

INSTITUTO SUPERIOR DE ENGENHARIA DO PORTO

MESTRADO EM ENGENHARIA QUÍMICA
RAMO TECNOLOGIAS DE PROTECÇÃO AMBIENTAL



Monitorização de Pesticidas em Águas de Esposende

Ana Sofia de Oliveira Dias Teixeira

Outubro de 2010

Orientador: Valentina Maria Fernandes Domingues
Co-Orientador: Rui M. Sá Rangel e Mónica A. Oliveira Dias Teixeira

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho
aos meus pais, Jorge Oliveira
e Victória Teixeira pelo carinho e amor,
e à minha irmã, companheira das mil aventuras.

AGRADECIMENTOS

Desenvolver uma tese de mestrado em 6 meses foi um desafio que assumi realizar prontamente, sem pensar no caminho que teria que percorrer. Ao longo destes meses acompanharam-me pessoas com um rigor científico reconhecido e com uma elevada capacidade de companheirismo, pertenci e pertenço a uma equipa de investigação de mérito. Sem elas este trabalho não teria sido realizado.

As palavras de agradecimento nunca serão suficientes, nem transmitirão a minha gratidão e admiração a todos os que me ajudaram nesta etapa. É com grande satisfação, carinho, amor e respeito que vos digo – Muito Obrigada!

Galardoo a **Valentina Maria Fernandes Domingues**, minha orientadora, pela competência científica e acompanhamento do trabalho, pela disponibilidade e generosidade demonstradas ao longo destes meses de trabalho, bem como as críticas, correcções e sugestões relevantes realizadas durante a orientação.

Aos meus co-orientadores **Rui Manuel Sá Rangel** e **Mónica Alexandra de Oliveira Dias Teixeira**, agradeço a oportunidade de participar num projecto desta dimensão, fermentando em mim o gosto pela investigação científica, bem como a amizade e a boa disposição demonstrada ao longo da execução deste trabalho.

A **Cristina Maria Fernandes Delerue Alvim de Matos**, da qual me orgulho como aluna, pela competência científica, pelo incansável apoio moral, pela permanente disponibilidade e por todas as palavras sábias que permitiram abrir janelas quando todas as portas foram fechadas.

A todos os colegas de mestrado, em especial à Ana Isabel Pereira, Sandra Oliveira, Sílvia Mendes e Teresa Pinho pelo apoio e animação ao longo desta pequena jornada. Aos meus companheiros (as), Virgínia Fernandes, Paula Paíga, António Soares, Joel Sousa e Camilo Pinto. As palavras são escassas, mas os sorrisos infinitos.

Agradeço ao GRAQ- Grupo de Reacção de Análises Químicas. Pela oportunidade de realizar este trabalho.

Projecto financiado pelo CITS- Centro de Investigação em Tecnologias da Saúde -3221/ Abril de 2009.

*“ Se eu vi mais longe, foi porque estive de pé,
Em ombros de GIGANTES”*

Isaac Newton
(1643-1727)

De forma a proteger o ambiente e a saúde humana, é imperativo evitar, prevenir ou reduzir as concentrações prejudiciais de poluentes nocivos na água subterrânea. A necessidade da obtenção de níveis de protecção da água subterrânea, encontra-se estabelecida em normas de qualidade e devem ser desenvolvidas metodologias que permitam a avaliação do estado químico da água subterrânea.

Este trabalho experimental centrou-se no desenvolvimento de uma metodologia analítica de detecção e quantificação por cromatografia gasosa com detector de captura de electrões dos pesticidas atrazina e respectivos metabolitos (desetilatraxina e deisopropilatraxina), simazina, terbutilazina e o metabolito deseterbutilazina, folpete, dimetoato, diazinão, malatião, cloropirifos e o azinfos-metilo em águas de poços.

O estudo progressivo baseou-se na colheita de água a 20 poços agrícolas na zona de Esposende, área considerada pelo Ministério da Agricultura do Desenvolvimento Rural e Pescas como sendo uma zona vulnerável.

O método utilizado para a validação da técnica cromatográfica baseou-se na norma ISO 8466-1:1990. Os parâmetros de validação considerados foram: especificidade/selectividade, capacidade de identificação, limites de detecção e quantificação, relação sinal/ruído, linearidade e curva de calibração, precisão (repetibilidade, precisão intermédia e reprodutibilidade), eficiência de extracção e arrastamento.

O método demonstrou ser capaz de identificar e quantificar os analitos, sem interferência de outros compostos. Obteve-se um valor para os parâmetros da precisão inferior a 10%, enquanto os mais baixos limites de detecção e de quantificação foram, respectivamente, 0,014 e 0,047 $\mu\text{g L}^{-1}$.

Na preparação de amostras optou-se pelo método de extracção em fase sólida, tendo sido testadas cinco diferentes tipos de colunas extractivas; Lichrolut[®] EN/RP-18; Strata SDB-L e C18-E; Chromabond HR-P e HR-X, sendo que as colunas Lichrolut[®] EN/RP-18 apresentaram melhores resultados para a globalidade dos pesticidas.

Da análise efectuada aos 20 poços agrícolas verificou-se que apenas 3 não apresentavam qualquer vestígio dos pesticidas monitorizados, sendo que as restantes apresentavam valores entre 0,05 e 53,2 $\mu\text{g L}^{-1}$, valores superiores aos impostos pela legislação em vigor (Decreto-Lei n.º 208/2008 de 28 de Outubro para água subterrânea e Decreto-Lei nº306/2007 referente a água para consumo).

Verificou-se que os proprietários dos poços agrícolas, dos quais se procedeu à amostragem de água para análise não têm a consciência da falta de qualidade dessa água, nem dos malefícios que possam advir do seu consumo

Palavras-Chave: Pesticidas, Cromatografia Gasosa, SPE, Validação.

The protection of environment and human health, it is imperative to avoid, prevent or reduce harmful levels of harmful pollutants in groundwater. The necessity of achieve levels of protection of groundwater, is established in quality standards and methodologies should be developed that allow assessment of chemical status of groundwater.

This work is developing an analytical method for detection and quantification by gas chromatography with electron capture detection of atrazine and its metabolites (desethylatrazine and deisopropylatrazine), simazine, and metabolite Terbutylazine, desethylterbutylazine, folpet, dimethoate, diazinon, malathion, chlorpyrifos and azinphos-methyl in water wells.

Were collected 20 waters from agricultural wells in the area of Esposende, this area is considered by the Ministry of Agriculture Rural Development and Fisheries as a vulnerable area.

The reference used for the validation of chromatographic technique was based on ISO 8466-1:1990. The validation parameters were considered: specificity / selectivity, identification capability, quantification and detection limits, signal to noise ratio, linearity and calibration curve, precision (repeatability, intermediate precision and reproducibility), extraction efficiency and carryover.

This method showed capacity to identify and quantify analytes this compounds without interference from other compounds. The value obtained for precision was less than 10% and for limits of detection and quantification were, respectively, 0.014 and 0.047 mg L⁻¹. Sample preparation was chosen method of solid phase extraction and were tested five different types of columns and quarrying; Lichrolut ® EN/RP-18; Strata SDB-L and C18-E; Chromabond HR-P and HR-X , and the columns Lichrolut EN/RP-18 ® showed better results for the full range of pesticides.

Analysis of the 20 agricultural wells was found that only 3 showed no trace of pesticides monitored, and the remainder had values between 0.05 and 53.2 mg L⁻¹, all higher than those imposed by legislation (Decree Law No. 208/2008 of 28 October to groundwater and Decree-Law No. 306/2007 regarding drinking water). It was found that owners of agricultural wells, which has conducted water sampling for analysis are not aware of the lack of quality of water, or the harm that may result from its consumption.

Keywords: Pesticides, Gas Chromatography, SPE, Validation.

DEDICATÓRIA.....	I
AGRADECIMENTOS.....	III
EPÍGRAFE.....	V
RESUMO.....	VII
ÍNDICE GERAL.....	XI
ÍNDICE DE TABELAS.....	
XIII	
ÍNDICE DE FIGURAS.....	XV
SIGLAS, ABREVIATURAS E UNIDADES.....	
XVII	
1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1. Pesticidas	2
1.1.1. <i>Toxicidade dos Pesticidas</i>	4
1.1.2. <i>Absorção e Distribuição dos Pesticidas no Organismo</i>	6
1.1.3. <i>Cinética e Metabolismo dos Pesticidas</i>	7
1.1.4. <i>Biotransformação, Eliminação e Excreção</i>	8
1.1.5. <i>Aspectos Toxicológicos de alguns Pesticidas Estudados</i>	8
1.2. Pesticidas em águas.....	14
1.2.1. <i>Metodologia analítica em águas</i>	18
1.3. Pesticidas no homem.....	19
1.3.1. <i>Metodologia analítica no homem</i>	21
1.4. Legislação.....	22
1.5. Concelho de Esposende	23
1.6. Cromatografia Gasosa com Detector de Captura de Electrões	25
1.7. Técnica de Extracção SPE.....	26
1.8. Validação de Procedimentos Analíticos	27
1.8.1. <i>Especificidade/Selectividade</i>	28
1.8.2. <i>Capacidade de Identificação</i>	29
1.8.3. <i>Limite de Detecção e Limite de Quantificação</i>	29
1.8.4. <i>Relação Sinal/Ruído</i>	29
1.8.5. <i>Eficiência da Extracção</i>	30
1.8.6. <i>Efeito Matriz</i>	30
1.8.7. <i>Arrastamento</i>	31
1.8.8. <i>Precisão</i>	31

1.8.9. <i>Exactidão</i>	34
1.8.10. <i>Gama de trabalho e Linearidade</i>	34
1.8.11. <i>Robustez</i>	34
2. OBJECTIVOS	35
2.1. Objectivo Geral	35
2.2. Objectivos Específicos	35
3. METODOLOGIA	37
3.1. Recolha de dados para a caracterização da amostra.....	37
3.2. Aplicação dos questionários de colheita	37
3.2.1. <i>Aplicação dos questionários</i>	38
3.3. Amostragem	39
3.4. Reagentes e Consumíveis	40
3.5. Equipamentos	41
3.6. Procedimento para o Desenvolvimento das Metodologias Analíticas e Validação das Técnicas Analíticas.....	42
3.6.1. <i>Metodologia de Extracção</i>	42
3.6.2. <i>Metodologia analítica e programa do GC</i>	43
3.6.3. <i>Estudo da Especificidade/Selectividade e Capacidade de Identificação</i>	43
3.6.4. <i>Estudo da Linearidade, Limites de Quantificação e Detecção e a Razão Sinal/Ruído</i>	43
3.6.5. <i>Estudo do Parâmetro Arrastamento</i>	44
3.6.6. <i>Estudo do Parâmetro Precisão</i>	45
3.6.7. <i>Estudo do Parâmetro Exactidão</i>	45
3.6.8. <i>Estudo do Parâmetro Robustez</i>	45
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	47
4.1. Caracterização da Amostra.....	47
4.2. Resultados da Opinião dos Agricultores Face à Utilização de Pesticidas e o Estado da Qualidade da Água	49
4.3. Resultados da Monitorização da água dos poços	50
4.3.1. <i>Seleção do Processo de extracção</i>	50
4.3.2. <i>Avaliação do Método Cromatográfico</i>	51
4.3.3. <i>Níveis de pesticidas em amostras de água</i>	56
5. CONCLUSÃO.....	61
6. SUGESTÕES PARA TRABALHO FUTURO.....	63
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	65
ANEXOS.....	73

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1.1 Classificação toxicológica dos pesticidas.....	6
Tabela 1.2 Caracterização e certas propriedades físico-químicas de alguns herbicidas da família das triazinas.....	9
Tabela 1.3 Valores de DL ₅₀ em ratos por via oral e dérmica, para as triazinas estudadas ...	10
Tabela 1.4 Caracterização e propriedades físico-químicas da família dos insecticidas organofosforados estudados	12
Tabela 1.5 Valores de DL ₅₀ em ratos por via oral e dérmica, para os organofosforados estudados.....	13
Tabela 1.6 Níveis permitidos para alguns pesticidas seleccionados, normalmente pesquisados em água potável, segundo a EPA, Portugal, Brasil e Argentina.....	16
Tabela 1.7 Valores de algumas Triazinas em águas encontrados em Portugal.....	17
Tabela 1.8 Tabela ANOVA (factor único)	32
Tabela 1.9 Cálculo das estimativas da precisão	33
Tabela 4.1 Estrutura dos agricultores de Esposende voluntários para a doação de amostras de águas de poços	47
Tabela 4.2 Localização exacta da recolha das amostras de águas.	48
Tabela 4.3 Informação dos agricultores sobre o manuseamento, aplicação de pesticidas, análises realizadas e confiança na água	49
Tabela 4.4 Valores obtidos para os parâmetros: Linearidade, Limites de detecção e quantificação e sinal ruído.....	53
Tabela 4.5 Gama de concentrações dos analitos usada na curva de calibração para a determinação dos pesticidas em águas.....	54
Tabela 4.6 Valores obtidos para o estudo da Repetibilidade (Sr), Reprodutibilidade (Srun) e precisão intermédia (S1)	55
Tabela 4.7 Teores de pesticidas encontrados nas águas de poços do concelho de Esposende	57
Tabela A.1 Cálculos intermédios para a determinação dos parâmetros Selectividade/Especificidade	74
Tabela A.2 Cálculo auxiliar para a precisão.....	74

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.1 Número de casos de suspeita de intoxicação por pesticidas nos últimos 10 anos	5
Figura 1.2 Produtos de biotransformação da atrazina. (1) 2- cloro-4-etilamino-6-2-atrazina; (2) 2-cloro-4,6-diamino-s-triazina; (3) 2-cloro-4-amino-6-isopropilamino-s-triazina; (4) 2-hidroxi-4-etilamino-6-isopropilamino-s-triazina e (5) 2-hidroxi-4,6-s-triazina	10
Figura 1.3 Representação da Estrutura Química Base dos Insecticidas Organofosforados	11
Figura 1.4 Estrutura química do folpete	13
Figura 1.5 Risco relativo para o ambiente representado pelas forças motrizes da agricultura sobre o ambiente, por região	23
Figura 1.6 Importância de cada indicador de “forças motrizes” na atribuição do risco relativo para o ambiente, por região	24
Figura 3.1 Formulário de Amostragem de águas aplicado no concelho de Esposende	38
Figura 3.2-Rotulagem dos recipientes de amostragem	39
Figura 3.3 Localização esquemática dos pontos de colheita de águas de poços agrícolas no concelho de Esposende	40
Figura 3.4 Coluna de SPE Lichrolut® EN/RP-18 com 6 mL de volume	41
Figura 3.5 Coluna de SPE Stracta SDB-L	41
Figura 3.6 Coluna de SPE Stracta C ₁₈ -E	41
Figura 3.7 Coluna SPE Chromabond HR-P	41
Figura 3.8 Coluna SPE Chromabond HR-P	41
Figura 3.9 Manifold utilizado no procedimento de Extração	42
Figura 4.1 Percentagem de recuperação das triazinas, dos organofosforados e do ftalimida folpete	50
Figura 4.2 Cromatograma de uma solução padrão de pesticidas (0,2 µg/L)	52
Figura 4.3 Cromatograma de uma amostra de água desionizada	56
Figura 4.4 Distribuição de casos negativos/positivos e comparação com a legislação	58
Figura 4.5 Distribuição dos pesticidas monitorizados pelas 20 amostras de águas analisadas	58
Figura 4.6 Número de pesticidas encontrados nas 20 águas de poços agrícolas monitorizados	59

SIGLAS, ABREVIATURAS E UNIDADES

µg- microgramas

ATZ- Atrazina

CE- Comunidade Europeia

GC- Cromatografia Gasosa

CTP- Comissão de Toxicologia dos Pesticidas

DATZ- DesetilAtrazina

DPATZ- DesetilPropilAtrazina

DRAPN- Direcção Regional de Agricultura e Pescas do Norte

DTBZ- DesetilTerbutilazina

ECD- Detector de Captura de Electrões

EPA- “Agência de Protecção Ambiental dos Estados Unidos”

EPI- Equipamento de Protecção Individual

FAO- “*Food and Agriculture Organization*”

HST- Higiene e Saúde no Trabalho

IMC- Índice de Massa Corporal

INE- Instituto Nacional de Estatística

L- Litro

LOD- Limite de Detecção

LOQ- Limite de Quantificação

mL- mililitro

OCP- Pesticidas Organoclorados

OF- Pesticidas Organoclorados

OMS- Organização Mundial de Saúde

SMZ- Simazina

TBZ- Terbutilazina

ZV1- Zona vulnerável 1

“Se os humanos tivessem baptizado o seu planeta a partir de um olhar lançado do espaço, este ter-se-ia chamado Água, e não Terra”[1].

1. Introdução

Apesar da evidente abundância de água em todo o globo, tem vindo a ser reconhecido, ao longo de décadas, por cientistas dos mais variados ramos do conhecimento, de que existe um risco real de ocorrer escassez da água potável.

O homem dispõe de dois recursos para o abastecimento de água doce: água superficial e água subterrânea [2].

A utilização da água subterrânea é uma alternativa bastante viável em termos económicos, uma vez que de uma maneira geral, se trata de uma água de elevada qualidade, que dispensa tratamentos sofisticados e que se encontra dispersa por extensas áreas do planeta.

A água captada dos poços artesanais pode ser utilizada no abastecimento público, industrial ou comercial. No entanto, durante a construção de poços artesanais é necessário ter em consideração, por exemplo: factores geológicos, factores hidrológicos e os factores ambientais. As principais causas de contaminação da água proveniente de poços são o aporte directo de impurezas, quer através da abertura superior do poço; contaminação no momento da retirada de água ou devido às chuvas intensas que arrastam contaminantes usando como canal transportador os macroporos constituintes do subsolo que assim contaminam o lençol freático [3].

Em Portugal, e até ao presente momento, não tem existido qualquer obrigatoriedade legal no sentido de que se proceda a análises químicas e/ou toxicológicas das águas de poços, ficando-se apenas por uma mera recomendação. No entanto, a indisponibilidade de informações que poderiam resultar do recurso sistemático a análises de água é impeditiva da adopção de qualquer acção destinada ao controlo e/ou erradicação dos contaminantes que utilizam a água como meio de transporte ou de cultura.

O uso descontrolado da água, a falta de iniciativas que visem a sua sustentabilidade conduz a um provável cenário de escassez de água potável, obrigando as entidades competentes, a desenvolver novos meios de disponibilidade dos recursos hídricos, tendo como base a optimização da utilização e controlo dos desperdícios de água doce [4].

Nos rios pode ocorrer, por via directa, a contaminação por pesticidas, em virtude da aplicação de pesticidas em actividades de controlo de algas e insectos, lançamentos de efluentes industriais e domésticos sem um tratamento prévio. A contaminação de rios também pode ocorrer por via indirecta, a exemplo do que acontece em processos de lixiviação do contaminante através do solo, em processos de erosão e/ou devido à precipitação atmosférica. A presença de pesticidas nos rios, com origem no uso agrícola daquelas substâncias pode depender da dinâmica desses compostos no solo e do contributo de agentes naturais, tais como o vento [5, 6].

Vários investigadores evidenciam a sua preocupação com o impacto real que os pesticidas podem causar no meio ambiente. Existe por isso o interesse em quantificar os pesticidas presentes em rios e em bacias hidrográficas provenientes da actividade agrícola para tentar determinar relevantes parâmetros toxicológicos, tais como; concentrações letais e sub-letais bem como os efeitos que podem alterar a dinâmica das cadeias alimentares [5, 7-9].

1.1. Pesticidas

Os pesticidas são substâncias usadas para destruir, combater ou alterar o ciclo de uma praga. Podem ser de origem natural ou sintética e actuar de forma física, química ou biológica no metabolismo das pragas [10, 11], sendo classificados consoante o modelo mais adequado à forma de abordagem pretendida seja, por exemplo, pelo alvo de acção e pela estrutura química. Assim, uma classificação dirigida ao alvo de acção poderá incluir as seguintes classes de pesticidas: acaricidas (carraças, aranhas, ácaros), antimicrobianos (microorganismos), avicidas (pássaros), fungicidas (fungos), herbicidas (plantas, ervas daninhas), insecticidas (insectos), moluscicidas (caracóis e lesmas), piscicidas (peixes), rodenticidas (roedores) [12]. Se se adoptar uma classificação segundo a estrutura química, os pesticidas são agrupados de acordo com famílias químicas específicas, tais como:

- Insecticidas: organoclorados; organofosforados; carbamatos; formamidina; tiocianatos; dinitrofenóis; organoestanhado; piretróides; acilureias;
- Fungicidas: ditiocarbamatos; tiazóis; sulfanimidas; pirimidinas; fenilamidas; triazóis; ftalimidas; estrobilurinas; acetamidas;

- Herbicidas: anilinas; compostos quaternários de amónio; ácido propiónico; triazinas ; ureias [13].

Os pesticidas podem adoptar outras designações, tais como: agrotóxicos, protectores agrícolas, remédio, produtos fitossanitários ou praguicidas.

A utilização de pesticidas visa, rentabilizar a produção de alimentos, ao limitar ou eliminar a proliferação das pragas que podem consumir ou alterar a produção alimentar [14].

A Argentina vendeu mais de 120.000 toneladas de produtos alimentares, de origem animal e vegetal, à União Europeia e aos Estados Unidos da América, o que representa um aumento inter-anual de 28,65%, enquanto o Brasil apresentou um incremento inter-anual de 40%. Estes incrementos resultantes da produção de alimentos, deve-se em grande parte à eliminação de pragas com utilização de pesticidas. Segundo o Ministério da Agricultura o elevado número de importações de alimentos, coloca Portugal no ranking dos países economicamente dependentes e de consumo elevado [15].

Apesar de os pesticidas serem agentes responsáveis não só pelos desequilíbrios que provocam no ecossistema como também pelo surgimento de novas patologias no homem. No entanto, especialistas que participaram em debates mundiais, chegaram à conclusão que a erradicação dos pesticidas não representa uma solução viável. A organização internacional “*Food and Agriculture Organization*” (FAO) considera que a solução alternativa passa pelo uso adequado dos pesticidas a par da monitorização dos pesticidas em águas e nos alimentos, de modo a evitar problemas económicos a nível mundial e prejuízos para a saúde das populações [14].

Segundo dados disponibilizados por esta mesma organização, o mercado mundial de agrotóxicos alcançou 32 biliões de dólares no ano 2000, sendo que os países em desenvolvimento contribuíram com uma parcela de 3 biliões de dólares [15].

Sob o ponto de vista de Higiene e Segurança no Trabalho (HST), o Ministério da Agricultura, do Desenvolvimento Rural e das Pescas tem desenvolvido esforços de forma a minimizar os impactos toxicológicos relacionados com o manuseamento de substância fitofarmacêuticas, disponibilizando informações sobre locais de compra de equipamentos de protecção individual (EPI'S) e sobre o uso correcto dos mesmos [16].

No entanto, alguns estudos revelam que apesar da divulgação de informações, existe ainda uma elevada percentagem de agricultores, nomeadamente os mais idosos, que não usam

EPI'S, valendo-se do argumento relacionado com custo elevado e a pouca duração dos equipamentos, preferindo assim socorrerem-se da sabedoria e da experiência acumulada ao longo dos anos, que não assenta em dados científicos nem é alvo de actualização por via da formação. São também os agricultores de idade mais avançada que não marcam presença nas acções de formação promovidas, por exemplo, pela Associação de Defesa dos Agricultores de Braga.

Numa entrevista datada de 2005 no Jornal de Noticias, os agricultores alegaram que não lêem os rótulos das embalagens e não frequentam as formações no âmbito da HST dadas pela Direcção Regional da Agricultura e das Pescas do Norte, motivo pelo qual não possuíam os conhecimentos necessários para o adequado manuseamento de produtos fitossanitários [17].

1.1.1. Toxicidade dos Pesticidas

Os pesticidas, na sua essência, são considerados substâncias tóxicas, com os inerentes perigos para o ser humano. Em termos gerais, o risco tóxico está directamente relacionado com o potencial tóxico do composto, o grau de contaminação e o tempo de duração da exposição.

Considera-se, que o principal problema que o uso dos pesticidas acarreta é o da sua utilização indiscriminada, à margem de qualquer preocupação com a segurança da sua utilização. Os cuidados a ter para lidar com os pesticidas em segurança não devem circunscrever-se aos agricultores, mas abranger todos os que directa ou indirectamente contactam com pesticidas.

De forma a garantir o nível desejável de segurança é necessário proceder a avaliações quer das normas de utilização de cada produto quer da relação risco/benefício [18].

A classificação toxicológica assente no grau de toxicidade dos produtos tenta evidenciar o potencial perigo do pesticida, por alguma das vias de contacto/absorção seja por ingestão, inalação ou por via intradérmica. Esta classificação baseia-se em dados de toxicidade aguda do produto obtidos, por exemplo, através de estudos efectuados em animais de laboratório para cálculo da dose letal em 50% de uma população exposta (DL_{50}).

A acção tóxica pode manifestar-se quando se atinge um determinado limiar de concentração do pesticida no organismo podendo neste caso verificar-se a recuperação total ou parcial, ou então, perdurar um certo nível de toxicidade que só será possível de recuperar alguns

dias ou meses após o contacto. Este efeito permite considerar dois tipos de intoxicação: a intoxicação aguda e a intoxicação crónica.

A intoxicação aguda ocorre quando a exposição a grandes quantidades de pesticidas, sucede num período de tempo relativamente pequeno, podendo esta intoxicação ser accidental, ocupacional, homicida ou suicida. Esta última é a situação mais frequente de ocorrer no Homem, uma vez que os indivíduos com instintos suicidas reconhecem nos pesticidas o seu potencial letal e o fácil acesso a este tipo de tóxicos. Daí que a casuística das mortes por pesticidas tenha quase sempre uma etiologia de suicídio.

Na Figura 1.1, faz-se referência ao número de perícias toxicológicas para pesquisa de pesticidas, requisitadas e efectuadas ao nível da Delegação Norte do Instituto Nacional de Medicina Legal, I.P. ao longo da última década. Note-se que, os dados apresentados se baseiam no número de mortes com suspeita de intoxicação por pesticidas, não significando que os resultados analíticos tenham confirmado esse tipo de intoxicação.

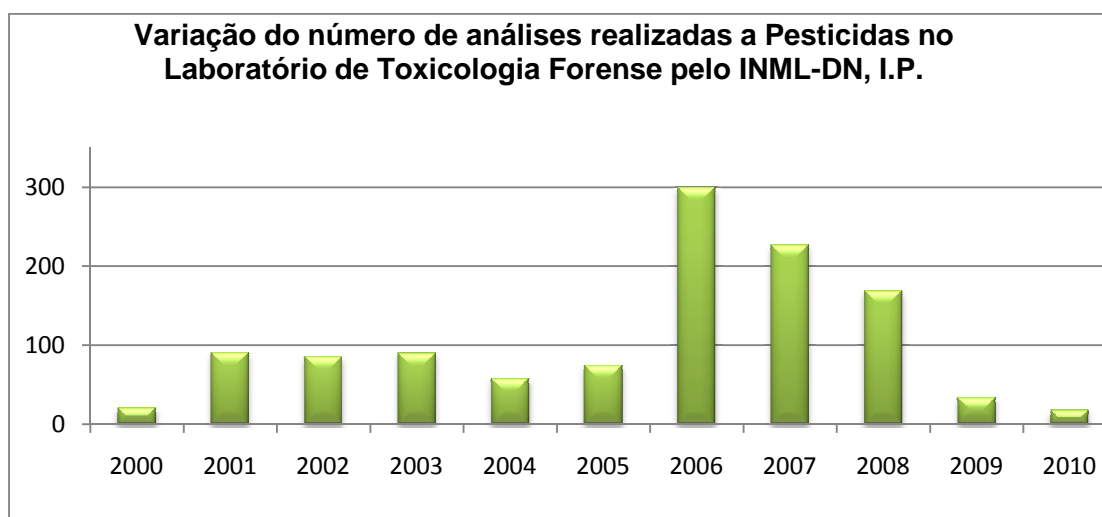


Figura 1.1 Número de casos de suspeita de intoxicação por pesticidas nos últimos 10 anos

Estudos de toxicidade oral e dérmica fornecem dados que servem como referência no estabelecimento dos níveis de toxicidade aguda, permitindo o seu enquadramento em cada uma das devidas categorias toxicológicas. No entanto, a classificação toxicológica só ocorre após a constatação de que o pesticida em estudo não apresenta nenhum factor de impedimento legal para o seu registo [19].

Relativamente à definição de níveis de intoxicação crónica, dado que esta se caracteriza por ocorrer quando a exposição se verifica num período de tempo relativamente longo.

Em qualquer dos tipos de intoxicações atrás referidas existem diversos factores a ter em consideração, tais como, as idiosincrasias do indivíduo exposto, designadamente a sua sensibilidade ao pesticida ou características genéticas [20].

Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), durante uma avaliação toxicológica todos os dados deverão ser analisados com igual importância. Os estudos de toxicidade crónica até agora publicados sobre os riscos de lesão em órgãos específicos e sobre os possíveis efeitos mutagénicos, carcinogénicos, neurotóxicos ou comportamentais no homem são inconclusivos. A Tabela 1.1 demonstra a classificação toxicológica dos pesticidas segundo a OMS [21].

Tabela 1.1 Classificação toxicológica dos pesticidas [21]

Classificação toxicológica	DL ₅₀ oral (mg/kg)		DL ₅₀ dérmica (mg/kg)	
	Produto sólido	Produto líquido	Produto sólido	Produto líquido
I a) Extremamente perigoso	5 ou menos	20 ou menos	10 ou menos	40 ou menos
I b) Altamente perigoso	5-50	20-200	10-100	40-400
II Moderadamente Leve	50-500	200-2000	100-1000	400-4000
III Levemente perigoso	Superior a 500	Superior a 2000	Superior a 1000	Superior a 4000

1.1.2. Absorção e Distribuição dos Pesticidas no Organismo

A capacidade de absorção de uma substância depende da sua forma de apresentação e da via pela qual ela penetra no organismo [20]. A inalação de partículas, gases ou vapores ocorre a nível das vias respiratórias, enquanto a via oral pode intervir na absorção devida à ingestão de alimentos ou de águas contaminadas, podendo estas últimas ser absorvidas por via cutânea no caso de contacto com a pele.

A inalação de substâncias dá-se quando se verifica a sua persistência na atmosfera. A absorção por via respiratória verifica-se, normalmente, um caudal de inalação entre 5 a 6 L/min, com um pico máximo de 30 L/min, para organismos em repouso. A extensa área pulmonar com aproximadamente 90 m², e a superfície alveolar, de, aproximadamente, 70 m² facilita o contacto com os compostos tóxicos presentes no ar. Sendo o pulmão um órgão bastante permeável e ricamente vascularizado, permite a rápida e eficiente absorção de substâncias presentes no ar, promovendo, por exemplo, a retenção dos pesticidas nos cílios

das vias aéreas superiores [22]. As partículas depositam-se em duas vias aéreas do sistema respiratório, na via aérea superior, precisamente na nasofaringe e na via aérea inferior onde a árvore tráqueo-bronquial e os alvéolos são os alvos preferenciais. A exposição aos pesticidas em níveis tóxicos resulta numa vasta variedade de sintomas e sinais, que dependem do pesticida utilizado, da dose absorvida e das condições de saúde do indivíduo. A contaminação por inalação apresenta os seguintes sintomas: ardor na garganta e pulmões, tosse, rouquidão e congestionamento das vias respiratórias [23].

Uma importante via de absorção de pesticidas é a via cutânea, que será mais pronunciada para as fórmulas oleosas dos pesticidas, dependendo fundamentalmente da lipossolubilidade, do grau de ionização, do tamanho da molécula e da capacidade de hidrólise do pesticida face às condições de pH da epiderme e da derme. Os pesticidas, que na sua maioria são lipossolúveis atravessam facilmente as membranas celulares da pele, de natureza lipoproteica, o que facilita a sua absorção [23].

Os sintomas apresentados pela contaminação por via dérmica são: irritação (pele seca e gretada), mudança da coloração da pele (áreas com cor amarelada ou avermelhada) e descamação.

Na absorção gastrointestinal são várias as características dos pesticidas que podem influenciar este mecanismo, destacando-se a sua constante de dissociação, o seu grau de lipossolubilidade, a sua solubilidade no pH do estômago ou do intestino, a sua massa molar e a sua estabilidade [24].

1.1.3. Cinética e Metabolismo dos Pesticidas

O sistema que envolve a intoxicação baseia-se em três elementos básicos: o pesticida (agente tóxico), o organismo e a resposta (sinais e sintomas).

Os pesticidas são transportados através do sangue dependendo de diversos factores, tais como a lipossolubilidade e grau de ionização, para atravessarem as membranas celulares e barreiras orgânicas. Os compostos lipossolúveis apresentam mais afinidade para as membranas, atravessando-as facilmente, enquanto as membranas celulares são mais permeáveis às formas não ionizadas dos pesticidas e relativamente impermeáveis às suas formas ionizadas [25].

1.1.4. Biotransformação, Eliminação e Excreção

As substâncias xenobióticas que penetram no organismo podem sofrer algum tipo de biotransformação. As principais reacções envolvidas neste processo são: oxidação, redução, hidrólise e conjugação [26].

Consoante o seu grau de lipossolubilidade e de polaridade a nível fisiológico, as substâncias apresentam maior ou menor capacidade para atravessar as membranas orgânicas e consequentemente poderem ser excretadas pelos rins.

Com frequência os pesticidas são biotransformados com formação de produtos mais polares.

Os primeiros produtos dessa biotransformação atravessam facilmente as membranas orgânicas e embora sejam filtrados a nível renal, são reabsorvidos pelos capilares glomerulares e permanecem no organismo. Atravessam depois um processo de biotransformação produzindo compostos polares, que estão desprovidos da actividade tóxica e são excretados pelos rins, pelo ar expirado, pelo suor e pela saliva. Este processo é responsável pelo aumento na duração da acção e pela concentração das substâncias xenobióticas no sangue e nos tecidos [24, 26].

Estes factores fisiológicos são normalmente os mesmos para qualquer tipo de contaminante.

1.1.5. Aspectos Toxicológicos de alguns Pesticidas Estudados

Da vasta gama de pesticidas existentes serão analisados alguns compostos constituintes do grupo dos insecticidas, herbicidas e fungicida. Dentro dos herbicidas optou-se pela família química das Triazinas, enquanto que do grupo dos insecticidas se privilegiaram, alguns Organofosforados, para além do estudo do folpete, um fungicida pertencente à família das Ftalimidas.

Alguns pesticidas das famílias das triazinas, nomeadamente a atrazina, bem como os organoclorados (OCPs) têm sido considerados agentes responsáveis pela disfunção do sistema reprodutor [27], indutores da doença de Parkinson e por provocar danos no sistema nervoso central [28, 29].

As triazinas são compostos com estrutura base da 1,3,5-triazina. As substituições ocorrem nas posições 2, 4 e 6. Os radicais substituintes na posição 2 podem ser $-Cl$ ou $-SCH_3$ e, nas posições 4 e 6, a substituição dá-se por grupos amina.

Estes herbicidas triazínicos são usados em aplicações pré- e pós-emergentes em culturas de milho e de cana-de-açúcar. A atrazina é também utilizada no controlo de plantas

daninhas em lagos [25]. Estes herbicidas s-triazínicos são pouco solúveis em água e muito solúveis em solventes orgânicos, à excepção da simazina. Na Tabela 1.2, estão representadas as propriedades físico-químicas dos herbicidas triazínicos [14, 30].

Tabela 1.2 Caracterização e certas propriedades físico-químicas de alguns herbicidas da família das triazinas [14, 30]

Características	Atrazina ¹	Simazina	Terbutilazina ²
Fórmula Estrutural			
Nome químico (IUPAC)	2-cloro-4-(etilamino)-6-(isopropilamino)-s-triazina	2-cloro-4,6-bis-etilamino-s-triazina	N2-tert-butyl-6-chloro-N4-ethyl-1,3,5-triazine-2,4-diamine
Nomes Comerciais	Gesaprin 800 Pm, Herbitrin, Siptran, Atrazinax 500, etc.	Gesatop, Sipazina 800 PM, Simanax SC, Herbazin 800 PM, etc.	Gardoprim
Fórmula Molecular	C ₈ H ₁₄ ClN ₅	C ₇ H ₁₂ ClN ₅	C ₉ H ₁₆ ClN ₅
Massa Molar (g/mol)	215,68	201,66	229,71
PF (°C)	171	225	176
Dissociação Ácida (pKa)	1,7 - (25°C)	1,62 (25°C)	2,00 (25°C)
Solubilidade em água (mg/L)	70 (22 °C)	5 (20°C)	6,6 (20°C)
Solubilidade em solventes orgânicos	Pouco solúveis: éter etílico, metanol e clorofórmio.	Acetona, etanol, clorofórmio, éter dietílico, acetato de etila	Metanol, Acetona, n-hexano

As triazinas podem ser absorvidas por via respiratória, cutânea ou oral. A biotransformação destes pesticidas envolve um processo de N-desalquilação e de conjugação do produto formado. O grupo isopropilo é mais facilmente removido que o etilo, sendo que os radicais – Cl e –SCH₃ permanecem intactos [24].

A capacidade de absorção cutânea da atrazina é de, cerca de 16% do total da concentração aplicada directamente sobre a pele humana.

Após a absorção cutânea as triazinas são biotransformadas através de processos oxidativos, formando derivados hidroxilados e grupos amina (Figura 1.2).

¹ Serão alvo de estudo os respectivos metabolitos da Atrazina, a Desetilatrizona e a Deisopropilatrizona.

² Tanto a Terbutilazina como o correspondente metabolito (Desetilterbutilazina) serão objectos deste estudo.

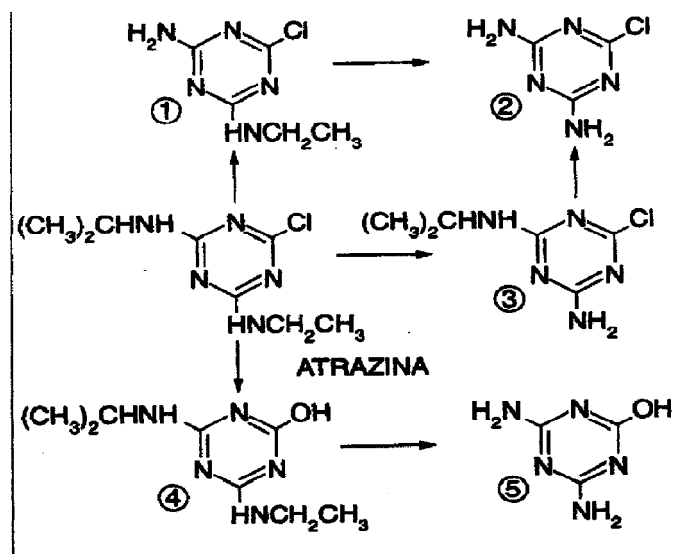


Figura 1.2 Produtos de biotransformação da atrazina. (1) 2- cloro-4-etilamino-6-2-amino-s-triazina; (2) 2-cloro-4,6-diamino-s-triazina; (3) 2-cloro-4-amino-6-isopropilamino-s-triazina; (4) 2-hidroxi-4-etilamino-6-isopropilamino-s-triazina e (5) 2-hidroxi-4,6-s-triazina

A atrazina, quando administrada em ratos em doses de 30 mg/kg, é parcialmente excretada através da urina (66%) e das fezes (18%) nas primeiras 72 horas. Valores de excreção idênticos encontram-se descritos para a Simazina. Por este motivo, a excreção urinária de metabolitos bi-desalquilados, desisopropilados e desetilados pode ser usada para a correspondente monitorização biológica da absorção destas triazinas.

No que se refere à toxicidade destes herbicidas triazínicos assinala-se os relativamente elevados índices para DL_{50} , facto que indicia a sua baixa toxicidade aguda (Tabela 1.3) [31].

Tabela 1.3 Valores de DL_{50} em ratos por via oral e dérmica, para as triazinas estudadas [31]

Compostos	DL_{50} (mg/kg) em ratos	
	Via Oral	Via dérmica
Atrazina	2000	3000
Simazina	5000	5000
Terbutilazina	1845	2000

Os pesticidas organofosforados (OF) são caracterizados pelas suas propriedades de não-persistência e lipossolubilidade. A sua utilização destina-se não só a controlar/erradicar pragas tal como a maioria dos pesticidas, mas também a serem usados no tratamento de algumas patologias, como por exemplo o glaucoma (doença que afecta o nervo óptico) [32-34]. Apresentam propriedades apolares e decompõem-se em meio alcalino. São,

possivelmente, os insecticidas mais usados, bem como os responsáveis pela maior parte das intoxicações devidas a pesticidas. Ao longo dos últimos 40 anos, o mercado dos pesticidas organofosforados tem vindo a contar com mais de 35.000 formulações diferentes [35].

Estes pesticidas são na maioria ésteres dos ácidos fosfóricos e fosfónicos ou derivados dos ácidos tionofosfórico e ditiofosfórico, possuem a estrutura química indicada na Figura 1.3. Os radicais R_1 e R_2 são grupos arilo ou alquilo que estão ligados directamente ao átomo de fósforo, formando fosfinatos, ou através de um átomo de oxigénio ou de enxofre, formando fosfatos e fosfortioatos. Em outros casos, R_1 está directamente ligado ao átomo de fósforo e R_2 está ligado por um átomo de oxigénio ou de enxofre, formando fosfonatos ou tiosfanatos. Os átomos (X) que podem formar ligação dupla com o fósforo podem ser oxigénio, enxofre ou selénio, enquanto o radical L pode incluir uma série de grupos, tais como halogénios, alquilos, arilos ou grupos heterocíclicos. O radical L, ligado através de um oxigénio ou átomo de enxofre ao átomo de fósforo, é designado como grupo de saída, sendo libertado pelo átomo de fósforo quando o mesmo é hidrolisado pela fosfotriesterase [25, 36].

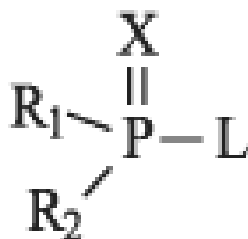


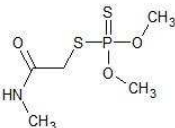
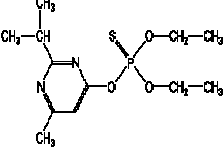
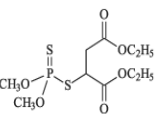
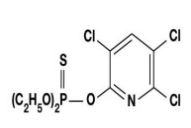
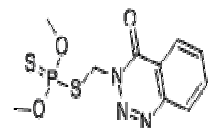
Figura 1.3 Representação da Estrutura Química Base dos Insecticidas Organofosforados

Os principais motivos da utilização massiva dos compostos OF no controle de insectos devem-se à franca actividade biológica a que se associa a sua baixa estabilidade na biosfera, uma vez que possui um tempo de semi-vida em plantas na ordem de 2 a 10 dias. A isso temos de considerar ainda o relativo baixo custo, a facilidade na sua síntese química, e o reduzido grau de toxicidade para muitos dos organismos que são alvo de tratamento, a que não é alheia a deficiente acumulação verificada em organismos vivos, já que 80 a 90% dos compostos são eliminados ao fim de 48h após contacto [36].

Alguns OF actuam como insecticidas, aracnicidas e acaricidas, a sua absorção pode ocorrer pelas vias oral, respiratória ou cutânea.

Na Tabela 1.4, encontram-se descritas as características e as propriedades físico-químicas dos insecticidas organofosforados estudados [30, 36-38].

Tabela 1.4 Caracterização e propriedades físico-químicas da família dos insecticidas organofosforados estudados [30, 36-38]

Características	Dimetoato	Diazinão	Malatião	Clorpirifos	Azinfos-metil
Estrutura Química					
Nome químico (IUPAC)	<i>O,O</i> -dimetil <i>S</i> -metilcarbamoilmetil fosforoditioato	<i>O,O</i> -dietil <i>O</i> -2-isopropil-6-metilprimidina-4-il fosforoditioato	<i>S</i> -1,2 bis (etoxicarbonil) etil <i>O,O</i> -demetilfosforoditioato	<i>O,O</i> -dietil-3,5,6-tricloro-2-piridilfosforotioato <i>O</i>	<i>S</i> -3,4-dihidro-4-oxo-1,2,3-benzotriazina-3-ilmetil <i>O,O</i> -dimetil fosforoditioat
Nomes Comerciais	Dimetoato	BASUDINE 600 EW	Maltox, Emmaton (por exemplo)	PYRINEX 5 G	Gusathion
Fórmula Molecular	C ₅ H ₁₂ NO ₃ PS ₂	C ₁₂ H ₂₁ N ₂ O ₃ PS	C ₁₀ H ₁₉ O ₆ PS ₂	C ₉ H ₁₁ NO ₃ Cl ₃ PS	C ₁₀ H ₁₂ N ₃ O ₃ PS ₂
Massa Molar (g/mol)	229,3	304,3	330,36	350,59	317,32
PF (°C)	43-45 °C	--	2,85 °C	42 °C	73 °C
Dissociação Ácida (pKa)	Não aplicável [38]				
Solubilidade em água (mg/L)	25000 (25 °C)	40 (20 °C)	148,2 (25 °C)	--	28 (20 °C)
Solventes orgânicos nos quais ocorre solubilidade	Metanol, n-hexano, entre outros				

Os OF apresentam uma toxicidade mais elevada nos humanos e em outros mamíferos comparativamente a outros pesticidas, como por exemplo as triazinas [5]. Dependendo da facilidade de absorção dos OF nos tecidos, os sinais clínicos da intoxicação são evidenciados no imediato ou tardiamente. Assim sendo, em situações de inalação de vapores deste tipo de pesticidas que possam estar presentes no ambiente, os primeiros sintomas aparecem em poucos minutos, enquanto que por ingestão ou por exposição cutânea pode resultar num aparecimento tardio dos sintomas. Na eventualidade de ocorrer uma exposição cutânea localizada, o efeito imediato tende a ficar restringido à área exposta, podendo suceder uma reacção exacerbada na presença de lesão cutânea ou dermatite. Exemplos de efeitos ou sintomas localizados sob acção de OF são:

- a nível de qualquer dos membros periféricos uma provável sudorese intensa e tremores musculares espontâneos;
- a nível de um olho pode acontecer visão turva e/ou miose;
- e no caso de exposição pulmonar, em pequenas quantidades, o sintoma associado pode ser tosse.

Salienta-se que, de acordo com os últimos estudos, foi revelado que os OF fazem parte do grupo de agentes químicos que podem levar à perda da audição [39].

Na Tabela 1.5, encontram-se descritos os valores de toxicidade, nomeadamente a dose letal para 50% da população de ratos pelas vias oral e cutânea [38,40].

Tabela 1.5 Valores de DL₅₀ em ratos por via oral e dérmica, para os organofosforados estudados [38]

Compostos	DL ₅₀ (mg/kg) em ratos	
	Via Oral	Via cutânea
Dimetoato	800	6000
Diazinão	300	475
Malatião	2100	4000
Clorpirifos	> 50 – 200	2000
Azinfos -metil	16	40 – 200

O folpete é um fungicida, pertence à família química das Ftalimida. Trata-se de um pesticida que é considerado selectivo. Normalmente é usado durante o inverno para evitar o aparecimento de fungos em plantas devido aos elevados teores de humidade no solo e no ar ambiente. A sua estrutura química está representada na Figura 1.4 e a sua massa molecular é de 296,56 g/mol.

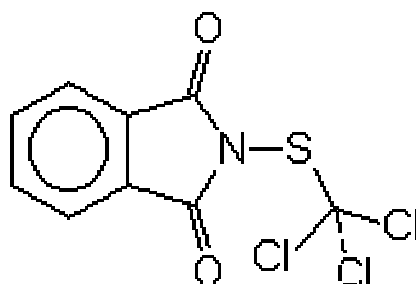


Figura 1.4 Estrutura química do folpete

Apresenta elevada solubilidade em água e um valor de pH entre 5,0 e 9,0. O ponto de fusão é de 177°C [41].

Relativamente às informações toxicológicas sabe-se que o folpete é menos tóxico em comparação com as triazinas e os organofosforados. Os índices de dose letal que se encontram descritos para este composto são: em ratos uma DL_{50} (oral) > 5000 mg/kg e em coelhos uma DL_{50} (dermico) > 2000 mg/kg. No Homem, a dose diária aceitável é de 0,01 mg/kg de peso corporal.

Não se lhe encontram descritas propriedades mutagénicas, teratogénicas ou carcinogénicas [42].

1.2. Pesticidas em águas

A contaminação das águas subterrâneas por pesticidas está directamente relacionada com a quantidade de água e a intensidade de precipitação no solo, factores estes que favorecem o processo de lixiviação. Embora o solo actue como um filtro físico e químico da passagem da água para as zonas subterrâneas, este não confere total protecção quanto ao risco de contaminação. O percurso da água através do solo até níveis geológicos inferiores pode arrastar contaminantes, especialmente se na superfície do solo estiverem presentes substâncias hidrossolúveis que facilmente são transportadas por lixiviação. Logo após a precipitação, parte da água que atinge o solo infiltra-se e percola no interior do subsolo.

A probabilidade de um poluente atingir a água subterrânea dependerá de vários factores tais como a espessura da zona não saturada; o teor de matéria orgânica; a permeabilidade da zona não saturada e do aquífero; o tipo e intensidade da precipitação e a inclinação do terreno.

A disponibilidade do poluente no solo é outro factor importante no que diz respeito à contaminação de águas subterrâneas. Um poluente que se deposite no solo poderá passar por uma série de reacções ou interacções químicas e físicas com os constituintes do solo antes de atingir a água subterrânea. Estas acções poderão neutralizar, modificar ou retardar a acção do poluente.

Em alguns casos, podem mesmo conduzir à formação de produtos mais tóxicos como, por exemplo, o dimetoato que se degrada em dimetoxina, à qual corresponde cerca de 75 a 100 vezes mais toxicidade do que no composto inicial. Igualmente para o malatião cuja degradação nos solos pode levar à formação de trimetilfosforotioato, que se apresenta com elevado potencial tóxico actuando directamente no sistema nervoso central e nos pulmões,

de forma a induzir uma sintomatologia de hipotermia e dificuldades respiratórias em homens e animais [43-45].

A nível mundial organizações internacionais como a Agência de Protecção Ambiental dos Estados Unidos (EPA) e a Comunidade Europeia (CE) estabeleceram valores limites em relação às concentrações de pesticidas em águas, sendo também ambas as entidades responsáveis pela organização e criação de listas de periculosidade (avaliadas de acordo com a toxicidade, persistência e uso dos pesticidas). Na lista desenvolvida pela Directiva 76/464/EEC destacam-se os pesticidas atrazina; 2,4-D; DDT; dieldrina; dimetoato; linurão; Malatião; Trifluralina, entre outros [14].

Os níveis permitidos pela CE são determinados pela Directiva da Água para consumo que estabelece que a concentração máxima tolerável de um pesticida individualmente não deve exceder 0,1 µg/L, e que a concentração total de pesticidas não deve exceder os 0,5 µg/L, em água potável [46]. Estas recomendações têm vindo a ser adoptadas em Portugal.

A Tabela 1.6 apresenta os níveis permitidos para alguns pesticidas, presentes em água potável, segundo a legislação vigente no Brasil, na Argentina e em Portugal, bem como face aos critérios definidos pela EPA. A Argentina e o Brasil representam os dois países com maior crescimento das exportações de alimentos ao longo dos últimos dois anos.

Tabela 1.6 Níveis permitidos para alguns pesticidas seleccionados, normalmente pesquisados em água potável, segundo a EPA, Portugal, Brasil e Argentina [48-50,107,108]

Pesticida	Nível (µg/L)			
	Brasil	Portugal	EPA	Argentina
Alaclor	20	0,1	2	0,1
Aldrina e Dieldrina	0,03	0,1	---	0,03
Atrazina	2	0,1	3	2
Bentazona	300	0,1	---	---
Clordano	0,2	0,1	2	0,3
2,4-D	30	0,1	70	100
DDT	2	0,1	---	1
Endossulfano	20	0,1	---	0,02
Endrine	0,6	0,1	2	0,0023
Glifosato	500	0,1	700	280
Heptacloro	0,03	0,1	0,2	0,1
Hexaclorobenzeno	1	0,1	0,1	0,01
Lindano	2	0,1	0,2	3
Metacloro	10	0,1	10	0,03
Metoxicloro	20	0,1	40	30
Molinato	6	0,1	---	---
Pendimetalina	20	0,1	---	---
Pentaclorofenol	9	0,1	0,1	0,5
Permetrina	20	0,1	---	50
Porpanil	20	0,1	---	---
Simazina	2	0,1	4	---
Trifluralina	20	0,1	2	---

A concentração e a forma de apresentação dos pesticidas no ambiente, nomeadamente nos percursos de águas, desde as nascentes até ao mar, podem trazer dificuldades às estações de tratamento de água, havendo assim uma crescente necessidade de tecnologias mais complexas do que aquelas que são normalmente usadas no tratamento de água com vista a torná-la potável [52, 53].

Actualmente, as monitorizações de pesticidas em água que são efectuadas em território nacional levantam algumas preocupações. A Tabela 1.7, evidencia os rios onde os teores de pesticidas estão acima dos valores legais, como por exemplo no Rio Guadiana.

Tabela 1.7 Valores de algumas Triazinas em águas encontrados em Portugal

Composto	Matriz	Quantidade encontrada µg/L	Rios	Ano	Referência
Atrazina	Águas Superficiais	0,05-28,89	Tejo-Ribatejo	1996-1998	[54]
Simazina	Águas Superficiais	0,05-0,10	Tejo-Lezíria	1991-1998	[55]
Atrazina	Águas Superficiais	0,05-6	Tejo-Setúbal	1991-1998	[55]
Simazina	Águas Superficiais	>0,5	Guadiana	2009	[56]
Atrazina	Águas Superficiais	>0,5	Guadiana	2009	[56]
Atrazina	Águas Superficiais	0,12	Douro	2007	[57]
Desetilatrazina	Águas Superficiais	0,05	Douro	2007	[57]
Terbutilazina	Águas Superficiais	<0,05	Douro	2007	[57]
Desetilterbutilazina	Águas Superficiais	<0,05	Douro	2007	[57]

Dado que os organofosforados apresentam um grau de decomposição relativamente rápido em comparação com outros pesticidas, com períodos que oscilam entre dias ou semanas, tem-se verificado dificuldades na detecção destes compostos sendo, por isso, raramente encontrados na cadeia alimentar [58]. No entanto, sabe-se que estes compostos são altamente tóxicos para a vida aquática e continuam a ser alvo de pesquisa e análise nos rios em Portugal.

A qualidade de uma água corresponde a um conjunto de características, físicas, químicas e biológicas de um certo corpo de água, avaliadas segundo critérios de qualidade que dependem da finalidade da sua utilização [59, 60].

Os grandes desafios de um programa de monitorização da qualidade da água são conhecer o funcionamento dos ecossistemas, organizar uma base de dados sobre a qualidade da água e perceber os factores que afectam essa qualidade a nível regional e nacional [60, 61].

Os métodos cromatográficos são os mais usados pelos laboratórios de análise química para determinação de pesticidas nas mais diversas matrizes, inclusive para amostras de água. Consoante a classe de pesticidas que interessa analisar, a metodologia a empregar é seleccionada entre a cromatografia gasosa (GC) ou a cromatografia líquida (HPLC). De igual modo, a escolha do tipo de detector depende do analito a pesquisar.

A necessidade em proceder à extracção dos pesticidas em grandes volumes de água como compensação pelas baixas concentrações de analitos requer o uso de procedimentos de pré-concentração adequados. As escolhas podem ser variadas, sendo que a opção mais comum recai sobre a extracção em fase sólida (SPE). Outras técnicas extractivas, como a microextracção em fase sólida (SPME) e a extracção em fase líquida (LLE) também podem ser utilizadas, apesar desta última apresentar geralmente baixos rendimentos extractivos e a utilização de solventes é elevada [62-64].

1.2.1. Metodologia analítica em águas

Em 1976, *Visi et al.* [65, 66] iniciaram na Hungria um programa de avaliação dos níveis de resíduos de pesticidas em águas superficiais. Numa fase inicial usaram a LLE, que em 2001 foi substituída pela SPE, dadas as vantagens no que respeita ao tempo de análise e ao custo, embora mantendo idênticas taxas de recuperação (entre 70-110%). De acordo com a metodologia implementada a partir de 2001, esta técnica de monitorização usa equipamento de GC-ECD (cromatografia gasosa com detector captura de electrões).

Boul, L. em 1987 estudou a concentração de Organofosforados em águas para consumo na Bulgária, nomeadamente o diazinão, o dimetoato, o clorpirifos, entre outros, utilizando LLE com recurso a vários tipos de solventes extractivos. Dentre os solventes estudados, o acetonitrilo foi o que apresentou melhores resultados, com percentagens de recuperação superiores a 87%. Estes pesticidas organofosforados foram analiticamente determinados por GC-ECD [67].

Em 1996, Liska I. e J. Slobodnik dois investigadores de nacionalidade eslovaca, elaboraram um artigo de revisão científica com o objectivo em estabelecer a comparação entre a determinação de pesticidas em águas por cromatografia gasosa e por cromatografia líquida. Até à data da sua publicação, a cromatografia líquida era a técnica analítica mais utilizada na determinação em simultâneo de vários pesticidas polares. Por outro lado, quando se

pretende analisar triazinas e outros herbicidas ambas as técnicas cromatográficas podem ser aplicadas [68].

Em 2000, *Azevedo D., et al.* estabeleceu a comparação entre técnicas de cromatografia gasosa e líquida, acopladas com detectores de massas para a detecção de 48 pesticidas. As colheitas de amostras de água foram efectuadas em rios de Portugal e o processo de extracção usado foi SPE, obtendo-se percentagens de recuperação para a maioria dos compostos superior a 70%. A comparação entre o tipo de cromatografia empregue permite concluir que os pesticidas podem ser convenientemente analisados por GC-MS e por LC-MS. No entanto, na análise por GC-MS alguns dos pesticidas estudados têm de sofrer processos de derivatização apresentando uma demora acrescida na execução da preparação da amostra relativamente à cromatografia líquida [69].

Nagaraju D., e Huang S. publicaram em Maio de 2007, os resultados do estudo da determinação de triazinas em águas por GC-MS comparando duas técnicas de microextracção, a já aqui abordada microextracção em fase sólida (SMPE) e a microextracção líquido-líquido (MELL). Este estudo demonstrou que o recurso à MELL reduz consideravelmente o tempo de extracção necessário para extracção daqueles analitos em relação à SPME. Para além disso, trata-se de um procedimento extractivo menos dispendioso e mais simples, apesar de ambos conduzirem a idênticos limites de detecção na análise por GC/MS [70].

Yu Zhi-gang *et al.*, em 2009 determinaram herbicidas e respectivos metabolitos em amostras de água de rios, na província de Heilongjiang, China. O equipamento utilizado foi LC-MS equipado com uma pré-coluna de derivatização, que foi determinante para os bons resultados obtidos. Na extracção foram usadas colunas SPE, cujas percentagens de recuperação rondaram os 80% [71].

1.3. Pesticidas no homem

O risco de exposição aos pesticidas não apresenta relevância apenas para quem os manuseia, no decurso das práticas agrícolas, mas também abrange toda a população que manuseia alimentos e que durante todo o processo de crescimento foram alvo de exposição aos mesmos por via da alimentação.

Estima-se que, actualmente, em todo mundo cerca de 3 milhões de pessoas estejam contaminadas por pesticidas, das quais 70% correspondem a populações de países em desenvolvimento [60].

No sentido de monitorizar a exposição a pesticidas podem ser encaradas vários tipos de abordagens com incidência no tipo de agente tóxico e na forma de contacto entre agente e indivíduo.

Ao longo do tempo tem-se verificado que os pesticidas oferecem risco para saúde humana [72], sendo considerados potenciais mutagénicos, na medida em que alteram a actividade dos ácidos nucleicos [73].

De acordo com a casuística da Delegação do Norte do INML, I.P., entidade responsável pela determinação de pesticidas em casos mortais no homem residentes na região norte, o número de casos de contaminação letal actualmente provocados pelo uso dos pesticidas tem vindo a decrescer. No entanto, em 1997 foi publicado um estudo referente ao número de perícias toxicológicas entre 1987-1996, onde se constatou que entre este período ocorreram 537 casos de contaminação por pesticidas, registando-se um pico de 75 e 74 casos em 1988 e 1989 respectivamente. Da mesma publicação sabe-se que a etiologia mais comum é o suicídio e que os pesticidas mais utilizados em 465 casos são os insecticidas, especialmente da família dos organofosforados, seguindo-se os herbicidas com 9 casos [74].

No ano de 2006 a mesma delegação apresentou dados que revelaram que entre o ano de 2000-2005 das 514 perícias toxicológicas realizadas, detectou-se que o pesticida clorfenvinfos estava presente em 31% das perícias, seguindo-se o dimetoato com 22%. Este estudo corrobora com o publicado pela mesma instituição em 1997 dado que a etiologia mais comum é o suicídio [75].

Bertrand Nadel e Sandrine Rouland em 2005 demonstraram que os agricultores expostos a pesticidas apresentaram um maior risco de desenvolver neoplasias no sistema linfático. Face a esta informação e devido ao impacto criado, resolveu-se prolongar o estudo até 2009. O estudo realizado em Marselha, designado por *Agrican* apresentava como principal objectivo desenvolver biomarcadores que testemunhem uma ligação molecular entre a exposição dos agricultores aos pesticidas, a anomalia genética e a proliferação dessas células, reconhecidas como precursoras de cancro. Esse efeito é em função da dose e do tempo de exposição.

Esse estudo, baseava-se em duas formas de monitorização, uma primeira que consistia na elaboração de um inquérito, e uma segunda que incidia em análises biológicas, em amostras de sangue [76].

Torna-se cada vez mais importante dispor de estudos de monitorização do risco destas substâncias baseados em metodologias analíticas em diferentes matrizes, que elucidem no sentido de adopção de políticas e normas de uso dos produtos pesticidas, bem como de medidas para combate ao risco e aos danos que tais produtos podem causar ou causam no meio ambiente e no Homem.

1.3.1. Metodologia analítica no homem

Em 1992, um grupo de investigadores liderado por Kumazawa T., especialista, publica um método analítico que permite a rápida adsorção de triazinas através das colunas C₁₈ (SPE) a partir de fluidos biológicos com vista à sua análise por cromatografia gasosa (GC) com detector ionização de chama (FID) e detector de fósforo-azoto (NPD), obtendo resultados satisfatórios que os possibilita serem utilizados na rotina laboratorial [77]. Em 2007, Inoue *et al.*[78] utiliza as mesmas SPE que Kumazawua e implementa um método rápido por LC-MS para a detecção de Organofosforados em soro humano, obtendo-se valores de detecção mais baixos.

Jia G. *et al.*, em 2007, determinaram a quantidade de organofosforados em urina humana por GC com detector de fotometria de chama (GC-FPD). Estes investigadores relacionaram a percentagem de recuperação com a temperatura da urina durante o processo de extracção e verificaram que para uma temperatura superior a 70°C os compostos se decompunham, sendo que a temperatura óptima considerada foi de 50°C. Neste estudo obtiveram-se valores de precisão inferiores a 5% e limites de detecção superiores a 0,04 µg/L [79].

Além das cromatografias gasosa e líquida, podem ser utilizadas outras técnicas para a detecção de pesticidas no homem, nomeadamente através do recurso a técnicas de imunoensaios (ELISA) [80-82] apesar de não serem tão específicas e fiáveis como as primeiras.

1.4. Legislação

A grande maioria dos pesticidas são considerados substâncias perigosas, pelo que existe em Portugal, desde 1967, legislação específica (à semelhança do que ocorre por exemplo para as substâncias radioactivas), a par da legislação relativa às Substâncias Químicas Perigosas (ex: Decreto-Lei 225/83, Decreto-Lei 280-A/87, Portaria 732-A/96 e Decreto-Lei 154-A/2002).

Na legislação específica dos pesticidas destaca-se [83]:

- O Decreto-Lei 47/802 de 197/67, que deu início à homologação dos pesticidas agrícolas;
- O Decreto-Lei 48/988 de 8/5/69, que criou, dois anos depois, a Comissão de Toxicologia dos Pesticidas (CTP), que estabeleceu o regime jurídico de classificação, embalagem e rotulagem dos pesticidas e dos adjuvantes de uso extemporâneo;
- O Decreto-Lei 294/88 de 24/8/88, que, três anos depois da integração de Portugal na CEE, adaptou os princípios constantes das directivas comunitárias, a legislação anterior relativa à classificação, embalagem e rotulagem dos pesticidas;
- O Decreto-Lei 284/94, que extinguiu a CTP e procedeu à sua substituição pela Comissão de Avaliação Toxicológica dos Produtos Fitofarmacêuticos e procurou iniciar a revisão do sistema de homologação, de acordo com a directiva 91/414/CEE;
- O Decreto-Lei 94/98 de 15 de Abril, que sete anos após a publicação da Directiva 91/414/CEE, definiu as regras da homologação a adoptar, após a eliminação das “inúmeras imprecisões de ordem formal e lacunas técnicas da legislação anterior”, “...expurgando esses erros”;
- O Decreto-Lei 82/2003 de 23 de Abril, que, quatro anos depois, transpôs para o direito nacional a Directiva 1999/45/CE de 31 de Maio, que tornou obrigatória a inclusão, nos rótulos e nas fichas de dados de segurança, da informação disponível sobre a classificação toxicológica e frases de risco e de segurança e alargou aos pesticidas a legislação anteriormente adoptada para as substâncias químicas perigosas, nomeadamente: a classificação toxicológica e as frases de risco;
- O Decreto-Lei 22/2004 de 22 de Janeiro, que completou os anexo IV e V da Directiva 91/414/CEE relativos às frases de risco e frases de segurança a adoptar com os pesticidas agrícolas.
- O Decreto-Lei nº208/2008 para águas subterrâneas e o Decreto-Lei nº306/2007 destinado a águas para consumo humano, estabelecem que o valor máximo permitido por cada pesticida é de 0,1 µg/L e que no colectivo não devem ultrapassar os 0,5 µg/L [107,108].

Em Portugal, o uso de pesticidas na agricultura actualmente depende dos registos fixados pelos órgãos competentes, Ministério da Saúde (MS), do Ministério da Agricultura e Desenvolvimento Rural e das Pescas, regendo-se também pelas Directivas e Normas vigentes na Comunidade Europeia.

Os órgãos competentes, citados acima, expressam-se através dos Regulamentos (CEE) 2092/91 e Regulamento (CEE) 2078/92.

Relativamente ao manuseamento de produtos fitofarmacêuticos Portugal rege-se pelo Decreto-Lei 101/2009, onde estão estabelecidas as condições para a venda e aplicação dos mesmos, exigindo que a partir de 1 de Janeiro de 2011 todo e qualquer empresário agrícola que aplique produtos fitofarmacêuticos, deverá estar habilitado para o efeito [84].

1.5. Concelho de Esposende

Um estudo realizado pelo Instituto Nacional de Estatística (INE) a zona Entre Douro e Minho apresenta um risco significativo para o ambiente, (Figura 1.5), devido à elevada utilização de fertilizantes e pesticidas comparativamente com o resto do País, (Figura 1.6) [90].

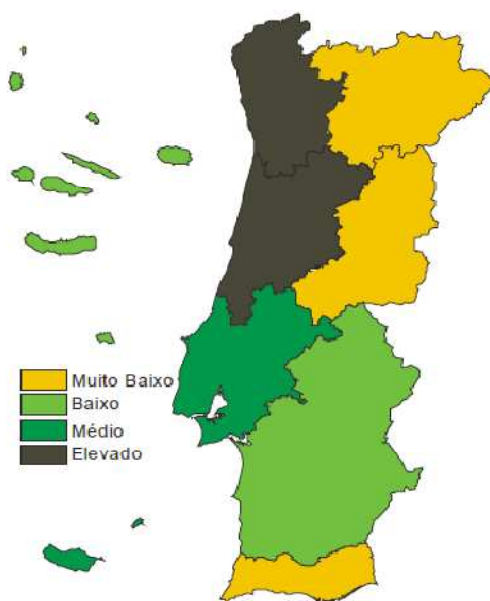


Figura 1.5 Risco relativo para o ambiente representado pelas forças motrizes da agricultura sobre o ambiente, por região [90]

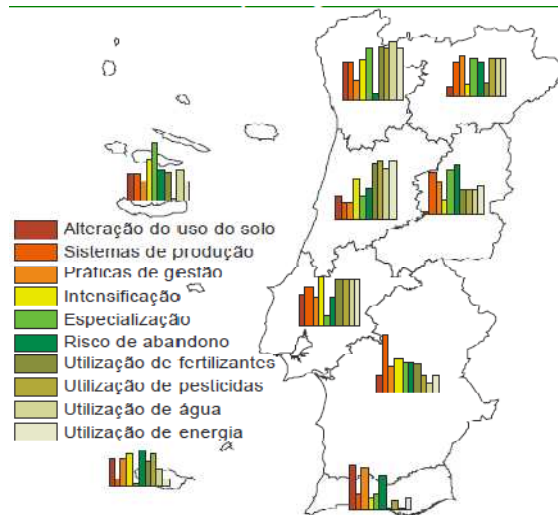


Figura 1.6 Importância de cada indicador de “forças motrizes” na atribuição do risco relativo para o ambiente, por região [90]

Ressalta-se que de uma forma global, Portugal se encontra entre os cinco Estados Membros com melhores indicadores em termos agro-ambientais, sendo que a nível europeu os países que apresentam um maior risco ambiental são por exemplo; a Itália, a Holanda, a Dinamarca, a Bélgica e a Grécia [90].

Actualmente o território de Esposende é classificado pela Direcção Regional da Agricultura da Pescas do Norte (DRAPN) como zona vulnerável nº1 (ZV1), da qual fazem parte todas as freguesias do seu Concelho. Esta zona foi assim assinalada devido à sua susceptibilidade relativamente à poluição provocada pelo uso excessivo de nitratos e devido às práticas agrícolas, contribuindo assim para a poluição das mesmas. Por estas razões os pesticidas a pesquisar em 2010 em águas para consumo humano no concelho de Esposende são; o alacloro, a atrazina, a bentazona, o diurão, o linurão, o S- metolacloro e a terbutilazina [85].

O DRAPN, disponibiliza os “programas de acção” elaborados por cada Estado Membro, visando sempre os objectivos na “Directiva Nitrato”. Actualmente o que se encontra em vigor foi aprovado pela Portaria nº556/2003 de 12 de Julho. Esta Directiva encontra-se em revisão devido ao alargamento da área vulnerável [86].

O concelho de Esposende é constituído por 15 freguesias e abarca uma área de 95,18 km². Sendo o segundo concelho mais pequeno do Distrito de Braga, no entanto, é aquele que apresenta a maior densidade populacional (334 habitantes/km²) de toda a província do Minho [87].

A sua morfologia permite distinguir duas zonas de características bem distintas. Uma que abrange a zona costeira (área de várzea e veiga) [87], que é banhada pelo Oceano Atlântico a poente, numa extensão aproximadamente de 14 km e outra que é atravessada pelos rios Cávado, mais a sul, e pelo Neiva, a Norte. É uma região com características periurbanas, em que o nível económico assentava (hoje com menor relevo, mas ainda considerável) em actividades agro-pecuárias, onde ocorre o cultivo de cereais como o milho, vinhos, legumes, e criação de gado bovino [88].

A localização morfológica, a aproximação ao Litoral e ao nível freático à zona radicular, a elevada permeabilidade dos solos e a utilização intensiva de adubos constituem factores de grande vulnerabilidade que podem conduzir à poluição das águas subterrâneas, com nitratos de origem agrícola.

Por vezes, as contínuas adubações tradicionais realizadas neste Município ultrapassam as quantidades máximas impostas pela Direcção Regional de Agricultura e Pescas do Norte (DRAPN) [86, 89].

Uma outra actividade agrícola tradicional coexiste em Esposende, que aproveita as boas condições edafo-climáticas do concelho, ligada à produção hortícola, intensiva mão-de-obra e outros factores de produção [88]. Esta actividade agrícola encontra-se fortemente dependente dos recursos naturais, dando origem a uma relação muito particular entre a agricultura e o ambiente. É inequívoco que a essas actividades agrícolas estejam associados a riscos de exposição ocupacional e eventuais problemas de saúde pública a produtos potencialmente tóxicos, como por exemplo os pesticidas.

1.6. Cromatografia Gasosa com Detector de Captura de Electrões

A cromatografia gasosa é uma técnica para separação e análise de mistura de substâncias voláteis. A amostra é vaporizada e introduzida num fluxo de gás adequado designado de fase móvel ou gás de arraste. Este gás arrasta a amostra vaporizada e passa por um tubo contendo a fase estacionária -coluna cromatográfica, onde ocorre a separação da mistura. Esta técnica apresenta um importante papel na quantificação de pesticidas nas mais diversas matrizes, devido à disponibilidade de detectores sensíveis e selectivos. O Detector de Captura de Electrões (ECD) permite a detecção e análise de vários pesticidas nomeadamente os organoclorados, mas de uma maneira geral todos os compostos halogenados, com níveis de detecção bastante inferiores aos detectores de chama (nomeadamente os FID).

O ECD baseia-se na captura de electrões gerados a partir de um fonte de radiação β , geralmente ^{63}Ni , fechada numa célula com um gás inerte (N_2). Se uma voltagem é aplicada, os electrões ao serem capturados pelo ânodo geram uma corrente eléctrica de fundo. Se as moléculas electrofílicas (por exemplo, compostos orgânicos que na sua composição têm halogéneos) entram na célula, absorvem parte dos electrões e são ionizadas com carga negativa produzindo desse modo um sinal no detector.

1.7. Técnica de Extração SPE

A extração em fase sólida é uma técnica de separação Sólido - Líquido. Esta técnica baseia-se na interacção molecular específica entre o analito presente numa matriz líquida e um adsorvente sólido e posteriormente à eluição do analito com um solvente apropriado. O sucesso dessa técnica depende da afinidade do analito ao ser extraído da matriz com o adsorvente e da facilidade de eluição dessa substância pelo solvente usado para extrair o analito. As etapas da SPE são [64];

- Condicionamento do cartucho, que corresponde à etapa de activação do material do cartucho com um solvente apropriado.
- Adição da amostra, que corresponde à passagem da amostra pelo cartucho. Esta passagem deverá ser quantitativa de forma a não comprometer a reprodutibilidade da extração. O caudal de passagem deverá ser aproximadamente de 2 mL/min de forma a garantir que os analitos ficam adsorvidos no sorvente.
- Remoção dos interferentes; esta etapa consiste em fazer passar lentamente um solvente inerte pelo cartucho, de forma a eliminar os interferentes sem eluir os analitos. Normalmente o solvente de eleição é o solvente da amostra.
- Eluição do Analito; durante esta etapa, os analitos são recuperados num pequeno volume de solvente apropriado. A escolha do solvente deve permitir a eluição dos analitos e manter retidos os compostos interferentes. O procedimento deve ser executado pela passagem de, no mínimo, duas alíquotas favorecendo assim um aumento do tempo de interacção. Quando há imiscibilidade entre solventes antes da etapa de eluição, deve-se secar o cartucho.

O material adsorvente mais utilizado quando se trabalha com pesticidas é a sílica modificada. Os grupos químicos ligam-se e interagem com os compostos e podem apresentar polaridades variáveis tais como os hidrocarbonetos lineares C_8 e C_{18} , grupos ciano ou amino, etc. Também podem ser utilizados como adsorventes algumas resinas

poliméricas, no entanto, a sílica apresenta vantagens nomeadamente em questões de limpeza da coluna, menor gasto de solventes e apresentam menos interferências. As resinas poliméricas têm um custo mais reduzido e permitem um volume de extracção maior em menos tempo [62].

1.8. Validação de Procedimentos Analíticos

Sempre que se procede ao desenvolvimento de um procedimento de análise cromatográfica, como em qualquer outra técnica analítica, torna-se importante proceder à validação do procedimento analítico para avaliar o grau de confiança e se os resultados são fidedignos, de forma a ser aplicado na rotina laboratorial [91]. Na determinação da concentração de pesticidas devem ser desenvolvidos métodos de extracção eficientes, bem como procedimentos analíticos com alta selectividade, a fim de assegurar que caso estejam presentes nas amostras analisadas, seja possível a sua separação e a posterior quantificação [92]. A validação de um procedimento analítico consiste na avaliação da capacidade do processo analítico em produzir resultados compatíveis com a precisão e a exactidão, consideradas na prática, como satisfatórias. A variabilidade associada a um procedimento analítico, deve levar em consideração todas as incertezas do processo, incluindo aquelas atribuídas aos equipamentos, soluções de referência, calibrações, analista e ambiente [93].

A validação de um procedimento que emprega técnicas cromatográficas, pode ser considerado como a soma de diferentes etapas de validação a serem incluídos no processo analítico. Em geral, a validação envolve a execução e a interpretação do procedimento. Desta forma, todas as variáveis devem ser consideradas, tais como: estratégia de amostragem, preparação da amostra, detecção e tratamento dos dados [53].

Os parâmetros geralmente envolvidos na validação de procedimentos analíticos são: especificidade/selectividade, capacidade de identificação, limites de detecção e quantificação, Relação Sinal/Ruído, linearidade e curva de calibração, precisão (repetibilidade, precisão intermédia e reprodutibilidade), exactidão eficiência de extracção e arrastamento [53, 94, 95].

1.8.1. *Especificidade/Selectividade*

A selectividade de um método instrumental de separação é a capacidade de avaliar, de forma inequívoca, as substâncias que se pretendem detectar e avaliar a presença de compostos que podem interferir com a sua determinação numa amostra complexa. A selectividade avalia o grau de interferência de espécies como por exemplo componentes de matriz, metabolitos, impurezas e produtos de degradação. A selectividade garante que o pico de resposta seja exclusivamente do analito. Se a selectividade não estiver assegurada, parâmetros como a linearidade, a exactidão e a precisão encontram-se comprometidos.

Os termos selectividade e especificidade são muitas vezes utilizados como conceitos sobreponíveis, o que pode gerar controvérsia, no entanto a IUPAC sugere que apenas deverá ser utilizado o termo selectividade. Um método instrumental de separação que produz resposta para uma única substância de interesse, normalmente um dado elemento, pode ser chamado específico e um método que produz resposta para vários compostos químicos, com uma característica em comum, pode ser chamado selectivo. A selectividade é o primeiro passo no desenvolvimento e validação de um método instrumental de separação e deve ser reavaliada continuamente durante a validação e durante uso do método [96, 97]. De acordo com esta definição, a técnica de GC/MS, muito utilizada em análises laboratoriais, pode ser considerada específica.

Quando não é utilizado um equipamento acoplado com massas, exemplo GC/MS, consideram-se interferentes os compostos que originem sinais com uma resolução inferior a 1,0 ($R < 1$), ver equação 1.1.

Em métodos quantitativos, consideram-se interferentes os compostos que originem erros e valores de repetibilidade superiores a 20 %.

O valor de R calcula-se segundo a equação:

$$R = 2x \frac{(tr2 - tr1)}{Wb2 + Wb1} \quad \text{Equação 1.1}$$

Onde:

tr1- tempo de retenção do primeiro pico

tr2- tempo de retenção do segundo pico

Wb1- largura da base do primeiro pico

Wb2- largura da base do segundo pico

1.8.2. Capacidade de Identificação

A determinação da capacidade de identificação consiste na injeção de 10 amostras positivas em condições normais de utilização, aplicando os critérios de identificação em vigor. Este teste pode ser realizado em conjunto com a avaliação da especificidade/selectividade. O método é considerado adequado se a percentagem de falsos resultados negativos for igual ou inferior a 10% [95].

1.8.3. Limite de Detecção e Limite de Quantificação

A sensibilidade de um procedimento analítico como um todo é, normalmente, definida em termos de Limite de Detecção (LOD) e Limite de Quantificação (LOQ) [98]. O LOD representa a menor concentração da substância em exame que pode ser detectada, mas não necessariamente quantificada, sendo geralmente expresso em unidades de concentração.

O LOQ é a menor concentração de soluto que pode ser determinada com precisão e exactidão aceitáveis nas condições experimentais e também é geralmente expresso em unidades de concentração [95].

O limite de detecção é determinado segundo a Equação 1.2 e o limite de quantificação determinado pela Equação 1.3.

$$\text{LOD} = \frac{3,3 \times S_{x/y}}{a} \quad \text{Equação 1.2}$$

$$\text{LOQ} = \frac{10 \times S_{x/y}}{a} \quad \text{Equação 1.3}$$

Em que:

$S_{x/y}$ - é o desvio padrão residual da curva de calibração;

a- é o declive da recta

1.8.4. Relação Sinal/Ruído

O ruído é a flutuação da linha de base do cromatograma. É a diferença entre a maior altura e a maior profundidade dos picos, não relacionada a nenhum composto detectado. Com o tempo, muda o ruído e conseqüentemente o LOD e o LOQ. É por isso que os instrumentos

devem ser verificados com frequência e os dados reportados de acordo com a variação em cada aquisição [99].

Para determinar a relação sinal/ruído é feita a comparação entre a medida dos sinais de amostras com baixas concentrações conhecidas do(s) composto(s) de interesse e um branco. A relação sinal/ruído deve ser de 3:1, proporções aceitáveis como estimativas do LOD. Os mesmos critérios podem ser adoptados para o LOQ, utilizando a relação 10:1 [95, 100].

1.8.5. Eficiência da Extração

A recuperação (Rec) avalia a eficiência do método de extração do analito em amostras fortificadas da matriz e é normalmente expressa em termos de percentagem. Depende da concentração, por isso deve ser avaliada na faixa de concentração esperada para a amostra e utilizam-se níveis próximos nesta faixa de fortificação [92]. A recuperação é calculada através da equação 1.4.

$$Rec (\%) = \frac{\text{massa obtida}}{\text{massa real}} \times 100 \quad \text{Equação 1.4}$$

A avaliação deste parâmetro só é possível em procedimentos extractivos que não incluam reacções químicas de derivatização. Nesses casos, apenas é possível avaliar a eficiência da extração dos passos anteriores a essa derivatização.

Para métodos quantitativos as concentrações testadas devem obedecer aos seguintes critérios:

- A concentração correspondente à “gama baixa” deve ser superior ao limite de detecção;
- A concentração correspondente à “gama alta” deve ser igual ou inferior ao limite de quantificação;

1.8.6. Efeito Matriz

Do ponto de vista da validação de métodos cromatográficos, os requisitos necessários para a validação estabelecidos pelas agências reguladoras são basicamente os mesmos, independentemente do sistema de detecção usado. Segundo *Rogatsky* e *Stein* [100], o efeito matriz em cromatografia pode ser avaliado da seguinte forma: adicionar o analito a

uma amostra branca e comparar a razão sinal-ruído, área ou altura do pico obtido pelo método com o analito adicionado ao solvente puro. Quando não houver uma matriz branca podem ser comparados por adição de um padrão interno marcado isotopicamente à amostra e ao solvente puro. No entanto, não fica explícito se a adição do analito deverá ser realizada antes do preparação da amostra ou no extracto final pronto a ser injectado. Nesse sentido, salienta-se a importância que para uma avaliação do efeito matriz, deverão ser comparados os sinais obtidos para os analitos adicionados na matriz após esta ter passado pelo procedimento de extracção, com o sinal do analito no solvente (solução padrão). Se for comparado o sinal obtido na análise da amostra branco que tenha sido fortificada com o(s) analito(s) antes da preparação da mesma, com o sinal do analito no solvente, o que estará a ser avaliado de facto será o efeito matriz mais a eficiência da extracção [102-104].

1.8.7. Arrastamento

Em análises laboratoriais por vezes são analisadas amostras em que os compostos apresentam concentrações elevadas, por essa razão a avaliação deste parâmetro não deve ser negligenciada. O arrastamento consiste na retenção na coluna cromatográfica do composto que se identifica nas injeções seguintes. Neste caso, deverão ser adoptadas as acções correctivas que permitam eliminar a sua ocorrência.

1.8.8. Precisão

A precisão representa a dispersão de resultados entre ensaios independentes, repetidos de uma mesma amostra, amostras semelhantes ou padrões, sob condições definidas. Normalmente é expressa através da estimativa do desvio padrão relativo (RSD), calculado pela Equação 1.5.

$$RSD = \frac{s}{x_m} \times 100 \quad \text{Equação 1.5}$$

Onde:

s- estimativa do desvio padrão absoluto $\left\{ \sum \frac{(x_i - x_m)^2}{n-1} \right\}^{1/2}$;

x_i- valores individuais;

x_m- média de uma série de medidas (replicatas);

n- numero de medidas.

A precisão pode ser determinada em termos de repetibilidade e precisão intermédia.

A repetibilidade representa a concordância entre os resultados de medições sucessivas de um mesmo método, efectuadas sob as mesmas condições de medição, chamadas condições de repetibilidade: mesmo procedimento, mesmo analista, mesmo instrumento usado sob as mesmas condições, mesmo local e repetições em curto intervalo de tempo [97].

A precisão intermédia indica o efeito das variações dentro do laboratório devido a eventos como diferentes dias ou diferentes analistas, diferentes equipamentos ou uma combinação destes factores. Esta medida da precisão é reconhecida como a mais representativa da variabilidade dos resultados em um único laboratório e, como tal, mais aconselhável a ser adoptada. O objectivo da validação da precisão intermédia é verificar que no mesmo laboratório o método fornecerá os mesmos resultados depois de estar finalizado [97].

A reprodutibilidade é o grau de concordância entre os resultados das medições de uma mesma amostra, efectuadas sob condições variadas (mudança de operador, local, equipamentos, etc.). Este parâmetro refere-se a estudos de colaboração entre laboratórios e deve ser considerado em situações como a padronização de procedimentos analíticos. É muito comum encontrar divergências nas análises realizadas em diferentes laboratórios para a mesma amostra. Frequentemente, variações assinaláveis são observadas entre os resultados. Assim, os dados provenientes de apenas um laboratório não são suficientes para avaliar a reprodutibilidade do método.

As ferramentas mais usadas actualmente pelos laboratórios de análise química para a determinação da precisão são a ferramenta informática ANOVA (factor único), através da qual podem ser obtidos os valores da repetibilidade e da precisão intermédia. As expressões matemáticas utilizadas estão apresentadas na Tabela 1.8.

Tabela 1.8 Tabela ANOVA (factor único)

Fonte	Média Quadrática (MQ)	Graus de Liberdade
Dentro de Grupos	$MS_{run} = \frac{n \sum_{i=1}^p (\bar{X}_i - \bar{\bar{X}})^2}{p - 1}$	p-1
Entre Grupos	$MS_r = \frac{\sum_{i=1}^p \sum_{j=1}^n (X_{ij} - \bar{X}_i)^2}{p(n - 1)}$	p(n-1)
Total		pn-1

Onde:

p é o número de sequências de cada análise para cada nível de concentração (uma sequência para cada nível)

n é o número de replicados em cada sequência

X_{ij} representa um replicado individual (replicado j) obtido na sequência i

\bar{X}_i representa a média de n replicados obtidos na sequência i .

$\bar{\bar{X}}$ é a média das médias de p sequências.

Para calcular a estimativas da precisão usa-se a expressões matemáticas que se situam na Tabela 1.9. A precisão obtidas nestas condições é representada de acordo com a norma ISO 5725-3:1994.

Tabela 1.9 Cálculo das estimativas da precisão

Precisão	Expressão
Repetibilidade (S_r)	$S_r = \sqrt{MS_r}$
Reprodutibilidade (S_{run})	$S_{run} = \sqrt{\frac{MS_{run} - MS_r}{n}}$
Precisão intermédia (S_1)	$S_1 = \sqrt{(S_r^2) + (S_{run}^2)}$

Para o cálculo da precisão, o cálculo do desvio padrão e do coeficiente de variação é obrigatório. Para estudar o comportamento ao longo da gama de trabalho:

- Se o desvio padrão for aproximadamente constante ao longo da gama de concentração, ele poderá ser estimado através da análise de todos os resultados obtidos para a gama de trabalho. Pode aplicar-se o teste F para testar a homogeneidade de variâncias;
- Se o coeficiente de variação (CV) for aproximadamente constante ao longo da gama de trabalho, utiliza-se a equação 1.6.

$$CV = \sqrt{\frac{(n_1-1)xCv_1^2 + (n_2-1)xCv_2^2}{(n_1-1) + (n_2-1) + \dots}} \quad \text{Equação 1.6}$$

Se, simultaneamente, o desvio padrão e o coeficiente de variação não forem constantes ao longo de toda a gama de trabalho, indicam-se os valores calculados para a gama baixa, média e alta.

1.8.9. Exactidão

Representa o grau de concordância entre os resultados individuais obtidos numa amostra e um valor de referência aceite como verdadeiro. É importante salientar que um valor exacto ou verdadeiro é o valor obtido por uma medição perfeita e este valor é indeterminado por natureza. A exactidão é sempre considerada dentro de certos limites, a um dado nível de confiança (ou seja, aparece sempre associada a valores de precisão). Estes limites podem ser estreitos em níveis de concentração elevados e mais amplos em níveis vestigiais.

Os processos mais utilizados para avaliação da exactidão de um método são: materiais de referência; comparação de métodos; ensaios de recuperação e adição padrão.

1.8.10. Gama de trabalho e Linearidade

A linearidade corresponde à capacidade do método fornecer resultados directamente proporcionais à concentração do analito, dentro de uma determinada faixa de aplicação. A correlação entre o sinal medido (área ou altura do pico) e a massa ou concentração da espécie a ser quantificada muito raramente é conhecida *à priori*. Na maior parte dos casos, a relação matemática entre o sinal e a concentração ou massa da espécie de interesse deve ser determinada empiricamente, a partir de sinais medidos para massas ou concentrações conhecidas dessa espécie. Essa relação matemática, normalmente expressa como uma equação da recta é designada por curva de calibração [96].

Com o estudo da curva de calibração e linearidade procura-se investigar se, para um determinado intervalo de concentrações, os sinais analíticos são directamente proporcionais às concentrações utilizadas. A norma ISO 8466-1:1990 estabelece um teste estatístico para a avaliação da linearidade.

1.8.11. Robustez

A robustez de um método mede a sensibilidade que esta apresenta com pequenas variações. Logo, considera-se que o método é robusto quando sujeito a pequenas variações, não altera nenhum dos parâmetros. No caso dos métodos cromatográficos os parâmetros normalmente avaliados são, entre outros; programação da temperatura, natureza do gás de arraste, tempo de extracção ou agitação. As mudanças introduzidas reflectem-se quando um método é transferido para outros laboratórios, analistas ou equipamentos [96].

2. Objectivos

2.1. Objectivo Geral

- Monitorizar pesticidas existentes em águas de poços agrícolas do concelho de Esposende.

2.2. Objectivos Específicos

- Desenvolver e validar uma técnica analítica para determinação simultânea de alguns pesticidas em águas, nomeadamente a atrazina e respectivos metabolitos (desetilatraxina e deisopropilatraxina), a simazina, a terbutilazina e o metabolito desetilterbutilazina, o folpete, o dimetoato, o diazinão, o malatião e clorpirifos e o azinfos-metilo.
- Quantificar os teores dos pesticidas relatados no tópico anterior em poços agrícolas na área de Esposende.
- Estimar a sensibilidade dos agricultores para a realização periódica de análises a águas.

3. Metodologia

Para a execução deste trabalho, realizou-se uma pesquisa, de forma a expor os principais pesticidas responsáveis pelo desequilíbrio orgânico no homem e de que forma é que estes permanecem continuamente no organismo humano e no ambiente. Após esta pesquisa iniciou-se o processo de desenvolvimento analítico, destinado a implementar um procedimento de separação cromatográfica optimizados, considerando-se como parâmetros de selecção do método, a melhor resolução, a maior sensibilidade e o menor tempo de análise.

O passo seguinte foi a optimização do método de extracção e pré-concentração dos analitos em água, por utilização de extracção em fase sólida (SPE). Posteriormente, procedeu-se a validação do procedimento para análise dos pesticidas seleccionados.

No decurso da colheita das amostras de águas no concelho de Esposende foi aplicado um pequeno questionário aos consumidores de forma a avaliar a percepção destes perante a utilização da água.

A componente analítica foi realizada no laboratório do Grupo de Reacção e Análises Químicas (GRAQ) -Instituto Superior de Engenharia do Porto.

3.1. Recolha de dados para a caracterização da amostra

Todos os dados foram recolhidos a partir de habitantes de Esposende.

3.2. Aplicação dos questionários de colheita

Os questionários, para além de um instrumento de identificação servem para recolha de informações por via da resposta a perguntas, tendo como objectivo a recolha de informações complementares a uma dada amostra.

Seleccionou-se esta ferramenta de recolha de informação por se revelar de suma importância, principalmente quando se está perante variáveis de natureza subjectiva, nomeadamente sobre a utilização de equipamentos de protecção individual. A construção do questionário, foi realizada de um modo estruturado, tendo-se em consideração os itens a estudar e a facilidade de interpretação dos mesmos. Devido ao grau de escolaridade dos inquiridos optou-se pela elaboração de um questionário de colheita rápido e com reduzido número de questões.

O questionário foi preenchido durante a colheita de águas no concelho de Esposende e pelos respectivos agricultores durante o mês de Junho de 2010. Foi distribuído pessoalmente, de forma a transmitir aos agricultores a garantia de confidencialidade das respostas, através da qual se pretende minimizar qualquer distorção dos resultados. Este apresentou uma duração de aproximadamente 5 minutos, tendo sido devolvido de imediato.

3.2.1. Aplicação dos questionários

O primeiro grupo de questões, está relacionado com a caracterização individual e baseia-se na recolha de aspectos de identificação, tais como, idade e sexo.

No preenchimento do questionário é atribuído um número de processo (canto superior direito). Este número irá permitir o reconhecimento do questionário, durante o processamento dos dados (Figura 3.1).

Questionário: Amostragem de Água		
		Processo N.º ____ / ____
		Data: ____ / ____ / ____
ELEMENTOS DE IDENTIFICAÇÃO		
Sexo ____	Idade ____ (anos)	Profissão: _____
Distrito:	Concelho:	Freguesia:
AMOSTRA		
Finalidade da amostra:		
<input type="radio"/> Agrícola <input type="radio"/> Consumo <ul style="list-style-type: none"> • Número de consumidores: _____ 		
APLICAÇÃO DE PESTICIDAS EM ACTIVIDADES AGRÍCOLAS		
<input type="radio"/> Sim. <input type="radio"/> Não		
UTILIZAÇÃO DE EQUIPAMENTOS DE PROTECÇÃO INDIVIDUAL		
<input type="radio"/> Sim. <input type="radio"/> Não		
ANÁLISE DA ÁGUA		
Alguma vez realizou análises à água?		
<input type="radio"/> Sim. <input type="radio"/> Não		
Possui confiança na qualidade da água que tem à sua disposição?		
<input type="radio"/> Sim. <input type="radio"/> Não		
PATOLOGIAS		
Tem conhecimento da ocorrência de doenças, como o cancro na sua área de residência?		
<input type="radio"/> Sim. <input type="radio"/> Não		

Figura 3.1 Questionário de Amostragem de águas aplicado no concelho de Esposende

A recolha destes dados foi efectuada no sentido de se caracterizar a amostra e averiguar uma eventual relação entre os compostos obtidos nas análises, a percepção que os agricultores têm da água.

3.3. Amostragem

Recorreu-se à utilização de recipientes de vidro Âmbar, com 1 L de capacidade, devidamente identificado com um rótulo tal como se observa na Figura 3.2. Estes recipientes reduzem a actividade fotossintética, a fixação de determinadas espécies químicas às suas paredes e/ou a reacção de outras espécies químicas.

Em cada recipiente foi colocado um rótulo que continha as seguintes informações:

- Local (coordenadas do Sistema Global de Posição
- Data;
- Condições atmosféricas;
- Tipo de amostra (água para consumo ou agrícola);
- Parâmetros a determinar.

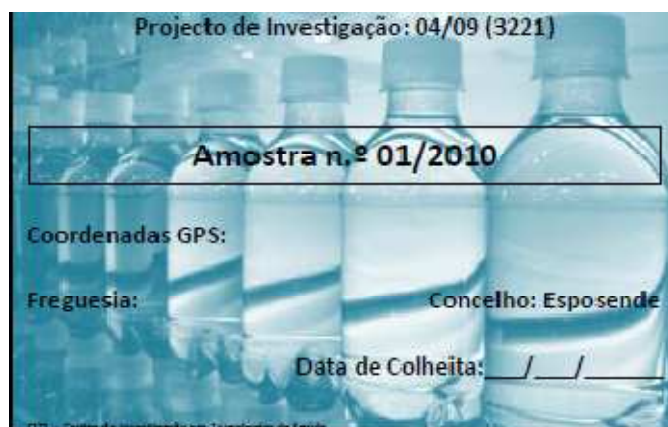


Figura 3.2. Rotulagem dos recipientes de amostragem.

No total foram colhidas 20 amostras de águas de poços do concelho de Esposende, sendo que 4 pertenciam à freguesia da Apúlia (A1, A2, A3 e A4), 4 à freguesia de Fonte Boa (B1, B2, B3 e B4), 1 na freguesia de Fão (C1), 4 na freguesia de Palmeira de Faro (D1, D2, D3 e D4), 3 na freguesia de Vila Chã (E1, E2 e E3), 1 na Freguesia das Marinhas (F1), 2 na freguesia de Antas (G1 e G2) e 1 na freguesia de Forjães (H1) tal como se observa na Figura 3.3. Salienta-se que os recipientes utilizados para a colheita de amostras foram adequadamente lavados, de forma a evitar a contaminação da mesma. O volume de amostra recolhido, foi o suficiente para assegurar a repetição da análise caso esta fosse

necessária. As amostras foram transportadas em arcas de refrigeração adequadas, de forma a evitar a quebra dos frascos ou qualquer contaminação externa das amostras. Após a sua entrada no laboratório as amostras foram processadas de imediato.

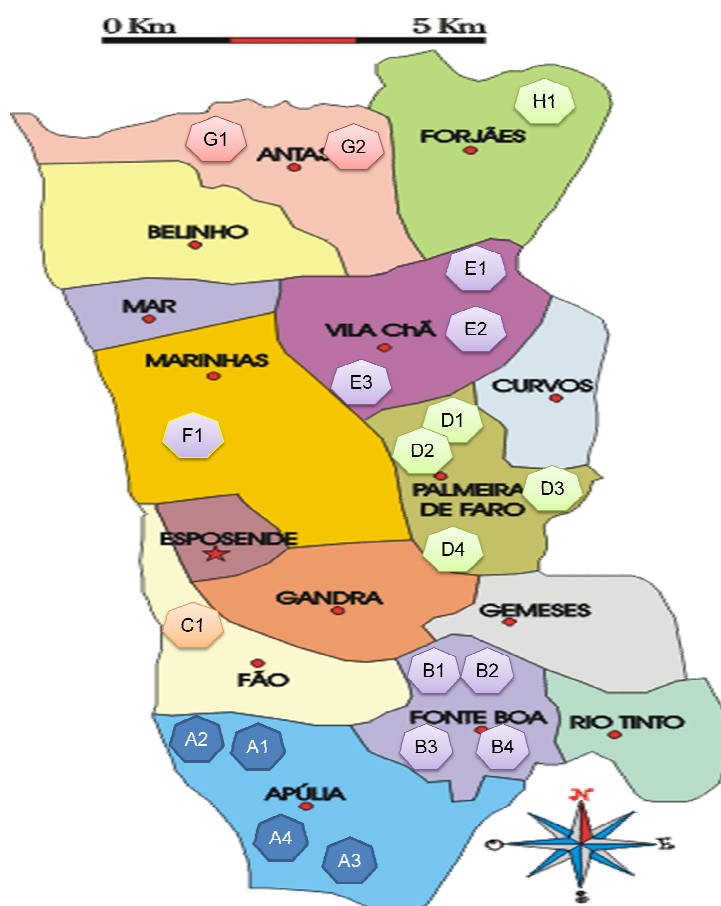


Figura 3.3 Localização esquemática dos pontos de colheita de águas de poços agrícolas no concelho de Esposende

3.4. Reagentes e Consumíveis

A água ultra pura utilizada apresentava uma resistividade mínima de $17 \text{ M}\Omega\text{cm}^{-1}$ obtida por purificação da água desionizada num sistema de marca Barnstead, modelo E-pure 4 e num sistema de marca Millipore, modelo Milli-Q element, Elix 10. A água ultrapura foi utilizada como solvente no processo de extracção. Os solventes utilizados, nomeadamente o Metanol, o n-hexano, o Acetonitrilo e o Acetato de Etilo era de qualidade LiChrosolv (Merck) ou com $\geq 99,9\%$ pureza (Sigma-Aldrich).

Todas as soluções padrão foram preparadas numa solução de metanol Chromasolv®, $\geq 99,9\%$ pureza (Sigma-Aldrich).

Foram usadas as seguintes colunas de extracção em fase sólida (SPE):

- Lichrolut® EN/RP-18 de 6 mL (Figura 3.4);

- Strata SDB-L e C18-E (Figura 3.5 e Figura 3.6 respectivamente)
- Chromabond HR-P e HR-X (Figura 3.7e Figura 3.8 respectivamente);



Figura 3.4 Coluna de SPE Lichrolut® EN/RP-18 com 6 mL de volume



Figura 3.5 Coluna de SPE Strata SDB-L



Figura 3.6 Coluna de SPE Strata C₁₈-E



Figura 3.7 Coluna SPE Chromabond HR-P



Figura 3.8 Coluna SPE Chromabond HR-X

3.5. Equipamentos

A preparação dos padrões de pesticidas foi realizada por pesagem de uma dada massa de cada um dos compostos numa balança analítica Mettler TOLEDO NewClassic MS.

Usou-se um sistema de ultra sons marca Fungilab S.A. e modelo Ultrasonic cleaner, de forma a promover a rápida dissolução dos compostos no solvente orgânico.

O equipamento utilizado no procedimento de extracção foi um manifold marca Phenomenex, sendo que a bomba utilizada era da marca KNFLAB referência N86KT.18 (Figura 3.9).

A localização exacta da colheita de amostras foi obtida através de um dispositivo de GPS – Tomtom XL Europe).



Figura 3.9 Manifold utilizado no procedimento de Extração

As análises à água foram efectuadas por cromatografia gasosa (GC) num equipamento Shimadzu modelo 2010, equipado com um detector de captura de electrões (ECD), injector automático marca *hta* modelo HT 300A e um sistema de aquisição de dados *GC Solutions*.

3.6. Procedimento para o Desenvolvimento das Metodologias Analíticas e Validação das Técnicas Analíticas

3.6.1. Metodologia de Extração

De forma a estudar qual o enchimento da SPE mais adequada para a determinação dos pesticidas a analisar, testaram-se 5 colunas de extração diferente. Duas da marca Strata SDB-L e C18-E, duas SPE's da marca Chromabond HR-P e HR-X e uma da marca Lichrolut EN/RP-18.

Adicionou-se em cada amostra 1 mL de metanol e ajustou-se o pH com ácido acético glacial até um pH de 5.

A cinco amostras de água desionizada de 500 mL foi adicionado 1mL de uma solução padrão com 100 µg/L em frascos devidamente lavados. O procedimento de extração iniciou-se pelo condicionamento da coluna com 7 mL de acetato de etilo, 7 mL de metanol e 7 mL de água ultra-pura a um caudal de 3 mL/min. Fez-se passar as 5 amostras pelos 5 cartuchos distintos a um caudal de 5 mL/min aproximadamente. Deixou-se secar sob vácuo durante 3 horas de forma a garantir que as colunas de SPE estavam isentas de água e

finalmente procedeu-se à eluição. O processo de eluição consistiu na passagem de 2 solventes orgânicos, metanol e o acetonitrilo (1:1), e obtenção de extracto por secagem do solvente.

Retomou-se o extracto com 500 µL de metanol, promovendo a solubilidade com agitação por vortex durante aproximadamente 30 segundos. Por fim, procedeu-se à injeção desta solução no GC-ECD.

3.6.2. Metodologia analítica

Relativamente à técnica cromatográfica empregada a separação dos analitos foi efectuada numa coluna TRB-5MS (30m – 0.25 µm) da marca Thermo; o hélio foi usado como gás de arraste e o azoto como gás de “make-up”. O programa de temperaturas iniciou-se em 35 °C (7 min) seguido de 15 °C/min até 90°C (7 min), 20 °C/min até 150 °C (10 min), 20°C/min até 200 °C (5 min), 22 °C/min até 220°C (2.5 min), 70°C/min até 300 °C (3.5 min). A temperatura do injector foi de 270 °C e do detector 300 °C.

3.6.3. Estudo da Especificidade/Selectividade e Capacidade de Identificação

De forma a avaliar os parâmetros Especificidade/Selectividade mediram-se 500 mL de água desionizada para dois frascos devidamente lavados. Num dos frascos foi adicionado 1 mL de uma concentração de 100 µg/L da solução padrão de pesticidas sendo que no segundo frasco não foi adicionado qualquer pesticida (branco). Foi efectuada o processo de extracção e injectou-se. Este procedimento foi repetido durante 5 vezes.

Para avaliar a capacidade de identificação foi necessário preparar 10 amostras brancas e verificou-se se a percentagem de falsos negativos era inferior a 10%.

3.6.4. Estudo da Linearidade, Limites de Quantificação e Detecção e a Razão Sinal/Ruído.

Dado que a linearidade corresponde à capacidade do método fornecer resultados directamente proporcionais à concentração do analito, dentro de uma determinada gama de aplicação, em que o valor mais baixo dessa gama corresponde ao limite de quantificação e

o mais elevado corresponde ao valor do qual a concentração do analito deixa de ter um comportamento linear. Optou-se por determinar estes 4 parâmetros em simultâneo.

Para estudar a linearidade prepararam-se 9 padrões com concentrações de 2,5; 5; 25; 50; 100; 150; 250; 350 e 500 µg/L. Foram fortificadas 9 amostras de 500 mL de água desionizadas com o 1 mL do respectivo padrão mais 1 mL de metanol. A amostra foi submetida ao processo de extracção descrito no subcapítulo 3.6.1 e de seguida analisaram-se os resultados.

Para determinar a razão sinal/ruído diluiu-se a solução padrão de 0,01 µg/L (próximo do LOD) em 4 soluções de 0,0002; 0,001; 0,002 e 0,003 µg/L com a finalidade de verificar se os valores dos limites de detecção e de quantificação obtidos pela equação da recta no estudo da linearidade são realmente visualizados pelo equipamento e se corresponde à relação teórica de 3:1 relação para o limite de detecção e de 10:1 para o limite de quantificação quando se relaciona ambos os limites com o sinal dado pelo equipamento.

3.6.5. Estudo do Parâmetro Arrastamento

Para avaliar o parâmetro arrastamento foram intercaladas as amostras positivas com brancos. Por cada duas amostras positivas analisadas 3 vezes cada uma, era injectada um branco. O número de amostras positivas injectadas foi de 6 e de 3 amostras para os brancos. Inicialmente entre as corridas não foram feitas limpezas da coluna com solvente orgânico e as amostras positivas injectadas eram amostras fortificadas com uma concentração 50 µg/L.

Foram estudados o metanol e o n-hexano como solventes de limpeza em injeções intercalares, sendo que este último apresentou melhores resultados. Logo, as medidas correctivas aplicadas foram: entre todas as amostras analisadas em triplicado era injectado uma solução de n-hexano com um programa de temperaturas entre os 90 °C e os 280 °C com duração de 15 minutos em duplicado sendo que a última injeção deverá ter o mesmo programa de análise que têm as amostras.

Quando se injectavam soluções com concentrações mais elevadas, verificou-se que a coluna em uso pelo cromatógrafo perdia sensibilidade na retenção e separação dos compostos em análise, precisamente nas triazinas. Logo como medida “correctiva” cortaram-se 10 mm da coluna em uso.

3.6.6. Estudo do Parâmetro Precisão

Dentro do parâmetro da precisão foram estudadas a precisão intermédia, a repetibilidade e a reprodutibilidade. Para executar este estudo, fortificou-se uma amostra de água desionizada com 500 µg/L de solução padrão. Para o estudo da precisão intermédia, a amostra foi injectada durante 15 dias e em triplicata. Uma nova solução padrão foi preparada a cada 5 dias. A fonte de variabilidade aplicada foi o tempo.

3.6.7. Estudo do Parâmetro Exactidão

Dado que para avaliar este parâmetro é necessário um valor de referência não se efectuou o estudo da exactidão.

3.6.8. Estudo do Parâmetro Robustez

O parâmetro robustez foi analisado ao longo de toda a validação analítica. Os indicadores estudados foram: o pH, a duração do padrão e o comportamento da coluna.

Quanto à temperatura efectuou-se o seguinte procedimento: preparou-se dois padrões de igual concentração (1 µg/L) e ambos foram injectados. Um foi guardado no congelador a uma temperatura aproximadamente de -6°C e outro permaneceu à temperatura ambiente. Os padrões foram injectados de 2 em 2 dias e em duplicado.

4. Resultados e Discussão

Neste capítulo serão apresentados e discutidos os resultados obtidos.

4.1. Caracterização da Amostra

Neste estudo participaram 20 agricultores de 8 freguesias do concelho de Esposende. A estrutura do universo dos agricultores de Esposende e das respostas ao formulário de colheita quanto ao género, a idade, a localidade, bem como a finalidade da água colhida encontra-se na Tabela 4.1.

Tabela 4.1 Estrutura dos agricultores de Esposende voluntários para a doação de amostras de águas de poços

Freguesia	Sexo	Idade	Finalidade da amostra		Número de consumidores
			Agrícolas	Consumo	
Apúlia	M	66	Sim	Sim	4
Apúlia	M	79	Sim	Não	--
Apúlia	M	56	Sim	Sim	4
Apúlia	F	70	Sim	Não	--
Fonte Boa	F	50	Sim	Sim	3
Fonte Boa	F	49	Sim	Não	--
Fonte Boa	F	70	Sim	Não	--
Fonte Boa	M	65	Sim	Sim	3
Fão	F	49	Sim	Não	--
Palmeira	M	53	Sim	Não	--
Palmeira	M	77	Sim	Sim	8
Palmeira	M	60	Sim	Sim	2
Palmeira	F	55	Sim	Sim	3
Vila Chã	M	48	Sim	Não	--
Vila Chã	M	62	Sim	Não	--
Vila Chã	M	88	Sim	Sim	8
Marinhas	M	70	Sim	Não	--
Antas	M	54	Sim	Não	--
Antas	F	70	Sim	Sim	1
Forjães	F	50	Sim	Sim	2

A taxa global de resposta ao formulário foi de 100%, sendo a amostra global constituída por 40% de mulheres e 60% de homens. A idade média dos agricultores foi de 62 ± 10 anos de idade.

Pela análise da Tabela 4.1 verifica-se que todas as águas colhidas para análise eram para fins agrícolas e que 50% das águas eram também usadas para consumo, ou seja, por 38 indivíduos.

Na Tabela 4.2 encontra-se a posição exacta da colheita das amostras, recorrendo á tecnologia GPS, bem como o código atribuído e a temperatura atmosférica no momento em que foram colhidas as amostras.

Tabela 4.2 Localização exacta da recolha das amostras de águas.

Coordenada GPS	Esposende	Código	Temperatura Atmosférica
41,493° -8,76696'	Apúlia	A1	25
41,493° -8,77441'	Apúlia	A2	25
41,483° -8,77243'	Apúlia	A3	25
41,493° -8,76791'	Apúlia	A4	25
41,496° -8,74941'	Fonte Boa	B1	27
41,495° -8,7408'	Fonte Boa	B2	27
41,498° -8,73905'	Fonte Boa	B3	27
41,497° -8,73824'	Fonte Boa	B4	27
41,512° -8,76696'	Fão	C1	27
41,539° -8,74948'	Palmeira	D1	27
41,539° -8,74991'	Palmeira	D2	22
41,555° -8,7459'	Palmeira	D3	22
41,543° -8,74588'	Palmeira	D4	22
41,572° -8,75024'	Vila Chã	E1	22
41,572° -8,75088'	Vila Chã	E2	22
41,570° -8,75220'	Vila Chã	E3	22
41,569° -8,77452'	Marinhas	F1	22
41,601° -8,76497'	Antas	G1	22
41,603° -8,75823'	Antas	G2	22
41,604° -8,74860'	Forjães	H1	22

4.2. Resultados da Opinião dos Agricultores Face à Utilização de Pesticidas e o Estado da Qualidade da Água

A opinião dos agricultores sobre o grau de confiança que depositavam na água dos poços e se conheceram casos de pessoas que tivessem padecido de algum tipo de patologia nos últimos anos revelou que, 60% agricultores tinham conhecimento que as patologias tinham ocorrido, no entanto, não dispunham de dados suficientes que lhes permitam correlacionar o estado insalubre com a utilização de pesticidas.

De acordo com as declarações dos agricultores inquiridos, todos eles manuseavam pesticidas, mas apenas 30% usavam EPI's (Tabela 4.3). Segundo estes a água dos respectivos poços era utilizada para fins agrícolas e para consumo sem qualquer restrição, apesar de, em 95% dos casos, nunca terem sido sujeitas a qualquer tipo de análise.

Tabela 4.3 Informação dos agricultores sobre o manuseamento, aplicação de pesticidas, análises realizadas e confiança na água

Aplicação de Pesticidas	Utilização de EPI's	Análises Águas	Confiança na Qualidade da Água
Sim	Não	Não	Sim
Sim	Não	Não	Sim
Sim	Não	Não	Sim
Sim	Não	Não	Sim
Sim	Sim	Não	Sim
Sim	Sim	Não	Sim
Sim	Não	Não	Sim
Sim	Não	Não	Sim
Sim	Não	Sim	Sim
Sim	Não	Não	Sim
Sim	Não	Não	Sim
Sim	Sim	Não	Sim
Sim	Sim	Não	Sim
Sim	Não	Não	Sim
Sim	Não	Não	Sim
Sim	Não	Não	Sim
Sim	Sim	Não	Sim
Sim	Não	Não	Sim
Sim	Sim	Não	Sim
Sim	Não	Não	Sim

4.3. Resultados da Monitorização da água dos poços

Neste sub-capítulo apresentam-se os resultados referentes à metodologia de extracção, à análise cromatográfica, e aos níveis de pesticidas presentes em águas de poços, do concelho de Esposende.

4.3.1. Selecção do Processo de extracção

Os testes preliminares efectuados no procedimento de SPE permitiram seleccionar o cartucho mais adequado para os pesticidas em estudo. Ao avaliar os resultados obtidos para este teste, verificou-se que os 5 cartuchos apresentam sensibilidades distintas para os diferentes pesticidas. Dado que a coluna Lichrolut EN/RP foi a que proporcionou percentagens de recuperação mais satisfatórias (Figura 4.1), optou-se pela sua utilização no processamento de todas as amostras. Estas colunas são as adequadas para a extracção de pesticidas em águas, dado que as duas fases (não-polar e polar) promovem a adsorção dos compostos com ambas as polaridades.

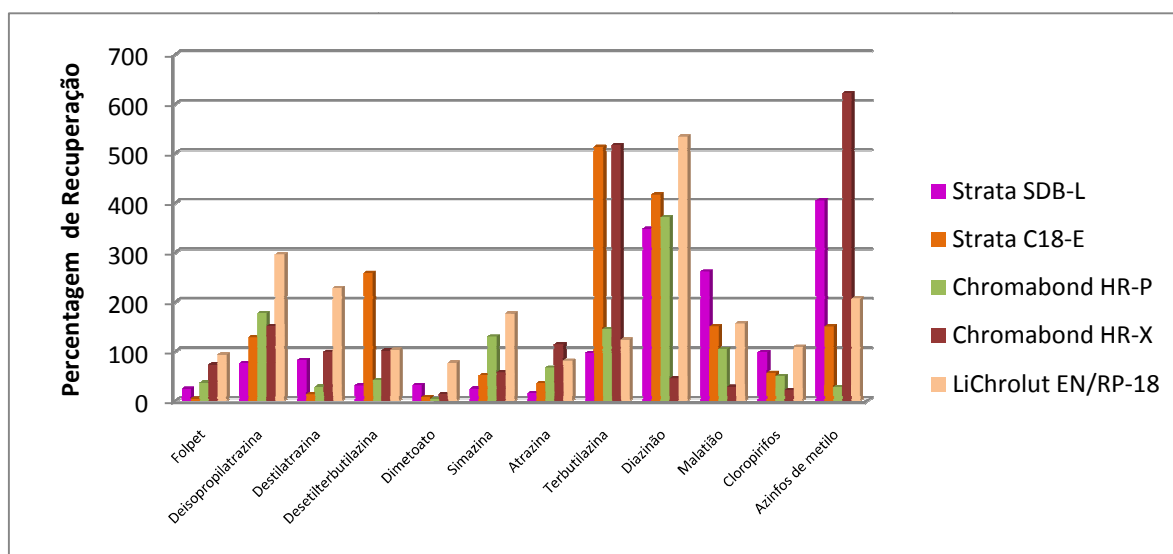


Figura 4.1 Percentagem de recuperação das triazinas, dos organosfosforados e do ftalimida folpete

Observaram-se elevadas percentagens de recuperação (superiores a 100%), verificou-se que a água desionizada fortificada com o padrão de pesticidas manifesta o efeito matriz depois de passar nos cartuchos de SPE. Tal facto já foi descrito por outros autores.

4.3.2. Avaliação do Método Cromatográfico

No estudo da robustez, notou-se pequenas variações de pH na amostra, encontrando-se já descrito na literatura [96], pelo que se estudaram as variações de pH a 3,8 e a 7,6. As áreas dos compostos das famílias das triazinas e os organofosforados sofreram uma diminuição quando o pH era básico.

Considera-se portanto, que para todos os pesticidas em estudo o pH das amostras deverá manter-se a um valor aproximado de 5,0.

Verificou-se que o padrão que se encontrava à temperatura ambiente apresentava um índice de degradação dos compostos relativamente superior ao outro que foi acondicionado a -6°C. No entanto, salienta-se que as triazinas e o ftalimida folpete, apresentam um índice de degradação bastante superior aos organofosforados estudados, implicando a preparação de novas soluções padrão a cada 4 semanas.

Para quantificar o folpete, a atrazina, a desetilatrizona, a desisopropilatrizona, a simazina, a terbutilazina, a desetilterbutilazina, o dimetoato, o diazinão, o malatião, o clorpirifos e o azinfos-metilo presente em amostras de água adaptou-se e optimizaram-se as recomendações da norma ISO 8466-1:1990.

Após a optimização das condições de extracção e cromatográficas, estudaram-se os tempos de retenção dos analitos acima referidos. Os tempos de retenção em minutos, obtidos para os compostos analisados foram de: 24,1 para o folpete; 32,0 para a deisopropilatrizona; 32,7 para a desetilatrizona; 32,9 para a desetilterbutilatrizona; 34,1 para o dimetoato; 34,3 para a simazina; 34,6 para a atrazina; 35,2 para a terbutilazina; 35,5 para o diazinão; 39,2 para ao malatião; 39,7 para o clorpirifos e 45,6 para o azinfos de metilo (Figura 4.2).

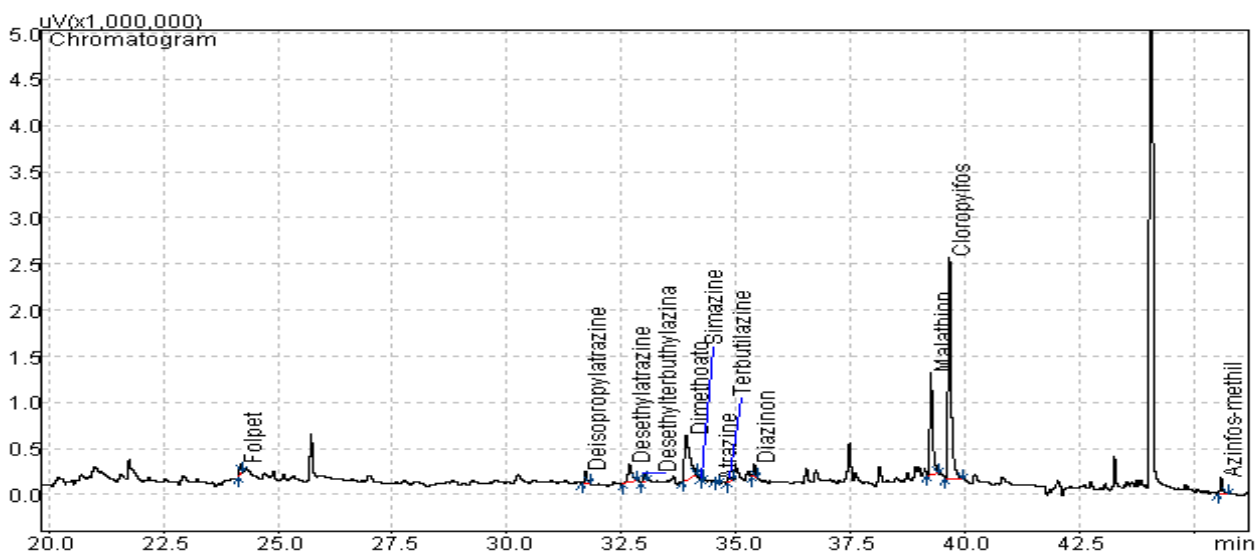


Figura 4.2 Cromatograma de uma solução padrão de pesticidas (0,2 µg/L)

Na validação o primeiro e o mais simples parâmetro a ser avaliado é a linearidade, que é obtida ao correlacionar os valores de área *versus* a concentração da solução analítica, para tal usaram-se 9 soluções padrão na gama de concentrações 0,005-1,5 µg/L. Verificou-se que o coeficiente de determinação, r^2 , é adequado. As curvas analíticas obtidas para os analitos mostraram ser lineares, pois apresentaram valores de r^2 entre 0,995 e 0,999.

A relação teórica para calcular o sinal/ruído foi de 3:1 para o limite de detecção e de 10:1 para o limite de quantificação quando se relaciona ambos os limites com o sinal dado pelo equipamento. Para este estudo foram analisados 3 níveis de padrões analíticos, cuja matriz foi, água desionizada fortificada com padrões de pesticidas nas seguintes concentrações: uma concentração inferior ao LOD e 2 com concentração inferior ao LOQ e acima do LOD.

Os valores, referentes ao método, para LOD situaram-se entre 0,014 e 0,103 µg L⁻¹ e para LOQ entre 0,047 e 0,343 µg L⁻¹, para os analitos estudados (Tabela 4.4). Estes resultados indicam que o método é suficientemente sensível para detectar a presença destes pesticidas em níveis baixos de concentração.

Tabela 4.4 Valores obtidos para os parâmetros: Linearidade, Limites de detecção e quantificação e sinal ruído após a passagem no SPE.

Composto	Equação da Recta	r^2	LOD ($\mu\text{g/L}$)	LOQ ($\mu\text{g/L}$)	Linearidade ($\mu\text{g/L}$)	S/N
Folpete	$3000000x+3640.7$	0,999	0,025	0,082	0,05 – 0,75	0,008
Deisopropilatrizona	$142453x+8955,9$	0,995	0,014	0,047	0,05 – 1,5	0,005
Desetilatrizona	$596168x+787,97$	0,997	0,046	0,155	0,05 – 1,5	0,015
Desetilterbutilazina	$313321x+13802$	0,999	0,029	0,097	0,05 – 1,5	0,010
Dimetoato	$957684x+86629$	0,998	0,068	0,228	0,08 - 1,5	0,023
Simazina	$379017x+7594,9$	0,996	0,103	0,343	0,10 – 1,5	0,034
Atrazina	$50936x+4168,5$	0,999	0,022	0,073	0,05 – 1,5	0,007
Terbutilazina	$76351x+9157,3$	0,997	0,097	0,322	0,10 – 1,5	0,032
Diazinão	$122633x+24455$	0,999	0,048	0,159	0,05 – 1,5	0,016
Malatião	$3000000x+241860$	0,999	0,025	0,082	0,05 – 1,5	0,008
Clorpirifos	$7000000x+685014$	0,998	0,071	0,235	0,07 – 1,5	0,024
Azinfos de metilo	$106677x+47950$	0,997	0,098	0,327	0,10 -1,5	0,033

Após o estudo da linearidade, dos limites de quantificação e detecção e da razão sinal/ruído, de forma a estudar a curva de calibração realizou-se uma regressão linear pelo método dos mínimos quadrados, tal como no estudo da linearidade, sendo utilizados 7 padrões. Verificou-se que o coeficiente de determinação, r^2 , é adequado. As curvas analíticas obtidas para os analitos mostraram ser lineares, pois apresentaram valores de r^2 entre 0,995 e 0,999 (Tabela 4.5), sendo satisfatórios para a análise de resíduos de pesticidas [105].

Tabela 4.5 Gama de concentrações dos analitos usada na curva de calibração para a determinação dos pesticidas em águas

Analito	Gama de concentrações	Equação da recta	R ²
Folpete	0,1-1,0	Y=3000000x+4360,5	0,9990
Deisopropilatrizona	0,05-0,7	Y=145890x + 6927,8	0,9966
Desetilatrizona	0,2-1,0	Y= 543883x + 24866	0,9988
Desetilterbutilazina	0,1-0,7	Y= 630971x + 42862	0,9964
Dimetoato	0,2-1,5	Y= 948247x + 96004	0,9979
Simazina	0,3-1,5	Y= 367629x + 19632	0,9952
Atrazina	0,1-0,7	Y= 50533x + 4367,1	0,9993
Terbutilazina	0,3-1,5	Y=74355x + 12033	0,9971
Diazinão	0,2-1,0	Y= 121013x + 25698	0,9968
Malatião	0,1-0,7	Y=3000000x+237237	0,9997
Clorpirifos	0,2-1,0	Y= 7000000x+835416	0,9992
Azinfos de metilo	0,3-1,5	Y=105305x+50707	0,9949

A precisão do método foi avaliada através do tratamento de dados com a ferramenta informática ANOVA (factor único), em que as expressões matemáticas se situam na Tabela 1.8. Os resultados obtidos para o estudo da Repetibilidade (Sr), Reprodutibilidade (Srun) e precisão intermédia (S1) encontram-se na tabela abaixo indicada Tabela 4.6. Os cálculos intermédios para a obtenção destes resultados encontram-se na Tabela A.2. em anexo.

Estes resultados estão em consonância com a literatura, tendo-se obtido para todos os analitos valores inferiores a 10% [106].

Tabela 4.6 Valores obtidos para o estudo da Repetibilidade (Sr), Reprodutibilidade (Srun) e precisão intermédia (S1)

Composto	Sr	Srun	St
Folpete	0,09	2,97	2,97
Deisopropilatrazina	0,64	0,99	1,18
Desetilatrazina	5,00	3,45	6,07
Desetilterbutilazina	5,24	6,88	8,65
Dimetoato	4,67	6,74	8,20
Simazina	0,65	1,65	1,78
Atrazina	1,95	8,15	8,38
Terbutilazina	1,23	3,13	3,36
Diazinão	3,20	3,71	4,90
Malatião	2,08	0,36	2,11
Cloropirifos	0,36	9,51	9,52
Azinfos de metilo	0,90	1,18	1,48

Para avaliar os parâmetros Especificidade/Selectividade, calculou-se a percentagem de falsos resultados negativos e positivos. Ambos os resultados foram de 0%. Dado que a percentagem obtida na avaliação da especificidade/selectividade foi de 0% desvalorizou-se a execução do parâmetro capacidade de identificação, os cálculos intermédios encontram-se em anexo (Tabela A.1).

Tendo por base a análise a um branco, no método de extracção por SPE, ou seja, amostra sem a presença dos analitos, avaliou-se os solventes e materiais utilizados em todo o processo para verificar se estes apresentavam interferências nos tempos de retenção dos compostos em estudo. De seguida procedeu-se à análise cromatográfica. O cromatograma da água desionizada está representado na Figura 4.3

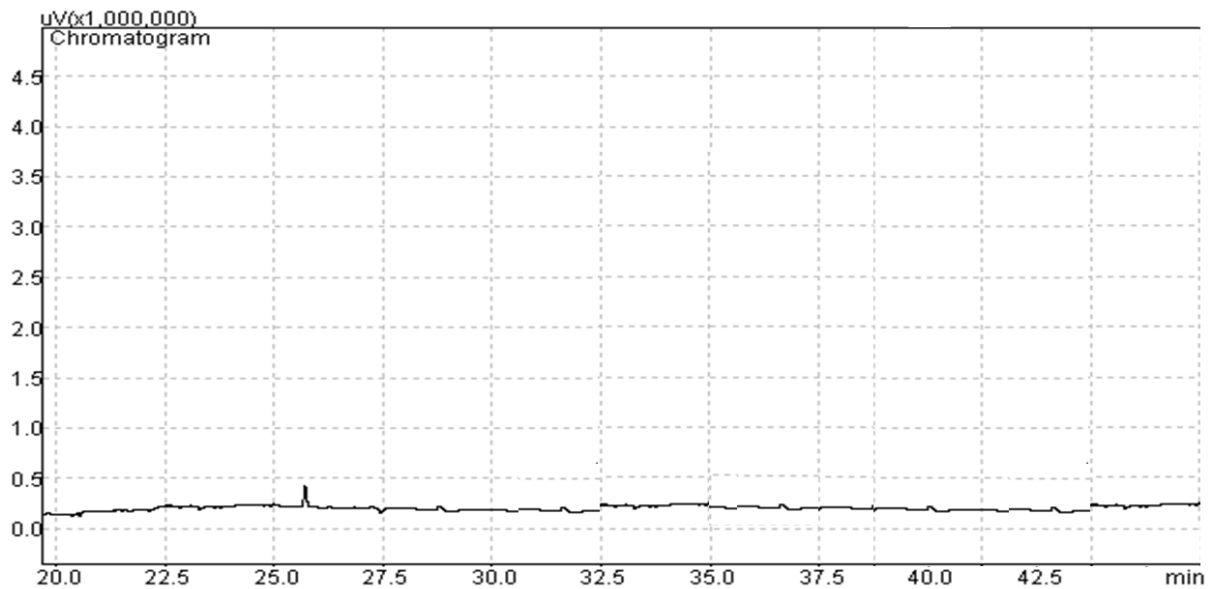


Figura 4.3 Cromatograma de uma amostra de água desionizada

4.3.3. Níveis de pesticidas em amostras de água

Os níveis de pesticidas encontrados no concelho de Esposende encontram-se descritos na Tabela 4.7.

Das 20 águas analisadas 15% não apresentavam qualquer vestígio dos pesticidas monitorizados sendo que das restantes 85% todas apresentavam valores de pesticidas superiores aos permitidos pela legislação em vigor (Figura 4.4), ou seja 0,5 µg/L para o conjunto de pesticidas presente em cada amostra (Decreto-Lei n.º 208/2008 para águas subterrâneas e Decreto-Lei n.º 306/2007 destinado a água para consumo humano). Os dois Decreto-Lei apresentam o mesmo valor limite e tiveram que ser ambos tidos em consideração dado que algumas águas não eram apenas destinadas para fins agrícolas, mas também para consumo humano.

Tabela 4.7 Teores de pesticidas encontrados nas águas de poços do concelho de Esposende

Amostra	Folpete (µg/L)	Deisopropil atrazina (µg/L)	Desetil atrazina (µg/L)	Desetil terbutilazina (µg/L)	Dimetoato (µg/L)	Simazina (µg/L)	Atrazina (µg/L)	Terbutilazina (µg/L)	Diazinão (µg/L)	Malatião (µg/L)	Cloropirifos (µg/L)	Azinfosmetilo (µg/L)	Σ pesticidas (µg/L)
A1	n.d	0.63	n.d	n.d	n.d	n.d	<LOD	n.d	<LOD	0.06	3.24	4.39	8.32
A2	n.d	n.d	25.2	n.d	<LOD	<LOD	8.49	<LOD	3.54	0.11	0.05	1.64	39.03
A3	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	
A4	n.d	<LOD	2.45	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	2.45
B1	n.d	n.d	0.69	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	<LOD	0.69
B2	n.d	n.d	5.95	n.d	n.d	n.d	31.5	<LOD	<LOD	0.06	<LOD	<LOD	37.45
B3	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	
B4	n.d	<LOD	1.05	<LOD	<LOD	n.d	53.2	<LOD	n.d	<LOD	<LOD	<LOD	54.25
C1	n.d	n.d	0.96	n.d	n.d	<LOD	2.32	27.7	<LOD	n.d	n.d	n.d	30.98
D1	<LOD	n.d	6.28	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	2.75	9.03
D2	<LOD	<LOD	22.2	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	<LOD	n.d	n.d	1.21	23.41
D3	n.d	n.d	49.27	<LOD	<LOD	<LOD	n.d	n.d	<LOD	<LOD	n.d	5.24	54.51
D4	n.d	n.d	2.46	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	2.64	5.1
E1	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	
E2	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	<LOD	4.51	4.51
E3	n.d	n.d	0.42	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	<LOD	0.75	1.17
F1	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	<LOD	n.d	n.d	<LOD	
G1	n.d	n.d	0.54	0.08	<LOD	<LOD	31.6	n.d	n.d	n.d	0.05	5.21	37.48
G2	<LOD	<LOD	1.49	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	1.06	2.55
H1	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	n.d	n.d	n.d	n.d	<LOD	<LOD	<LOD	1,86	1.86

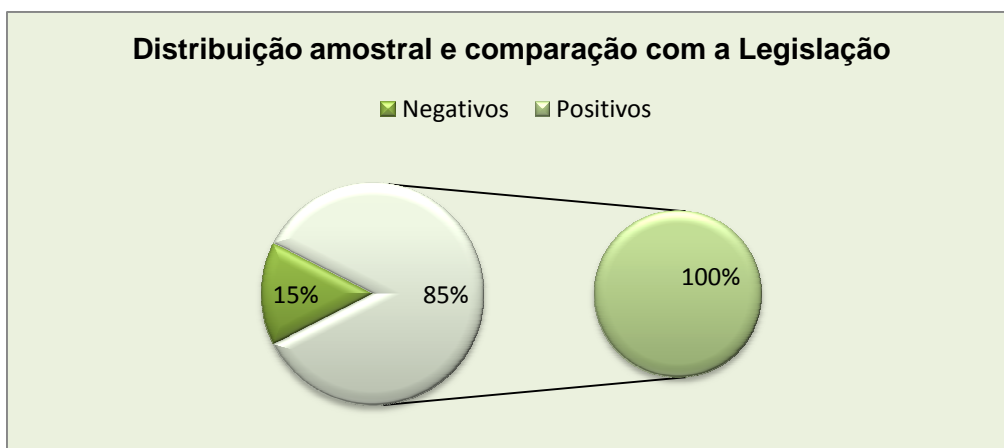


Figura 4.4 Distribuição de casos negativos/positivos e comparação com a legislação.

Dos pesticidas monitorizados, os mais detectados nas águas de Esposende foram a desetilatrazina, a atrazina e o azinfos de metilo. As análises mostram-se negativas quanto à presença de outros pesticidas nomeadamente, o folpete, o dimetoato e a simazina (Figura 4.5).

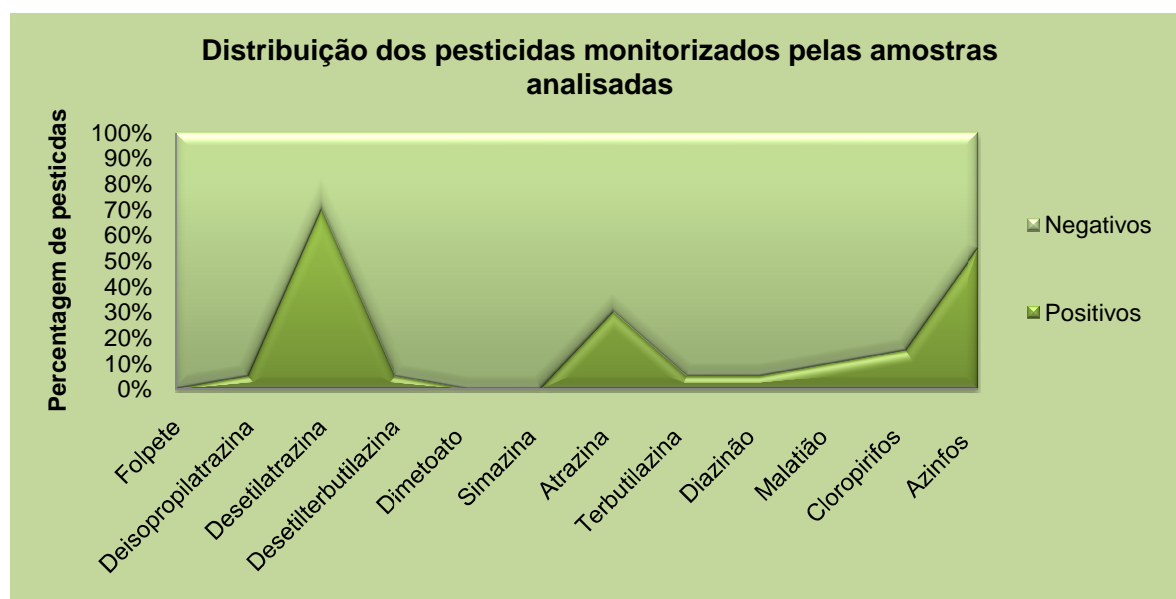


Figura 4.5 Distribuição dos pesticidas monitorizados pelas 20 amostras de águas analisadas.

Quanto à ausência do folpete nas águas monitorizadas, esta poderá ser explicada pela sazonalidade da sua aplicação, normalmente em Novembro, bastante afastada temporalmente do mês de Junho que foi o da amostragem para este estudo.

Salienta-se a ausência na detecção da simazina e do dimetoato nas amostras analisadas, bem como os baixos valores dos restantes organofosforados o que pode ser devido à sua elevada solubilidade em água e rapidez de degradação no ambiente, em consonância com o

que foi descrito na literatura. Pela análise da Figura 4.6, observa-se que 65% das amostras de águas apresentavam mais de 2 pesticidas e em apenas 20% das amostras foi detectado 1 único pesticida.

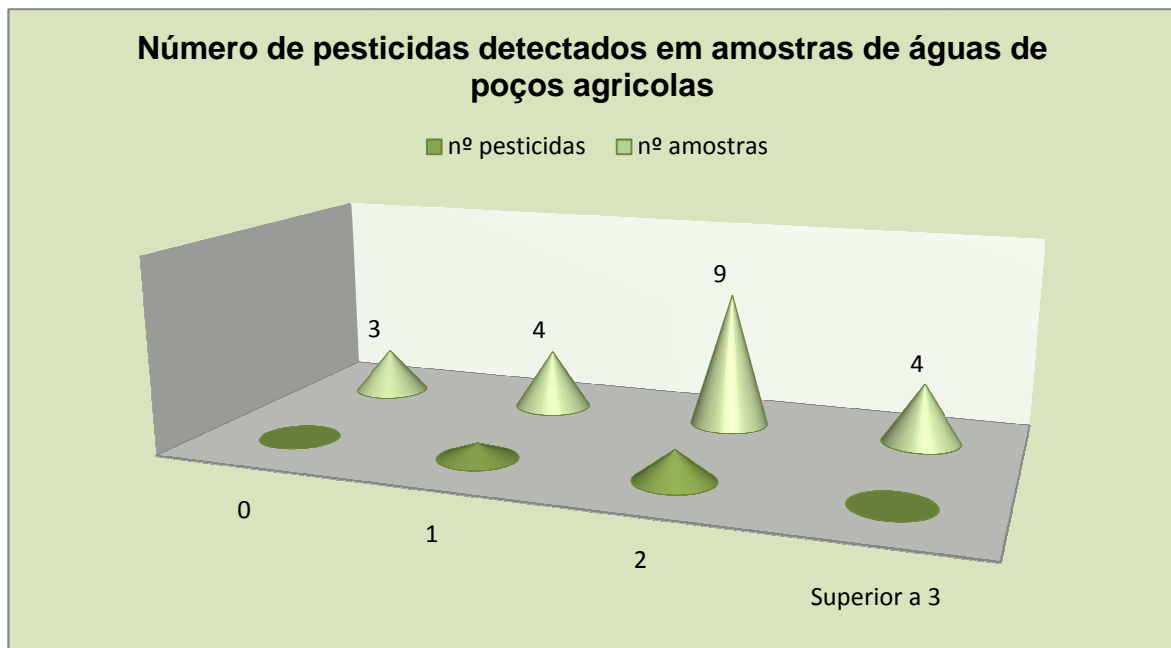


Figura 4.6 Número de pesticidas encontrados nas 20 águas de poços agrícolas monitorizados.

5. Conclusão

O método proposto mostrou, através dos parâmetros de validação seguidos, ser eficiente e confiável para a determinação dos pesticidas: folpete, atrazina, desetilatrizona, desisopropilatrizona, simazina, terbutilazina, desilterbutilazina, dimetoato, diazinão, maltião, clorpirifos e azinfos-metilo em amostras de água provenientes de poços agrícolas.

Os cartuchos SPE, Lichrolut EN/RP-18 foram utilizados no processamento de todas as amostras por apresentarem as percentagens de recuperação mais satisfatórias.

Para grande parte dos pesticidas estudados, as concentrações encontradas em águas provenientes de poços para fins agrícolas e de consumo foram superiores aos valores permitidos pela legislação em vigor, devendo ser alvo de uma monitorização contínua, devido à potencial toxicidade, elevada persistência e eventual efeito cumulativo desses pesticidas a nível do ambiente e dos animais, com prováveis repercussões na saúde humana.

No âmbito de estudos académicos, o resultado deste tipo de trabalhos deverá ser comunicado à população estudada, de forma a contribuir para alterar a percepção errada acerca da qualidade da água.

6. Sugestões para Trabalho Futuro

- Quantificar os níveis dos metabolitos destes pesticidas em material biológico, por exemplo: urinas, da população desta região de forma a avaliar a sua exposição e correlacionar com este trabalho.

7. Referências Bibliográficas

- [1] Marques, VS, 2010. Desafios globais da água no século XXI. A última gota.
- [2] Hidrovector. "Ciclo Hidrológico". www.hidrovector.com.br/pocos-artesianos.asp (acedido em 31 de Março de 2010).
- [3] Gonsalves, M, Morenoz, B, Milani, C and Collares, GL, 2008. Análise das águas dos poços artesianos do campus CAVG-UFPEL. *Livro de Resumos da 2ª Mostra de Trabalhos de Tecnologia Ambiental*, 3: 10-12.
- [4] Tundisi, JG, 2005. *Água no século XXI: Enfrentando a escassez*. Rima, São Carlos, 248pp.
- [5] Maraschin, L, 2003. *Avaliação do Grau de Contaminação por Pesticidas na Água dos Principais Rios Formadores do Pantanal Mato-Grossense*. Dissertação de Pós-graduação em Saúde e Ambiente. Instituto de Saúde Coletiva da Universidade Federal de Mato Grosso. 90pp.
- [6] Isensee, AR, 1991. Movement of Herbicides in Terrestrial and Aquatic Environments. In: Pimentel, ed. *Handbook of Pest Management in Agriculture*, 651-9.
- [7] Ghosh, HS, Battacharaya, S, 1994. Effect of Pesticides on a Non-Target Fish Species (Channa Punctatus). *Environmental Pollution*, 9: 15-18.
- [8] Kassai, F and Hanazato, T, 1995. Effects of Triazine Herbicide, Simetryn, on Freshwater Plankton Communities in Experimental Ponds. *Environmental Pollution*, 89 (2): 197-202.
- [9] Maund, S, Sherratt, TN, Stickland, T, Biggs, J, Williams, P, Shillabeer, N and Jepsom, PC, 1997. Ecological Considerations in Pesticides Risk Assessment for Aquatic Ecosystems. *Pesticides Science*, 49 (2): 185-190.
- [10] Guillot, JD, 2007. Pesticidas em debate no plenário: para proteger as plantas, o ambiente e a saúde. *Parlamento Europeu*.
- [11] Tanabe, AMH, Kawata, K and Sakai, M, 1996. Monitoring of herbicides in river water by gas chromatography-mass spectrometry and solid-phase extraction. *Journal of Chromatography A*, 754 (1-2): 159-168.
- [12] Teixeira, MJVP, 1995. *Desenvolvimento e validação de metodologias analíticas para a análise de pesticidas em uvas*. Tese de Mestrado em Controlo de Qualidade. Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto.
- [13] Paula, P, 2005. *Novas metodologias de extracção de pesticidas em matrizes alimentares (vegetais) e ambientais (solos)*. Faculdade de Engenharia da Universidade do Porto.

- [14] Faria, I, 2004. *Avaliação de Diferentes Solventes na Extração em Fase Sólida de Pesticidas em Água. Desenvolvimento e Validação de Metodologia*. Tese de Mestrado em Química Analítica. Universidade Estadual de Campinas. 79pp.
- [15] Food and Agriculture Organization of the United Nations/World Health Organization, 1993. Good Laboratory practice on pesticides in food. *Food Standards Programme Codex Alimentarius Commission*. Rome: Sulp 1: 164 (<http://www.fao.org/countryprofiles/default.asp?lang=en>).
- [16] Ministerio da Agricultura do Desenvolvimento Rural e das Pescas, 2006. Equipamentos de protecção individual a utilizar na manipulação e aplicação de produtos fitofarmacêuticos. Direcção Regional de Agricultura da Beira Litoral, 4.
- [17] Sousa, D, 2005. Agricultores idosos não se protegem dos químicos. *Jornal de Notícias*. 2.
- [18] Kotaka, ET and Zambrone, FAD, 2001. Contribuições para a construção de directrizes de avaliação do risco toxicológico de agrotóxicos. *International Life Sciences Institute*. 160.
- [19] Pozzebon, JM, 2002. *Desenvolvimento de Métodos de Extração, Separação e Quantificação de Herbicidas em Fluido Biológico*. Tese de Doutoramento em Química. Universidade Estadual de Campinas.
- [20] Cañadas, EV, 2004. Etiología general de las intoxicaciones. In: Calabuig G, ed. *Medicina legal y toxicología*. 6 ed. Barcelona: Masson.
- [21] World Health Organization, 1996. The WHO recommended classification of pesticides by hazard and guidelines to classification. In: IPCS, ed.: Genebra: 63.
- [22] Salgado, PET and Fenícola, NAGG, 1989. *Noções Gerais de Toxicologia Ocupacional*. UNESP, São Paulo, 144pp.
- [23] Lauwerys, RR, 1994. *Toxicologia industrial e intoxicaciones profesionales*. Masson, 640pp.
- [24] Oga, S, 1996. *Fundamentos de Toxicologia*. Atheneu São Paulo, 516pp.
- [25] Larini, L, 1999. *Toxicologia dos Praguicidas*. Manole, São Paulo, 230pp.
- [26] Larini, L, 1997. *Toxicologia*. Manole, São Paulo, 301pp.
- [27] Safe, SH, 2004. Endocrine disruptors and human health: is there a problem? An Update. *Toxicology*. 108: 487-493.
- [28] Kolpin, DW, Schnoebelen, DJ and Thurman, EM, 2004. Degradates Provide Insight to Spatial and Temporal Trends of Herbicides in Ground Water. *Ground Water*. 42(4): 601-608.
- [29] Hayes, TB, 2006. Atrazine-Induced Hermaphroditism at 0,1 ppb in American Leopard Frogs: Laboratory and Fiel evidence. *Environmental Health Perspectives*, 114-141.

- [30] Agência Nacional de Vigilância Sanitária. "Índice Monográfico de Pesticidas". 2003. <http://www.anvisa.gov.br/toxicologia/monografias/index.htm> (acedido em 13 de Abril de 2010).
- [31] Environmental Protection Agency, 1995. Reregistration Eligibility Decision (RED). *Prevention, Pesticides and Toxic Substances*, United States, 186.
- [32] Messer, GJ, Stoudemire, A, Knos, G and Johnson, GC, 1992. Electroconvulsive therapy and the chronic use of pseudocholinesterase-inhibitor (echothiophate iodide) eye drops for glaucoma: A case report. *General Hospital Psychiatry*, 14 (1): 56-60.
- [33] Keifer, MC, Wesseling, C, McConnell, R, Linda, R, Mark, RC, *et al.*, 2005. Pesticides and Related Compounds. *Textbook of Clinical Occupational and Environmental Medicine (Second Edition)*. Edinburgh: W.B. Saunders, 1099-126.
- [34] INFARMED, 2004. Folheto informativo do Iodeto de Ecotiofato.
- [35] Toxicologia. "Inseticidas organofosforados e carbamatos". 2010. <http://lct.nutes.ufrj.br/toxicologia/mXII.orga.htm#> (acedido em 09 de Agosto de 2010).
- [36] Santos, VMR, Donnici, CL, Costa, JBN and Caixeiro, JMR, 2007. Compostos Organofosforados Pentavalentes: Histórico, Métodos Sintéticos de Preparação e Aplicação como Inseticidas e Agentes Antitumorais. *Química Nova*. 30 (1): 159-170.
- [37] Cooplantio, 2006. Efeito da Acidez da Água sobre Produtos Fitossanitários. Paraná, 5.
- [38] OMS. "Dimethoate". 2010. <http://sitem.herts.ac.uk/aeru/footprint/en/Reports/244.htm> (acedido a 09 de Agosto de 2010).
- [39] Korbes, D, Silveira, A, Hyppolito, M,A and Murano, G, 2010. Ototoxicidade por Organofosforados: Descrição dos Aspectos Ultra estruturais do Sistema Vestibulococlear de Cobaias. *Barzilian Journal of Otorhinolaryngology*, 76 (2): 238-244.
- [40] Caldas, L, 2000. Intoxicações Exógenas Agudas por Carbamatos, Organofosforados, Compostos Bipyridílicos e Piretróides. *Centro de Control de Intoxicações*. CCnl, Rio de Janeiro, 43pp.
- [41] Gheller, J, 2007. Controle Químico. PROF FITO II, São Paulo.
- [42] Arysta LifeScience, 2005. Folpan Agricur 500 WP, São Paulo.
- [43] Silva, I, 2006. Monitoração de Pesticidas em Ambientes de Intensa Actividade Agricola na Região do Norte Fluminense. *Centro de Ciências e Tecnologia da Universidade Estadual do Norte Fluminense*.
- [44] National Research Council, 1993. Ground Water Vulnerability Assessment: Contamination Potential under Conditions of Uncertainty. In: Council NR, ed. *National Academy Press*. Washington DC.
- [45] Palmer, RC, Holman, IP, Robins, NS and Lewis, MA, 1995. Guide to Groundwater Vulnerability Mapping in England and Wales. In: Bristol, ed. *Nacional Rivers Authority*.
- [46] EEC Drinking Water Guideline 80/779/EEC. EEC 1980:11-29.

- [47] Kopta, F and Igarzábal, D, 1993. Informe Sobre la Necesidad de Actualizar la nómina de Plaguicidas y Cianotoxinas. Córdoba, Rallt.
- [48] Portaria 1469, 2000. Ministério da Saúde da República Federativa do Brasil.
- [49] Environmental Law Institute Research Report on Opportunities for Advancing Environmental Justice, 2001. An Analysis of US-EPA Statutory Authorities. EPA, Washington DC.
- [50] Argentina, G, 1993. Decreto 831/93, Anexo II Tabla 2. In: Ministério da Agricultura.
- [51] Environmental Protection Agency. "National Primary Drinking Water Regulations". 2009. <http://www.epa.gov/safewater/consumer/pdf/mcl.pdf> (acedido a 01 de Abril de 2010).
- [52] Neto, ML and Sarcinelli, P, 2009. Agrotóxicos em Água para Consumo Humano: Uma Abordagem de Avaliação de Risco e Contribuição a Processo de Atualização da Legislação Brasileira. *Engenharia Sanitária Ambiental*, 14 (1): 10.
- [53] Maroneze, A, 2004. *Validação de procedimento analítico empregando SPE e GC-ECD para Determinação de Pesticidas Organoclorados em Água e Avaliação da Permeabilidade destes nos Dialisadores Utilizados em Hemodiálise*. Tese de Mestrado em Química. Universidade Federal de Santa Catarina. 101pp.
- [54] Batista, S, Silva, E, Cerejeira, MJ, Silva-Fernandes, AM, 2000. Exposure of Ground Water to Alachlor, Atrazine and Metolachlor in Maize Areas of Ribatejo and Oeste (Portugal). *Toxicological & Environmental Chemistry*, 79 (3-4) :223-232.
- [55] Cerejeira, MJ, Viana, P, Pereira, T, Silva, E, Valério, MJ, Silva, A, Ferreira, M and Silva-Fernandes, AM, 2003. Pesticides in Portuguese surface and ground waters. *Water Research*, 37: 1055-1063.
- [56] Pérez, J, Loureiro, S, Menezes, S, Palama, P, Fernandes, R, Barbosa, I and Soares, A, 2009. Estudo científico revela que a água do Alqueva é tóxica. *Publico*.
- [57] Águas do Douro e Paiva. "Qualidade da Água Bruta no Rio Douro". 2007. www.addp.pt (acedido em 19 de Maio 2010).
- [58] Baird, C, 1995. *Toxic Organic Chemicals*. In: Company WHFa, ed. Environmental Chemistry. New York.
- [59] Pires, MAF, Cotrim, MEB, Marques, MN, Bohere-Morel, MBC and Martins EAJ, 2001. Qualidade da água para consumo humano: uma oportunidade de avaliação da concepção e aplicabilidade da nova legislação. *Revista Brasileira de Pesquisa e Desenvolvimento*, 3 (2): 127-138.
- [60] Marques, MN, 2005. Avaliação do Impacto de Agrotóxicos em Áreas de Protecção Ambiental, Pertencentes à Bacia Hidrográfica do Rio Ribeira de Iguape, São Paulo. Uma Contribuição à Análise Crítica da Legislação sobre o Padrão de Potabilidade. São Paulo: Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares.

- [61] Pires, MAF, 2004. *Análise Crítica da Legislação sobre Potabilidade das águas destinadas ao Abastecimento Público*. In: Relatório Técnico final FAPESP-PP, ed. São Paulo.
- [62] Tolosa, I, Readman, JW and Mee LD, 1996. Comparison of the performance of solid-phase extraction techniques in recovering organophosphorus and organochlorine compounds from water. *Journal of Chromatography A*, 725 (1): 93-106.
- [63] Columé, A, Cárdenas, S, Gallego, M and Valcárcel, M, 2001. Selective enrichment of 17 pyrethroids from lyophilised agricultural samples. *Journal of Chromatography A*, 912 (1): 83-90.
- [64] Lanças, FM, 2004. *Extração em Fase Sólida (SPE)*. Rima: São Carlos, 96pp.
- [65] Maloschik, E, Ernst, A, Hegedus, G, Darvas, B and Székács, A, 2007. Monitoring water-polluting pesticides in Hungary. *Microchemical Journal*, 85 (1): 88-97.
- [66] Majzik-Solymos, E, Visi, E, Karoly, G, Beke-Berczi, B and Gyorfi, L, 2001. Comparison of extraction methods to monitor pesticide residues in surface water. *Journal of Chromatography Science*, 39 (8): 325-331.
- [67] Neicheva, A, Kovacheva, E and Marudov, G, 1988. Determination of organophosphorus pesticides in apples and water by gas-liquid chromatography with electron-capture detection. *Journal of Chromatography A*, 437 (1): 249-253.
- [68] Liska, I and Slobodník, J, 1996. Comparison of gas and liquid chromatography for analysing polar pesticides in water samples. *Journal of Chromatography A*, 733 (1-2): 235-58.
- [69] Azevedo, DA, Lacorte, S, Vinhas, T, Viana, P and Barceló, D, 2000. Monitoring of priority pesticides and other organic pollutants in river water from Portugal by gas chromatography-mass spectrometry and liquid chromatography-atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 879 (1): 13-26.
- [70] Nagaraju, D and 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 (1-2): 89-97.
- [71] Yu, Z-g, Liu, B, Jiang, Z-h and Zhang, G-l, 2009. Simultaneous determination of herbicide mefenacet and its metabolites residues in river water by solid phase extraction and rapid resolution liquid chromatography-mass spectrometry with pre-column derivatization. *Journal of Chromatography A*, 1216 (15): 3090-3097.
- [72] Hapeman, CJ, Mcconnell, LL, Rice, CP and Angier, JT, 2003. Agricultural Research Service research on understanding agrochemical fate and transport to prevent and mitigate adverse environmental impacts. *Pest Management Science*, 59 (6-7): 681-690.

- [73] Gabbianelli, R, Nasuti, C, Falcioni, G and Cantalamessa, F, 2004. Lymphocyte DNA Damage in Rats Exposed to Pyrethroids: Effect of Supplementation With Vitamins E and C. *Toxicology*, 203 (1-3): 17-26.
- [74] Rangel, R, Rezende, P, González, J, Oliveira, JB, and Costa, J, 1997. Suicídios por Pesticidas *Circunscrição Médico-Legal do Porto*. BMLTF, XI (1): 5.
- [75] Costa, P, Moreira, P, Tarelho, S and Rangel, R, 2006. Intoxicações por Pesticidas: Evolução dos Últimos 6 anos. *5º Congresso Nacional de Medicina Legal*. Ericeira.
- [76] Le Monde, 2010. Agricultores Expostos a Pesticidas Podem Desenvolver Cancro. *Movimento dos Trabalhadores Rurais sem Terra*, Marselha.
- [77] Kumazawa, T, Sato, K, Seno, H and Suzuki, O, 1992. Rapid isolation with Sep-Pak C18 cartridges and capillary gas chromatography of triazine herbicides in human body fluids. *Forensic Science International*. 54 (2) :159-166.
- [78] Inoue, S, Saito, T, Mase, H, Suzuki, Y, Takazawa, K, Yamamoto, I, *et al*, 2007. Rapid simultaneous determination for organophosphorus pesticides in human serum by LC-MS. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 44 (1): 258-264.
- [79] Jia, G, Lv, C, Zhu, W, Qiu, J, Wang, X and Zhou, Z, 2008. Applicability of cloud point extraction coupled with microwave-assisted back-extraction to the determination of organophosphorous pesticides in human urine by gas chromatography with flame photometry detection. *Journal of Hazardous Materials*, 159 (2-3): 300-305.
- [80] Harrison, R, Goodrow, M and Hammock, B, 1991. Competitive inhibition ELISA for the s-triazine herbicides: Assay optimization and antibody characterization. *Agriculture Food Chemistry*, 39(1): 122-128.
- [81] Williams, K, Thorpe, SA and Reynolds, SL, 1996. The use of ELISA for the Determination of Pesticides Resdues in Food. *International Journal of Environmental Analytical Chemistry*, 65 (1-4): 149-152.
- [82] Cho, Y, Lee, H, Park, E, Lee, Y, Hammock, B, Ahn, K and Lee, J, 2002. Development of an ELISA for the Organophosphorus Insecticide Chlorpyrifos. *Korean Chemical Society*, 23 (3): 481-488.
- [83] Amaro, P, 2007. Pesticidas, Saúde e Ambiente e os Tabus dos Pesticidas em Portugal. *1^{as} Jornadas Nacionais de Olivicultura Biológicas*.
- [84] Ministério da Agricultura do Desenvolvimento Rural e das Pescas. "Produtos Fitofarmacêuticos". 2009. http://www.drapn.min-agricultura.pt/drapn/fitosanidade/apli_dl1001_2009.html# (acedido em 31 de Março de 2010).
- [85] Ministério da Agricultura e do Desenvolvimento Rural e das Pescas, 2009. *Pesticidas a pesquisar em 2010 em Águas para Consumo Humano*. In: Direcção-Geral de Agricultura e Desenvolvimento Rural, ed.

- [86] Direcção Regional de Agricultura e Pescas do Norte. "A Zona Vulnerável nº1". 2010. www.drapn.min-agricultura.pt/drapn/zonavul/a_zv_1.html (acedido em 23 de Março de 2010).
- [87] Câmara Municipal de Esposende. "Freguesias". 2010. www.cm-esposende.pt (acedido em 15 de Maio de 2010).
- [88] Diniz, F, Poeta, A, Silva, C, Pinto, L and Abreu, S, 2003. Relatório da Cidade de Esposende - Portugal: O Papel das Pequenas e Médias Cidades no Desenvolvimento Rural. Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro. 44pp.
- [89] Leite, R, 2008. Os recursos Rurais de Esposende: Avaliação Baseada em Indicadores de Sustentabilidade na Zona Vulnerável 1. *Engenharia Civil UM - Universidade do Minho*, 33: 17-32.
- [90] Instituto Nacional de Estatística, 2009. *Indicadores Agro-Ambientais*. Destaque.
- [91] Primel, EG, 2003. *Aplicação de Extracção em Fase Sólida e Técnicas Cromatográficas para a Determinação de Herbicidas em Águas de Superfície e Acompanhamento da Degradação a Campo e no Laboratório*. Tese de Doutoramento em Química. Universidade Federal de Santa Maria.
- [92] Associação Grupo de Analistas de Resíduos de Pesticidas, 1999. *Manual de Resíduos de Pesticidas em Alimentos*. Rio de Janeiro.
- [93] Tomlin, C, 2000. *The e-Pesticides Manual*. In: The British Crop Protection Council, ed..
- [94] Causon, R, 1997. Validation of chromatographic methods in biomedical analysis. *Journal Chromatography B*, 689 (1): 175-180.
- [95] Castañera, A, 2007. *Validação de Ensaios. Procedimento Técnico*. Lisboa: Instituto Nacional de Medicina Legal, 17pp.
- [96] Ribani, M, Bottoli, CBG, Collins, CH, Jardim, I and Melo, L, 2003. Validação em Métodos Cromatográficos e Electroforéticos. *Química Nova*, 27 (5): 771-780.
- [97] Ermer, J, 2001. Validation in pharmaceutical analysis. Part I: an integrated approach. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 24 (5-6): 755-67
- [98] Chasin, AA, Nascimento, E, Ribeiro-Neto, L, Siqueira, ME, Andraus, MH, Salvador, M, Fernícola, N, Gorni, R and Salcedo, S, 1998. Validação de métodos em análises toxicológicas: uma abordagem geral. *Revista Brasileira de Toxicologia*, 11 (1): 1-6.
- [99] Meloan, CE, 1996. *Pesticides Laboratory Training Manual*. AOAC, International, 484pp.
- [100] Rogatsky, E and Stein, D, 2005. Evaluation of Matrix Effect and Chromatography Efficiency: New Parameters for Validation of Method Development. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, 16 (11): 1757-1759.
- [101] Paschoal, J, Rath, S, Airoidi, F and Reyes, F, 2008. Validação de Métodos Cromatográficos para a Determinação de Resíduos de Medicamentos Veterinários em Alimentos. *Química Nova*, 31 (5): 1190-1198.

- [102] Pinho, G, Neves, A, Queiroz, M and Silvério, F, 2009. Matrix Effect in Pesticides Quantification by Gas Chromatography. *Química Nova*, 32 (4): 987-995.
- [103] Fajgelj, A and Ambrus, A, 2000. *Principles and Practice of Method Validation*. Royal Society of Chemistry, 305pp.
- [104] American Public Health Association (APHA), American Water Works Association (AWWA), Water Environment Federation (WEF), eds., 2005. *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*. 21 ed. Washington DC.
- [105] Pimentel, MF and Barros, NB, 1996. Calibração: Uma revisão para Químicos Analíticos. *Química Nova*, 19 (3): 268-277.
- [106] Decreto-Lei n.º 208/2008 de 28 de Outubro. Estabelece o regime de protecção das águas subterrâneas contra a poluição e deterioração. Diário da República, 2008.
- [107] Decreto-Lei nº306/2007 de 27 de Agosto. Regime da qualidade da água destinada a consumo humano. Diário da República, 2007.

A. Anexos

Tabela A.1 Cálculos intermédios para a determinação dos parâmetros Selectividade/Especificidade

Composto	R1	R2	R3	R4	R5	Rmédio
Folpete	3E-07	-3,25E-07	0	-6,53E-09	8,13E-07	1,6122E-07
Dpatrazina	-5E-06	-5,57E-06	5E-06	0	5,05E-06	-1,01138E-07
Datrazina	0	0	5E-06	0	0	9,02595E-07
Dterbutilazina	0	0	8E-06	0	0	1,60216E-06
Dimetoato	0	0	0	0	0	0
Simazina	0	0	0	0	0	0
Atrazina	0	0	0	0	0	0
Terbutilazina	0	0	0	0	0	0
Diazinon	0	0	0	0	0	0
Malatião	0	0	0	0	0	0
Cloropirifos	0	0	0	0	0	0
Azinfos	0	0	0	0	0	0

Tabela A.2 Cálculo auxiliar para a precisão

Composto	Xi (média)	Xij	X	Msr _{un}	MSr
Folpete	340654,18	340655,00	340626,00	88,23	0,01
DesetiPropilatrazina	3257,57	3263,30	3267,20	10,30	0,41
Desetilatraxina	76185,00	76140,00	76149,00	144,00	25,00
Desetilterbutilazina	87812,60	87859,80	87879,70	500,27	27,50
Dimetoato	102733,15	102775,20	102798,60	475,97	21,83
Simazina	4334,19	4340,00	4350,00	27,77	0,42
Atrazina	23797,58	23780,00	23720,00	668,74	3,82
Terbutilazina	19179,29	19168,20	19149,40	99,27	1,52
Diazinão	78075,27	78046,50	78038,80	147,78	10,22
Malatião	1708869,09	1708850,40	1708862,00	5,59	4,31
Cloropirifos	3007803,48	3007806,70	3007893,70	904,41	0,13
Azinfos	106180,88	106172,80	106192,40	14,75	0,81

