27/07/2010	26
Rio Lima Norte	Lat:41°42'1.88"N; Long:8°44'49.48"W	13/06/2010	27
Rio Lima Sul	Lat:41°41'57.37"N; Long:8°44'36.55"W	13/06/2010	27
Rio Sousa	Lat:41°05'26.77"N; Long:8°30'39.77"W	13/06/2010	27
Rio Águeda	Lat:40°36'31.43"N; Long:8°31'47.34"W	27/06/2010	26
Rio Tâmega	Lat:41°16'8.87"N; Long:8°4'36.12"W	27/06/2010	26
Rio Leça Norte	Lat:41°12'52.23"N; Long:8°40'5.23"W	07/07/2010	25
Rio Leça Sul	Lat:41°12'52.04"N; Long:8°40'5.10"W	07/07/2010	25
Rio Cávado Norte	Lat:41°31'2.38"N; Long:8°46'17.91"W	11/07/2010	25
Rio Cávado Sul	Lat:41°30'54.69"N; Long:8°46'29.12"W	11/07/2010	25

Na Figura 2.2 estão assinalados os locais de amostragem para uma melhor percepção



Figura 2. 2 Mapa representativo dos locais de colheita de amostras

2.5 Procedimento analítico

A técnica analítica utilizada neste trabalho foi SPME seguida de GC-MS.

2.5.1 Procedimento de extracção

Antes do início do trabalho as fibras utilizadas foram condicionadas a 250°C em corrente de hélio durante uma hora no injector do GC-MS, conforme recomendações do fabricante (Supelco®).

O volume de amostra escolhido para a extracção foi de 10 mL e os vials foram colocados numa placa de agitação (Figura 2.3). Durante a etapa de extracção movimentava-se a fibra sempre que apareciam algumas bolhas de ar à sua superfície.

A Figura 2.4 ilustra a etapa de adsorção da fibra e posterior dessorção da mesma.

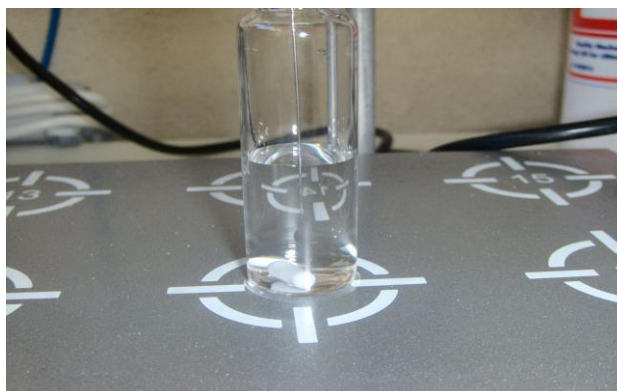


Figura 2.3- Fibra de PDMS na etapa de adsorção

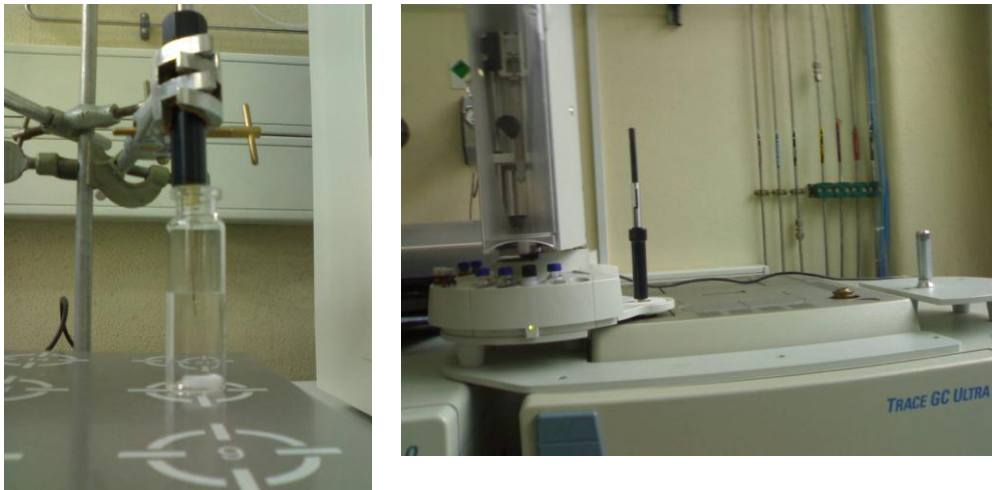


Figura 2.4- Adsorção dos analitos na fibra e posterior dessorção no equipamento

2.5.1.1 Optimização dos parâmetros

Foram preparados vials com o volume de 10 mL e concentração 500 µg/L para o estudo da optimização do método. Para tal evaporou-se em corrente de azoto à temperatura ambiente o solvente orgânico (n-hexano ou metanol) onde tinham sido preparados os padrões de pesticidas. Adicionou-se 10 mL de água ultrapura, e colocou-se em agitação onde foi testado a quantidade de metanol usada, o tempo de adsorção da fibra, a temperatura de dessorção e a quantidade de NaCl.

A temperatura de extracção utilizada em todos os ensaios foi de 20°C. Para obter melhor performance da fibra foi necessário conhecer as condições para as quais esta funciona da melhor forma e se obtêm melhores resultados. Mantendo os restantes parâmetros constantes apenas se fez variar uma.

Nos estudos de optimização dos parâmetros da fibra foram realizados ensaios em triplicado.

Os tempos de adsorção testados foram: 15 min, 30 min, 45 min e 60 min. Valores estes que foram estudados mantendo constante os restantes parâmetros constantes (500 µg/L, 0,2% NaCl, temperatura de dessorção de 270°C, 5% de metanol)

Testou-se a quantidade de NaCl com 0; 0,05; 0,1; 0,2 % em cada vial. Avaliou-se de modo idêntico a percentagem de metanol (0; 2,5; 5 e 7,5 %) e a temperatura de injectora (250, 260 e 270 °C) mantendo-se sempre os restantes parâmetros constantes.

2.5.1.2 Obtenção das curvas de calibração

Após a optimização da fibra foi efectuada a calibração mantendo constante os parâmetros de 2,5% metanol, 0% de NaCl, a temperatura de injector de 260°C e o tempo de exposição de 45 minutos.

As fibras usadas ficaram no injector todo o tempo da corrida cromatográfica para evitar que ficassem retidos nas fibras alguns compostos, evitando então o efeito de memória.

As amostras de água de rios foram analisadas nas mesmas condições que os padrões da curva de calibração.

2.5.2 Análise cromatográfica

Inicialmente foram injectados os pesticidas individualmente e identificados os seus tempos de retenção (Tr). Após determinação dos respectivos Tr todas as determinações foram analisadas em modo “selected reaction monitoring” (SRM).

A temperatura foi programada, sendo inicialmente de 60°C durante 1 min e aumentando de 20°C/min até aos 200°C onde se manteve por 1 min com posterior aumento de 5°C/min até aos 245°C onde se manteve por 40 min. A injeção foi em modo split/splitless. Os pesticidas foram distribuídos de acordo com o seu tempo de retenção em segmentos e apresentam os seguintes segmentos, de acordo com a Tabela 2.3.

Tabela 2.3 Segmentos usados e respectivos intervalos de tempo e iões de quantificação pesquisados

Segmento	Intervalo de tempo	Iões de quantificação
1	06,00-10,00	179, 137, 152, 199, 304
2	10,00-10,37	142, 249, 284, 290, 44,201, 186, 58, 200, 215
3	10,37-11,55	109, 181, 219
4	11,55-11,80	124, 178, 187, 198, 212, 285, 220, 175, 162
5	11,80-12,00	45, 146, 160, 188
6	12,00-12,35	109, 181, 219
7	12,35-12,66	93, 125, 127, 158, 173
8	12,66-15,00	66, 263, 293
9	15,00-15,60	195, 241, 339
10	15,60-17,05	176, 246, 318, 79, 263, 277, 81, 263, 281
11	17,05-17,40	165, 235, 354
12	17,40-19,70	165, 195, 199, 209, 235, 241
13	19,70-20,60	165, 166, 181
14	20,60-28,95	187, 189, 227, 244, 246, 314
15	28,95-39,00	77, 91, 127, 163, 181, 209, 415
16	39,00-51,00	419, 225, 167, 125
17	51,00	253, 181, 93, 172, 208

A temperatura à qual se encontrava o detector era de 250 °C e o injector operava em splitless com surge a 260 °C. O split time foi de 2 min na coluna o fluxo 1,00 mL/ min com uma velocidade linear de 50 mL/ min.

Para cada cromatograma obtido foram pesquisados os pesticidas usando os seus iões de quantificação nos seus tempos de retenção e depois, após integração, obteve-se a área para cada composto.

2.6 Preparação das amostras

Para cada amostra de rio e conforme a optimização da fibra foi medido 250 µL de metanol, colocado num vial e adicionou-se 20 µL de 2,4-D como pesticida que funcionaria como padrão interno. Completou-se o volume de 10 mL com a água do rio correspondente e com

o auxílio de um agitador colocou-se a adsorver a fibra durante o tempo para o qual esta foi otimizada. A concentração deste padrão interno foi de 1 µg/L.

3. DISCUSSÃO E RESULTADOS

3.1 Análise cromatográfica

Consultou-se a biblioteca Niest para obter os iões mais abundantes de cada pesticida. No entanto apenas se pesquisou alguns iões para cada pesticida. Na Tabela 3.1 encontra-se representado os tempos de retenção e dos iões obtidos da Niest, os iões pesquisados para cada pesticida.

Tabela 3.1 Pesticidas, seus iões de quantificação e tempos de retenção

Pesticida	RT	Ião de quantificação	Iões de identificação
Diazinão	9,3	179	199, 304, 137, 152
α-HCH	9,08	181	219, 109
HCB	10,16	284	142, 249, 290
Simazina	10,21	44	201, 186
Atrazina	10,21	200	58, 68, 215
β-HCH	10,45	181	109, 219
Lindano	11,55	181	109, 219
Vinclozolin	11,57	212	124, 178, 187, 198, 285
δ-HCH	12,12	181	109, 219
2,4-D	11,61	162	175, 220
Alacloro	11,95	45	146, 160, 188
Malatião	12,62	125	93, 127, 158, 173
Aldrina	12,97	66	263, 293
β-endossulfão	15,47	241	195, 339
p,p'-DDE	15,66	246	176, 318
Dieldrina	15,83	79	263, 277
Endrina	16,92	81	263, 281
o,p'-DDT	17,11	235	165, 354
p,p'-DDD	17,70	235	165, 199
α-endossulfão	17,31	241	195, 209
Bifentrina	19,84	181	165, 166
Metoxicloro	20,44	227	237, 36, 114, 141
Iprodiona	20,34	187	189, 244, 246, 314
Cipermetrina	32,20	163	77, 91, 127, 181, 209, 415
Fenvalerato	40,30	125	167, 225, 419
Deltametrina	52,30	253	93, 172, 181, 208

3.2 Optimização da fibra

3.2.1 Efeito da concentração salina

O efeito da quantidade de sal é importante pois este pode influenciar a eficiência de extracção dos analitos presentes na matriz. É muito importante que este valor seja optimizado para evitar um uso excessivo de NaCl o que iria conduzir a uma diminuição dos coeficientes de actividade de alguns compostos mais sensíveis.

As quantidades de sal testado foram: 0; 0,05; 0,1 e 0,2 % de NaCl.

Para tal mantiveram-se constantes as outras variáveis com os valores de 0,5% de metanol, 45 min de tempo de exposição e temperatura do injectador de 260°C.

Para cada quantidade de sal foram feitas duas injeções, e foi usado o valor médio das áreas obtidas para a realização de um gráfico em que seja perceptível qual a melhor quantidade de sal.

Os valores médios de áreas encontram-se representados no gráfico da Figura 3.1.

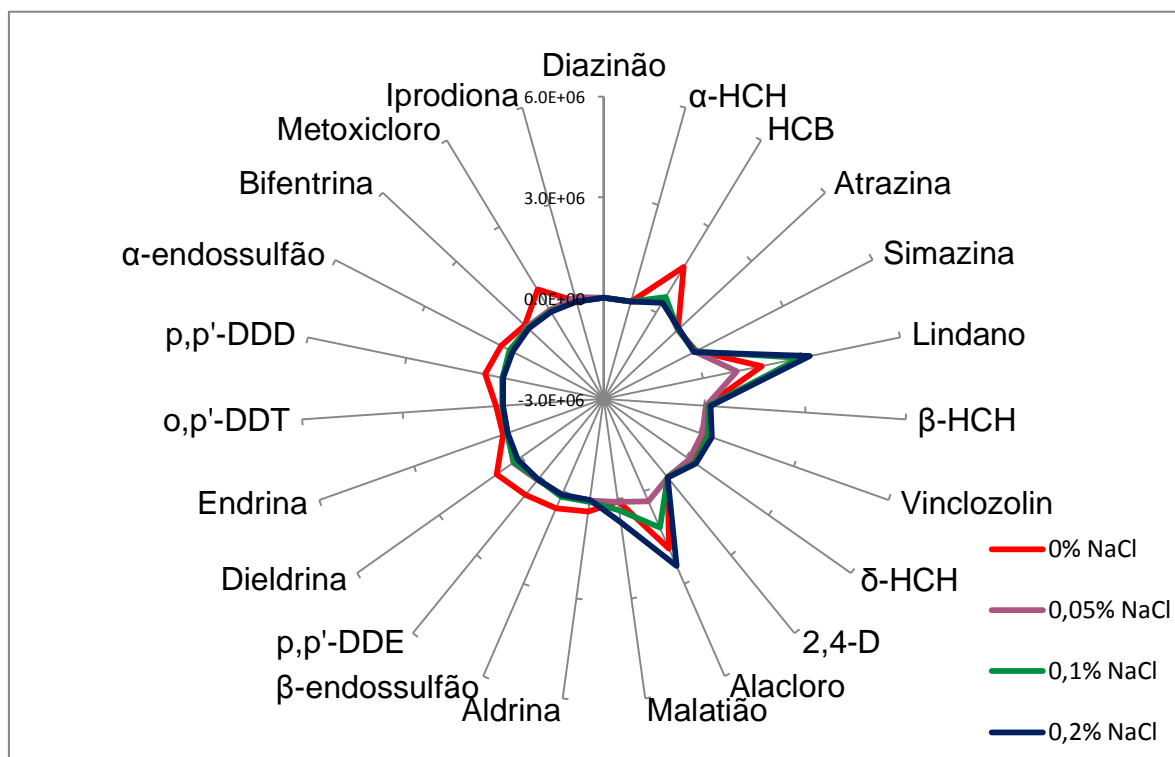


Figura 3. 1 Representação das áreas médias obtidas dos pesticidas em estudo com a variação da quantidade de cloreto de sódio adicionada à amostra

O critério usado para a escolha da quantidade de sal é a comparação das áreas, logo mediante a análise do gráfico pode-se constatar que para a maioria dos pesticidas as quantidades de NaCl para as quais se obtém melhores áreas são as realizadas com 0,2 % de NaCl e a ausência do mesmo. Por questões económicas e como se encontram quase em igualdade optou-se pela ausência de sal o que se traduz em maior facilidade do método. Para alguns pesticidas o efeito da concentração salina nem sempre é vantajoso como é o caso do HCB e do metoxicloro.

O facto de se ter optado pela ausência de sal não é de estranhar visto que este factor não ajuda muito no caso de analitos pouco solúveis na matriz em análise. A adição de um sal à amostra é preferivelmente usada quando a extracção ocorre em “headspace” uma vez que o sal poderá conferir danos no revestimento da fibra polimérica.

3.2.2 Efeito da temperatura

Para o estudo do efeito da temperatura do injectador, teve-se em conta que esta deverá ser suficiente para que todos os analitos presentes na fibra desorvam não sendo superior às temperaturas de operação da fibra. Neste estudo manteve-se constante as condições de operação de 2,5 % de metanol, tempo de exposição de 45 minutos e 0,2 % de sal.

O gráfico da Figura 3.2 que representa os resultados obtidos com as três temperaturas estudadas para a desorção dos analitos.

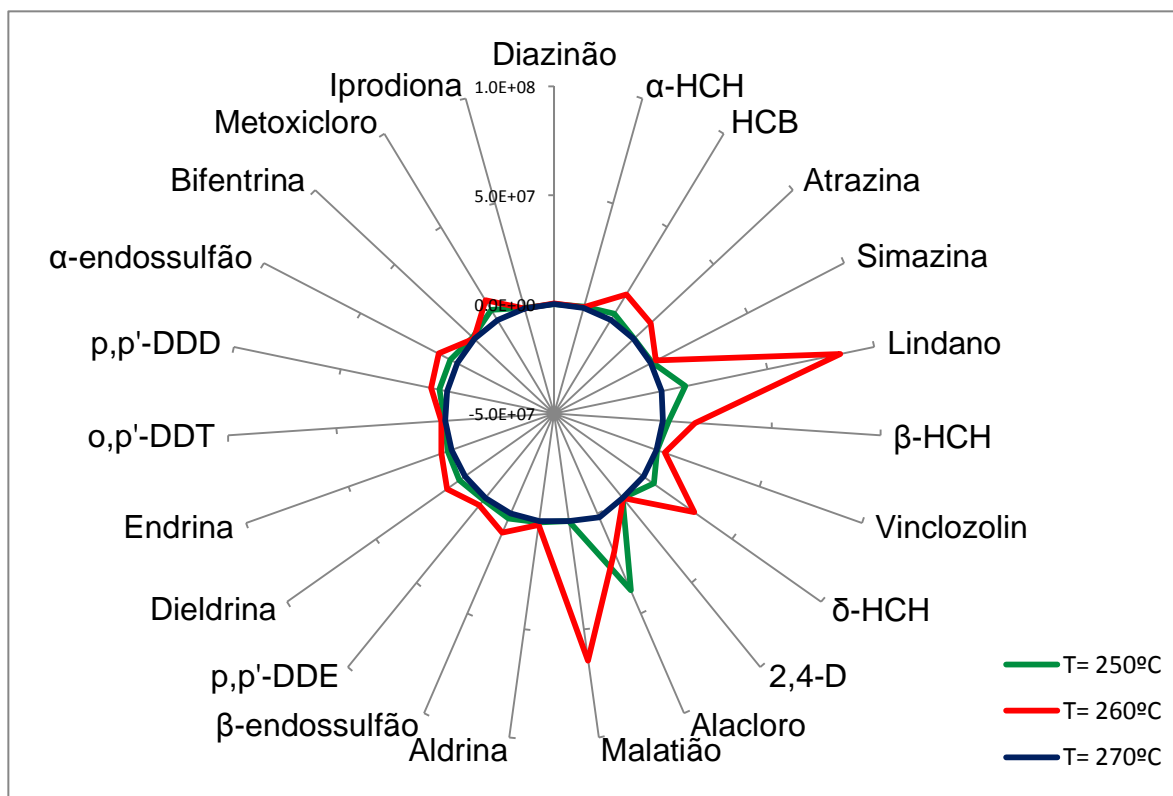


Figura 3. 2 Representação das áreas médias obtidas dos pesticidas em estudo com a variação da temperatura do injector

Pela análise do gráfico pode-se constatar que a temperatura que favorece a dessorção dos pesticidas globalmente na fibra é a de 260°C. Foi então a esta temperatura que a limpeza da fibra e a dessorção dos analitos foram executadas. O condicionamento da fibra não requer esta temperatura, ele foi realizado durante 30 minutos a uma temperatura de 250°C de acordo com o manual fornecido pelo fabricante, Supelco®.

3.2.3 Efeito da quantidade de metanol

A quantidade de metanol pode interferir com a capacidade de absorção da fibra e também minimizar a adsorção dos pesticidas ao material de vidro. Os valores usados nesta determinação foram de 0; 2,5; 5 e 7,5 % de metanol. Para tal, foram feitos dois ensaios para cada quantidade mantendo as restantes condições constantes (0,2 % de NaCl, temperatura do injector de 260°C e tempo de exposição de 45 min).

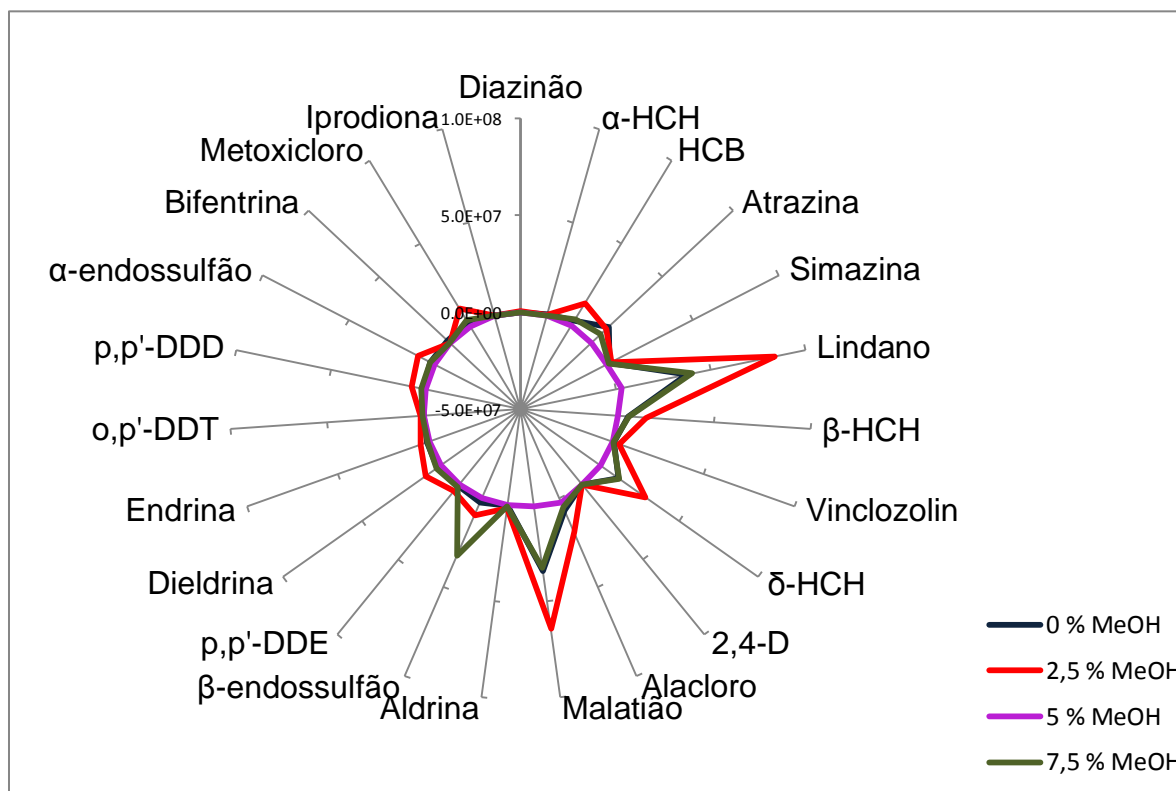


Figura 3.3 Representação das áreas médias obtidas dos pesticidas em estudo com a variação da quantidade de metanol adicionado

Verificou-se que a 5% de metanol as áreas obtidas para cada pesticida são notoriamente pequenas enquanto para 2,5 % de metanol se encontra áreas bastante elevadas quando comparadas com as restantes. Entre a percentagem de 0 e 7,5 % pouca alteração é visível. A quantidade escolhida foi sem dúvida a de 2,5 % metanol.

3.2.4 Efeito do tempo de exposição

O tempo de exposição da fibra à solução é sem dúvida um dos factores mais importantes. É imprescindível que a fibra fique em contacto com os analitos um período de tempo suficiente para que se atinja o equilíbrio entre as duas fases. No entanto esse tempo poderá ser de muitos minutos ou até horas. Os intervalos de tempos testados neste trabalho foram aqueles que a bibliografia sugeria como sendo os tempos necessários para a extracção dos analitos, 15 minutos, 30 minutos, 45 minutos e 60 minutos. Pela análise da Figura 3.4 pode-se constatar que para o tempo de 45 minutos as áreas eram superiores as restantes obtidas para a maioria dos pesticidas e restantes tempos de exposição.

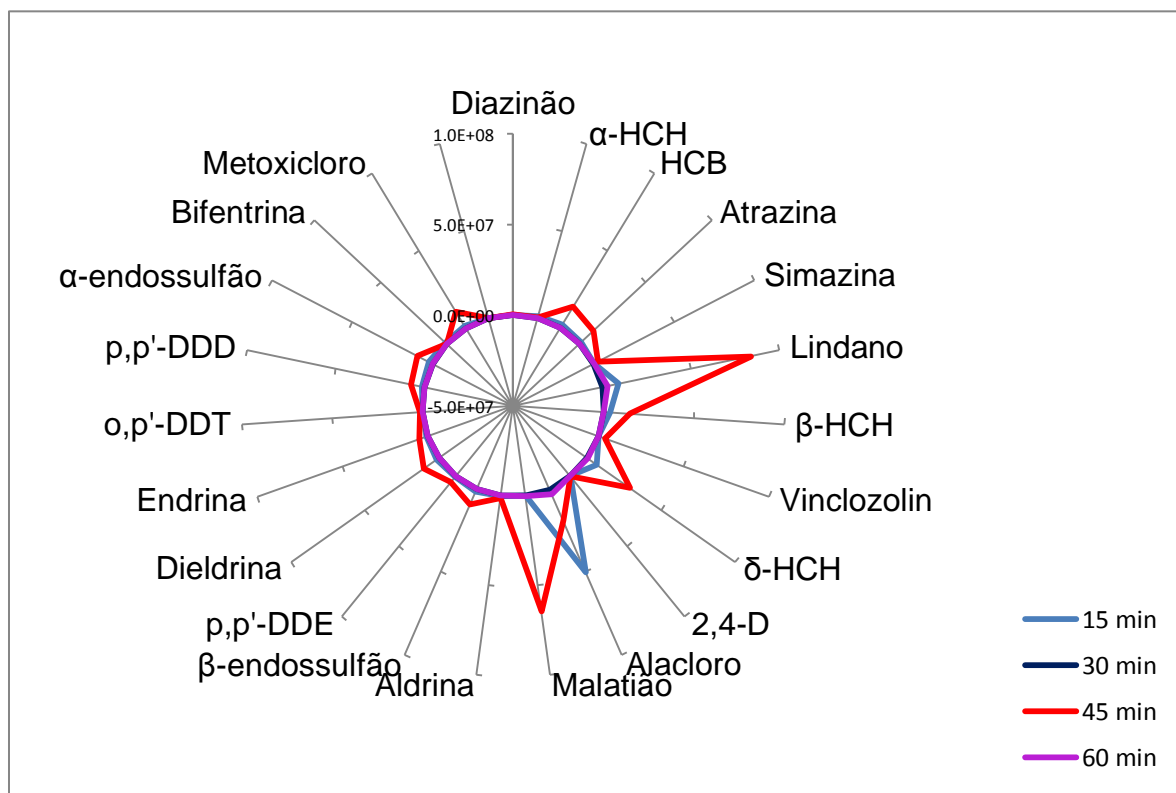


Figura 3. 4 Representação das áreas médias obtidas dos pesticidas em estudo com a variação do tempo de exposição

3.2.5 Efeito do pH

Fizeram-se vários estudos com água desionizada com estes pesticidas mas sem ajuste de pH, em que a falta de reprodutibilidade nalguns pesticidas era notória. Posteriormente repetiram-se esses ensaios com pH ajustado a 3.5 e a reprodutibilidade melhorou.

3.3 Curvas de calibração

No decorrer deste trabalho observou-se em inúmeras injeções que a fibra não respondia, voltando a ter uma resposta adequada no dia seguinte.

Na calibração foram preparadas as soluções com as concentrações de 0,01; 0,05; 0,1; 0,2; 0,3; 0,5; 1; 3; 5 e 10 µg/L a partir da solução mãe e suas diluições. Na Figura 3.5 está representado um cromatograma obtido com a concentração de 0,05 µg/L de cada pesticida.

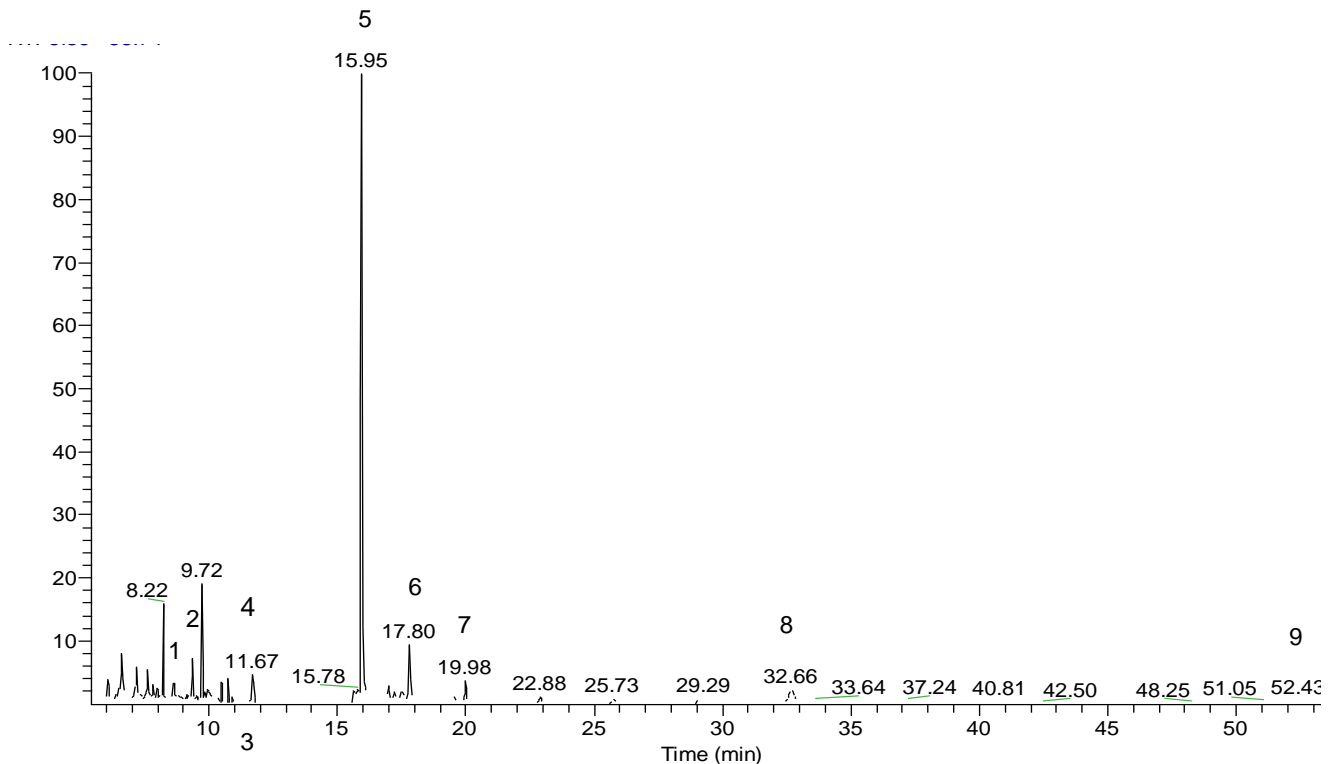


Figura 3. 5Cromatograma obtido em modo SRM para a concentração de 0,05 µg/L de cada pesticida.

Sendo que 1- α-HCH; 2- diazinão; 3- simazina/atrazina; 4- 2,4-D; 5-dieldrina; 6- p,p'-DDD; 7- bifentrina; 8- cipermetrina e 9- deltametrina.

Para cada concentração foram feitas três injeções e foi usado o valor médio destas ou então um dos valores de concentração para a obtenção da recta de calibração. Os valores do declive (m), ordenada na origem (b) e também o R^2 encontram-se representados na Tabela 3.2.

Durante o período em que se realizou este trabalho, a coluna cromatográfica foi perdendo a capacidade de resolução de alguns analitos. Por isso para a triazina e a simazina não foi possível a sua separação cromatográfica assim como o o,p'-DDT e o p,p'-DDD que tendem a ter T_r cada vez mais próximos.

Os limites de detecção (LOD) e limites de quantificação (LOQ) foram determinados a partir da razão sinal/ruído (S/N) fornecido pelo programa Xcalibur num cromatograma em que cada pesticida tinha uma concentração de 0,05 µg/L.

No caso da cipermetrina, bifentrina, endrina e alacloro, estes foram bastante complicados de se obter uma boa linearidade uma vez que a fibra para além de não dar resultados muito reprodutíveis também se mostrou bastante inconstante para estes pesticidas em questão.

Tabela 3.2 Valores obtidos de declive e ordenada na origem para cada recta de calibração, razão sinal ruído e limites de detecção e quantificação obtidos pela razão sinal/ruído

Pesticida	Gama de concentrações (µg/L)	m	b	R ²	SN*	LOD (µg/L)	LOQ (µg/L)
Diazinão	0,2-5	3126,8	12734	0,9996	6534	2,30E-05	7,65E-05
α-HCH	0,01-1	25075	7833,4	0,999	1004	1,49E-04	4,98E-04
HCB	0,2-10	2567,8	6981,1	0,9955	58	2,59E-03	8,62E-03
Atrazina/simazina	0,05-5	2211,9	12717	0,9951	79	1,90E-03	6,33E-03
β-HCH	0,05-5	3529,3	13499	0,9973	50	3,00E-03	1,00E-02
Lindane	0,01-5	3205,2	4394,8	0,9997	253	5,93E-04	1,98E-03
vinclozolina	0,01-5	3294,2	14525	0,9976	111	1,35E-03	4,50E-03
δ-HCH	0,01-5	662,81	4462,8	0,9968	1178	1,27E-04	4,24E-04
2,4-D	0,3-10	16362	22554	0,9968	4120	3,64E-05	1,21E-04
Alacloro	0,05-5	167,63	1843,2	0,9985	414	3,62E-04	1,21E-03
Malatião	0,3-5	477,87	3746	0,9851	47	3,19E-03	1,06E-02
Aldrina	0,2-5	501,76	2545,9	0,9979	21	7,14E-03	2,38E-02
β-endossulfão	0,01-5	14923	23853	0,9997	38	3,95E-03	1,32E-02
p,p'-DDE	0,1-5	44761	278261	0,9986	165	9,09E-04	3,03E-03
Dieldrina	0,2-5	10126	31380	0,9978	21	7,14E-03	2,38E-02
Endrina	0,2-5	4595	27946	0,9492	188	7,98E-04	2,66E-03
o,p'-DDT	0,05-5	81600	10175	0,9923	110	1,36E-03	4,55E-03
p,p'-DDD	0,01-1	6815,9	8864,7	0,9958	73	2,05E-03	6,85E-03
α-endossulfão	0,01-5	10923	18455	0,9964	206	7,28E-04	2,43E-03
Bifentrina	0,01-5	2659,2	34692	0,9612	247	6,07E-04	2,02E-03
Metoxicloro	0,1-5	143202	93322	0,9997	65	2,31E-03	7,69E-03
Iprodiona	0,01-5	740,06	3967,5	0,9939	21	7,14E-03	2,38E-02
Cipermetrina	0,2-5	2784,1	9467,2	0,9813	133	1,13E-03	3,76E-03
Fenvalerato	0,01-5	2159,6	6193,4	0,9964	32	4,69E-03	1,56E-02
Deltametrina	0,01-10	7472,8	11799	0,9992	20	7,50E-03	2,50E-02

* Obtido do cromatograma com uma concentração de 0,05 µg/L de cada pesticida

3.4. Pesticidas nas águas dos rios da região Norte Portugal

Relativamente à análise das águas dos rios foram efectuadas colheitas em ambas as margens. Através do programa do Xcalibur foi efectuada uma pesquisa dos pesticidas usando para tal os seus iões de identificação e quantificação. Para o reconhecimento do pesticida foi comparado o espectro de massa obtido com o obtido por um padrão. Os cromatogramas apresentados foram obtidos em modo SRM em que a pesquisa dos pesticidas também foi efectuada em modo SRM.

Durante a realização destas análises, e atendendo provavelmente a um efeito matriz não foi possível separar cromatograficamente a simazina da atrazina. Como estas triazinas têm iões de quantificação comuns e o mesmo tempo de retenção os resultados foram apresentados como simazina/atrazina. Como se pode verificar pela tabela 3.1 a atrazina e a simazina saem em conjunto no mesmo tempo de retenção.

Nesta fase do trabalho verificou-se uma falta de reprodutibilidade com variações de cerca de 80%. Esta situação não melhorou com a utilização de um novo conjunto de fibras. Por isso não apresentamos aqui os valores da concentração de pesticidas dos rios da região Norte. No entanto, a sua detecção por GC-MS comprova por si só a sua presença nestas águas de superfície.

Devido à falta de reprodutibilidade obtida durante a realização deste trabalho não se apresentam os valores de concentrações obtidas nas amostras. Qualquer concentração apresentada estaria envolvida um desvio de tal forma elevado que a sua apresentação não teria sentido. No entanto a sua presença quando detectada por esta metodologia é indiscutível, porque foi garantida a limpeza da fibra entre as amostras.

3.4.1 Rio Tâmega

O rio Tâmega é um rio internacional, que desagua em Entre-os-Rios no Rio Douro. Neste rio, foram pesquisados todos os pesticidas atrás referidos e foram detectados por espectrometria de massa os seguintes: diazinão, HCB, α -HCH, β -HCH, Lindano, δ -HCH, fenvalerato, 2,4-D, alacloro, malatião, dieldrina, aldrina, bifentrina, p,p'-DDE, simazina/atrazina, vinclozolina e metoxicloro.

De acordo com o Ministério da Agricultura, do Desenvolvimento Rural e das Pescas são pesticidas a pesquisar na Região de Amarante nas águas destinadas para consumo humano o 2,4-D, o alacloro e a atrazina. Esta é uma região vinícola e demais culturas de variadas espécies, onde a presença de um elevado número de pesticidas seria de esperar.

Para os resultados das análises da água deste rio apresenta-se um cromatograma em modo SRM e respectiva pesquisa dos iões de identificação e quantificação para o pesticida alacloro. Apresenta-se também o espectro de massas do respectivo pesticida onde é de fácil visualização os iões de identificação e de quantificação.

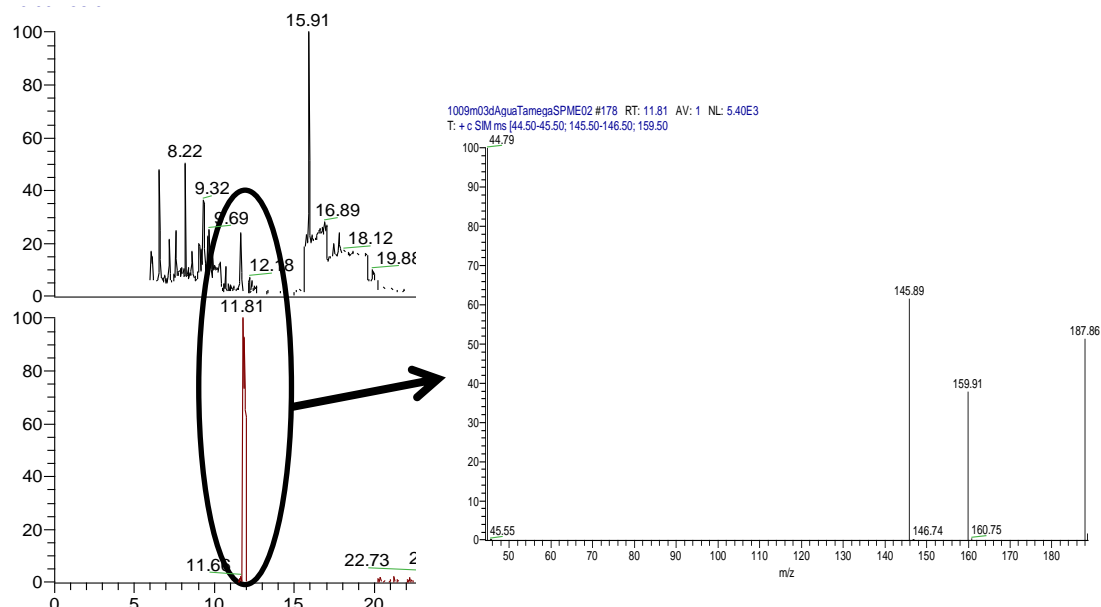


Figura 3.6 Pico cromatográfico em SIM e espectro de massas obtido na pesquisa do alacloro na água do rio Tâmega

Como se pode ver pelo espectro obtido o pico que sai aos 11,81 min é o alacloro uma vez que quando comparado o espectro de massas obtido com o do padrão, estes apresentam o mesmo comportamento em que o ião mais abundante é o 45, ião de quantificação do alacloro.

3.4.2 Rio Douro

O rio Douro é o segundo rio mais extenso da Península Ibérica. Atravessa extensas zonas agrícolas e, como tal, seria de esperar a detecção de pesticidas. De acordo com o Ministério da Agricultura, do Desenvolvimento Rural e das Pescas os compostos que se poderiam encontrar neste rio seria o 2,4-D, o alacloro e a atrazina. Os pesticidas encontrados foram: o HCB, Simazina/atrazina, vinclozolina, 2,4-D, malatião, aldrina, metoxicloro, fenvalerato e deltametrina.

Na Figura 3.7 representa-se um exemplo da pesquisa de um pesticida nomeadamente o malatião.

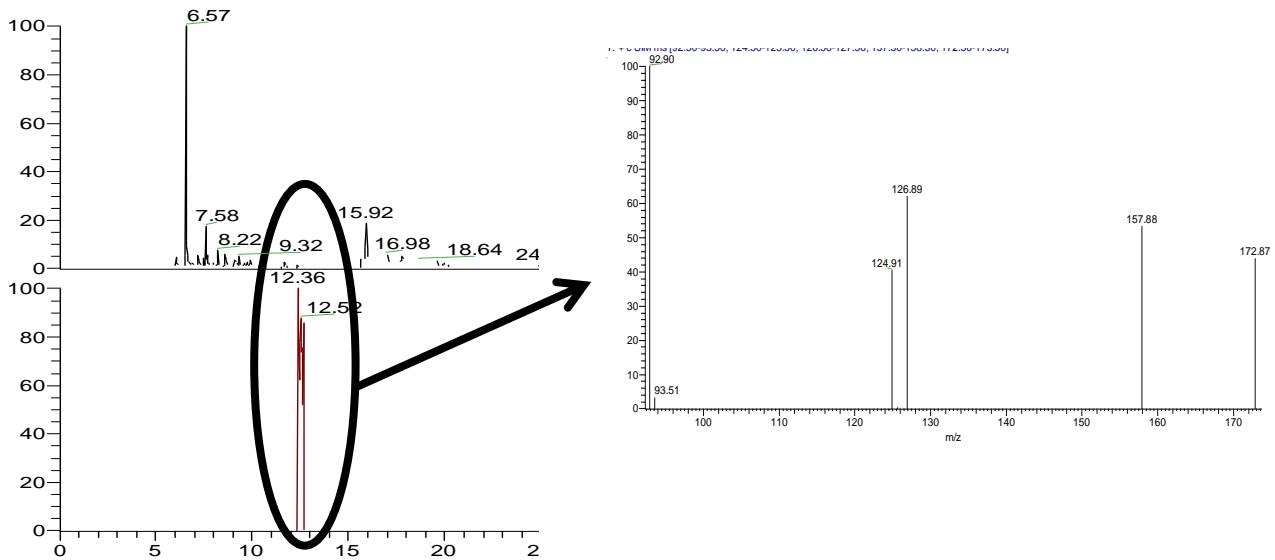


Figura 3. 7 Pico cromatográfico em SRM e espectro de massa obtido na pesquisa do malatião nas águas do rio Douro

O pico correspondente ao malatião é aquele que apresenta como tempo de retenção um valor de 12,36. Refere-se que o seu espectro de massas foi devidamente comparado com o espectro de massas obtido para o pesticida padrão.

3.4.3 Rio Lima

Sendo o do rio Lima um rio internacional que atravessa áreas rurais espera-se que apresente também a presença de pesticidas. Neste rio detectou-se o diazinão, α -HCH, lindano, δ -HCH, HCB, simazina/atrazina, vinclozolina, 2,4-D, alacloro, malatião, aldrina, fenvalerato e deltametrina. A deltametrina apenas foi identificada na margem norte. Existe a possibilidade da sua presença depender das correntes existentes, do tipo de sedimentos presentes nas águas do rio que afectam a deposição e adsorção dos pesticidas.

Como exemplo apresenta-se o caso da pesquisa do 2,4-D com os seus iões de identificação e quantificação numa das margens da água do Rio Lima na Figura 3.8.

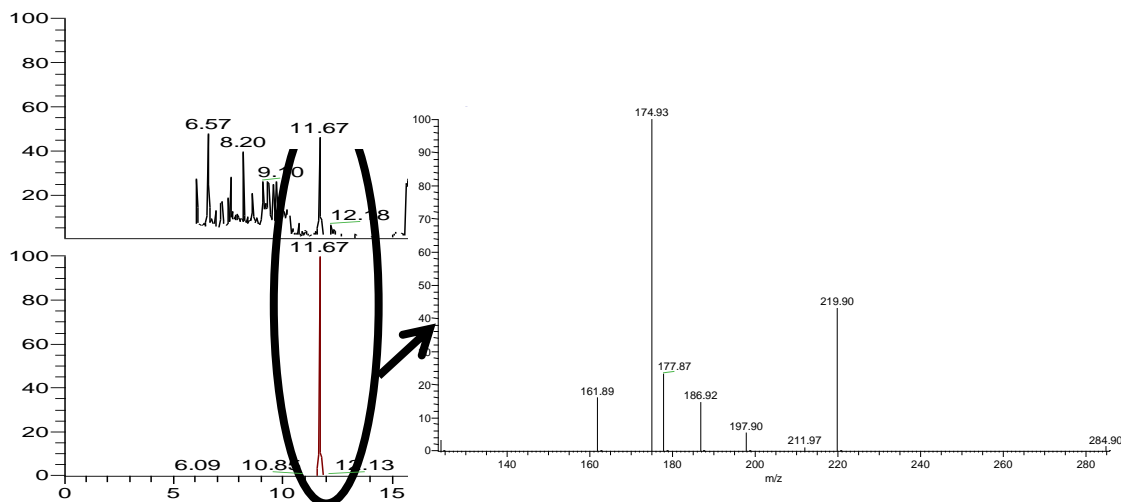


Figura 3. 8 Pico cromatográfico em SRM e espectro de massas obtido na pesquisa do 2,4-D na água do rio Lima

Ao comparar o espectro de massa obtido com o espectro de massa obtido numa solução padrão podemos confirmar que realmente se trata do 2,4-D, cujo tempo de retenção é de 11,67 minutos.

3.4.4 Rio Sousa

Este rio é afluente do Rio Douro com apenas 182 km de comprimento, mas passa por inúmeras localidades com prática agrícola intensa. Desta forma é bastante provável tanto a detecção de herbicidas como de insecticidas. De uma forma geral a agricultura local é a base de produtos básicos, nomeadamente batata, couve, vinha, e uma diversidade de árvores de fruto

Da análise da amostra do Rio Sousa foram detectados os seguintes pesticidas: diazinão, α -HCH, β -HCH, δ -HCH, lindano, HCB, simazina/atrazina, 2,4-D, malatião, aldrina, metoxicloro, alacloro, cipermetrina e fenvalerato. Sendo que todos os pesticidas mencionados estão presentes nas duas margens com a excepção do lindano, metoxicloro e cipermetrina que não se encontram presentes na margem sul do rio.

O facto de haver pesticidas que apenas estão presentes numa das margens deve-se ao facto de poder haver uma deposição de pesticidas no fundo do rio e além disso temos que ter em conta que alguns destes são bastante persistentes e que apesar de estar neste momento proibida a sua venda, o tempo de vida destes pode ser o suficiente para que ainda permaneçam nas águas.

Na Figura 3.9 mostra-se um espectro correspondente a pesquisa do malatião na margem norte do Rio Sousa.

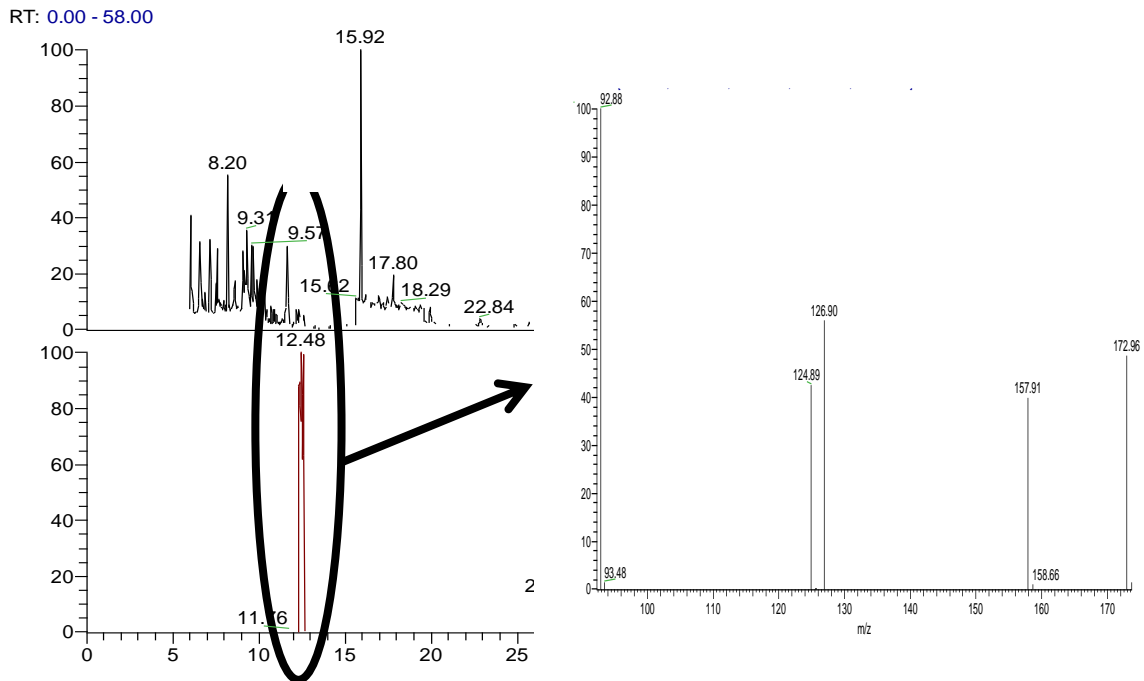


Figura 3. 9 Pico cromatográfico em SIM e espectro de massas obtido na pesquisa do malatião na água do rio Sousa

3.4.5 Ria de Aveiro

A ria de Aveiro corre cerca de 46 Km paralelamente ao mar e banha algumas localidades em comparação com os restantes rios. Dada a sua proximidade com o mar e uma vez que a barreira que os separa é muito pequena e sensível, alguma água do mar pode entrar na ria o que traduz numa salinização da mesma.

Na água recolhida da Ria de Aveiro foram encontrados os seguintes pesticidas: diazinão, α -HCH, β -HCH, lindano, δ -HCH, HCB, simazina/atrazina, 2,4-D, malatião, aldrina, metoxicloro e fenvalerato.

Mostra-se também na Figura 3.10 a título de exemplo um cromatograma em que foi pesquisado a presença de um pesticida: o malatião

RT: 0.00 - 58.00

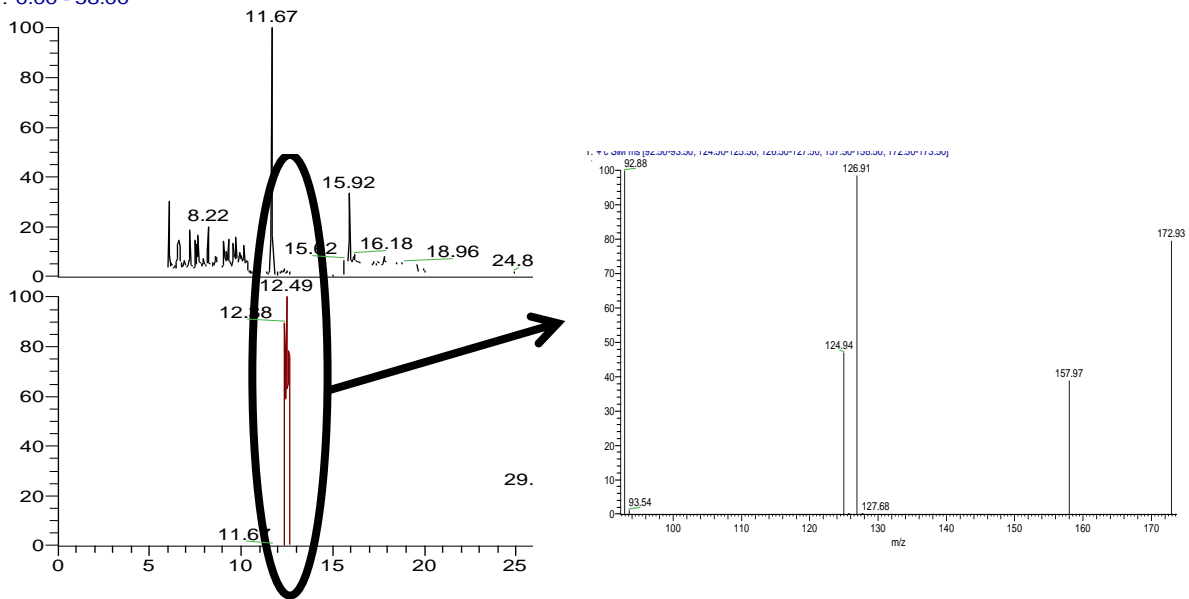


Figura 3. 1 Pico cromatográfico em SIM e espectro de massas obtido na pesquisa do malatião na água da ria de Aveiro

3.4.6 Rio Águeda

Na análise deste rio internacional espera-se poucos pesticidas uma vez que esta água percorre mais terreno mais florestal do que campos agrícolas. Há no entanto alguns campos de cultivo perto do rio no entanto são pequenos em comparação com as zonas agrícolas que rodeiam o rio Douro e o Tâmega.

Os pesticidas encontrados na água deste rio são o diazinão, HCB, 2,4-D, malatião e aldrina.

Na figura 3.11 mostra-se a pesquisa do pesticida HCB através dos seus iões de quantificação e identificação e representa-se também o espectro de massas que foi previamente comparado com o obtido pela solução padrão.

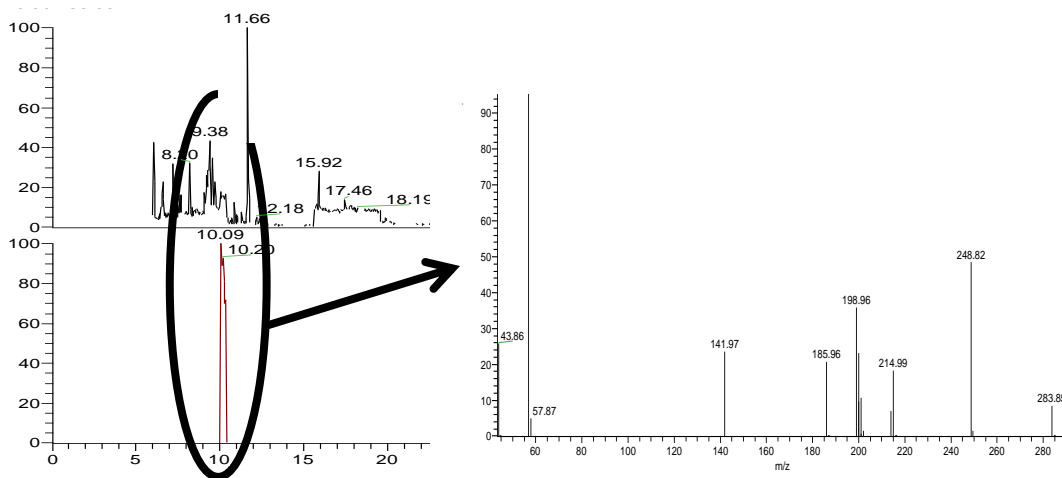


Figura 3. 11 Pico cromatográfico em SIM e espectro de massas obtido na pesquisa do HCB na água do rio Águeda

3.4.7 Rio Minho

Na pesquisa de pesticidas nas águas do Rio Minho foram encontrados os pesticidas: diazinão, α -HCH, β -HCH, δ -HCH, 2,4-D, lindano, HCB, simazina/atrazina, malatião, aldrina, p,p'-DDE, metoxicloro e fenvalerato.

Segundo o Ministério da Agricultura, do Desenvolvimento Rural e das Pescas, seria de esperar a presença de 2,4- D e atrazina ou seus metabolitos. Abaixo encontra-se um cromatograma referente às triazinas (atrazina e simazina).

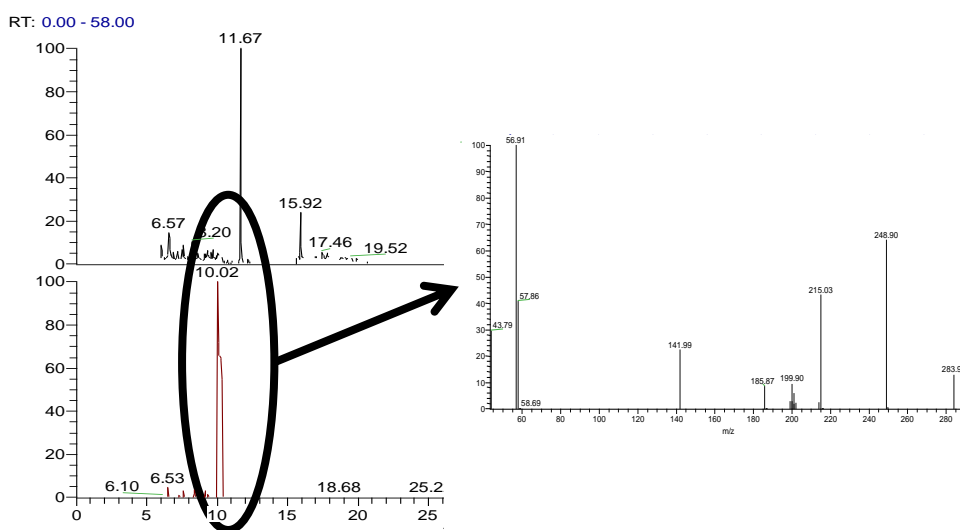


Figura 3.12 Pico cromatográfico em SIM e espectro de massas obtido na pesquisa das triazinas na água do rio Minho

3.4.8 Rio Cávado

O rio Cávado nasce na Serra do Larouco, passa pelo concelho de Braga, Barcelos e desagua no Oceano Atlântico junto a Esposende, após um percurso de 135 km.

Tendo como principal Guia o documento publicado pelo Ministério da Agricultura, do Desenvolvimento Rural e das Pescas, nas Regiões por onde este rio passa seria provável encontrar nas águas superficiais e de consumo o alacloro e a atrazina, pesticidas estes que não foram encontrados nesta análise. Os pesticidas encontrados foram o diazinão, α -HCH, β -HCH, lindano, δ -HCH, HCB, 2,4-D, malatião, β -endossulfão, p,p'-DDE, metoxicloro, cipermetrina e fenvalerato. Na margem sul apenas não foi identificado o β -endossulfão tal deve-se ao facto de poder ter ocorrido uma deposição de pesticidas no fundo do rio, em sedimentos ou até mesmo em plantações próximas.

Para a análise destes pesticidas, mostra-se a seguir um exemplo da pesquisa de um pesticida, o metoxicloro. (Figura 3.12)

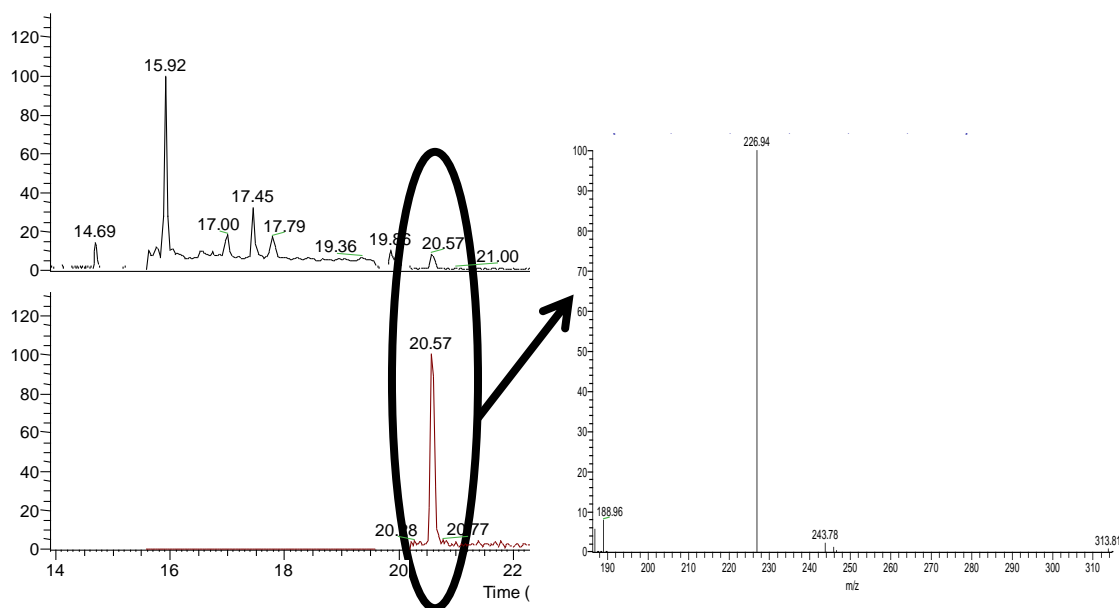


Figura 3. 13 Pico cromatográfico em SRM e espectro de massas obtido na pesquisa do metoxicloro na água do rio Cavado

3.4.9 Rio Leça

O Rio Leça nasce no concelho de Santo Tirso a uma altitude aproximada de 420 m, percorrendo 48 quilómetros até à foz, junto ao porto de Leixões. Actualmente, atravessa uma região onde a actividade industrial é intensa, tendo sofrido os efeitos da falta de tratamento dos resíduos industriais, que ainda são, muitas vezes, lançados directamente nas suas águas. A degradação qualitativa das águas e dos sistemas biológicos é patente nas zonas afectadas pela actividade antrópica (agricultura, indústria ligeira, deposição não autorizada de resíduos), pondo em risco sistemas hidrogeológicos de interesse local. Consequentemente, este rio tem sido considerado um dos mais poluídos da Europa.

Quanto à análise deste rio, o que seria de esperar era que se obtivessem valores de 2,4-D, alacloro e atrazina pois são os pesticidas previstos pelo Ministério da Agricultura, do Desenvolvimento Rural e das Pescas.

Pela análise dos resultados obtidos verificou-se a presença do diazinão, 2,4-D, alacloro, malatião, aldrina, β -endossulfão, p,p'-DDE, cipermetrina e fenvalerato. Na margem norte apenas não foi identificado o alacloro enquanto na margem sul todos os mencionados foram

detectados. Mostra-se na imagem a seguir a pesquisa do alacloro para a margem sul do Rio Leça (Figura 3.14).

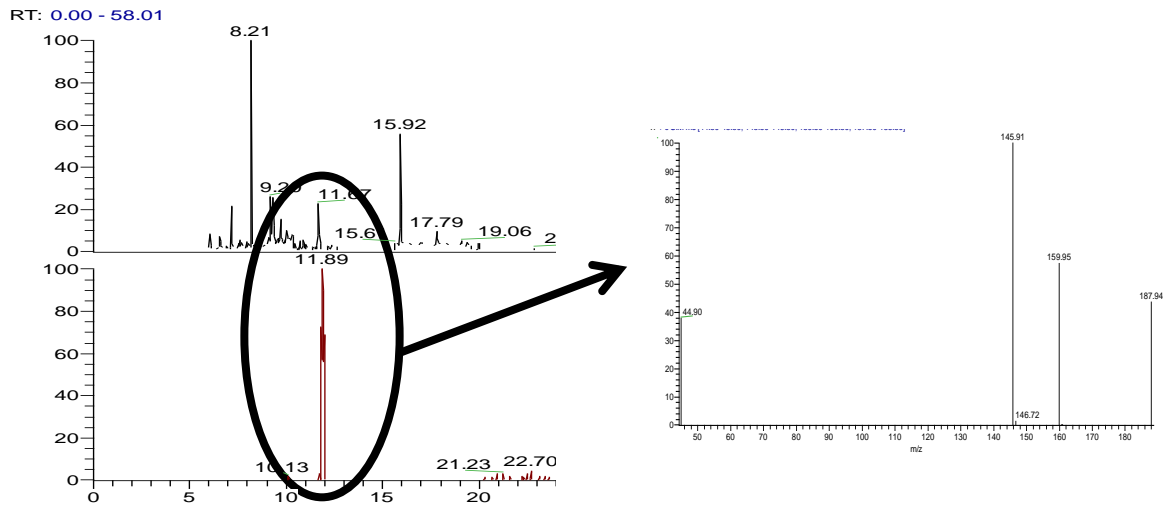


Figura 3. 14 Pico cromatográfico em SRM e espectro de massas obtido na pesquisa do Alacloro na água do rio Leça

3.4.10 Análise global

Dos pesticidas presentes nas águas uns foram encontrados em maior quantidade que outros. Os rios analisados foram 9 e perante os resultados obtidos verifica-se que o 2,4-D e o malatião estão presentes em todas as amostras analisadas e a endrina, o, p'-DDT, p,p'-DDD, α -endossulfão e a iprodiona não foram detectados. Este facto não é de estranhar já que está proibida a venda de pesticidas organoclorados em Portugal há cerca de 20 anos, no entanto foram pesquisados devido à sua persistência. Dos pesticidas pesquisados os que se encontram em menor número de amostras são a bifentrina e a dieldrina.

A Figura 3.15 representa a percentagem de ocorrência de cada pesticida no total de amostras analisadas, 9 rios do norte de Portugal.

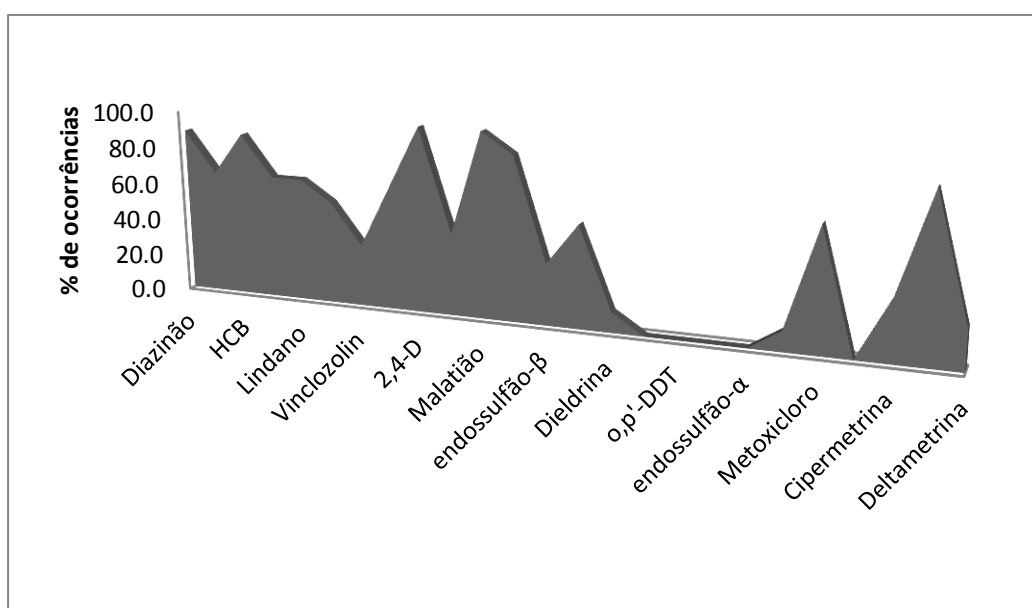


Figura 3. 15 Percentagens de ocorrências dos pesticidas pesquisados

Quanto ao rio mais contaminado este será o rio Tâmega no qual foram detectados 17 pesticidas. O rio que contém menos pesticidas é o rio Águeda. A Figura 3.16 representa graficamente o número de pesticidas encontrados nos rios estudados.

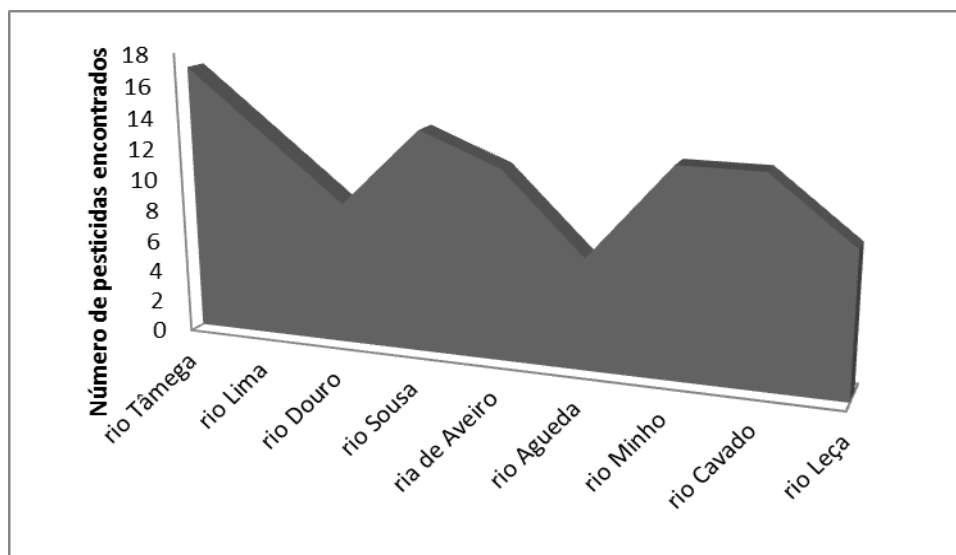


Figura 3.16 Número de pesticidas presentes nos respectivos rios

O facto de a amostragem ter sido realizada numa época de menor pluviosidade faz com que os poluentes estejam menos diluídos e por isso a sua detecção mais facilitada. A amostragem destas águas foi efectuada essencialmente na foz dos rios, onde é esperado uma concentração mais elevada de contaminantes do que a montante visto que desde a nascente até a foz do rio eles passam por diversas localidades e zonas de intensa actividade agrícola. Tal facto traduz-se numa acumulação de pesticidas na foz no rio visto que durante o percurso efectuado pelo rio ele vai transportando para a foz do mesmo.

Tabela 3.3- Listagem dos pesticidas encontrados nos rios e sua classificação de acordo com a família e classe química.

Rio	Família	Classe Química	Pesticidas
Rio Douro	Herbicida	Organoclorados	2,4-D
		Triazinas	Simazina/ atrazina
	Insecticida	Organoclorados	Metoxicloro e aldrina
		Organofosforados	Malatião
		Piretróides	Deltametrina e fenvalerato
	Fungicida	Organoclorados	Vinclozolin e HCB

Tabela 3.3 (continuação) - Listagem dos pesticidas encontrados nos rios e sua classificação de acordo com a família e classe química

Rio	Família	Classe Química	Pesticidas
Rio Lima	Fungicida	Organoclorados	HCB e vinclozolina
	Insecticida	Organoclorados	Aldrina, α -HCH, lindano e δ -HCH
		Organofosforados	Malatião e diazinão
		Piretróides	Fenvalerato e deltametrina
	Herbicida	Organoclorados	2,4-D e alacloro
		Triazinas	Simazina/atrazina
Rio Sousa	Fungicida	Organoclorados	HCB
	Insecticida	Organoclorados	Aldrina, α -HCH, β -HCH, δ -HCH, lindano e metoxicloro
		Organofosforados	Diazinão e malatião
		Piretróides	Cipermetrina e fenvalerato
	Herbicida	Organoclorados	2,4-D e alacloro
		Triazinas	Simazina/atrazina
Ria de Aveiro	Fungicida	Organoclorados	HCB
	Insecticida	Organofosforados	Diazinão e malatião
		Organoclorados	Aldrina, α -HCH, β -HCH, δ -HCH, lindano e metoxicloro
		Piretróides	Fenvalerato
	Herbicida	Organoclorados	2,4-D
		Triazinas	Simazina/atrazina

Tabela 3.3 (continuação) - Listagem dos pesticidas encontrados nos rios e sua classificação de acordo com a família e classe química

Rio	Família	Classe Química	Pesticidas
Rio Águeda	Fungicida	Organoclorados	HCB
	Insecticida	Organofosforados	Diazinão e malatião
		Organoclorados	Aldrina
	Herbicida	Organoclorados	2,4-D
Rio Tâmega	Insecticida	Organoclorados	α -HCH, β -HCH, lindano, δ -HCH, dieldrina, aldrina, p,p'-DDE, e metoxicloro.
		Organofosforados	Diazinão e malatião,
		Piretróides	Bifentrina e fenvalerato
	Fungicida	Organoclorados	HCB e vinclozolina
	Herbicida	Organoclorados	2,4-D e alacloro
		Triazina	Simazina/atrazina
Rio Minho	Insecticida	Organoclorados	α -HCH, β -HCH, lindano, δ -HCH, aldrina, p,p'-DDE, metoxicloro
		Organofosforados	Malatião e Diazinão
		Piretróides	Fenvalerato
	Fungicida	Organoclorados	HCB
	Herbicida	Organoclorados	2,4-D
		Triazinas	Simazina/atrazina

Tabela 3.3 (continuação) - Listagem dos pesticidas encontrados nos rios e sua classificação de acordo com a família e classe química

Rio	Família	Classe Química	Pesticidas
Rio Cávado	Insecticida	Organoclorados	α -HCH, β -HCH, lindano, δ -HCH, β -endossulfão, p,p'-DDE, metoxicloro e cipermetrina
		Organofosforados	Diazinão e malatião
		Piretróides	Cipermetrina e fenvalerato
	Herbicida	Organoclorados	2,4-D
	Fungicida	Organoclorados	HCB
Rio Leça	Insecticida	Organoclorados	Malatião, aldrina, β -endossulfão e p,p'-DDE
		Organofosforados	Diazinão
		Piretróides	Cipermetrina e fenvalerato
	Herbicida	Organoclorados	2,4-D e alacloro

4 CONCLUSÕES

Este trabalho teve como objectivo a optimização de um método simples, rápido e sem uso de grandes quantidades de solvente na identificação e quantificação de 23 pesticidas legislados como desreguladores endócrinos em águas de rios do Norte de Portugal.

Para tal usou-se a detecção por espectrofotometria de massas com o uso de iões de quantificação e identificação visto ser uma técnica bastante sensível. Como método de extracção foi usado SPME com o uso de uma fibra de PDMS de 100 μm de espessura. As condições de operação para este trabalho foram uma temperatura de injeção de 260°C, ausência de cloreto de sódio, 0,25 % de metanol e um tempo de amostragem de 45 minutos.

No decorrer deste trabalho, vários foram as dificuldades que se fizeram sentir. De todos os problemas que vieram a surgir o mais pertinente é o facto da falta de reprodutibilidade que foi de cerca de 80%. A fibra exigiu certos cuidados nomeadamente de temperatura ambiente constante, 25°C e pH ajustado a 3.5 sendo que a qualquer variação mínima ocorreria um desvio ainda maior.

No Rio Tâmega foram encontrados os seguintes pesticidas: diazinão, α -HCH, β -HCH, δ -HCH, lindano, HCB, simazina/ atrazina, vinclozolina, alacloro, 2,4-D, malatião, aldrina, bifentrina, metoxicloro e fenvalerato.

No rio Douro estão presentes HCB, simazina/ atrazina, vinclozolina, 2,4-D, malatião, aldrina, fenvalerato e deltametrina.

No rio Lima encontra-se diazinão, α -HCH, δ -HCH, 2,4-D, HCB, vinclozolina, lindano, simazina/atrazina, alacloro, malatião, aldrina, fenvalerato e deltametrina.

No rio Sousa os pesticidas encontrados foram: diazinão, HCB, aldrina, α -HCH, β -HCH, δ -HCH, lindano, simazina/ atrazina, 2,4-D, cipermetrina, alacloro, fenvalerato e malatião.

No rio Cávado estão presentes o diazinão, α -HCH, β -HCH, δ -HCH, lindano, HCB, 2,4-D, malatião, metoxicloro, cipermetrina e o fenvalerato.

Na ria de Aveiro encontrou-se o diazinão, α -HCH, β -HCH, δ -HCH, lindano, HCB, simazina/atrazina, 2,4-D, Malatião e aldrina. No rio Águeda estão presentes o diazinão, HCB, 2,4-D, aldrina e malatião.

Instituto Superior de Engenharia do Porto

E por último no rio Leça esta presente o diazinão, 2,4-D, alacloro, malatião, aldrina, cipermetrina e fenvalerato.

5. PERSPECTIVA DE TRABALHOS FUTUROS

Como proposta a trabalho futuro seria interessante completar este estudo nas mesmas amostras mas em modo de detecção MS-MS.

A realização de alguns testes para resolver o problema da falta de reprodutibilidade nomeadamente com outro injectoer com programação de temperatura e outro tipo de liner.

6 BIBLIOGRAFIA

- [1] M.M.,Caroline; S.R.,Beverly; M.S., Ana; S., Carlos; 2003; Endocrine disruptores: from Wingspread to environmental developmental biology; Journal of steroid biochemistry & Molecular biology 83, 235-244.
- [2] Carson, R., *Silent Spring*, Mariner Books
- [3] Directiva 2008/105/CE do Parlamento Europeu e do Conselho de 16 de Dezembro de 2008.
- [4] Ambiente, M. Decreto-Lei nº 236/98. Diário da Republica I Série A, 3676-3722 (1998)
- [5] Alpendurada, M.F. et al, 2007, Evaluation of the pesticides contamination of groundwater sampled over two years from a vulnerable zone in Portugal, Journal of agricultural and food chemistry 55, 6227-6235
- [6] Lambropoulou, D.A., Konstantinou, I.K., Albanis, T.A., 2007, Recent developments in headspace microextraction techniques for the analysis of environmental contaminants in different matrices, Journal of chromatography A, 70-96.
- [7] Decreto-Lei nº 306/2007 de 27 de Agosto de 2007, Diario da Republica nº 164, Serie I
- [8] Ministério da Agricultura, do desenvolvimento rural e das pescas, Direcção Geral de Agricultura e Desenvolvimento Rural, <http://www.dgadr.pt/> acedido a 15 de Julho de 2010
- [9] Costa, L.L.F. et al, 2008, Determinação de herbicidas usados no cultivo de arroz irrigado na região sul do estado de santa catarina através da SPME-GC-ECD, Quimica Nova, volume 31, nº1, 79-83
- [10] Tomlin, C.D.S. (Ed.),The Pesticides Manual, 11th Ed., British Crop Protection Council, 1997.
- [11] Gültekin, I., Ince, N.H., 2007, Synthetic Endocrine Disruptors in the environment and water remediation by advance oxidation processes, Journal of environmental management, 816-832
- [12] Sampedro et al, 2000, 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, Journal of Chromatography 269, 1851-1854.

- [13] Kamatsu, C.; Vaz, J.M.; 2004, Otimização dos parâmetros de extração para a determinação multiresíduos de pesticidas em amostras de água empregando microextração em fase sólida; Química Nova, Volume 27, nº 5, 720-724
- [14] Magdic, S. e Pawliszyn, J.B. 1996. Analysis of organochlorine pesticides using solid-phase microextraction, Journal of Chromatography, A, 723, 111-122.
- [15] Simonich, S.L. e Hites, R.A. 1995, Global distribution of persistent organochlorine compounds, Science, 269, 1851-1854.
- [16] Walker, A. 2003. Adsorption and degradation: from the laboratory to the real world, Proceedings of the XII Symposium Pesticides Chemistry, 1
- [17] Pythias Espino, M.A. et al, 2001, Analysis of organophosphorus pesticides in water by graphitized carbon black extraction and gas chromatography-mass spectrometry, Kimika 17(1), 13-18
- [18] Lacorte, S. et al; 1995; Degradation of organophosphorus pesticides and their transformation products in estuarine waters, Environ. Scienc Technology, 29(2), 431-438
- [19] Ling, Y.C. e Huang I.P., 1995, Multi-residue matrix solid-phase dispersion method for the determination of six synthetic pyrethroids in vegetables followed by gas chromatography with electron capture detection, Journal of Chromatography A, 695, 75-82.
- [20] Capman, R.A. e Harris, C.R., 1978, Extraction and liquid-solid chromatography cleanup procedures for the direct analysis of four pyrethroid insecticides in crops by gas-liquid chromatography, journal of chromatography, 266, 513-518
- [21] Chen, Z.M. e Wang, Y.H., 1996, Chromatography methods for the determination of pyrethrin and pyrethroid pesticide residues in crops, foods and environmental samples, Journal of Chromatography A, 754, 367-395
- [22] Guimarães, J.R.P.F; Disruptores Endócrinos no meio ambiente: um problema de saúde pública e ocupacional, versão descarregada da internet no dia 25/06/2010.
- [23] Nogueira, J.M.F.; 2003; Desreguladores Endócrinos: efeitos adversos e estratégias para monitorização dos sistemas aquáticos, Química, 88; 65-71
- [24] Communication from the Commission to the Council and the European Parliament on the implementation of the Community Strategy for Endocrine Disrupters- a range of

substances suspected of interfering with the hormone systems of humans and wildlife (COM(1999)706); Brussels, 14.06.2001

[25] Faechin, I. e Pasquini, C.; 1998; Extracção liquido-liquido em sistemas de fluxo. Quimica Nova, 21(1), 60-69

[26] Miliades, G.E. et al, 1999, High-performance liquid chromatography determination of benoylurea insecticides residues in grapes and wine using liquid and solid-phase extraction, Journal of Chromatography A, 835, 133-120

[27] Manual de Operações Unitarias; Blackdder, Nedderman, 2004; Hewus

[28] Pawliszyn, J; 1997; Solid-phase microextraction theory and practice, Wiley-VCH; New York

[29] Wang, Z. et al; 2000; High-performance polyethylene glycol-coated solid-phase microextraction fibers using solid-gel technology; Journal of Chromatography A; 893; 157-168

[30] Pawliszyn, J.; 1999; Applications of solid-phase microextraction, RSC chromatography monographs

[31] Dórea, H.S.; 2008; Microextracção em fase sólida: aspectos termodinâmicos e cinéticos; Scientia Plena; vol.4; Num. 7

[32] Alpendurada, M.F.; 2000; Solid-phase microextraction: a promising technique for sample preparation in environmental analysis; Journal of Chromatography A; 889; 3-14

[33] Bagher, H. et al; 2010; A sol-gel-based amino functionalized fiber for immersed solid-phase microextraction of organophosphorus pesticides from environmental samples; Microchemical Journal; 94; 1-6

[34] Kataoka, H. et al; 2000; Applications of solid-phase microextraction in food analysis, Journal of Chromatography A, 880; 35-62

[35] Wen, Y et al; 2006; Analysis of estrogens in environmental waters using polymer monolith in- polyether ether ketone tube solid-phase microextraction combined with high-performance liquid chromatography; Journal of Chromatography A; 1133; 21-28

[36] Alpendurada, M.F. et al, 2007, Optimisation and validation of a solid-phase microextraction method for simultaneous determination of different types of pesticides in

water by gas chromatography-mass spectrometry; *Journal of chromatography A*, 1141, 165-173

[37] Mmualefe, L.C. et al, 2009; Headspace solid phase microextraction in the determination of pesticides in water samples from the Okavango Delta with gas chromatography-electron capture detection and time-of-flight mass spectrometry; *Microchemical Journal*, 91, 239-244.

[38] Silverstein, R.M. et al; 2005; *Spectrometric identification of organic compounds*; John Wiley & Sons, Inc.; New York

[39] Haffman, E.; Stroobant, V.; 1999; *Mass spectrometry: Principles and Applications*. Second Edition; John Wiley & Sons, Inc. ; Paris

[40] Aguinaga,N.; et al; 2009; Solid-Phase Microextraction Coupled to Gas Chromatography-Mass Spectrometry for the Analisis of Famoxadone in Wines, Fruits and Vegetables; Taylor Francis

[41] Vidal, J.L.; 2009; Determination of pesticides transformation products: A review of extraction and detection methods, *Journal of Chromatography A*, 1216, 6767-6788

[42] Moliner-Martinez, Y. et al; 2009; Miniturized matrix solid phase dispersion procedure and solid phase microextraction for the analysis of organochlorinated pesticides and polybrominated diphenylethers in biota samples by gas chromatography electron capture detection; *Journal of Chromatography A*, 1216, 6741-6745

[43] Zhu,F. et al; 2009; Application of solid-phase microextraction for the determination of organophosphorus pesticides in textiles by gas chromatography with mass spectrometry; *Analytica Chimica Acta* 650; 202-206

[44] Guillet, V. et al; 2007; Microwave/SPME method to quantify pesticide residues in tomato fruits; *Journal of Environmental Science and Health, Part B*.

[45] Wang, Y. et al; 2009; A novel fluorinated polyaniline-based solid-phase microextraction coupled with gas chromatography for quantitative determination of polychlorinated biphenyls in water samples; *Analytica Chimica Acta*, 646; 78-84

[46] Chai, M.K.; Tan, H.T.; 2009; Validation of a headspace solid-phase microextraction procedure with gas chromatography-electron capture detection of pesticides residues in fruits and vegetables; *Food Chemistry* 117, 561-567

- [47] Li, H.P.; Lin, C.H.; 2009; Analysis of aqueous pyrethroid residuals by one-step microwave- assisted headspace solid-phase microextraction and gas chromatography with electron capture detection; *Talanta* 79, 466-471
- [48] Shi, Z.G.; et al; 2009; Carbon monolith: Preparation, characterization and application as microextraction fiber; *Journal of Chromatography A*, 1216, 5333-5339
- [49] Mohammadi, A.; et al; 2009; Headspace solid-phase microextraction using a dodecylsulfate-doped polypyrrole film to ion mobility spectrometry for the simultaneous determination of atrazine and ametryn in soil and water samples; *Talanta* 78, 1107-1114
- [50] Mollahosseini, A.; Noroozian, E.; 2009; Polyphosphate-doped polypyrrole coated on steel fiber for the solid-phase microextraction of organochlorine pesticides in water; *Analytica Chimica Acta* 638; 169-174
- [51] Poli, D.; et al; 2009; Single step determination of PCB 126 and 153 in rat tissues by using solid phase microextraction/gas chromatography-mass spectrometry: comparison with solid phase extraction and liquid/liquid extraction; *Journal of chromatography B*; 877; 773-783
- [52] Xing, Y.N. et al; 2009; Detection of DDT and its metabolites in two estuaries of South China using a SPME-based device: First report of p,p'-DDMU in water column; *Environmental Pollution* 157; 1382-1387
- [53] Mmualefe, L.; et al; 2009; Headspace solid phase microextraction in the determination of pesticides in water samples from the Okavango Delta with gas chromatography-electron capture detection and time-of-flight mass spectrometry; *Microchemical Journal* 91; 239-244
- [54] Djozan; D.; Mahkam, M.; Ebrahimi, B.; 2009; Preparation and binding study of solid-phase microextraction fiber on the basis of ametryn- imprinted polymer Application to the selective extraction of persistent triazine herbicides in trap water, rice, maize and onion; *Journal of Chromatography A*, 1216; 2211-2219
- [55] Wang, J.; et al; 2009; Sampling atmospheric pesticides with SPME: laboratory developments and field study; *Environmental Pollution* 157, 365-370
- [56] Viñas, P.; et al; 2009; Method development and validation for strobilurin fungicides in baby foods by solid-phase microextraction gas chromatography-mass spectrometry; *Journal of Chromatography A*; 1216; 140-146

[57] Leong, M.; Huang, S.; 2008; Dispersive liquid-liquid microextraction method based on solidification of floating organic drop combined with gas chromatography with electron-capture or mass spectrometry detection; *Journal of Chromatography A*, 1211; 8-12

[58] Carvalho, P.N. et al; 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; *Talanta* 76, 1124-1129

[59] Ravelo-Pérez, L.M.; et al; 2008; Solid-phase microextraction and samples stacking micellar electrokinetic chromatography for the analysis of pesticide residues in red wines; *Food Chemistry* 111, 764-770

[60] Eberlin, M.N.; Silva, R.C.; 2008; Faster and simpler determination of chlorophenols in water by fiber introduction mass spectrometry; *Analytica Chimica Acta* 620, 97-102

[61] Alvarez, M.F.; et al; 2008; Development of a solid-phase microextraction gas chromatography with microelectron-capture detection method for a multiresidue analysis of pesticides in bovine milk; *Analytica Chimica Acta* 617, 37-50

[62] Tsimeli, K., et al, 2008, Development of a rapid and sensitive method for the simultaneous determination of 1,2- dibromoethane, 1,4-dichlorobenzene and naphthalene residues in honey using HS-SPME coupled with GC-MS; *Analytica Chimica Acta* 617, 64-71

[63] Zeng, J. et al; 2008; Development of polymethylphenylsiloxane-coated fiber for solid-phase microextraction and its analytical application of qualitative and semi-quantitative of organochlorine and pyrethroid pesticides in vegetables; *Analytica Chimica Acta* 619; 59-66

[64] Kasiotis, K. et al; 2008; Headspace solid phase micro extraction gas chromatographic determination of fenthion in human serum; *International Journal of Molecular Sciences*, 9, 906-913

[65] Gupta, M; et al; 2008; Coupled in-tube and on-fibre solid-phase microextractions for cleanup and preconcentration of organic micropollutants from aqueous samples and analysis by gas chromatography-mass spectrometry; *Analytica Chimica Acta* 618; 61-69

[66] Fidalgo, N; et al; 2008; Enantioselective determination of the organochlorine pesticides bromocyclen in spiked fish tissue using solid-phase microextraction coupled to gas chromatography with ECD and ICP-MS detection; *Talanta* 75; 710-716

- [67] Regueiro, J. et al; 2008; Ultrasound-assisted emulsification-microextraction of emergent contaminants and pesticides in environmental waters; *Journal of Chromatography A* 1190; 27-38
- [68] Vázquez, P.P.; et al; 2008; Application of solid-phase microextraction for determination of pyrethroids in groundwater using liquid chromatography with post-column photochemically induced fluorimetry derivatization and fluorescence detection; *Journal of Chromatography A*; 1188; 61-68
- [69] Fernandez-Alvarez, M. et al; 2008; Simultaneous determination of traces of pyrethroids, organochlorine and other main plant protection agents in agricultural soils by headspace solid phase microextraction-gas chromatography; *Journal of Chromatography A*, 1188; 154-163
- [70] Schurek, j. et al; 2008; application of head-space solid-phase microextraction coupled to comprehensive two-dimensional gas chromatography-time-of-flight mass spectrometry for the determination of multiple pesticides residues in tea samples; *Journal of Chromatography A*, 611; 163-172
- [71] Rocha, c. et al; 2008; Determination of trace triazine and chloroacetamide herbicides in tile-fed drainage ditch water using solid-phase microextraction coupled with GC-MS; *Environmental Pollution* 152; 239-244
- [72] Vázquez, P.P. et al; 2008; Solid-phase microextraction (SPME) for the determination of pyrethroids in cucumber and watermelon using liquid chromatography induced fluorimetry derivatization and fluorescence detection; *Analytica Chimica Acta* 607; 74-82
- [73] Benhabib, K.; et al; 2008; Steady-state diffusion regime in solid-phase microextraction kinetics; *Analytica Chimica Acta* 609; 113-119
- [74] Scheyer, A. et al; 2008; Pesticides analysed in rainwater in Alsace region (Eastern France): comparison between urban and rural sites; *Atmospheric Environment* 41; 7241-7252
- [75] Hernández, F. et al; 2007; Micropollutants in water by solid-phase microextraction combined with gas chromatography/high-resolution time-of-flight mass spectrometry; *Anal. Chem.* 79; 9494, 9504

[76] Nagaraju, D., Huang, S.D.; 2007; Determination of triazine herbicides in aqueous samples by dispersive liquid-liquid microextraction with gas chromatography-ion trap mass spectrometry; *Journal of Chromatography A*, 1161; 89-97

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

[78] Álvarez, M.F.; et al; 2007; Alternative sample preparation method for photochemical studies based on solid phase microextraction: synthetic pyrethroid photochemistry; *Journal of Chromatography A*, 1152; 156-167

[79] Lambropoulou, D.; et al; 2007; Recent developments in headspace microextraction techniques for the analysis of environmental contaminants in different matrices; *Journal of Chromatography A*; 1152; 70-96

[80] Xu, X. ; et al; 2007; Analysis of chloroacetanilide herbicides in water samples by solid-phase microextraction coupled with gas chromatography-mass spectrometry; *Analytica Chimica Acta* 591; 87-96

[81] Tena, M.T.; Carrillo, J.D.; 2007; Multiple solid-phase microextraction: theory and applications; *Analytical Chemistry*; Vol 26; nº3

[82] Picó, Y.; et al; 2007; Current trends in solid-phase-based extraction techniques for the determination of pesticides in food and environmental; *Journal Biochemical and biophysical methods*; 70; 117-131

[83] Campillo; N. et al; 2007; Pesticide analysis in herbal infusions by solid-phase microextraction and gas chromatography with atomic emission detection; *Talanta* 71; 1417-1423

[84] Zhou, S.N.; et al; On-fiber standardization technique for solid-coated solid-phase microextraction; *Anal. Chem.* 79; 1221-1230

[85] López, R.; et al; 2007; Determination of organochlorine pesticides and polychlorinated biphenyls in human serum using headspace solid-phase microextraction and gas chromatography-electron capture detection, *Journal of chromatography B*, 846, 298-305

[86] Prosen, H. et al; Partitioning of selected environmental pollutants into organic matter as determined by solid-phase microextraction; *Chemosphere* 66; 1580-1589

- [87] Silva, G.A.; et al; Simultaneous optimization by neuro-genetic approach of a multiresidue method for determination of pesticides in *Passiflora alata* infuses using headspace solid phase microextraction and gas chromatography; *Journal of Chromatography A*, 1138; 251-261
- [88] Derouiche, A.; Driss, M.R.; Morizur, J.P.; 2007; 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; 231-243
- [89] Fytianos, K.; et al; Solid phase microextraction applied to the analysis of organophosphorus insecticides in fruits; *Chemosphere* 65; 2090-2095
- [90] Ji, L.L. et al; 2006; Study on a móvel circulating cooling solid-phase microextraction method; *Journal of Chromatography A*, 1135; 1-5
- [91] Casas, V.; et al; 2006; Multivariate optimization of the factors influencing the solid-phase microextraction of pyrethroid pesticides in water; *Journal of Chromatography A*, 1124; 148-156
- [92] Deng, C.; Mao, Y.; Yao, N.; 2006; Development of microwave-assisted extraction followed by headspace solid-phase microextraction and gas chromatography-mass spectrometry for quantification of camphor and borneol in *Flos Chrysanthemi Indici*; *Analitica Chimica Acta* 575; 120-125
- [93] Morais, S. et al; 2006; Analysis of PCBs in soil and sediments by microwave-assited extraction, headspace-SPME and high resolution gas chromatography with ion-trap tandem mass spectrometry; *International Journal of Environmental Analytical Chemistry*; Vol.86; nº6
- [94] Souza, D.A.; Lanças, F.M.; Solventless Samples Preparation for Pesticides Analysis in Environmental Water Samples Using Solid-Phase Microextraction-high Resolution gas chromatography/mass spectrometry; *Journal of Environmental Science and Health*; Vol.B38; nº4; 417-428

7 ANEXOS

A.1 Tabela com a concentração de cada pesticida para a preparação da solução mãe.

Pesticida	Concentração (µg/L)	Solvente
2,4-D	440000	Metanol
Alacloro	4802000	n-hexano
Aldrina	2414000	n-hexano
Atrazina	350000	Metanol
Bifentrina	622000	n-hexano
Cipermetrina	2236000	n-hexano
p,p'-DDD	2506000	n-hexano
p,p'-DDE	2152000	n-hexano
o,p'-DDT	1676000	n-hexano
Deltametrina	2298000	n-hexano
Diazinão	5164000	n-hexano
Dieldrina	1954000	n-hexano
α -Endossulfão	1644000	n-hexano
β -Endossulfão	2238000	n-hexano
Endrina	1760000	n-hexano
Fenvalerato	2500000	n-hexano
HCB	1210000	n-hexano
HCH	3878000	n-hexano
Iprodiona	698000	Metanol
Malatião	4090000	n-hexano
Metoxicloro	3036000	n-hexano
Simazina	620000	Metanol
Vinclozolina	720000	Metanol

