

DETERMINAÇÃO DE PESTICIDAS EM ÁGUAS POR  
MICROEXTRACÇÃO EM FASE LÍQUIDA  
ASSOCIADA Á CROMATOLOGRAFIA GASOSA E  
ESPECTROMETRIA DE MASSA

**ANDREIA CRISTINA HENRIQUES ALVES**

Dissertação apresentada na Faculdade de Ciências e Tecnologia da  
Universidade Nova de Lisboa  
para a obtenção do grau de Mestre em Bioorgânica

Orientador: Prof. Dr<sup>a</sup> Maria Margarida Pontes Gonçalves

**Lisboa**

**2010**

## Resumo

O objectivo deste trabalho foi o desenvolvimento de métodos sensíveis para a determinação de pesticidas organofosforados (OPPs) em água. Foram desenvolvidos dois métodos que incluíram os pesticidas profos, o diazinão, o clorpirifos metil, o metil paratião, o fenclorfos, o clorpirifos e o tributilfosforotritioito e que são apresentados nos Capítulos II e III. No Capítulo II, apresenta-se um método de microextracção líquido-líquido dispersiva (DLLME) associada a cromatografia gasosa e a espectrometria de massa (GC-MS) para a determinação de OPPs em matrizes aquosas. As condições de DLLME foram optimizadas para solventes de extracção halogenados e não halogenados.

As melhores condições de DLLME foram encontradas com o sistema clorofórmio/2-propanol (solvente de extracção/solvente de dispersão); na validação deste método, obtiveram-se limites de detecção (LODs) entre 1.5 ng/L e 71.4 ng/L e limites de quantificação (LOQs) entre 5.1 ng/L e 238.1 ng/L. A reprodutibilidade foi estudada em três concentrações da gama de trabalho, obtendo-se valores dos desvios padrão relativos entre 7.5% e 10.3%. As recuperações foram avaliadas com amostras reais de águas da torneira, de rega e do poço fortificadas a uma concentração de 800 ng/L, obtendo-se valores entre 46.1% e 129.4%.

No Capítulo III, apresenta-se um método ainda mais sensível que DLLME para a determinação de OPPs em águas: a extracção em fase sólida associada à extracção líquido-líquido homogénea (SPE-HLLME). O método de SPE-HLLME foi optimizado e validado, obtendo-se limites de detecção 40 pg/L e 310 pg/L e limites de quantificação entre 150 pg/L e 1040 pg/L.

A reprodutibilidade foi estudada na concentração limite prevista pela legislação (100 ng/L), obtendo-se valores dos desvios padrão relativos entre 7.1 % e 11.6 %. As recuperações foram feitas com amostras reais de águas da torneira, água de rega e água do poço, fortificadas com uma concentração de 100 ng/L, obtendo-se valores entre 30.9 % e 101.4 %.

**Palavras-chave:** água destinada ao consumo humano, microextracção líquido-líquido dispersiva, extracção em fase sólida associada à extracção líquido-líquido homogénea.

## Abstract

The aim of this work was to develop sensitive methods for the determination of organophosphorous pesticides (OPPs) in water samples. The two methods developed included the pesticides profos, diazinon, chlorpyrifos methyl, methyl parathion, fenchlorphos, chlorpyrifos and tributylphosphorotrithioite and are presented in Chapters II and III.

In Chapter II is presented a method of dispersive liquid-liquid microextraction (DLLME) associated with gas chromatography and mass spectrometry (GC-MS) for the determination of the OPPs in aqueous matrices. The conditions of DLLME were optimized for halogenated and non-halogenated extraction solvents.

The best DLLME conditions were found using chloroform/2-propanol (extraction solvent/dispersion solvent). The validation of the method gave detection limits (LOD) between 1.5 ng/L and 71.4 ng/L and quantification limits (LOQ) between 5.1 ng/L and 238.1 ng/L. Reproducibility was studied at three concentrations in the working range, with relative standard deviations values between 7.5% and 10.3%. Recoveries were evaluated using real samples of tap water, irrigation and well fortified at a concentration of 800 ng/L and were in the range of 46.1% to 129.4%.

In Chapter III is presented a technique more sensitive than DLLME for the determination of OPPs: the association between solid phase extraction and homogeneous liquid-liquid extraction (SPE-HLLME). The validation of SPE-HLLME method gave limits of detection (LODs) between 40 pg/L and 310 pg/L and limits of quantification (LOQs) between 150 pg/L and 1040 pg/L.

Reproducibility was studied in the concentration limit prescribed by the law (100 ng/L), and the values of relative standard deviations were between 7.1% and 11.6%. The recoveries were evaluated with real samples of tap water a, irrigation water and well water, fortified at a concentration of 100 ng/L and were in the range of 30.9% to 101.4%.

**Keywords:** Drinking Water, dispersive liquid-liquid microextraction, extraction solid phase associated with homogeneous liquid-liquid extraction.

## **Agradecimentos**

Agradeço à Prof. Doutora Maria Margarida Pontes Gonçalves, orientadora deste trabalho, todo o seu empenho, força e dedicação. Agradeço os conhecimentos, que me transmitiu, não só na fase experimental como na fase teórica deste trabalho, incentivando-me a ter um sentido crítico do meu trabalho e a aperfeiçoar aspectos que outrora poderiam ser melhorados. Com determinação e esperança, demonstrou que, os obstáculos difíceis que surgiram durante a realização deste trabalho, poderiam ser contornados mesmo que nos parecessem quase impossíveis. Para si, o impossível tornou-se o possível, e é esta força e vontade de concentrar os objectivos delineados, que merecem o meu obrigada.

À Engenheira Maria Bernardo, que foi uma das grandes ajudas na realização deste trabalho, agradeço a sua dedicação e companheirismo. Os conhecimentos que me foi transmitindo, também foram preciosos e ao qual eu lhos agradeço.

À minha mãe, ao meu pai, ao meu namorado e a toda a minha família, agradeço a força que demonstraram e o apoio incondicional que me transmitiram, para que fosse possível concretizar este trabalho.

À minha mãe que sempre me apoiou, não posso deixar de lhe agradecer, mesmo nos momentos difíceis...

Ao meu namorado, que sempre manifestou a sua compreensão e paciência, apoiando-me nas decisões tomadas.

E a ti pai, que sempre me apoiaste, dando-me a tua força e compreensão e transmitindo-me a tua experiência de vida, o teu carinho e os valores que fizeram de mim o que eu hoje sou. Foste o meu grande apoio, durante a realização desta tese, e apesar de tudo, continuas a sê-lo onde quer que estejas. Foi por ti, todo o meu esforço e empenho neste trabalho. Foi por ti, que desesperei e que muitas lágrimas deitei...

Mas valeu a pena, porque tu neste momento, estarias orgulhoso e feliz por mim. Eu sei que este também era um dos teus sonhos, por isso fi-lo por ti.

Assim dedico-te esta tese, a ti meu pai... o meu obrigada por tudo.

# Índice

RESUMO .....	I
ABSTRACT .....	II
AGRADECIMENTOS.....	III
ÍNDICE .....	IV
ÍNDICE DE FIGURAS.....	VIII
ÍNDICE DE TABELAS .....	XI
SÍMBOLOS E ABREVIATURAS .....	XIV
<b>CAPÍTULO I - INTRODUÇÃO.....</b>	<b>1</b>
1.1 PERSPECTIVA AMBIENTAL.....	1
1.1.1 A ÁGUA E A VIDA .....	1
1.1.2 FONTES DE POLUIÇÃO DA ÁGUA .....	3
1.1.3 TIPOS DE RESÍDUOS .....	5
1.1.4 PESTICIDAS NA AGRICULTURA.....	8
1.1.5 CLASSES DE PESTICIDAS .....	10
1.1.6 UTILIZAÇÃO DE PESTICIDAS EM PORTUGAL .....	12
1.2 ÁGUA DESTINADA AO CONSUMO HUMANO.....	13
1.2.1 SISTEMAS DE TRATAMENTO DA ÁGUA DESTINADA AO CONSUMO HUMANO.....	13
1.2.2 LEGISLAÇÃO RELATIVA À QUALIDADE DA ÁGUA DESTINADA AO CONSUMO HUMANO .....	15
1.2.2.1 Legislação Comunitária .....	15
1.2.2.2 Legislação Nacional.....	18
1.3 DETERMINAÇÃO DE PESTICIDAS EM ÁGUAS .....	20
1.3.1 MÉTODOS DE EXTRACÇÃO .....	20
1.3.1.1 Extracção líquido-líquido (LLE) .....	21
1.3.1.2 Extracção em fase sólida (SPE).....	22
1.3.1.3 Microextracção em Fase Sólida (SPME) .....	24
1.3.1.4 Extracção Sorptiva em Barra de Agitação (SBSE).....	25
1.3.1.5 Microextracção em Fase Líquida (LPME).....	26
1.3.1.6 Microextracção líquido-líquido com gota suspensa (SDME) .....	27
1.3.1.7 Microextracção líquido-líquido com membrana (HFME) .....	28
1.3.1.8 Microextracção líquido-líquido com gota flutuante (SFDME).....	29
1.3.1.9 Microextracção Líquido-Líquido Dispersiva (DLLME) .....	30
1.3.1.10 Microextracção líquido-líquido homogénea (HLLME).....	34
1.3.2 MÉTODOS DE ANÁLISE .....	35
1.3.2.1 Cromatografia Gasosa.....	35
1.3.2.2 Cromatografia Gasosa e Espectrometria de Massa .....	42

1.3.2	VALIDAÇÃO DO MÉTODO ANALÍTICO .....	45
1.3.2.1	Selectividade/ Especificidade .....	46
1.3.2.2	Calibração analítica.....	46
1.3.2.3	Intervalo de Linearidade Analítica .....	48
1.3.2.4	Limiares Analíticos.....	49
1.3.2.5	Sensibilidade.....	49
1.3.2.6	Precisão .....	50
1.3.2.7	Robustez.....	51
1.3.2.8	Exactidão.....	51
1.3.2.9	Eficiência de Extracção.....	51

## **CAPÍTULO II - DETERMINAÇÃO DE PESTICIDAS ORGANOFOSFORADOS EM ÁGUA POR DLLME-GC-MS..... 53**

2.1	INTRODUÇÃO .....	53
2.1.1	PESTICIDAS ORGANOFOSFORADOS NA AGRICULTURA.....	53
2.2	PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL .....	60
2.2.1	SOLVENTES E REAGENTES .....	60
2.2.2	AMOSTRAS REAIS.....	60
2.2.3	MATERIAIS.....	60
2.2.4	PREPARAÇÃO DE SOLUÇÕES-PADRÃO E CONSTRUÇÃO E RECTAS DE CALIBRAÇÃO .....	61
2.2.5	MICROEXTRACÇÃO LÍQUIDO-LÍQUIDO DISPERSIVA (DLLME) .....	62
2.2.6	ANÁLISE CROMATOGRÁFICA.....	63
2.2.7	CÁLCULOS .....	64
2.3	RESULTADOS E DISCUSSÃO DOS RESULTADOS .....	65
2.3.1	OPTIMIZAÇÃO DO PROCESSO DE SEPARAÇÃO CROMATOGRÁFICA .....	65
2.3.2	ESTUDO DO PROCESSO DE DLLME .....	67
2.3.2.1	Solventes halogenados .....	68
2.3.2.1.1	Avaliação do equilíbrio de fases.....	71
2.3.2.1.2	Avaliação da partição dos analitos .....	76
2.3.2.1.3	Optimização das condições de DLLME para o sistema clorofórmio / 2-propanol .....	79
2.3.2.2	Solventes não halogenados.....	85
2.3.2.2.1	Avaliação do equilíbrio de fases.....	87
2.3.2.2.2	Avaliação da partição dos analitos .....	90
2.3.2.2.3	Optimização das condições de DLLME para o sistema ciclohexano/1-propanol .....	100
2.3.2.3	Comparação entre solventes halogenados e não halogenados .....	104
2.3.3	VALIDAÇÃO DA DETERMINAÇÃO DE PESTICIDAS ORGANOFOSFORADOS EM ÁGUA POR DLLME COM CLOROFÓRMIO/2-PROPANOL.....	106
2.3.3.1	Construção de rectas de calibração .....	106

2.3.3.2	Determinação dos limites de detecção e de quantificação .....	108
2.3.3.3	Análise da Linearidade, Precisão, Variância entre dados .....	109
2.3.3.4	Precisão do método analítico: análise da repetibilidade .....	110
2.3.3.5	Exactidão do método analítico. Efeito de matriz.....	111

**CAPÍTULO III - DETERMINAÇÃO DE PESTICIDAS ORGANOFOSFORADOS EM ÁGUA POR SPE-HLLME-GC-MS..... 117**

**3.1 INTRODUÇÃO ..... 117**

**3.2 PARTE EXPERIMENTAL ..... 119**

3.2.1	MATERIAIS E SOLVENTES .....	119
3.2.2	PREPARAÇÃO DE SOLUÇÕES-PADRÃO E CONSTRUÇÃO E RECTAS DE CALIBRAÇÃO .....	119
3.2.3	MÉTODO DE ASSOCIAÇÃO DA EXTRACÇÃO EM FASE SÓLIDA COM A MICROEXTRACÇÃO LÍQUIDO-LÍQUIDO HOMOGÉNEA (SPE-HLLME).....	120
3.2.4	ANÁLISE CROMATOGRÁFICA.....	121
3.2.5	AMOSTRAS REAIS.....	121
3.2.6	CÁLCULOS .....	121

**3.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO ..... 122**

3.3.1	DESENVOLVIMENTO E OPTIMIZAÇÃO DO PROCESSO DE SPE-HLLME.....	122
3.3.1.1	Efeito da variação do volume das amostras de água (clorofórmio/2-propanol) .....	122
3.3.1.2	Extracção sequencial da mesma amostra .....	123
3.3.1.3	Comparação de diferentes sistemas de solventes de extracção/solventes de dispersão.....	125
3.3.1.4	Fixação do volume de fase orgânica sedimentada em 15 µL .....	127
3.3.1.5	Estudo independente de parâmetros de HLLME: volume de solvente de dispersão e do volume de água .....	128
3.3.1.6	Estudo da variação do volume de água em HLLME para os sistemas clorofórmio/2-propanol, tetracloroetileno/1-propanol e tetracloreto de carbono/acetona .....	130
3.3.1.7	Aumento do volume de amostra utilizada em SPE-HLLME com os sistemas clorofórmio/2-propanol, tetracloroetileno/1-propanol e tetracloreto de carbono/acetona .....	133
3.3.1.8	Redução do volume de tetracloreto de carbono no passo de HLLME .	135
3.3.1.9	Aumento do volume de amostra no passo de SPE .....	136
3.3.2	VALIDAÇÃO DO MÉTODO DE SPE-HLLME-GC-MS PARA A DETERMINAÇÃO DE PESTICIDAS ORGANOFOSFORADOS EM ÁGUAS .....	137
3.3.2.1	Estudo da linearidade e gama de trabalho .....	137
3.3.2.2	PRECISÃO DO MÉTODO ANALÍTICO: ANÁLISE DA REPETIBILIDADE.....	139
3.3.2.3	Ensaio de recuperação em amostras reais.....	139

<b>CAPITULO IV-CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS PARA O FUTURO .....</b>	<b>141</b>
<b>BIBLIOGRAFIA.....</b>	<b>145</b>
<b>ANEXOS.....</b>	<b>XIX</b>

## Índice de Figuras

<b>Figura 1.1</b> – Consumo de água por sector de actividade.	5
<b>Figura 1.2</b> – Resultados do programa de revisão de pesticidas previsto na Directiva 91-414-CEE de 15 de Julho de 1991.	10
<b>Figura 1.3</b> - Colunas de extracção em fase sólida (a) e sistema de filtração sob vácuo (b).	22
<b>Figura 1.4</b> – Etapas do processo de extracção em fase sólida.	23
<b>Figura 1.5</b> – Microextracção em fase sólida.	25
<b>Figura 1.6</b> – Desorção dos analitos com solvente após SBSE com Twister.	26
<b>Figura 1.7</b> - Publicações envolvendo LPME, indexadas na Web of Science, no período de 1997 a 2010.	27
<b>Figura 1.8</b> - Microextracção líquido-líquido com gota suspensa.	28
<b>Figura 1.9</b> – Microextracção líquido-líquido com membrana.	29
<b>Figura 1.10</b> - Microextracção líquido-líquido com gota flutuante.	30
<b>Figura 1.11</b> - Microextracção líquido-líquido dispersiva.	32
<b>Figura 1.12</b> - Publicações relativas a DLLME indexadas na Web of Science no período entre 2006 e 2009.	32
<b>Figura 1.13</b> - Injetor com e sem repartição para colunas capilares.	37
<b>Figura 1.14</b> - Detectores universais utilizados em GC.	40
<b>Figura 1.15</b> - Detectores específicos/ selectivos.	41
<b>Figura 1.16</b> - Detectores usados na análise cromatográfica de pesticidas.	42
<b>Figura 1.17</b> - Processo de Ionização por Impacto de Electrão.	43
<b>Figura 2.1</b> - Iões seleccionados para cada analito pelo método de extracção de ião individual.	66
<b>Figura 2.2</b> - Efeito da força iónica da fase aquosa no factor de enriquecimento dos pesticidas organofosforados, no sistema clorofórmio-isopropanol-água.	81
<b>Figura 2.3</b> – Variação do factor de enriquecimento dos pesticidas organofosforados em função do pH da amostra de água.	82
<b>Figura 2.4</b> – Variação da percentagem de extracção dos pesticidas organofosforados em função do pH da amostra de água.	83
<b>Figura 2.5</b> - Factores de enriquecimento obtidos para os pesticidas organofosforados com o solvente de extracção ciclohexano e diferentes solventes de dispersão.	90
<b>Figura 2.6</b> – Percentagens de extracção obtidas para os pesticidas organofosforados com o solvente de extracção ciclohexano e diferentes solventes de dispersão.	91
<b>Figura 2.7</b> - Factores de enriquecimento obtidos para os pesticidas organofosforados com o solvente de extracção heptano e diferentes solventes de dispersão.	92

<b>Figura 2.8</b> – Percentagens de extracção obtidas para os pesticidas organofosforados com o solvente de extracção heptano e diferentes solventes de dispersão.	<b>92</b>
<b>Figura 2.9</b> - Factores de enriquecimento obtidos para os pesticidas organofosforados com o solvente de extracção octano e diferentes solventes de dispersão.	<b>93</b>
<b>Figura 2.10</b> – Efeito da variação do volume do solvente de extracção no factor de enriquecimento dos OPPs, para o sistema ciclohexano/1-propanol.	<b>94</b>
<b>Figura 2.11</b> – Percentagens de extracção obtidas para os pesticidas organofosforados com o solvente de extracção octano e diferentes solventes de dispersão.	<b>95</b>
<b>Figura 2.12</b> – Efeito da variação do volume do solvente de extracção no factor de enriquecimento dos OPPs, para o sistema ciclohexano/1-propanol.	<b>95</b>
<b>Figura 2.13</b> – Efeito da variação do volume do solvente de extracção nas percentagens de extracção dos OPPs, para o sistema ciclohexano/1-propanol.	<b>96</b>
<b>Figura 2.14</b> – Efeito da variação do volume do solvente de extracção nas percentagens de extracção dos OPPs, para o sistema heptano/1-propanol	<b>97</b>
<b>Figura 2.15</b> - Efeito da secagem da fase orgânica para o sistema de heptano (50 µL)/metanol (0.5 mL) nos factores de enriquecimento dos OPPs.	<b>98</b>
<b>Figura 2.16</b> - Efeito da secagem da fase orgânica para o sistema de heptano (50 µL)/metanol (0.5 mL) nas percentagens de extracção dos OPPs.	<b>98</b>
<b>Figura 2.17</b> - Factores de enriquecimento obtidos para os sistemas ciclohexano/1-propanol e heptano/metanol nas melhores condições de extracção identificadas para cada um deles.	<b>99</b>
<b>Figura 2.18</b> - Efeito da variação do volume de ciclohexano nos factores de enriquecimento dos OPPs.	<b>101</b>
<b>Figura 2.19</b> - Efeito da variação do volume de ciclohexano nas percentagens de extracção dos OPPs.	<b>101</b>
<b>Figura 2.20</b> - Efeito da variação do volume de 1-propanol nos factores de enriquecimento dos OPPs.	<b>103</b>
<b>Figura 2.21</b> - Efeito da variação do volume de 1-propanol na percentagem de extracção.	<b>104</b>
<b>Figura 2.22</b> - Comparação entre os sistemas de solventes halogenados e não halogenados otimizados para o método de microextracção líquido-líquido dispersiva.	<b>105</b>
<b>Figura 2.23</b> - Cromatograma em modo de varrimento completo para a amostra de água da torneira.	<b>113</b>
<b>Figura 2.24</b> - Cromatograma em modo de varrimento completo para a amostra de água do poço (Tábua).	<b>114</b>
<b>Figura 2.25</b> - Cromatograma em modo de varrimento completo para a amostra de aguado poço (Arganil).	<b>115</b>

<b>Figura 2.26-</b> Cromatograma em modo de varrimento completo para a amostra de água de rega.	<b>116</b>
<b>Figura 3.1-</b> Efeito da variação do volume de amostra nos factores de enriquecimento.	<b>123</b>
<b>Figura 3.2 -</b> Percentagem de área cromatográfica obtida para cada analito em três extracções sucessivas de uma amostra de água com 100 mL.	<b>124</b>
<b>Figura 3.3 -</b> Percentagem de área cromatográfica obtida para cada analito em três extracções sucessivas de uma amostra de água com 500 mL.	<b>124</b>
<b>Figura 3.4-</b> Factores de enriquecimento obtidos com SPE-HLLME utilizando diferentes sistemas de solventes.	<b>126</b>
<b>Figura 3.5 -</b> Factores de enriquecimento para um volume de fase sedimentada de 15 µL.	<b>127</b>
<b>Figura 3.6 -</b> Variação do volume de fase aquosa em HLLME com o sistema clorofórmio/2-propanol.	<b>131</b>
<b>Figura 3.7 -</b> Variação do volume de fase aquosa em HLLME para o sistema tetracloroetileno/1-propanol.	<b>132</b>
<b>Figura 3.8-</b> Variação do volume de fase aquosa em HLLME para o sistema tetracloroeto de carbono/acetona.	<b>132</b>
<b>Figura 3.9-</b> Factores de enriquecimento para os pesticidas com um volume de amostra de 500 mL e uma concentração de fortificação de 100 ng/L.	<b>137</b>
<b>Figura 3.10-</b> Cromatograma da extracção dos pesticidas a partir de uma amostra da água da torneira utilizando o método de SPE-HLLME-GC-MS.	<b>140</b>

## Índice de Tabelas

<b>Tabela 1.1</b> - Fontes de poluição industrial.	<b>4</b>
<b>Tabela 1.2</b> - Características físicas e químicas dos resíduos.	<b>7</b>
<b>Tabela 1.3</b> - Classes e Famílias de pesticidas.	<b>12</b>
<b>Tabela 1.4</b> - Pesticidas usados em diversas culturas nacionais.	<b>13</b>
<b>Tabela 1.5</b> - Procedimentos para tratamento de águas para consumo humano.	<b>14</b>
<b>Tabela 1.6</b> - Compostos estudados através de microextração líquido-líquido dispersiva e referidos na literatura.	<b>34</b>
<b>Tabela 2.1</b> - Pesticidas organofosforados estudados e tipo de culturas onde se aplicam.	<b>53</b>
<b>Tabela 2.2</b> - Estruturas Químicas e N° de CAS dos pesticidas organofosforados.	<b>54</b>
<b>Tabela 2.3</b> - Solubilidade em água, constantes de dissociação ( $pK_a$ ) e constantes de partição octanol/água $\log K_{ow}$ dos vários pesticidas organofosforados.	<b>55</b>
<b>Tabela 2.4</b> – Limiares analíticos (LOD e LOQ) obtidos na determinação de pesticidas organofosforados por SPME-GC-MS e SPE-GC-MS.	<b>56</b>
<b>Tabela 2.5</b> - Condições de extração e limites de detecção (LODS) obtidos por DLLME para alguns pesticidas organofosforados	<b>57</b>
<b>Tabela 2.6</b> - Tempo médio gasto e custos associados a cada técnica extração do diazinão a partir de amostras de água.	<b>58</b>
<b>Tabela 2.7</b> – Iões seleccionados para detecção selectiva, iões moleculares e tempos de retenção dos pesticidas organofosforados.	<b>65</b>
<b>Tabela 2.8</b> - Equações das rectas de calibração e respectivos coeficientes de correlacção para os pesticidas estudados, na gama de 100 $\mu\text{g/L}$ a 800 $\mu\text{g/L}$ .	<b>67</b>
<b>Tabela 2.9</b> - Densidades, solubilidades em água, momentos dipolares e constantes dieléctricas dos solventes halogenados incluídos neste estudo.	<b>69</b>
<b>Tabela 2.10</b> – Massa ( $m_{sol}$ ) ou volume ( $V_{sol}$ ) de solvente halogenado necessário para saturar 5 mL de água, a 25°C.	<b>70</b>
<b>Tabela 2.11</b> - Densidades, solubilidades, momentos dipolares e constantes dieléctricas dos solventes de dispersão incluídos neste estudo.	<b>71</b>
<b>Tabela 2.12</b> - Avaliação da qualidade da dispersão para diferentes combinações de solvente de extração e solvente de dispersão.	<b>73</b>
<b>Tabela 2.13</b> - Volume de fase orgânica sedimentada para as diferentes combinações de solvente de extração e solvente de dispersão.	<b>75</b>
<b>Tabela 2.14</b> - Factores de enriquecimento dos pesticidas organofosforados em DLLME efectuada com diversas combinações de solventes	<b>77</b>
<b>Tabela 2.15</b> – Percentagem de extração dos pesticidas organofosforados em DLLME efectuada com diversas combinações de solventes.	<b>78</b>

<b>Tabela 2.16</b> - Variação dos factores de enriquecimento (EF) dos pesticidas organofosforados em função do volume de 2-propanol ( $V_{disp}$ ).	79
<b>Tabela 2.17</b> -Variação da percentagem de extracção dos pesticidas organofosforados em função do volume de 2-propanol ( $V_{disp}$ ).	80
<b>Tabela 2.18</b> - Efeito da força iónica da fase aquosa na percentagem de extracção dos pesticidas organofosforados, no sistema clorofórmio-isopropanol-água.	81
<b>Tabela 2.19</b> - Efeito da secagem da fase orgânica nos factores de enriquecimento e percentagens de extracção dos pesticidas organofosforados.	84
<b>Tabela 2.20</b> – Densidade, solubilidade em água a 25 °C, momento dipolar e constante dieléctrica dos solventes não halogenados seleccionados para este trabalho.	86
<b>Tabela 2.21</b> – Massa ( $m_{sol}$ ) ou volume ( $V_{sol}$ ) de alguns solventes não halogenados necessário para saturar 5 mL de água, a 25°C.	87
<b>Tabela 2.22</b> - Qualidade da dispersão e volume sedimentado para DLLME efectuada com misturas de solventes não halogenados.	88
<b>Tabela 2.23</b> - Qualidade da dispersão e volume sedimentado para DLLME com misturas de solventes não halogenados, com adição de NaCl (10%).	89
<b>Tabela 2.24</b> – Percentagens de recuperação para os sistemas de solventes optimizados: Ciclohexano/1-propanol Vs. Clorofórmio/2-propanol.	105
<b>Tabela 2.25</b> – Gamas de trabalho, equações das rectas de calibração, coeficientes de correlação e coeficientes de variação do método validado.	107
<b>Tabela 2.26</b> – Limites de detecção e limites de quantificação dos pesticidas no método validado.	108
<b>Tabela 2.27</b> - Testes aos parâmetros da validação do método analítico.	110
<b>Tabela 2.28</b> - Precisão do método de DLLME-GC-MS.	111
<b>Tabela 2.29</b> - Recuperações relativas das quatro amostras reais estudadas e fortificadas com 800 ng/L de cada analito.	112
<b>Tabela 3.1</b> - Condições de extracção e limiares analíticos dos analitos estudados pelo método de associação do SPE com DLLME.	118
<b>Tabela 3.2</b> - Eficiência de extracção (%) dos OPPs por SPE-HLLME-GC-MS com os três sistemas de solventes estudados.	126
<b>Tabela 3.3</b> - Valores de % Extracção obtidos para os três sistemas estudados considerando um volume de fase sedimentada de 15 $\mu$ L.	128
<b>Tabela 3.4</b> - Factores de enriquecimento obtidos no estudo de variação do volume de solvente de dispersão, com um volume de água de 5 mL.	129
<b>Tabela 3.5</b> - Factores de enriquecimento obtidos no estudo de variação do volume de solvente de dispersão, com um volume de água de 10 mL.	129

<b>Tabela 3.6-</b> Factores de enriquecimento e percentagens de extracção para o método SPE-HLLME com um volume de amostra de 100mL.	<b>134</b>
<b>Tabela 3.7-</b> Factores de enriquecimento e percentagens de extracção para o método SPE-HLLME com um volume de amostra de 200mL.	<b>134</b>
<b>Tabela 3.8-</b> Factores de enriquecimento em SPE-HLLME para o sistema CCl <sub>4</sub> /acetona utilizando diferentes volumes de tetracloreto de carbono.	<b>136</b>
<b>Tabela 3.9 -</b> Parâmetros de validação do método de SPE-HLLME-GC-MS optimizado.	<b>138</b>
<b>Tabela 3.10-</b> Precisão do método de SPE-HLLME-GC-MS.	<b>139</b>
<b>Tabela 3.11 -</b> Ensaios de recuperação do método de SPE-HLLME aplicado a amostras reais de água de rega e de consumo.	<b>140</b>

## Símbolos e Abreviaturas

$a$	Ordenada na origem (equação da recta $y = a + bx$ )
A1	Águas superficiais com tratamento físico e desinfeção, classificação definida pelo Decreto-Lei n.º 236/98
A2	Águas superficiais com tratamento físico, químico e desinfeção, classificação definida pelo Decreto-Lei n.º 236/98
A3	Águas superficiais com tratamento físico, químico de afinação e desinfeção, classificação definida pelo Decreto-Lei n.º 236/98
AED	<i>Atomic Emission Detector</i> - Detector de Emissão Atómica
APCI	<i>Atmospheric-Pressure Chemical Ionization</i> - Ionização Química à Pressão Atmosférica,
API	<i>Atmospheric Pressure Ionization</i> - Ionização à Pressão Atmosférica
$[A]_{org}$	Concentração do analito na fase orgânica
$[A]_{aq}$	Concentração do analito na fase aquosa
ANSI	<i>American National Standards Institute</i> - Instituto Nacional Americano de Padrões
$b$	Declive da recta (equação da recta $y = a + bx$ )
BSI	<i>British Standards Institute</i> - Instituto Britânico de Padrões
BTEX	<i>Benzene, Toluene, Ethylbenzene and Xylene</i> - Benzeno, Tolueneo, Etilbenzeno e Xileno
C	Concentração (m/v)
$C_{sed}$	Concentração da fase sedimentada
$C_0$	Concentração dos analitos na fase aquosa
CAGER	Comissão de Acompanhamento de Gestão dos Resíduos
CAR	Carboxen
CAS	<i>Chemical Abstracts Service</i>
CE	Comunidade Europeia
CI	<i>Chemical Ionization</i> - Ionização Química
$CV_m$	Coefficiente de Variação do método
DI-SPME	<i>Direct Solid Phase Microextraction</i> - Microextração em Fase Sólida Directa

DLLME	<i>Dispersive Liquid-Liquid Microextraction</i> - Microextração líquido-líquido dispersiva
DGADR	Direcção-Geral de Agricultura e Desenvolvimento Rural
DQA	Directiva Quadro da Água
DS <sup>2</sup>	Diferença de variâncias (estudo de funções lineares)
DVB	Divinilbenzeno
ECD	<i>Electron Capture Detector</i> - Detector de Captura de Electrão
EF	<i>Enrichment Factor</i> - Factor de Enriquecimento
EI	<i>Electron Ionization</i> - Inoização por Impacto de Electrão
ERSAR	Entidade Reguladora dos Serviços de Águas e Resíduos
ESI	<i>Electrospray Ionization</i> - Ionização por Electrospray
EU	<i>European Union</i> - União Europeia
EPA	<i>Environmental Protection Agency</i> - Agência de Protecção do Ambiente
<i>F</i>	Valor tabelado da distribuição <i>F</i> de Snedecor/Fisher
FID	<i>Flame Ionization Detector</i> - Ionização de Chama
FPD	<i>Flame Photometric Detector</i> - Fotometria de Chama
FT-ICR	<i>Fourier-transform Ion Cyclotron Resonance</i> - Transformada de Fourier- Ressonância de Ião em Ciclotrão
FTIR	<i>Fourier Transform Infrared</i> -Transformada de Fourier- Espectrometria de Infravermelho
FullScan	Detecção por Varrimento completo
F <sub>R</sub>	Factor de resposta
GC	<i>Gas Chromatography</i> - Cromatografia Gasosa
HFME	<i>Hollow Fiber Microextraction</i> - Microextração líquido-líquido com membrana
HLLME	<i>Homogeneous Liquid-liquid Microextraction</i> - Microextração líquido-líquido homogénea
HPLC	<i>High Performance Liquid Chromatography</i> - Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

HS-SPME	<i>HeadSpace Solid Phase Microextraction</i> - Microextracção em Fase Sólida em fase de vapor
INAG	Instituto da Água
IPQ	Instituto Português da Qualidade
IRAR	Instituto Regulador de Águas e Resíduos
ISO	<i>International Organization for Standardization</i> - Organização Internacional de Padronização
IUPAC	<i>International Union of Pure and Applied Chemistry</i> - União Internacional da Química Pura e Aplicada
K ou $K_D$	Contante de Partição ou de Distribuição
LD <sub>50</sub>	<i>Lethal Dose 50%</i> - Dose Letal para 50% da população em teste
LER	Lista Europeia de Resíduos
LLE	<i>Liquid-Liquid Extraction</i> - Extracção líquido-líquido
LOD	<i>Limit of Detection</i> - Limite de Detecção
LOQ	<i>Limit of Quantification</i> - Limite de Quantificação
LPME	<i>Liquid Phase Microextraction</i> - Microextracção em fase líquida
MS	<i>Mass Spectrometry</i> - Espectrometria de Massa
MSn	Ionização com Multiestágio
$n$	Número de ensaios
$n_e$	Número de moles ou a massa de analito presentes na fase orgânica
$n_i$	Número de moles ou a massa de analito existentes na fase aquosa
N	Número de padrões de calibração
N.D	Não detectado
NPD	<i>Nitrogen Phosphorous Detector</i> - Detector de Nitrogénio-Fósforo
PA	Poliacrilato
PAHs	<i>Polycyclic aromatic Hydrocarbons</i> - Hidrocarbonetos aromáticos policíclicos
PBDs	<i>Polybrominated diphenyl ethers</i> - Ésteres difenílicos polibromados

PDMS	Polidimetilsiloxano
ppb	Partes por bilião (entendido como $\mu\text{g/L}$ )
ppm	Partes por milhão (entendido como $\text{mg/L}$ )
ppt	Partes por trilião (entendido como $\text{ng/L}$ )
QQQ	Triplo Quadrupólo
$R^2$	Coefficiente de Determinação da Recta
R	Coefficiente de Correlação da Recta
$\% R$	Percentagem de Recuperação
R.S.D	<i>Relative Standard Deviation</i> - Desvio Padrão Relactivo
$S^2$	Variância
$S_a$	Desvio padrão da ordenada na origem ( <i>a</i> )
$S_b$	Desvio padrão do declive da recta ( <i>b</i> )
$S_m$	Desvio padrão do método
$S_{x0}$	Desvio padrão correspondente a várias leituras no branco ou da solução com a concentração mais baixa da gama de trabalho
$S_{y/x}$	Desvio padrão residual de uma função linear
SBSE	<i>Stir Bar Sorptive Extraction</i> - Extracção Eorptiva em Barra de agitação
S.D	<i>Standard Deviation</i> - Desvio padrão
SDVB	<i>Styrene-divinylbenzene</i> - polímero de estireno-divinilbenzeno
SIRER	Sistema Integrado de Registo Electrónico de Resíduos
SIM	<i>Selected Ion Monitoring</i> - Monitorização por Ião Seleccionado
SPE	<i>Solid Phase Extraction</i> - Extracção em Fase Sólida
$\mu\text{SPE}$	<i>Solid Phase Micro-Extraction</i> - Micro-extracção em Fase Sólida
SPME	<i>Solid Phase MicroExtraction</i> -Microextracção em Fase Sólida
TBPT	<i>Tributylphosphorotrithioite</i>
TCD	<i>Thermo Conduvity Detector</i> - Detector de Condutividade Térmica

TIC	<i>Total Ion Current</i> - Corrente Iónica Total
TID	<i>Thermoionic Detector</i> - Detector Termoiónico
$t_R$	Tempo de Retenção
TSP	<i>Thermospray</i> - Ionização por Termospray
TOF	<i>Time-of-Flight</i> - Armadilha de Iões (Tempo de Vôo)
$t$	Valor da variável de Student
VMA	Valor Máximo Admissível
VMR	Valor Máximo Recomendável
VP	Valor Paramétrico
vs	Versus
$x$	Valores individuais de concentração conhecida de uma solução-padrão
$\bar{x}$	Média dos valores individuais de $x$
$\bar{y}$	Média dos valores individuais de $y$
$y'$	Área estimada a partir da equação da recta de calibração
$y_i$	Sinal obtido (área) para um padrão de determinada concentração
$\bar{y}_i$	Sinal estimado pela função de calibração linear para um padrão com a mesma concentração
$\bar{y}_{i2}$	Sinal estimado pela função de calibração polinomial do segundo grau para um padrão da mesma concentração

# Capítulo I - Introdução

## 1.1 Perspectiva Ambiental

### 1.1.1 A Água e a Vida

A água é um bem precioso e vital para todos os seres vivos. É um recurso limitado que devido á poluição, desertificação, e outros factores ambientais ou antropogénicos está a diminuir progressivamente no planeta.

Deste modo, torna-se urgente solucionar a sua escassez e melhorar a gestão dos recursos hídricos existentes, para que a inacessibilidade da água potável não se torne uma realidade para as gerações futuras. <sup>1</sup>

Comparando Portugal com outros países da Europa e da América do Norte, pode afirmar-se que o nosso país não é desfavorecido em recursos hídricos, pois os níveis de escoamento anuais resultantes da precipitação são bastante elevados, significando que parte dessa água vai para os sistemas de aquíferos existentes. Existem em Portugal cerca de 233 rios, no entanto a variabilidade do escoamento destes é muito acentuada ao longo do anos e irregular de ano para ano, o que pode ocasionar possíveis situações de escassez de água. Para que tal não aconteça, devem evitar-se situações de descontrolo do ciclo hidrológico que provoquem a diminuição da quantidade e da qualidade dos recursos existentes. <sup>2</sup>

Em algumas partes do globo terrestre existem dificuldades na acessibilidade da população à água potável, apesar dos esforços dispendidos em sistemas de tratamento e purificação de água. Este fenómeno de escassez não é novo, sobretudo para os países africanos, e começa também a ser uma realidade para alguns países europeus. Este problema tem origem em factores climáticos mas também na má gestão dos recursos hídricos existentes. Quando se fala de escassez de água, referimo-nos a desigualdades de longo prazo entre a oferta e a procura de água, enquanto a seca deve ser vista como um importante desvio face às condições naturais de disponibilidade de água, cuja ocorrência não pode ser controlada, mas cujos impactes podem ser minimizados a partir de uma eficiente gestão dos recursos.

Os problemas relacionados com o ordenamento do território e a gestão da água têm agravado a situação de desequilíbrio na distribuição deste recurso, provocando maiores impactes ambientais e sócio-económicos.<sup>1</sup>

Dados fornecidos por vários países, (Áustria, Bélgica, Chipre, Finlândia, Alemanha, Hungria, Itália, Malta, Holanda, Noruega, Portugal, Espanha e Reino Unido), revelam que estes têm sido, nos últimos anos, atingidos por secas que se traduzem em importantes prejuízos económicos.<sup>1</sup>

Devido à progressiva escassez de água doce, têm-se tomado medidas a nível comunitário e nacional para prevenir e contornar este problema, e para prevenir a contaminação dos recursos hídricos existentes, uma das causas fulcrais da deterioração da água. Nesse sentido, existe legislação a nível comunitário e nacional, que controla e gere todos os aspectos relacionados com os recursos hídricos de cada região visando a sua preservação e correcta utilização.

A utilização da água varia de região para região e altera-se durante as diferentes fases do desenvolvimento regional. Em zonas muito pouco desenvolvidas, predomina o consumo de água para a agricultura, a produção animal, e as actividades humanas essenciais (alimentação e higiene). Todavia, em zonas com algum desenvolvimento industrial e económico, a água é também usada para a aquicultura, a navegação e para a produção de trabalho ou energia com recurso a sistemas simples (moinhos, represas, pequenas barragens). Nas regiões de grande desenvolvimento industrial e tecnológico, a água é utilizada em aplicações de larga escala como a produção de energia térmica, a actividade agrícola intensiva, a produção de energia hidráulica, a construção de barragens, em sistemas de regulação fluvial e em redes de distribuição.<sup>3,4,5</sup>

Por outro lado, a água é também o meio receptor de diversos efluentes aquosos, nomeadamente, águas residuais, urbanas, industriais e agrícolas que são provenientes de fontes localizadas ou de fontes difusas. Esta utilização da água na recepção de efluentes contaminados é problemática, na medida em que promove a dispersão desses contaminantes no meio aquático e a sua migração para outros meios receptores como ar, solo ou biota. A poluição dos recursos hídricos contribui por sua vez para uma crescente deterioração das águas superficiais e subterrâneas que se destinam ao consumo humano.<sup>6</sup>

### **1.1.2 Fontes de Poluição da Água**

Durante a última década, tem-se verificado uma maior preocupação relativamente à poluição do ambiente, em especial à poluição da água, que conduziu ao reforço de normas e legislação dedicadas à monitorização e diminuição da poluição causada por diversas substâncias.

Esta problemática surge devido ao agravamento da contaminação da água de consumo, causada por substâncias orgânicas, inorgânicas e microbiológicas, como resultado da expansão das zonas urbanas e do aumento de resíduos provenientes de actividades antropogénicas.

A poluição causada por fontes localizadas pode ter soluções relativamente mais simples, quer pela minimização ou mesmo pela eliminação da fonte poluidora, caso isso seja possível e/ou indispensável.

Já as fontes de poluição difusa, constituem problemas de maior complexidade devido à imprecisão e diversidade da sua causa e origem geográfica, o que dificulta as medidas que é necessário implementar para reduzir ou eliminar os níveis de contaminação causados por este tipo de fontes poluidoras. As emissões provenientes de instalações agro-pecuárias, o lixiviamento de hidrocarbonetos a partir das estradas, as emissões de zonas habitacionais não ligadas à rede de esgotos são exemplos de fontes difusas.<sup>5</sup>

A elevada toxicidade de alguns poluentes (metais pesados, pesticidas, hidrocarbonetos aromáticos, etc), e o facto de a água ser um alimento consumido em quantidades apreciáveis por cada indivíduo, obriga ao estabelecimento de procedimentos analíticos que permitam assegurar a sua ausência nas águas consideradas adequadas ao consumo humano, sob pena de se poderem verificar efeitos adversos graves e irreversíveis na saúde pública. Por outro lado, estes contaminantes orgânicos ou inorgânicos presentes em concentrações muito baixas, em águas superficiais e subterrâneas captadas para produção de água potável, não são totalmente eliminados nos processos de tratamento e desinfecção destas águas. Assim, para que uma maior quantidade de águas superficiais e subterrâneas possa ser utilizada para consumo humano há que controlar os níveis de poluentes nessas águas, reduzindo a contaminação dos recursos hídricos.<sup>7,8</sup>

A indústria é o sector que mais utiliza a água como meio de recepção das suas descargas poluentes, sendo este problema particularmente acentuado na zona norte e litoral do País, onde existe uma maior concentração da actividade industrial. No sector industrial

nacional, as principais fontes responsáveis pelas descargas de poluentes lançadas em cursos de água doce são as seguintes: <sup>5,6,9,10</sup>

**Tabela 1.1**-Fontes de poluição industrial.

<b>Tipo de Indústria</b>	<b>Produções</b>
Extracção Mineira	Minérios vários
Agro-Alimentar	Alimentos sólidos e líquidos, em estado bruto ou processado
Agro-Pecuária	Animais e produtos animais
Têxtil	Têxteis e curtumes
Celulose	Pasta de papel, papel e cartão e derivados
Química e Petrolífera, Refinaria e Gás Natural	Produtos químicos, combustíveis, derivados do petróleo, gás natural
Madeiras	Produção de madeiras, mobiliário, painéis
Metalúrgicas e Metalomecânica	Matérias-primas metálicas (aço, ferro, alumínio, chumbo, cobre, ouro, prata, platina) e peças e utensílios metálicos
Cerâmica	Objectos e materiais de construção cerâmicos
Borracha e Resinas	Produção de materiais sintéticos e colas
Revestimentos	Tintas, vernizes, esmaltes, vedantes e isolantes
Fotográfica	Banhos de revelação, fixação e branqueamento

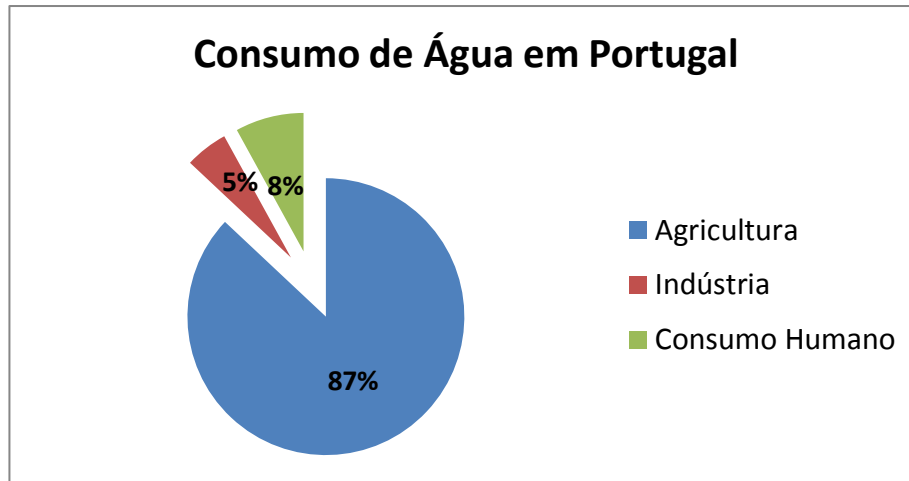
Estes sectores industriais são responsáveis pela emissão de quantidades apreciáveis de diversos contaminantes orgânicos e inorgânicos. Uma fracção dos produtos emitidos é removida por processos de volatilização, degradação térmica, fotoquímica ou microbiana bem como por processos de adsorção e absorção pelo solo ou por organismos vegetais ou animais. No entanto, dadas as quantidades significativas destes efluentes contaminados que são lançadas em cursos de água, nem sempre os processos de dispersão e degradação asseguram a redução da poluição para níveis seguros.

Já na actividade agrícola e pecuária, são produzidos efluentes ricos em fertilizantes e adubos, pesticidas e produtos fitofarmacêuticos. Os fertilizantes e adubos ricos em

nitratos e fosfatos são responsáveis pela ocorrência excessiva destes compostos em águas superficiais e subterrâneas. Quando estes poluentes são lançados directamente em cursos de água, sobretudo os de baixo fluxo, podem causar problemas de eutrofização pois estes poluentes são nutrientes para algas e microrganismos.

Os pesticidas e produtos fitofarmacêuticos são produtos tóxicos para organismos em geral, sendo os seus efeitos mais preocupantes, os mutagénicos, carcinogénicos ou de disrupção endócrina. Estes produtos químicos podem ainda exibir uma grande estabilidade química, o que lhes permite persistir em diversos meios durante períodos longos, resistir aos processos de biodegradação e serem eventualmente propagados ao longo da cadeia alimentar.

Além disso, a agricultura utiliza quantidades de água largamente superiores às outras actividades da responsabilidade do Homem (Figura 1.1). Se é verdade que uma fracção dessa água é absorvida pelas plantas ou evaporada, sendo portanto reciclada no ciclo biogeoquímico da água, uma outra parte é contaminada com pesticidas e adubos durante o processo de utilização agrícola e infiltra-se no solo transportando parte dessa carga poluente até às águas subterrâneas.<sup>11</sup>



**Figura 1.1-** Consumo de água por sector de actividade (adaptado na Ref<sup>a</sup> 11).

### 1.1.3 Tipos de Resíduos

Entende-se por resíduo, uma substância ou objecto, cujo detentor tem a obrigação ou intenção de se desfazer, nomeadamente os identificados na Lista Europeia de Resíduos (LER) ou mais recentemente, no artigo 3º do Decreto-Lei 178/2006 que transpõe a alínea a) do artigo 3.º do Decreto-Lei n.º 239/97.<sup>9,12</sup>

Os resíduos considerados perigosos possuem características susceptíveis de causar danos para a saúde e/ou para o ambiente e apresentam-se também na Lista Europeia de Resíduos.<sup>13,14</sup>

Dependendo das suas características e da sua origem, os resíduos são objecto de diversos sistemas de classificação.

Quanto à sua origem, os resíduos podem ser agrupados nas seguintes categorias:<sup>15,16</sup>

1. Resíduos Urbanos – são os provenientes de habitações bem como outros resíduos que, pela sua natureza ou composição, sejam semelhantes aos resíduos provenientes de habitações. Esta categoria subdivide-se em outras duas: a subcategoria dos resíduos sólidos urbanos, que englobam vários materiais sólidos incluindo os resíduos alimentares e a subcategoria dos resíduos provenientes do esgoto urbano, constituídos por matéria orgânica e inorgânica em solução ou em suspensão e ainda agentes patogénicos.
2. Resíduos Hospitalares – que são os resultantes das actividades médicas (prevenção, diagnóstico, tratamento, reabilitação e investigação). Esta categoria engloba resíduos orgânicos que, para além das suas características químicas, estão microbiologicamente contaminados servindo de veículo para diversos agentes patogénicos.<sup>10</sup>
3. Resíduos Industriais – são os gerados através de processos produtivos industriais, incluindo os processos de produção e distribuição de electricidade ou outras formas de energia. Nesta categoria estão englobados uma grande diversidade de resíduos, como plásticos, papel, madeira, fibras, borrachas, metais, ácidos, entre muitos outros.
4. Resíduos Agrícolas – são os provenientes da exploração agrícola e pecuária. De entre os resíduos desta categoria, destacam-se os pneus, os óleos, os produtos fitofarmacêuticos e os pesticidas.

Segundo os Decretos-Lei n.º 149/2004 e n.º 198/2008, definem-se as zonas sensíveis e as menos sensíveis das várias regiões do país, com os respectivos rios e bacias hidrográficas, para onde são normalmente lançadas as descargas de águas residuais urbanas e onde podem conseqüentemente surgir alguns dos poluentes perigosos.<sup>14,17</sup>

No que diz respeito às águas residuais das outras fontes (indústrias, agricultura, hospitais) existe uma variedade de diplomas que regulam a poluição causada.<sup>18</sup>

Quanto às características físicas e químicas dos resíduos e quanto à sua toxicidade estes podem ser classificados como: inertes, não inertes e perigosos. <sup>13</sup>

Algumas propriedades que influenciam a colocação de um resíduo numa destas categorias são a solubilidade, reactividade, biodegradabilidade e toxicidade.

Na tabela 1.2 apresentam-se as características de cada uma das categorias deste sistema de classificação.

**Tabela 1.2** - Características físicas e químicas dos resíduos.

<b>Resíduos</b>	<b>Características Principais</b>
<i>Inertes</i>	<ul style="list-style-type: none"><li>• Não sofrem transformações físicas, químicas ou biológicas</li><li>• Insolúveis em água, inflamáveis ou biodegradáveis</li></ul>
<i>Não inertes</i>	<ul style="list-style-type: none"><li>• Sofrem transformações físicas, químicas ou biológicas</li><li>• Solúveis em água</li><li>• Podem ser inflamáveis e biodegradáveis</li></ul>
<i>Perigosos</i>	<ul style="list-style-type: none"><li>• Reactivos, corrosivos, inflamáveis, tóxicos e patogénicos</li><li>• Mutagénicos, carcinogénicos, disruptores endócrinos</li><li>• Radioactivos</li></ul>

Na categoria dos resíduos perigosos, é dada uma especial atenção à avaliação dos efeitos biológicos, nomeadamente o potencial carcinogénico de cada substância. Esta análise é feita com base em estudos realizados a longo prazo em animais de laboratório. Deste modo, e segundo a Agência Internacional de Investigação de Cancro, existem cinco categorias de classificação para as substâncias químicas, dependendo do seu potencial carcinogénico.

Após avaliação dos efeitos biológicos dos resíduos perigosos, eles podem ainda ser classificados como mutagénicos, tóxicos para reprodução ou ecotóxicos. <sup>6,9</sup>

Actualmente, é possível ter acesso por via electrónica, à listagem dos tipos de resíduos existentes em Portugal, através do Sistema Integrado de Registo Electrónico de Resíduos (SIRER). No domínio da gestão de resíduos, a responsabilidade fica a cargo da Comissão de Acompanhamento de Gestão dos Resíduos (CAGER) que tem o dever de acompanhar as condições e evolução do mercado de resíduos, as operações e sistemas de gestão de resíduos bem como desempenhar um papel activo, tanto no incentivo ao aproveitamento dos resíduos enquanto matérias-primas secundárias, como também na adopção das novas e melhores tecnologias disponíveis para a sua gestão. <sup>12</sup>

As autoridades nacionais e regionais de resíduos, como o Instituto dos Resíduos, também têm a função de assegurar a implementação de estratégias de gestão de resíduos, pelos processos de incineração e co-incineração, sejam estes resíduos hospitalares, industriais, agrícolas ou urbanos.

Em suma, hoje em dia há cada vez mais a necessidade de controlar o impacto ambiental negativo causado por substâncias consideradas nocivas tanto para o Homem como para o ambiente. E sabendo que todos somos responsáveis por isso, dever-se-á contribuir para uma redução eficaz dos níveis de poluição, com vista à protecção da fauna e flora e garantindo um desenvolvimento sustentável para as gerações futuras.

#### **1.1.4 Pesticidas na Agricultura**

Designam-se por «pesticidas», todos os produtos fitofarmacêuticos e os biocidas, tal como definidos nos artigos 2.º da Directiva 91/414/CEE e na Directiva 98/8/CE, designando as substâncias químicas activas.<sup>19, 20, 21</sup>

Os pesticidas têm a função de eliminar animais ou plantas, considerados parasitas das culturas agrícolas. Cada composto denominado “pesticida” pode ainda ser subagrupado em classes, cujo nome provém em geral do latim, e que inclui o sufixo *-cida*, que significa matar. As classes mais comuns são a dos herbicidas, insecticidas, algicidas e bacterocidas, entre outros.

Estes produtos foram desenvolvidos sobretudo a partir da década de quarenta, sendo alguns deles obtidos por pequenas modificações de compostos utilizados como armas químicas durante a 2ª Guerra Mundial. O desenvolvimento da indústria química permitiu o desenvolvimento de inúmeros novos pesticidas que permitiram aumentar muito significativamente a produção de alimentos para uma população mundial em franca expansão. Só anos mais tarde se começou a perceber a extensão e a gravidade dos efeitos nefastos da utilização de pesticidas. A estabilidade química destes compostos, optimizada em laboratório de forma a permitir que fossem activos contra as pragas durante períodos longos de exposição às condições ambientais, dotou os pesticidas da capacidade de persistir nos ecossistemas e de se propagarem através da cadeia alimentar. Por outro lado, a toxicidade dos pesticidas que os torna tão eficientes contra os organismos a destruir é uma característica preocupante pois sabe-se que o Homem está exposto a resíduos de pesticidas por diferentes vias mas especialmente pela via alimentar.

Actualmente existem mais de 800 substâncias activas no mercado da União Europeia, das quais mais de 300 em Portugal.

Os efeitos secundários provocados pelos pesticidas incluem toxicidade para o Homem, toxicidade para outros animais, fitotoxicidade, diminuição da biodiversidade, aparecimento de pragas com elevada resistência, poluição generalizada dos ecossistemas.

O termo toxicidade, descreve o nível de perigo que compostos tóxicos apresentam quando em contacto com animais ou pessoas (Anexo I). Um dos parâmetros utilizados para quantificar a toxicidade é o LD<sub>50</sub> (dose letal em 50% dos animais testados).

Antes de cada pesticida entrar no mercado, realizam-se testes de toxicidade em ratos, coelhos e outros animais que tenham semelhanças fisiológicas com o Homem para garantir que a sua utilização não comporta riscos inaceitáveis para o Homem.

Assim, definem-se quatro categorias que classificam os pesticidas consoante o seu nível de perigo:

- **Categoria I**- representa os pesticidas perigosos e muito venenosos, abrangendo todos os pesticidas com valores de LD<sub>50</sub> entre 0-50 mg/Kg.
- **Categoria II**- representa os pesticidas moderadamente perigosos apresentando valores de LD<sub>50</sub> entre 50-500 mg/Kg.
- **Categoria III**- representa os pesticidas fracamente tóxicos cujo LD<sub>50</sub> está entre 500-5000mg/Kg.
- **Categoria IV**- representa os pesticidas que não são considerados tóxicos para o Homem, cujo valor de LD<sub>50</sub> é superior a 5000mg/Kg.

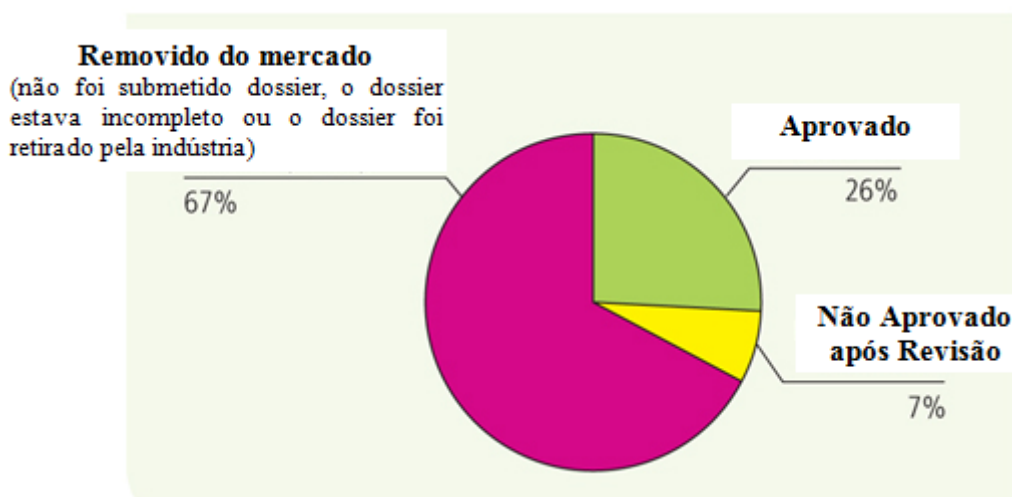
De acordo com esta classificação de toxicidade os pesticidas mais tóxicos são os insecticidas, seguindo-se os desfolhantes, depois os dessecantes, de seguida os herbicidas e por fim os fungicidas.<sup>21</sup>

A constatação do efeito nocivo destes compostos, conduziu ao desenvolvimento de políticas alternativas de desenvolvimento agrícola, assentes nos seguintes princípios:

- Proibição dos pesticidas de maior toxicidade (por exemplo, o DDT e seus isómeros).
- Produção de pesticidas alternativos com características menos agressivas para o ambiente (eficazes em pequenas doses, menos tóxicos e menos persistentes).
- Utilização de técnicas complementares que permitam reduzir a utilização de pesticidas.

A Comunidade Europeia (CE) lançou em 1993 um programa de revisão dos pesticidas em utilização no espaço europeu, tal como previsto na Directiva 91-414-CEE do Conselho, de 15 de Julho de 1991. <sup>19</sup>

Neste processo de revisão cada substância activa foi avaliada quanto à possibilidade da sua utilização com níveis mínimos de segurança no que diz respeito à saúde humana (consumidores, produtores, residentes locais e transeuntes) e no que diz respeito ao ambiente (água, solos e organismos como abelhas, minhocas, pássaros, e mamíferos). Quando esta Directiva foi adoptada existiam cerca de 1000 substâncias activas (e dezenas de milhar de produtos que continham estas substâncias), em utilização livre no mercado. As decisões de autorização de utilização ou de remoção de pesticidas do mercado iniciaram-se em 2001 e concluíram-se em 2009. Das 1000 substâncias activas avaliadas apenas 26% obtiveram a aprovação para a sua utilização no espaço europeu (Figura 1.2). <sup>22</sup>



**Figura 1.2** – Resultados do programa de revisão de pesticidas previsto na Directiva 91-414-CEE de 15 de Julho de 1991. (Adaptado a partir da Ref<sup>a</sup> 22)

### 1.1.5 Classes de Pesticidas

Cada pesticida tem um nome químico que representa a estrutura do composto, seguindo as regras de nomenclatura dos compostos orgânicos da International Union of Pure and Applied Chemistry (IUPAC) e um número de classificação no Chemical Abstracts Service (CAS). No entanto, como os nomes científicos segundo a nomenclatura IUPAC são muito extensos os pesticidas são normalmente designados pelos seus nomes comuns. O nome comum, por definição, é um nome livre menos extenso, usado na identificação de uma substância química, sem que seja necessário recorrer ao seu nome

científico. Na norma ISO (*International Standards Organization*) nº 257 (1988) e nas restantes actualizações (1999, 2001) podem ser consultadas as regras de atribuição e os respectivos nomes comuns atribuídos a cada pesticida. Outros organismos internacionais como o Instituto Nacional Americano de Padrões (*American National Standards Institute*), a Organização Internacional de Padronização (*International Organization for Standardization*) ou o Instituto Britânico de Padrões (*British Standards Institute*) podem atribuir nomes comuns aos novos agentes activos desenvolvidos dentro dos seus países. Contudo, esses nomes estão sujeitos a aprovação prévia por parte da ISO antes de serem postos no mercado da União Europeia (EU).<sup>21, 23</sup> Segundo a Directiva 91/414/EEC de 15 de Julho de 1991, os pesticidas que podem ser utilizados na agricultura estão indicados no anexo I da presente Directiva, num total de 71 substâncias activas autorizadas.<sup>19</sup> Estes pesticidas podem agrupar-se em classes que reflectem a sua acção e em famílias que reflectem as suas características estruturais (Tabela 1.3).<sup>21</sup>

**Tabela 1.3** - Classes e Famílias de pesticidas.

<b>Classes de Pesticidas</b>	<b>Família de Pesticidas</b>	<b>Exemplos de Pesticidas</b>
Acaricidas	<ul style="list-style-type: none"><li>• Organoclorados</li></ul>	Clorobenzilato
Algicidas	<ul style="list-style-type: none"><li>• Triazinas</li></ul>	Simazina
Avicidas	<ul style="list-style-type: none"><li>• Organofosforado</li></ul>	Endrina
Fungicidas	<ul style="list-style-type: none"><li>• Benzimidazóis</li><li>• Fenilamida</li></ul>	Benomil, Carbendazima Metalaxil
Herbicidas	<ul style="list-style-type: none"><li>• Ácidos Alifáticos</li><li>• Aminas</li><li>• Nitroanilinas</li><li>• Ureias</li><li>• Tiocarbamatos</li><li>• Triazinas</li><li>• Cloroacetamidas</li><li>• Benzotiadiazinona</li></ul>	2,4-D, MCPA Propanil Pendimetalina Linurão, Diurão Molinato Simazina, Atrazina, Propazina, Cimazina Metolaclor Bentazona
Insecticidas	<ul style="list-style-type: none"><li>• Organoclorados</li><li>• Organofosforados</li><li>• Carbamatos</li></ul>	Aldrina, Metoxiclor, DDT Malatião, Dimetoato, Diazinão, Clorpirifos, Fosmete, Metil Paratião Carbaril
Nematocidas	<ul style="list-style-type: none"><li>• Carbamatos</li></ul>	Carbofurão, Aldicarbe, Oxamil
Rodenticidas	<ul style="list-style-type: none"><li>• Ureia</li></ul>	Piriminil

### **1.1.6 Utilização de pesticidas em Portugal**

A lista de pesticidas a monitorizar em águas de consumo nas várias regiões de Portugal é elaborada pela Direcção-Geral de Agricultura e Desenvolvimento Rural (DGADR) e publicada anualmente pela Entidade Reguladora dos Serviços de Águas e Resíduos (ERSAR). Esta lista é elaborada a partir do histórico das vendas de produtos fitofarmacêuticos, e tendo em conta os resultados analíticos das pesquisas efectuadas no âmbito dos programas de controlo da qualidade da água para consumo humano.<sup>20, 24</sup>

A DGADR elabora também a lista de utilização dos vários pesticidas em função do tipo de culturas (Tabela 1.4).<sup>24</sup>

**Tabela 1.4** - Pesticidas usados em diversas culturas nacionais.

<b>Substância Activa</b>	<b>Tipo de Cultura</b>
<i>2,4-D</i>	Centeio, Trigo
<i>Alacloro</i>	Batateira, Feijoeiro, Milho, Soja
<i>Atrazina</i>	Milho
<i>Bentazona</i>	Cevada, Ervilheira
<i>Cimoxanil</i>	Vinha, Tomateiro, Batateira
<i>Clorpirifos</i>	Várias
<i>Clortolurão</i>	Cevada, Trigo
<i>Dimetoato</i>	Várias
<i>Diurão</i>	Citrinos, Espargos, Macieira, Oliveira, Pereira, Vinha
<i>Linurão</i>	Faveira, Cenoura, Cebola, Flores, Milho, Vinha
<i>MCPA</i>	Arroz, Centeio, Cevada, Linho, Trigo
<i>Metalaxil</i>	Vinha, Meloeiro, Tomateiro, Pepino, Tabaco
<i>Molinato, Propanil</i>	Arroz
<i>Terbutilazina</i>	Citrinos, Macieira, Pereira, Cereais, Milho, Olival, Vinha

## 1.2 Água Destinada ao Consumo Humano

### 1.2.1 Sistemas de tratamento da água destinada ao consumo humano

A água superficial ou subterrânea destinada ao consumo humano é sujeita a tratamentos físicos, químicos e de desinfecção de diferentes intensidades, com vista a obter uma água potável que pode ser consumida em segurança.

**Tabela 1.5** - Procedimentos para tratamento de águas para consumo humano.

<b>Categoria</b>	<b>Designação do Tratamento</b>	<b>Tipos de Tratamentos</b>
A1	Tratamento físico simples e desinfecção	Filtração rápida Desinfecção
A2	Tratamento físico normal, tratamento químico e desinfecção	Pré-cloração, Coagulação Floculação, Decantação Filtração, Desinfecção
A3	Tratamento físico e químico intensivo e desinfecção	Cloração, Floculação Decantação, Filtração Adsorção (carvão activado) Desinfecção (ozono, cloração final)

Os tipos de tratamento empregues em cada categoria visam atingir objectivos específicos. Por exemplo, a cloração e a desinfecção com ozono são processos que têm como objectivos a desinfecção da água e a remoção de alguns dos produtos químicos facilmente oxidáveis (como é o caso do aldicarbe e outros insecticidas).<sup>6, 8</sup>

Os produtos químicos utilizados no processo de tratamento de águas podem também interferir e adulterar a qualidade da água, na medida em que podem subsistir resíduos destes compostos ou produtos da sua reacção com a água ou com a matéria orgânica nela contida.<sup>6,8</sup> Como exemplos dos produtos utilizados nas várias etapas de tratamento da água, temos o hidróxido de cálcio, o sulfato de alumínio líquido, o cloro líquido, o hipoclorito de sódio, o permanganato de potássio, o sulfato de alumínio, o cloreto férrico, o carbonato de sódio, o dióxido de carbono, o ácido sulfúrico e o carvão activado.

Para além dos produtos químicos utilizados no tratamento da água, também os materiais que contactam com a água durante o seu armazenamento, transporte e abastecimento podem adulterar a sua qualidade.

Os principais materiais de contacto com águas de consumo são os que compõem as tubagens dos sistemas de abastecimento, nomeadamente: betão, argamassas de ligantes hidráulicos e seus componentes (cimentos, aditivos, adjuvantes e fibras), plásticos, compósitos de matrizes poliméricas, elastómeros e metais, sobretudo componentes de aço não-ligado e de ferro fundido.<sup>6, 25</sup>

De acordo com o artigo 10.º da Directiva n.º 98/83/CE, tanto os produtos químicos utilizados no tratamento da água para consumo humano bem como os materiais

utilizados nos sistemas de armazenamento, abastecimento e distribuição e que estejam em contacto com a água, não podem provocar alterações na qualidade da água que implique redução do nível de protecção da saúde humana. De acordo com esta Directiva, cada país da UE deverá dispor de um sistema de aprovação dos materiais de construção dos sistemas de abastecimento e dos produtos químicos usados nos processos de tratamentos de águas superficiais e subterrâneas.<sup>6, 26</sup>

## **1.2.2 Legislação Relativa à Qualidade da Água destinada ao Consumo Humano**

### **1.2.2.1 Legislação Comunitária**

A Directiva 2000/60/CE do Parlamento Europeu e do Conselho de 23 de Outubro de 2000 ou Directiva Quadro da Água (DQA) entrou em vigor em Dezembro de 2000, tendo como objectivos principais, estabelecer um enquadramento para a protecção das águas de superfície interiores, das águas de transição, das águas costeiras e das águas subterrâneas que previna a degradação dos ecossistemas aquáticos europeus, promova um consumo de água sustentável, assegure a redução das descargas de poluentes para os ecossistemas aquáticos e assim contribua para reduzir a poluição de águas superficiais e subterrâneas.

No Anexo VI desta Directiva definem-se as medidas a incluir nos programas de medidas para cada tipo de água remetendo no caso das águas destinadas para consumo humano as medidas previstas na Directiva 98/ 83/CE de 3 de Novembro de 1998.

No Anexo VIII da Directiva 2000/60/CE apresenta-se a lista indicativa das principais categorias de poluentes a monitorizar em águas destinadas ao consumo humano e no seu Anexo X estabelece-se a lista de substâncias prioritárias no domínio da política da água (Anexo II).

Entende-se por “substâncias prioritárias” as substâncias identificadas nos termos do n.º2 do artigo 16.º e enumeradas no anexo X da mesma Directiva, identificando todas as substâncias que apresentem riscos para o meio aquático ou através deste. A prioridade é estabelecida de acordo com os resultados de estudos de eco-toxicidade aquática e de exposição ao meio. Entre estas substâncias existem ainda as «substâncias perigosas prioritárias», isto é, substâncias identificadas nos termos do n.º3 e do n.º6 do artigo 16.º,

em relação às quais, há que se tomar medidas nos termos dos n.os 1 e 8 do mesmo artigo. Na Directiva 2000/60/CE estipula-se que, até 2020, os países europeus devem implementar as medidas necessárias para cessar as emissões e as descargas de todas as substâncias perigosas prioritárias lançadas no meio aquático.<sup>27, 28</sup>

A Directiva 2000/60/CE foi alterada, no que se refere à lista de substâncias prioritárias no domínio da política da água, pela Decisão N.º 2455/2001/CE de 20 de Novembro de 2001. O conjunto de substâncias perigosas prioritárias, alteradas a partir da Directiva do quadro da Água, está indicado numa lista de 33 substâncias referenciadas, que se encontra em Anexo.<sup>29</sup>

A Directiva 2000/60/CE foi ainda alterada pela Directiva 2008/32/CE de 11 de Março de 2008, no que diz respeito às competências de execução atribuídas à Comissão, pela Directiva 2008/105/CE de 16 de Dezembro de 2008, no que diz respeito às normas de qualidade ambiental no domínio da política da água e pela Directiva 2009/31/CE de 23 de Abril de 2009 no que diz respeito ao armazenamento geológico de dióxido de carbono, nomeadamente estipulando a proibição de armazenamento deste gás no leito do mar ou na coluna de água.

Na Directiva 2006/118/CE de 12 de Dezembro de 2006 relativa à protecção das águas subterrâneas, refere-se que as águas subterrâneas enquanto recurso natural valioso, sendo que estas representam as massas de água doce, mais sensíveis e importantes da União Europeia e, sobretudo, são uma importante fonte de abastecimento de água potável e como tal, devem ser protegidas da deterioração e da poluição química.<sup>30</sup>

Esta directiva estabelece medidas específicas no que respeita ao controlo da poluição das águas subterrâneas, modificando as medidas anteriormente referidas pelo n.ºs 1 e 2 do artigo 17.º da Directiva 2000/60/CE.<sup>28,30</sup>

De acordo com esta directiva, e tendo em conta as normas de qualidade para a avaliação das águas subterrâneas em conformidade com o artigo 4.º, estabeleceram-se limites máximos para poluentes como os pesticidas e seus metabolitos, cujo limite máximo para cada substância activa individual é de 0,1 µg/L e de 0,5 µg/L para o total de todos os pesticidas identificados e quantificados durante o processo de monitorização, incluindo os respectivos metabolitos e produtos de degradação.<sup>20, 30</sup>

Os parâmetros cuja determinação é obrigatória em águas destinadas ao consumo humano e os respectivos valores paramétricos estão definidos no Anexo I da Directiva 98/ 83/CE de 3 de Novembro de 1998, subdividido em Parte A (parâmetros microbiológicos), Parte B (parâmetros químicos) e Parte C (parâmetros indicadores).

Os parâmetros químicos englobam várias categorias de compostos orgânicos e inorgânicos considerados individualmente ou em grupo. Os compostos com valores paramétricos mais reduzidos são aqueles para os quais existe evidência de maiores efeitos tóxicos e incluem-se neste grupo o benzo(a)pireno (0,01 µg/L), a aldrina, a dialdrina, o heptacloro e o epóxido de heptacloro (0,030 µg/L) a acrilamida, a epícloridrina, os hidrocarbonetos aromáticos policíclicos e outros pesticidas além dos previamente referidos (0,1 µg/L).

Também no Anexo I da Directiva 98/ 83/CE de 3 de Novembro de 1998 estão definidas as categorias de compostos que podem ser classificados como «pesticidas» e que incluem:

1. insecticidas orgânicos,
2. herbicidas orgânicos,
3. fungicidas orgânicos,
4. nematocidas orgânicos,
5. acaricidas orgânicos,
6. algicidas orgânicos,
7. rodenticidas orgânicos,
8. controladores orgânicos de secreções viscosas,
9. produtos afins (nomeadamente, reguladores do crescimento),

e seus metabolitos, produtos de degradação e de reacção importantes.

No mesmo Anexo é também referido que “*só necessitam de ser controlados os pesticidas cuja presença é provável num determinado abastecimento de água*”.

No Anexo III da Directiva 98/ 83/CE são apresentadas as especificações para a análise dos parâmetros constantes do Anexo I da mesma Directiva. Em particular, definem-se os requisitos dos laboratórios onde sejam efectuadas as análises e as características do método de análise, nomeadamente a capacidade do método utilizado de medir no mínimo, concentrações iguais ao valor paramétrico com a exactidão, a precisão e o limite de detecção especificados. Na Nota 6 deste Anexo III é ainda indicado que as características do método de análise aplicam-se a cada pesticida e dependerão do pesticida em causa. Refere-se também nesta Nota 6 que, apesar de o limite de detecção especificado no Anexo III (25% do valor paramétrico) poder não ser conseguido actualmente para todos os pesticidas, os Estados-membros devem desenvolver esforços para alcançar esta norma.

### 1.2.2.2 Legislação Nacional

Segundo a legislação nacional aplicável a águas subterrâneas, superficiais e de consumo humano, estão definidas normas que permitem testar a qualidade destas águas, nomeadamente pelos aspectos organolépticos (cor, odor, sabor), pela presença de microrganismos, parasitas ou de outras substâncias quaisquer, em quantidades ou concentrações que constituam um perigo potencial para a saúde humana.

No âmbito dessa legislação entende-se por água destinada ao consumo humano:

- ❖ Toda a água no seu estado original ou após tratamento, destinada a ser bebida, a ser usada para cozinhar, á preparação de alimentos ou para outros fins domésticos, independentemente da sua origem e de ser ou não, fornecida a partir de uma rede de distribuição, de um camião ou navio-cisterna, em garrafas ou noutros recipientes.
- ❖ Toda a água utilizada numa empresa da indústria alimentar para o fabrico, transformação, conservação ou comercialização de produtos ou substâncias destinados ao consumo humano, excepto se autoridades nacionais competentes determinarem que a qualidade da água não afecta a salubridade do género alimentício na sua forma acabada.
- ❖ Água utilizada para produção de gelo.
- ❖ Água acondicionada em embalagens, recipientes ou autotanques que poderá ser posta à disposição do consumidor para consumo humano.<sup>15, 20, 26</sup>

O Decreto-Lei n.º 236/98, designado como a Lei da Água, estabelece medidas, normas, critérios e objectivos de qualidade com a finalidade de proteger o meio aquático, a saúde pública e melhorar a qualidade das águas em função dos seus principais usos. Quando se constate que a qualidade da água distribuída para consumo humano põe em risco a saúde, as autoridades de saúde comunicam às entidades gestoras as medidas que devem adoptar para minimizar os seus efeitos, podendo ainda determinar a suspensão da distribuição da água enquanto persistirem os factores de risco.<sup>15</sup> São também definidos neste diploma, critérios e planos de acção que visam melhorar a qualidade das águas que são provenientes de águas subterrâneas ou superficiais, tais como:<sup>15</sup>

- Águas para consumo humano
  - Águas doces superficiais destinadas à produção de água para consumo humano
  - Águas subterrâneas destinadas à produção de água para consumo humano
  - Águas de abastecimento para consumo humano (artigo 20.º)

- Águas para suporte da vida aquícola
  - Águas doces superficiais para fins aquícolas – águas piscícolas
  - Águas do litoral e salobras para fins aquícolas – águas conquícolas
  - Águas do litoral e salobras para fins aquícolas – águas piscícolas
- Águas balneares
- Águas de rega

Neste diploma, são ainda estabelecidas as condições de controlo de descargas de águas residuais no solo e no meio aquático, tentando preservar os recursos naturais existentes, bem como normas de qualidade fixadas no anexo II, a que correspondem os processos de tratamento anteriormente mencionados (A1, A2 e A3).

Também no anexo XIX estão referidas as substâncias ou grupos de substâncias que são tóxicas, onde se incluem na lista II os biocidas e seus derivados.

A autorização para captação de águas subterrâneas e/ou águas superficiais, ambas destinadas à produção de água para consumo humano, está decretada no Decreto-Lei n.º 46/94 que estabelece o regime de licenciamento da utilização do domínio hídrico sob a jurisdição do Instituto da Água.<sup>15,31</sup>

Segundo o Decretos-Lei n.º 236/98, compete à entidade gestora assegurar que a água destinada ao consumo humano satisfaz as exigências de qualidade presentes no anexo I deste último diploma.<sup>15</sup>

O Decreto-Lei n.º 306/2007, apresenta um programa de controlo da qualidade da água para consumo humano, mostrando qual deve ser a frequência de amostragem e quais os valores paramétricos que devem ser mantidos, evitando deste modo, situações que comportem riscos para a saúde humana. Refere que a realização de análises deve ser feita, preferencialmente em laboratórios de ensaios credenciados.<sup>20</sup>

É da responsabilidade da autoridade competente, isto é, a Entidade Reguladora dos Serviços de Águas e Resíduos assegurar o controlo analítico da qualidade das águas destinadas a consumo humano, permitindo por sua vez, que este decreto-lei seja cumprido.<sup>20</sup>

## 1.3 Determinação de Pesticidas em Águas

A determinação de pesticidas em águas tem as dificuldades inerentes a todas as determinações analíticas de concentrações inferiores a 1µg/L. As estratégias possíveis para efectuar determinações nesta gama de concentrações são o aumento do volume da amostra, a utilização de métodos de extracção que permitam um factor de enriquecimento muito elevado e/ou o recurso a detectores com limiares analíticos mais baixos.

### 1.3.1 Métodos de extracção

As técnicas mais vulgarmente utilizadas para efectuar a extracção de pesticidas a partir de matrizes aquosas são: <sup>32</sup>

- Extracção em fase sólida (SPE)
- Extracção líquido-líquido (LLE)
- Microextracção em fase sólida (SPME)

A microextracção em fase sólida utilizando uma barra magnética revestida com a fase estacionária polimérica (designada extracção sorptiva em barra de agitação, SBSE), surgiu como alternativa ao SPME.

Mais recentemente surgiram técnicas de microextracção em fase líquida (LPME) que permitem extrair compostos orgânicos a partir de matrizes aquosas recorrendo a volumes de solventes orgânicos na gama dos microlitros, com tempos de extracção curtos e com uma boa eficiência de extracção. Os volumes de amostra utilizados são tipicamente baixos (5 a 10 mL) e não requerem a utilização de consumíveis caros como as colunas de SPE, as fibras de SPME ou as barras de SBSE. Apresentam-se de seguida as descrições sucintas de cada um destes métodos de extracção e exemplos da sua aplicação à determinação de pesticidas em águas.

### 1.3.1.1 Extração líquido-líquido (LLE)

A extração líquido-líquido é o processo clássico de extração de compostos orgânicos a partir de matrizes aquosas, sendo muitas vezes utilizado como termo de comparação com técnicas mais recentes<sup>33,34</sup>. É uma técnica utilizada tradicionalmente em áreas como a química, petroquímica, farmacêutica e agricultura<sup>35</sup>.

O princípio subjacente à LLE é a partilha dos analitos entre a fase aquosa e uma fase orgânica imiscível na qual os analitos se deverão dissolver preferencialmente. O parâmetro que descreve a partilha de um analito A entre as duas fases em equilíbrio é a constante de distribuição ou de partição ( $K_D$ ) que pode ser calculada pela seguinte fórmula<sup>35, 36</sup>:

$$K_D = \frac{[A]_{org}}{[A]_{aq}}$$

onde  $[A]_{org}$  é a concentração do analito na fase orgânica e  $[A]_{aq}$  é a concentração do analito na fase aquosa. A extensão da extração é avaliada pela percentagem de recuperação ( $R\%$ ) que pode ser definida pela seguinte fórmula:

$$R\% = \frac{n_e}{n_i} \times 100$$

onde  $n_e$  é o número de moles ou a massa de analito presentes na fase orgânica, após a extração e  $n_i$  é o número de moles ou a massa de analito existentes na fase aquosa, antes da extração. Normalmente são necessárias mais de duas extrações descontínuas sucessivas para se obterem percentagens de recuperação superiores a 99%. Quando os valores de  $K_D$  são muito baixos pode optar-se por extração líquido-líquido contínua de forma a obter uma percentagem de recuperação elevada sem ter que efectuar um grande número de extrações líquido-líquido sucessivas.

Apesar de a LLE ser o método de referência utilizado em inúmeras normas internacionais, é um método que requer a utilização de elevadas de solventes orgânicos (geralmente mais do que 100 mL), envolve vários passos e um período de tempo considerável sobretudo nas etapas de concentração da amostra que têm que ser efectuadas por procedimentos suaves (evaporadores Kuderna-Danish ou equivalentes, evaporação em corrente de azoto), para evitar perdas dos solutos mais voláteis.

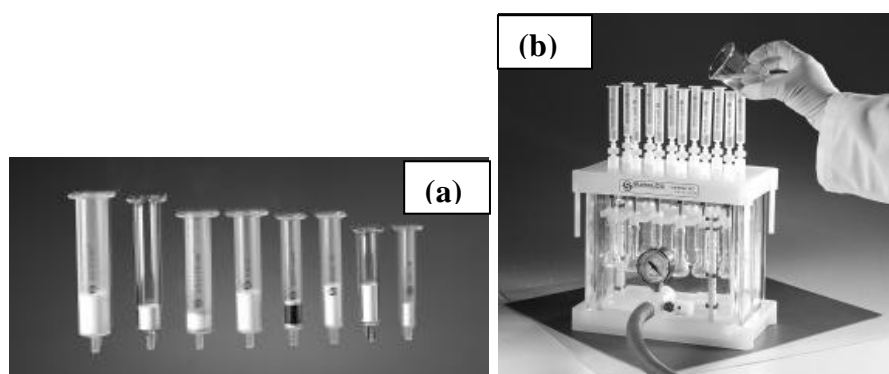
### 1.3.1.2 Extracção em fase sólida (SPE)

A extracção em fase sólida (com discos de extracção ou com colunas de extracção) consiste na adsorção selectiva dos analitos a extrair numa fase estacionária sólida, denominada adsorvente. A fase aquosa (ou outra amostra líquida) é filtrada sob vácuo, através do disco ou coluna de extracção. Os analitos são retidos pelo adsorvente e posteriormente eluídos com alguns mililitros de um solvente orgânico adequado. O extracto é finalmente concentrado até um volume adequado à sua análise<sup>36</sup>.

Esta técnica é mais rápida que a LLE, utiliza menores volumes de solventes orgânicos e pode ser automatizada reduzindo o tempo dispendido pelo utilizador<sup>36,37</sup>.

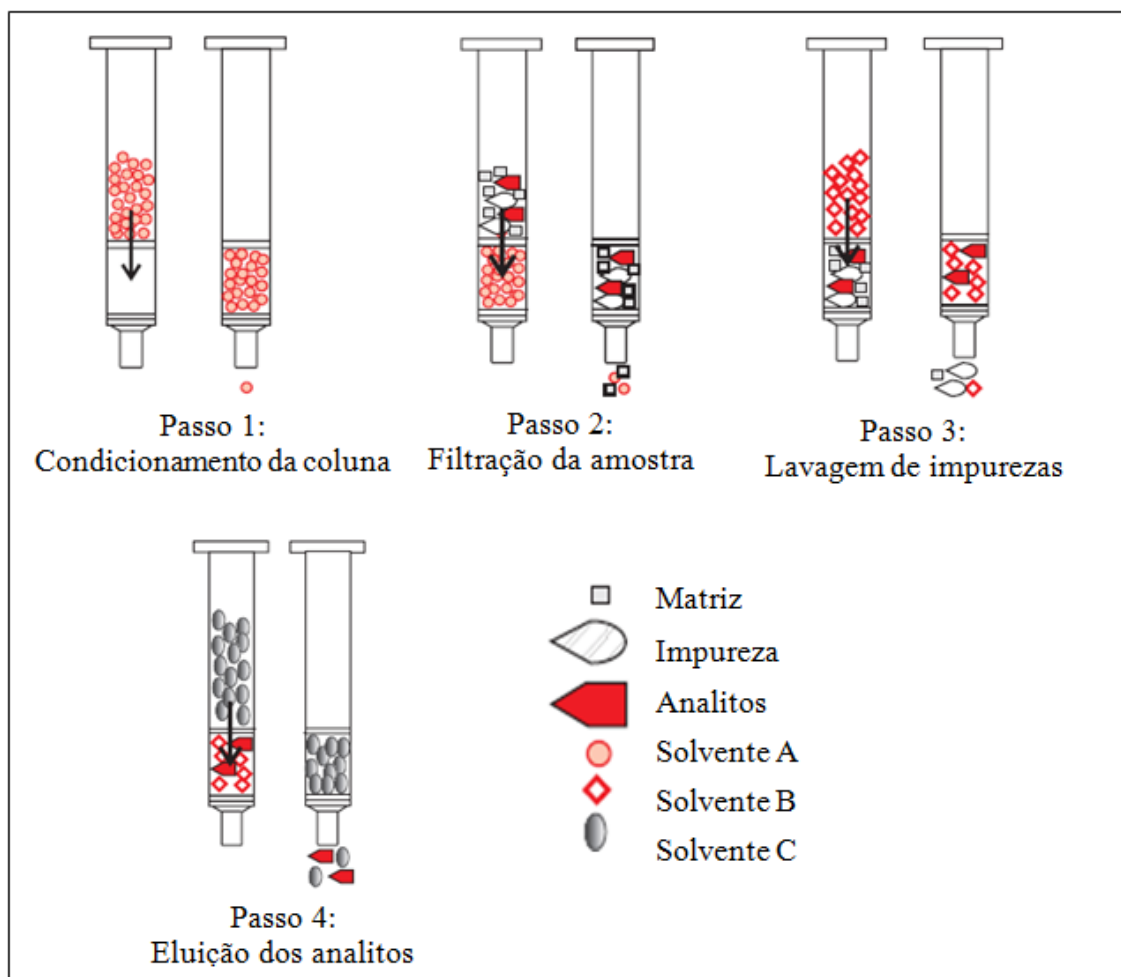
Existem diversas fases estacionárias (sílica, alumina, florisil, carbono e resinas) cuja selecção depende da natureza dos analitos a analisar e às quais correspondem diferentes tipos de interacção analito-fase estacionária<sup>32,36,37</sup>:

- a) Fase Reversa- envolve interacções de analitos presentes em matrizes polares com uma fase estacionária apolar. Como exemplos tem-se as fases constituídas por cadeias C<sub>8</sub> e C<sub>18</sub> ligadas a grupos silanol de sílica.
- b) Fase Normal- envolve interacções entre uma fase estacionária polar e analitos presentes em matrizes apolares. Os exemplos de fases polares são a sílica, a alumina ou a sílica funcionalizada com grupos polares tais como, CN, NH<sub>2</sub> ou diol.
- c) Permuta Iónica- envolve interacções iónicas entre a fase estacionária (positiva ou negativa) e os solutos carregados. Uma diversidade de resinas aniónicas ou catiónicas podem ser usadas neste tipo de interacções.
- d) Adsorção- envolve interacções entre analitos e materiais não modificados, ficando os compostos de interesse retidos no adsorvente, geralmente um material poroso.
- e)



**Figura 1.3** - Colunas de extracção em fase sólida (a) e sistema de filtração sob vácuo (b). (Adaptado da Refª 38).

O procedimento de SPE inicia-se pelo condicionamento da fase estacionária seguindo-se a filtração da amostra; poderá incluir-se um passo de lavagem da coluna de extracção com um solvente fraco, para remover impurezas, ou um passo de secagem da coluna em corrente de azoto, para remover água; por fim efectua-se a eluição dos analitos com um solvente ou solventes adequados (Figura 1.4).



**Figura 1.4** – Etapas do processo de extração em fase sólida.

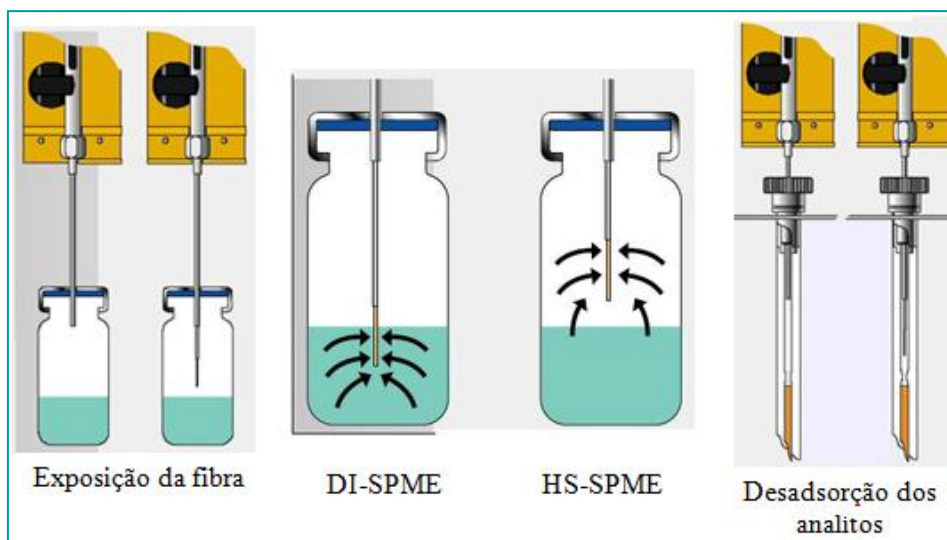
A determinação de um conjunto de 17 pesticidas de diferentes famílias (organofosforados, triazínicos, fenilúreias, anilidas, cloroacetanilidas, herbicidas ácidos e tiocarbamatos) foi efectuada em águas superficiais utilizando SPE e cromatografia líquida e espectrometria de massa<sup>38</sup>. Aplicações recentes da técnica de SPE à determinação de pesticidas envolvem a sua miniaturização dando origem a um outro método de microextração em fase sólida - o  $\mu$ SPE. Exemplos dessas aplicações são a determinação de pesticidas organoclorados e organofosforados em águas

utilizando um método parcialmente automatizado de  $\mu$ SPE-GC-FID,<sup>39</sup> ou a determinação de pesticidas carbamatos em solos<sup>40</sup>. Também a utilização de novas fases estacionárias na extracção de diversos contaminantes orgânicos, tem sido uma área de inovação em SPE: os nanotubos de carbono,<sup>41</sup> ou um polímero de metiltetradecilsiloxano<sup>42</sup> são exemplos de novas fases estacionárias propostas para a extracção de várias classes de pesticidas.

### **1.3.1.3 Microextracção em Fase Sólida (SPME)**

A microextracção em fase sólida revolucionou o campo da análise de compostos orgânicos em água ao permitir efectuar extracção e concentração dos analitos num só passo e na ausência de solventes orgânicos<sup>43</sup>. Algumas limitações iniciais da técnica como a baixa resistência mecânica das fibras ou alguma variabilidade entre lotes foram sendo ultrapassadas e hoje em dia as fibras de SPME apresentam, além da capacidade de efectuarem extracções muito selectivas, uma boa estabilidade mecânica (fibras Stableflex) e portanto um tempo de vida mais longo bem como boa reproductibilidade para ensaios feitos com diferentes lotes.

A microextracção em fase sólida (SPME) permite efectuar a concentração de compostos orgânicos voláteis ou não voláteis, expondo a fibra adsorvente à fase gasosa em equilíbrio com a amostra líquida (HS-SPME) ou directamente à amostra (DI-SPME). Os compostos retidos na fibra são posteriormente desadsorvidos termicamente ou por solventes no injector do GC ou do HPLC (Figura 1.5).



**Figura 1.5** – Microextração em fase sólida (Adaptado da Ref<sup>a</sup> 44).

A escolha da fase estacionária da fibra é uma etapa fundamental da optimização de um processo de SPME, existindo actualmente uma gama variada de fases que incluem o polidimetilsiloxano (PDMS), o divinilbenzeno (DVB), o carboxen (CAR) e o poliacrilato (PA), bem como combinações destes polímeros de forma a obter as características de adsorção adequadas a analitos com diferentes volatilidades e polaridades<sup>45</sup>.

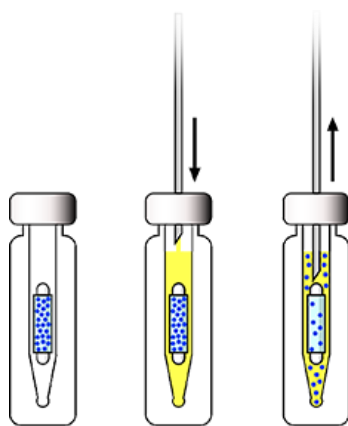
O equilíbrio de partição dos analitos entre a amostra e a fibra é descrito por uma constante de partição  $K$ , que é definida como a razão entre a concentração de analitos na fibra e a concentração de analitos na amostra.

A determinação de pesticidas em águas foi, desde a sua criação, uma das aplicações-alvo do SPME e continua a ser uma das suas áreas de maior actividade. A determinação de herbicidas em água da chuva recorrendo a SPME com derivatização e GC-MS-MS<sup>46</sup> ou a determinação de pesticidas organoclorados com uma fibra de SPME não comercial revestida com um polímero de metilfenilvinilsiloxano<sup>47</sup> são exemplos recentes da aplicação de SPME à análise de pesticidas.

#### 1.3.1.4 Extração Sorptiva em Barra de Agitação (SBSE)

A criação de barras magnéticas revestidas com polímeros idênticos aos utilizados na fabricação das fibras de SPME (Twister, Gerstel<sup>48</sup>), abriu a possibilidade de efectuar extracções selectivas, também na ausência de solvente, mas com maior capacidade de

retenção de analitos do que em SPME, devido à maior quantidade de polímero em contacto com a amostra. Após a extracção dos analitos estes podem ser desadsorvidos termicamente ou com um solvente adequado (Figura 1.6).



**Figura 1.6** – Desorção dos analitos com solvente após SBSE com Twister (Ref<sup>a</sup> 48).

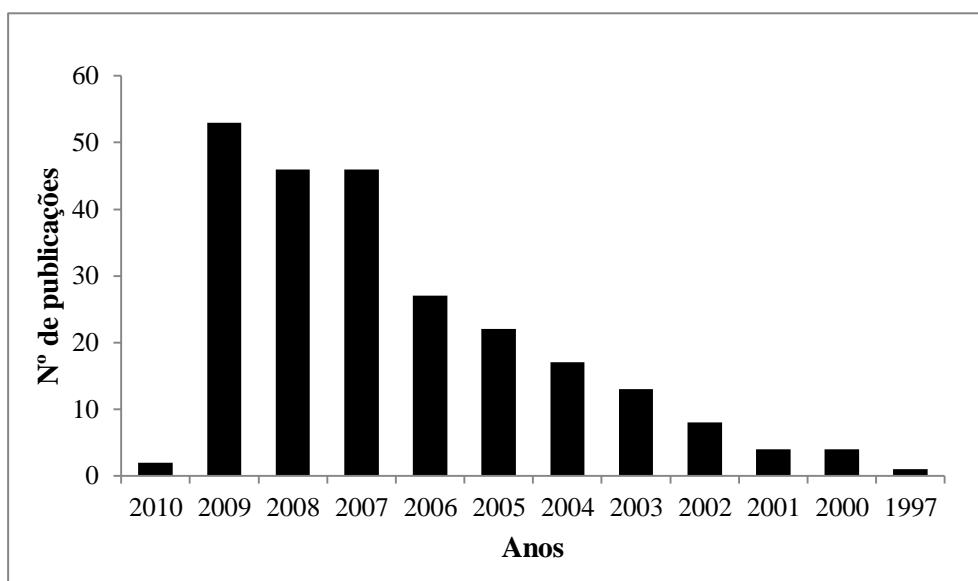
Esta técnica tem sido aplicada à determinação de pesticidas e outros contaminantes presentes em águas tanto em associação com GC<sup>49</sup>, como com HPLC<sup>50</sup>.

### 1.3.1.5 Microextracção em Fase Líquida (LPME)

Microextracção em fase líquida (LPME) é uma designação genérica que engloba diversas técnicas de microextracção, cujo denominador comum é o facto de utilizarem volumes de solvente de extracção na gama dos microlitros. Outro factor comum é o facto de não ser necessário utilizar as fibras, colunas ou barras de extracção necessárias aos diversos métodos de extracção em fase sólida, reduzindo assim consideravelmente os custos do processo.

Apesar de várias das técnicas de LPME serem muito recentes, já é possível encontrar na literatura algumas revisões da sua aplicação à determinação de pesticidas.<sup>51,52</sup>

O número de publicações indexadas na Web of Science com o termo LPME, tem aumentado regularmente desde 1997 (Figura 1.7).



**Figura 1.7** - Publicações envolvendo LPME, indexadas na Web of Science, no período de 1997 a 2010<sup>53</sup>.

### 1.3.1.6 Microextração líquido-líquido com gota suspensa (SDME)

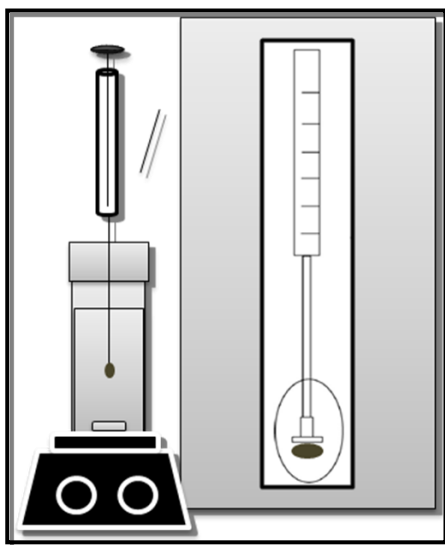
Esta técnica desenvolvida em 1996 por Jeannot e por Cantwell<sup>54</sup>, consiste na extração de compostos orgânicos a partir de água utilizando apenas uma gota de solvente orgânico suspensa na fase aquosa ou acima dela, durante um determinado período de tempo.

A transferência dos analitos ocorre da fase aquosa para a gota (fase orgânica) que é posteriormente recolhida e analisada por GC. A agitação da fase aquosa é fundamental para favorecer a difusão dos analitos para a gota, mas tem que ser suave, sobretudo quando a gota está imersa na solução.

Esta técnica tem sido aplicada à determinação de diversos contaminantes orgânicos em águas como por exemplo, pesticidas organoclorados, metais, ftalatos, entre outros.<sup>55,56,57,58</sup>

A escolha de solventes adequados a esta técnica está relativamente limitada pois eles têm que ter uma densidade bastante diferente da água, uma tensão superficial que permita manter a gota estável durante o processo de extração e uma baixa solubilidade em água; para extrações efectuadas na fase de vapor acima da solução aquosa é

também conveniente que o solvente utilizado seja pouco volátil à temperatura de extracção. Como a difusão dos analitos é o passo limitante desta técnica tem que se efectuar a optimização do tempo de extracção de forma a atingir eficiências de extracção elevadas<sup>56</sup>. A instabilidade mecânica da gota é também uma limitação desta técnica.

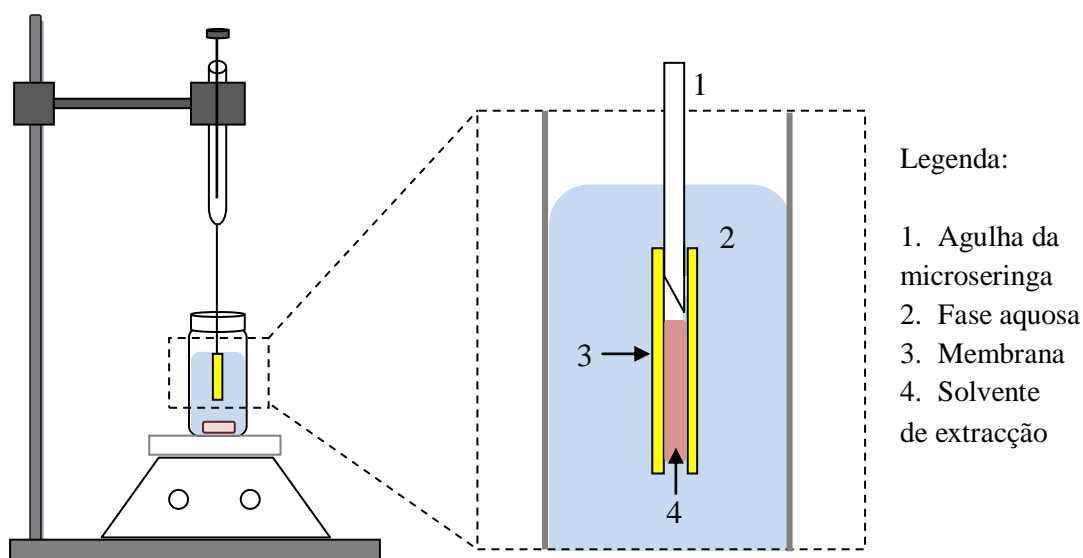


**Figura 1.8** - Microextração líquido-líquido com gota suspensa.

### **1.3.1.7 Microextração líquido-líquido com membrana (HFME)**

Na técnica de microextração líquido-líquido com membrana (HFME) o solvente orgânico (alguns microlitros) é colocado dentro de uma membrana de polipropileno (ou outro polímero adequado) que é por sua vez imersa na fase aquosa onde se encontram os analitos a extrair. A membrana tem que ser previamente imersa num solvente orgânico adequado que irá saturar a rede polimérica e funcionar como mediador dos analitos entre a fase aquosa no exterior da membrana e o solvente de extracção no seu interior (Figura 1.9). A membrana pode ser adaptada a uma microseringa de injeção pelo que após a extracção, o solvente de extracção pode ser simplesmente recolhido para o tambor da microseringa, remove-se a membrana e efectua-se em seguida a injeção do extracto num equipamento cromatográfico apropriado. Nesta técnica, a fase orgânica está mecanicamente mais estabilizada do que em SDME, e a membrana de polipropileno pode funcionar como barreira relativamente a alguns dos componentes indesejáveis da matriz<sup>59,60</sup>.

Por outro lado, a existência de uma barreira entre a fase dadora (fase aquosa) e a fase receptora (solvente de extracção), pode reduzir a eficiência da extracção por limitar os processos de difusão e reduzir a reproductibilidade do método devido a interferências como a formação de bolhas de ar na superfície da fibra ou a adsorção de substâncias hidrofóbicas na superfície da membrana (sobretudo no caso de amostras muito complexas como soro, sangue, urina ou águas residuais).



**Figura 1.9** – Microextração líquido-líquido com membrana.

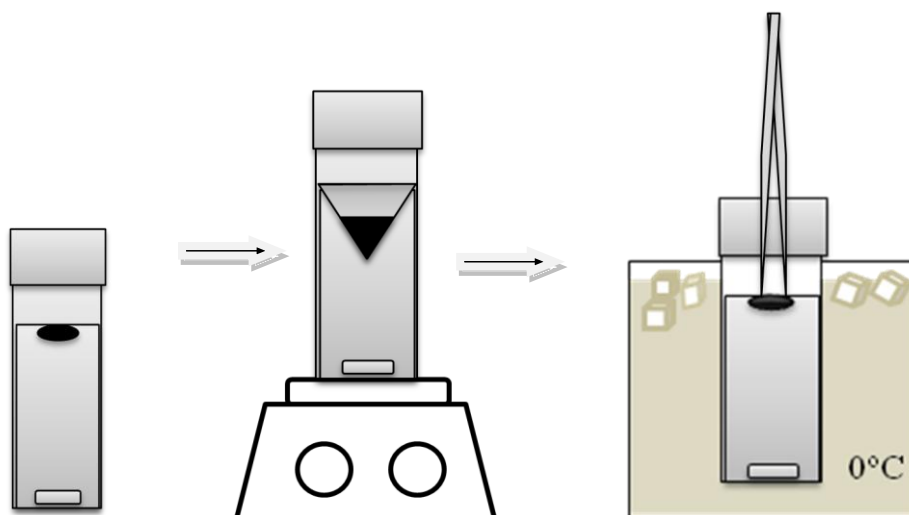
Exemplos da aplicação desta técnica à determinação de contaminantes em amostras de água são os métodos desenvolvidos para a extracção de pesticidas<sup>61</sup>, fenóis<sup>62</sup>, ésteres ftálicos<sup>63</sup> ou BTEX<sup>60</sup>, a partir de matrizes aquosas.

### 1.3.1.8 Microextração líquido-líquido com gota flutuante (SFDME)

Numa outra variante das técnicas de microextração em fase líquida utilizam-se solventes imiscíveis com água, menos densos que a água e com um ponto de solidificação baixo (abaixo de 0°C). Alguns microlitros de solvente são adicionados à solução aquosa que contém os analitos. A fase aquosa é submetida a uma agitação mecânica vigorosa para favorecer a migração dos analitos através da interface. Após o período de extracção as fases em equilíbrio são arrefecidas a 0°C para congelar o solvente orgânico. Uma vez no estado sólido o solvente de extracção pode ser

simplesmente removido com uma pinça metálica ou outro instrumento adequado (Figura 1.10).

Esta técnica recente descrita por Zanjani e pelos seus colaboradores<sup>59</sup> tem sido utilizada para a extracção de PAHS, metais<sup>64, 65</sup> e pesticidas organoclorados.



**Figura 1.10** - Microextração líquido-líquido com gota flutuante.

### 1.3.1.9 Microextração Líquido-Líquido Dispersiva (DLLME)

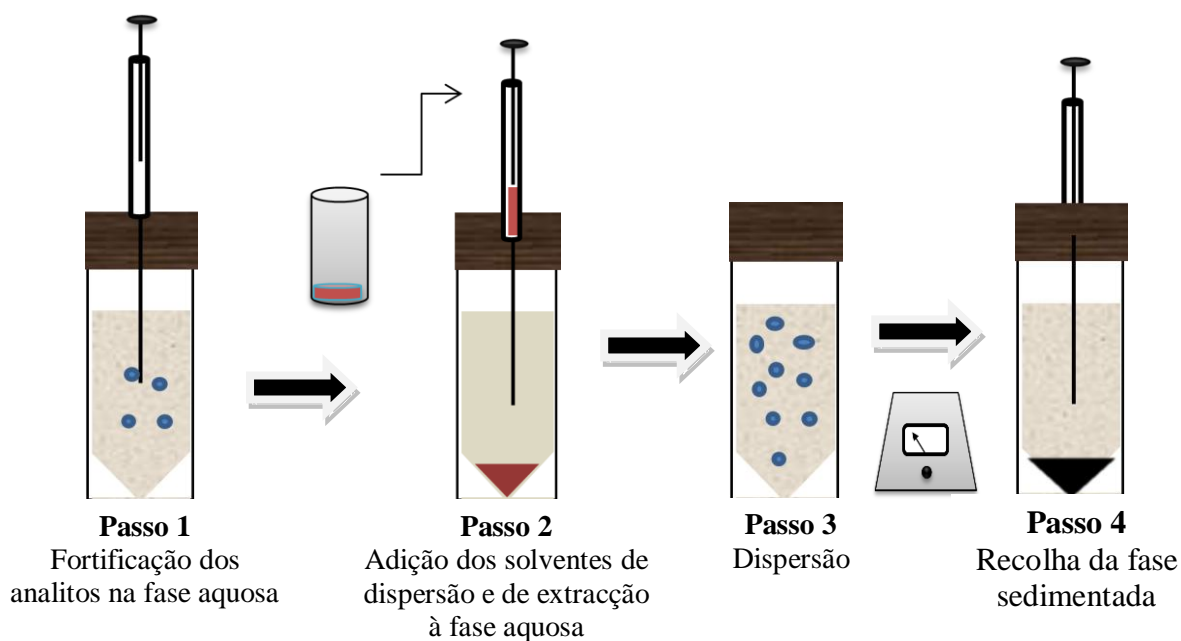
A microextração líquido-líquido dispersiva é de entre as várias técnicas de LPME aquela que regista um maior número de aplicações. O conceito fundamental desta técnica é a mistura de uma fase aquosa (5 a 10 mL) que contém os analitos, com alguns microlitros do solvente de extracção (apolar, imiscível com água e tipicamente mais denso que a água), e um pequeno volume (0.25 mL a 1 mL) do solvente de dispersão (um solvente orgânico miscível com água). A proporção volumétrica dos três componentes desta mistura ternária deve ser seleccionada de modo a que o sistema se situe na região de transição entre o estado monofásico e o estado difásico. Assim existem duas fases em equilíbrio: uma fase constituída pelo solvente de extracção apolar e que pode conter pequenas quantidades do solvente de dispersão e uma outra fase aquosa na qual está dissolvido o solvente de dispersão. No entanto, como as fases em equilíbrio estão próximo da transição para o estado monofásico, as suas densidades são bastante próximas o que permite formar emulsões estáveis. A função do solvente de dispersão é pois modificar as densidades da fase aquosa e da fase orgânica de forma a permitir a dispersão do solvente de extracção na fase aquosa de forma eficaz e

persistente. Ao dividir o volume de solvente de extracção num grande número de pequenas gotículas, maximiza-se a interface de contacto entre as fases o que facilita a partição dos analitos entre as fases, acelerando o processo de extracção. Ao manter o volume de solvente de extracção na ordem de alguns microlitros atinge-se um factor de enriquecimento muito elevado. Assim, a técnica de DLLME permite atingir factores de enriquecimento comparáveis ou superiores aos obtidos com as técnicas de microextracção líquido-líquido com gota suspensa, gota flutuante ou com membrana mas com um tempo de extracção muito mais reduzido e sem necessidade de agitação pois a dispersão de solvente de extracção remove as barreiras cinéticas à transferência de massa entre as fases. Após a extracção as fases são separadas por centrifugação obtendo-se assim uma fase orgânica de alguns mililitros que, como é habitualmente mais densa que a fase aquosa, se designa por fase sedimentada.

Os solventes de extracção mais utilizados em microextracção líquido-líquido dispersiva são o tetracloreto de carbono, o clorobenzeno, o tricloroetileno, o clorofórmio, o tetracloroetileno, o tetracloroetano, o diclorometano, o 1,2-diclorobenzeno, o hexano e o 1,1,1-tricloroetano.<sup>56,66,67,68,69,70,71, 72</sup>

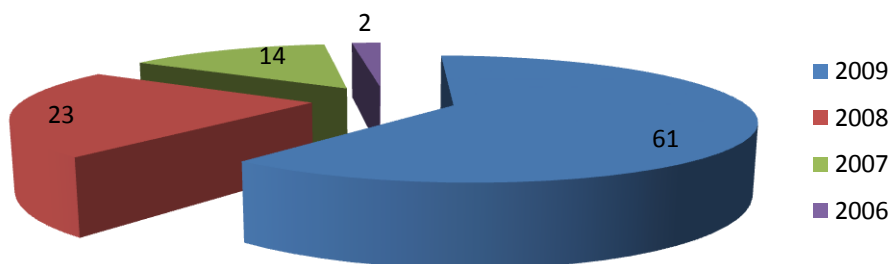
E os solventes de dispersão mais comuns são a acetona, o acetonitrilo, o metanol, o *tert*-butilmetil éter e o tetrahydrofurano.<sup>56, 67-72</sup>

Na Figura 1.11 ilustram-se os passos fundamentais de um ensaio de DLLME. Os analitos são adicionados à solução aquosa, numa determinada concentração (fortificação), em seguida efectua-se a adição conjunta dos solventes de dispersão e de extracção à fase aquosa (dispersão) e por fim procede-se à centrifugação para separar as fases. A fase sedimentada pode então ser recolhida com uma microseringa.



**Figura 1.11** - Microextração líquido-líquido dispersiva.

Esta técnica foi desenvolvida no ano de 2006 por Rezaee e seus colaboradores<sup>73</sup>, testando um conjunto de solventes de extração e de dispersão para a extração de hidrocarbonetos poliaromáticos (PAHs) de amostras aquosas. No mesmo trabalho demonstrou-se o potencial da técnica para outros grupos de contaminantes orgânicos como pesticidas organoclorados, pesticidas organofosforados ou derivados benzénicos. Desde então, têm-se multiplicado os trabalhos que exploram a aplicação desta técnica a amostras de água ou outras matrizes aquosas, sendo obtidos factores de enriquecimento geralmente entre 500 a 1000 para a maior parte dos analitos estudados. Na Figura 1.10 ilustra-se a evolução das publicações em DLLME referenciadas na Web of Science<sup>53</sup>.



**Figura 1.12** - Publicações relativas a DLLME indexadas na Web of Science no período entre 2006 e 2009.

Na Tabela 1.6 apresentam-se os diferentes grupos de contaminantes orgânicos cuja determinação foi estudada por DLLME.

Uma variante da técnica de DLLME foi recentemente apresentada para a extracção de pesticidas, sobretudo de matrizes aquosas, utilizando como solventes de extracção líquidos iónicos.<sup>74,75</sup> Estes solventes são considerados menos poluentes para a atmosfera e menos perigosos para o utilizador, que os solventes halogenados devido à sua volatilidade praticamente nula.<sup>74</sup> Os líquidos iónicos têm uma boa capacidade solvente em relação a uma grande variedade de compostos orgânicos e inorgânicos, o que os torna interessantes como solventes de extracção ou meios de reacção.

Como não são voláteis, as suas aplicações cromatográficas são sobretudo em cromatografia líquida, apesar de recentemente ter surgido uma aplicação em cromatografia gasosa.<sup>76</sup>

O processo de microextracção é um pouco diferente da técnica convencional pois a dispersão do líquido iónico (solvente de extracção) é efectuada sem a adição de um solvente de dispersão mas sim recorrendo a alterações da temperatura da mistura.<sup>74,75,77</sup>

**Tabela 1.6** - Compostos estudados através de microextração líquido-líquido dispersiva e referidos na literatura.

<b>Grupo de Compostos estudados</b>	<b>Referências</b>
Herbicidas triazínicos	[78]
Pesticidas Organoclorados	[55, 68, 72]
Pesticidas Organofosforados	[66, 69-71]
Hidrocarbonetos poliaromáticos	[79]
Metais	[80,81,82,83,84,85]
Ftalatos	[86,87]
Antibióticos e drogas	[88,89]
Antioxidantes	[90]
Compostos fenólicos	[80,91,92,93,94,95]
Derivados Benzénicos	[79, 95,96]
Aminas	[97,98]

#### **1.3.1.10 Microextração líquido-líquido homogénea (HLLME)**

Esta técnica surgiu para permitir a aplicação dos princípios da microextração dispersiva a amostras sólidas. Neste caso é efectuada uma pré-extração dos analitos a partir da matriz sólida, onde estes se encontram recorrendo a um solvente orgânico miscível com água. Um pequeno volume (~1mL) do extracto obtido, com ou sem concentração, é utilizado como solvente de dispersão num passo seguinte de DLLME. O solvente de extração é adicionado ao solvente de dispersão que contém os analitos, formando uma mistura homogénea que favorece a solvatação dos analitos. A mistura é então injectada em alguns mililitros de água, provocando a dispersão do solvente de extração. Neste processo algumas impurezas polares co-extraídas a partir da matriz

sólida poderão dissolver-se predominantemente na fase aquosa obtendo-se assim algum efeito de purificação do extracto.<sup>99,100</sup>

Este tipo de extracção pode ser usado em diversas matrizes (águas, solo) para a extracção de vários grupos de compostos, entre estes encontram-se os pesticidas organofosforados, os derivados benzénicos, os PAHs e os metais.<sup>100-101, 102</sup>

### **1.3.2 Métodos de Análise**

A análise de pesticidas é efectuada por cromatografia líquida (HPLC) ou por cromatografia gasosa (GC) dependendo da volatilidade e polaridade dos pesticidas em causa. A utilização de reacções de derivatização e de detecção selectiva têm sido estratégias adoptadas para melhorar a sensibilidade e selectividade da detecção destes compostos. A cromatografia líquida é predominantemente utilizada para a determinação de pesticidas polares e não voláteis cuja análise em cromatografia gasosa não é possível ou requer processos de derivatização dos pesticidas complicando assim o processo analítico. Como a cromatografia líquida não foi utilizada no âmbito deste trabalho serão de seguida apresentados com maior detalhe, alguns aspectos relacionados com a utilização de cromatografia gasosa na determinação de pesticidas.

#### **1.3.2.1 Cromatografia Gasosa**

A Cromatografia Gasosa foi inventada em 1952 por James e por Martin<sup>103</sup> e o conceito-chave, que ainda hoje é usado e que está por detrás desta técnica, é o conceito da volatilização dos compostos quando estes são aquecidos. Assim esta técnica pode ser usada para compostos mais voláteis como os PAHs ou para compostos semi-voláteis como os pesticidas.<sup>104</sup>

O processo de volatilização ocorre a uma dada temperatura definida no injector sendo os analitos introduzidos na coluna analítica, sob a forma gasosa, com o auxílio de um gás de arraste (hidrogénio, hélio ou azoto). Ao entrar na coluna que está normalmente a uma temperatura muito mais baixa que o injector, os analitos (e parte do solvente que foi injectado) condensam, sendo retidos pela fase estacionária. O efeito conjunto do gás de arraste (fase móvel) e do aumento da temperatura do forno vão promover a eluição

dos analitos, idealmente a diferentes velocidades, de forma a atingir a separação de todos os componentes da mistura injectada.

A distinção entre os analitos depende da capacidade de distribuição que estes têm entre a fase estacionária e a fase móvel, havendo portanto um equilíbrio de distribuição entre fases, que é determinante para a separação cromatográfica dos solutos.

À saída da coluna os analitos são detectados num detector sensível à sua massa ou a outras características estruturais e cuja resposta é proporcional à concentração do analito no gás de arraste.<sup>6,8,104</sup>

O gás de arraste é um componente essencial do sistema cromatográfico pois tem a função de eluir os compostos na coluna através de um equilíbrio de partição (fase estacionária ↔ fase móvel) que depende da densidade de cada gás, afectando por sua vez, a velocidade de difusão das moléculas de soluto através da fase estacionária. Assim a escolha do gás deve depender do tipo de coluna e do tipo de detector usado na análise cromatográfica.<sup>104,105</sup>

As características principais de um gás de arraste devem ser a inércia e a fraca absorção pela fase estacionária.<sup>104-106</sup>

O gás mais usado para colunas com fases estacionárias mais finas, é o hélio devido à sua baixa densidade, conseguindo velocidades de difusão altas para a maioria dos analitos. Contudo o azoto e o hidrogénio podem também ser utilizados, embora apresentem algumas desvantagens: no caso do azoto, a baixa capacidade de difusão na fase estacionária quando se utilizam colunas espessas; no caso do hidrogénio, a alta velocidade linear e baixa densidade pode provocar pontos activos de absorção dos analitos na fase estacionária.

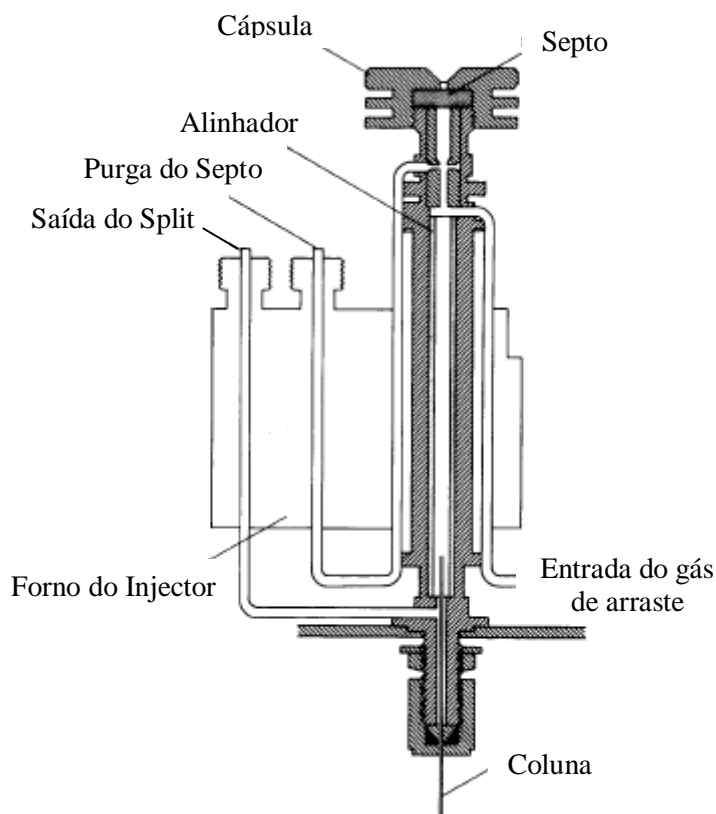
O injectador é outro componente determinante do sistema cromatográfico, sobretudo quando se pretendem analisar resíduos, como é o caso das determinações de pesticidas.

Existem vários modos de injeção:<sup>105,106,107,108</sup>

- **Com repartição (modo Split)** – A amostra é rapidamente vaporizada e apenas uma parte da mesma, será injectada na coluna.
- **Sem repartição (modo Splitless)** – A amostra é vaporizada e injectada integralmente na coluna transportada pelo gás de arraste.
- **De temperatura programável (PTV)** - A amostra é vaporizada no injectador que está equipado com um sistema próprio de aquecimento programado permitindo variar a temperatura durante o processo de injeção.

- **Directa (On-column)**- Difere do sistema anterior no facto da amostra ser directamente injectada na coluna em estado líquido.

A escolha adequada do injector e das condições de injeção é essencial para conseguir efectuar uma boa transferência dos analitos para a coluna. Na Figura 1.13 apresenta-se uma representação esquemática de um injector com válvula de repartição.



**Figura 1.13** - Injetor com e sem repartição para colunas capilares. <sup>107</sup>

O modo mais comum de injeção, utilizada na análise de resíduos (drogas, pesticidas) é o modo sem repartição, pois a amostra entra integralmente na coluna, aumentando a sensibilidade e diminuindo os limites de detecção desses analitos.

Outros parâmetros de injeção fundamentais para otimizar a sensibilidade dos analitos detectados e a resolução dos picos cromatográficos são a temperatura do alinhador e da coluna, a pressão na cabeça da coluna, o solvente da amostra, o volume de injeção e a velocidade de injeção e ainda o volume do alinhador. <sup>106</sup>

Também a temperatura do forno onde está inserida a coluna cromatográfica, deve ser programada em modo de gradiente ou isocrático, de modo a que os componentes de uma mistura sejam devidamente separados e com picos bem resolvidos, considerando a natureza das moléculas de soluto e da complexidade da amostra. Normalmente o modo

de temperatura mais escolhido é o da temperatura programada porque reduz o tempo de análise e melhora a separação e consequente detecção das moléculas de soluto, que possuem tempos de retenção muito próximos e que não são devidamente separados no modo de temperatura isocrática. Outras das vantagens do uso deste modo, é o facto de haver uma limpeza gradual da coluna com o aumento linear da temperatura.<sup>105,106,107, 108</sup>

A coluna é o componente essencial de qualquer técnica separativa. Existem assim dois tipos de colunas dependendo da natureza da fase estacionária:

- Colunas de empacotamento
- Colunas capilares

As mais usadas são as colunas capilares devido à sua capacidade de resolução e alta eficiência separativa. Todavia, a eficiência das colunas capilares depende de vários parâmetros como sendo o gás de arraste, o comprimento e diâmetros interno da coluna e da espessura de filme da fase estacionária.<sup>106</sup>

Estas podem ser revestidas com vários tipos de fases estacionárias e pode ter diversas dimensões (comprimento, espessura de filme e diâmetro interno de partícula) dependendo do tipo de compostos que se pretende analisar e do tipo de fase estacionária pretendida. A escolha das características da coluna tem consequências decisivas no tipo de separação cromatográfica que se poderá efectuar.<sup>106</sup>

A espessura de filme é determinante no processo de retenção dos analitos:

- A retenção aumenta com o aumento da espessura de filme e com a subsequente diminuição da eficiência da coluna.
- Filmes finos permitem altas resoluções para solutos com pontos de ebulição elevados e baixa resolução para compostos mais voláteis em quaisquer condições de temperatura.
- Espessuras inferiores a 0,2 µm permitem o uso de colunas com comprimento elevado para a análise de matrizes complexas.
- Quanto menor for a espessura de filme, menor será a temperatura de eluição de certos solutos.

Também o comprimento da coluna deve ser escolhido em função da complexidade das matrizes:

- Entre 25 a 30 metros: para a maioria das separações analíticas, sobretudo para análises rápidas e pouco complexas.
- Entre 30 a 60 metros: para análises demoradas e matrizes complexas.

Em suma, para se aumentar a capacidade de separação dos analitos, terá de se aumentar a espessura de filme, o diâmetro e/ou o comprimento da coluna. E para se ter maior resolução, deverá aumentar-se o comprimento da coluna, diminuir o diâmetro interno e a espessura de filme. Assim deverá haver também um equilíbrio entre a capacidade de separação e a capacidade de resolução, optando pela melhor situação, que permita uma melhor conjugação destes dois factores. <sup>106</sup>

As fases estacionárias mais comuns são as compostas por dimetilsiloxano (DB-1) usada para análise de compostos como os alcalóides, as aminas, os hidrocarbonetos e os fenóis ou ainda a fase que é composta por 5% fenil/ 95% dimetilsiloxano (DB-5), usada normalmente para a análise de álcoois, hidrocarbonetos aromáticos, pesticidas e compostos halogenados. Estas fases apolares têm a vantagem de sofrer menor sangramento do que as fases polares e por este motivo, apresentam uma linha de base menor, minimizando a subtracção desta no tratamento cromatográfico.

A derivatização é um processo químico bastante comum que por vezes tem de ser usado para alguns grupos químicos. O que se pretende com este processo químico, é aumentar a estabilidade e a volatibilidade de alguns compostos como é o caso das aminas, amidas, ácidos, tióis, aminoácidos, substituindo os átomos de hidrogénio por outros grupos menos reactivos. Este processo, permite melhorar a introdução dos compostos na coluna (ao torná-los mais voláteis) bem como a simetria dos picos cromatográficos, a sua separação e os limites de detecção (ao torná-los menos reactivos). Existem várias reacções químicas de derivatização, tais como a sililação, alquilação e acilação. <sup>104-107</sup>

A detecção em cromatografia gasosa, é um parâmetro fundamental como em qualquer outra técnica analítica, porque condiciona directamente a eficiência e a especificidade da análise. Os detectores cromatográficos podem ser classificados como: <sup>104, 105, 107</sup>

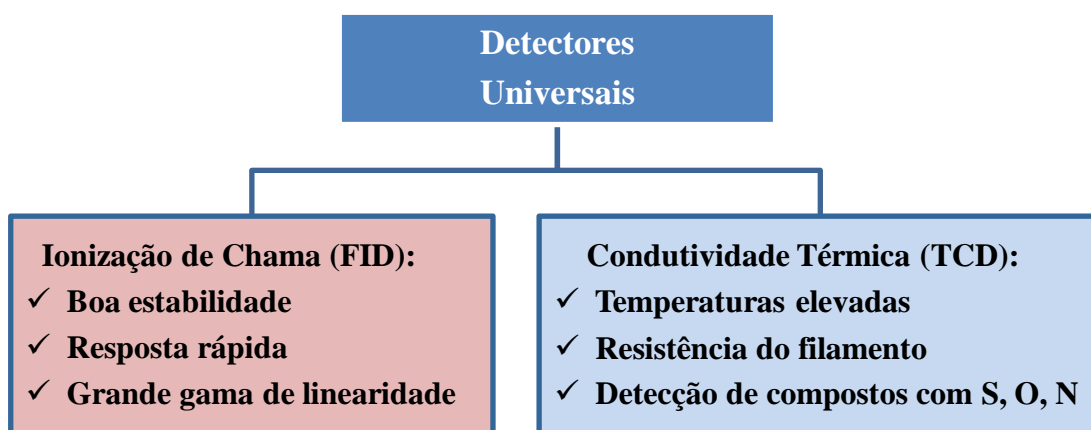
- ❖ Detectores Universais- respondem a qualquer analito presente na fase móvel.
- ❖ Detectores Selectivos e/ ou Específicos – respondem apenas a um grupo de analitos e/ou a um número limitado de componentes de uma mistura com características estruturais ou físico-químicas similares.

Os parâmetros operacionais que caracterizam os diferentes detectores são: <sup>105, 107</sup>

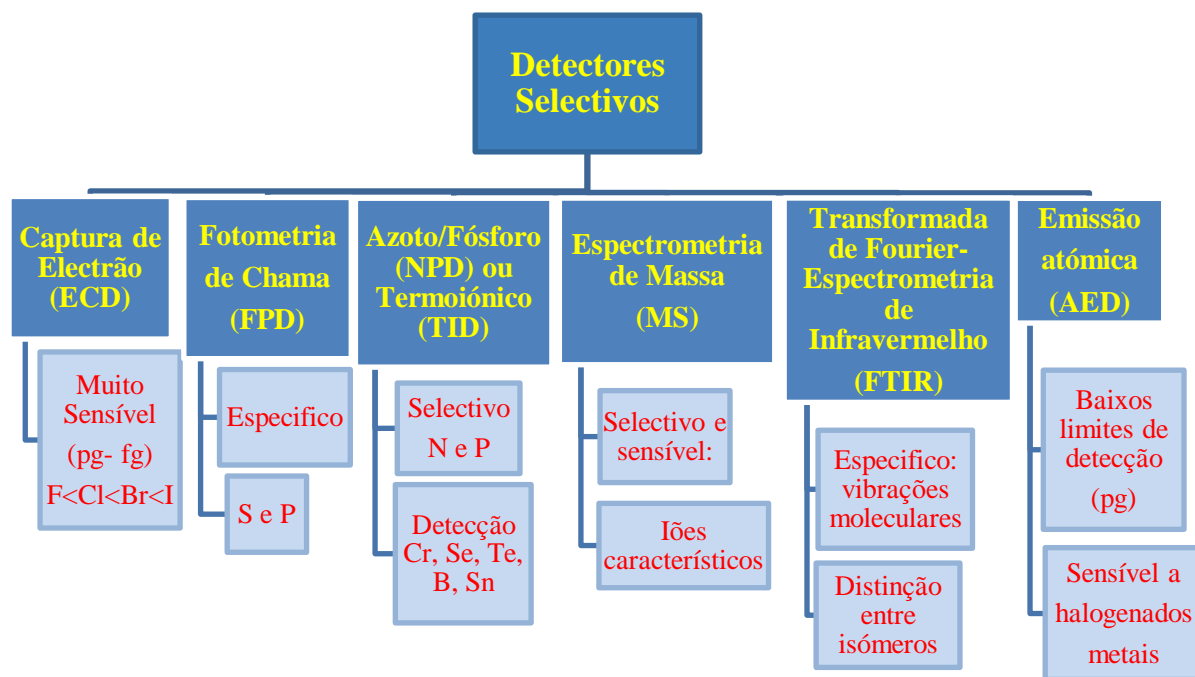
- 1) Sensibilidade – produzir uma variação mensurável do sinal em resposta a pequenas variações na concentração dos analitos.
- 2) Estabilidade – produzir sinais reproductíveis ao longo do tempo, quando na mesma situação analítica.

- 3) Gama de Concentrações (Gama Linear) – gama de concentrações na qual a relação entre o sinal produzido e a concentração dos analitos pode ser representada por uma expressão linear.
- 4) Factor de Resposta – razão entre a intensidade do sinal produzido e a concentração do analito.
- 5) Selectividade – capacidade de produzir sinais mais intensos para um determinado conjunto de analitos.
- 6) Ruído de Fundo – sinal correspondente à passagem da fase móvel e de impurezas da coluna.

Nas Figuras 1.14 e 1.15 apresentam-se algumas características de detectores universais e selectivos utilizados em cromatografia gasosa.



**Figura 1.14** - Detectores universais utilizados em GC.



**Figura 1.15** - Detectores específicos/ selectivos. <sup>105, 106, 108</sup>

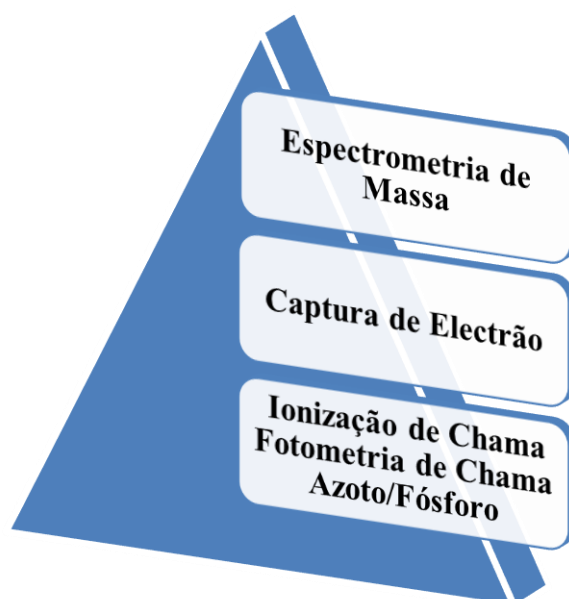
Os detectores universais podem ser utilizados para a análise de vários tipos de analitos, contudo apresentam menor sensibilidade do que os detectores específicos, como o caso do ECD ou NPD.

O detector FID, por exemplo, é um detector robusto com uma ampla gama linear, no entanto, não é normalmente usado para detectar pesticidas devido à sua fraca resposta, em moléculas que contenham átomos de azoto, oxigénio e enxofre. <sup>104,105</sup>

Já o espectrómetro de massa é simultaneamente um detector universal pois no modo de aquisição da corrente iónica total, detecta qualquer composto orgânico desde que este seja ionizável mas também pode ser considerado selectivo, no modo de monitorização de iões individuais. Estes iões podem ser o ião molecular e/ou os iões precursores resultantes de várias fragmentações. <sup>106, 107</sup>

Os pesticidas são compostos que contêm na sua estrutura átomos de cloro, azoto, fósforo ou outros heteroátomos pelo que há vantagens em utilizar na sua detecção os detectores selectivos para estes heteroátomos. Por outro lado, o espectrómetro de massa além de fornecer um valor de corrente iónica que é proporcional à concentração do pesticida permite obter também informação estrutural através do espectro de massa que é um elemento de confirmação da identidade do pesticida. Assim, constata-se que os

detectores mais frequentemente utilizados na análise de pesticidas são o MS, o ECD e o NPD (Figura 1.16).<sup>109,110,111</sup>



**Figura 1.16** - Detectores usados na análise cromatográfica de pesticidas.

### 1.3.2.2 Cromatografia Gasosa e Espectrometria de Massa

A espectrometria de massa é pela sua associação entre as funções de detecção e de identificação o método mais utilizado, não só para os pesticidas como para outros grupos de compostos, incluindo hidrocarbonetos poliaromáticos (PAHs), clorobenzenos, clorofenóis, trihalometanos, fenóis ou ésteres ftálicos.

No espectrómetro de massa, os compostos provenientes da coluna cromatográfica são convertidos em iões, separados em função da sua razão massa/carga e conduzidos até ao detector.

O processo de ionização é essencial e pode ocorrer por diferentes métodos: ionização por impacto de electrão (EI), ionização química (CI), ionização química à pressão atmosférica (APCI) ou ionização por electrospray (ESI).

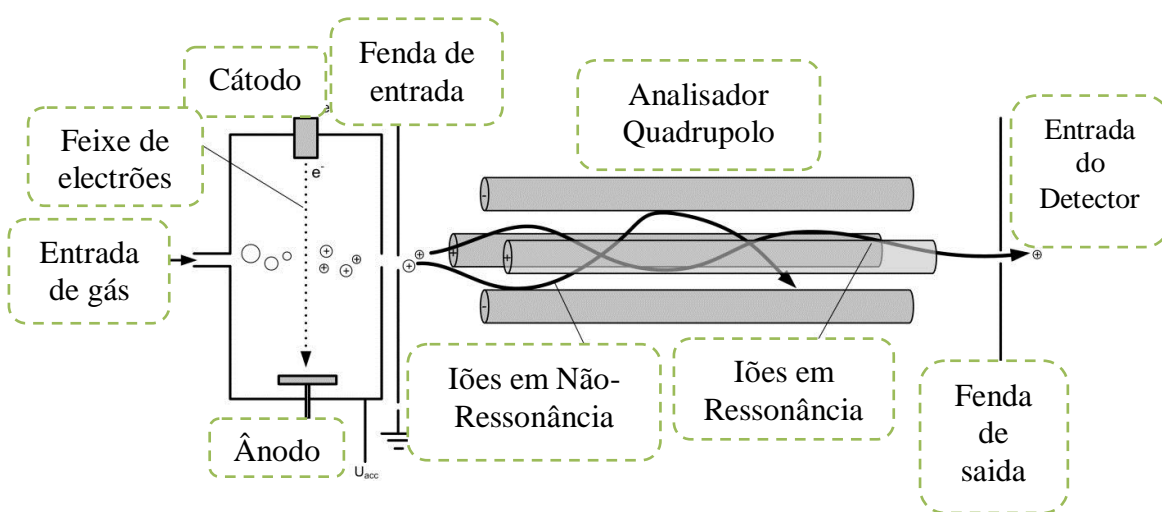
A fonte de ionização deve ter a capacidade de ionizar as moléculas por um destes métodos, mas sem as colocar num nível de energia tão alto que conduza à sua total desagregação. A temperatura da fonte tem que ser suficientemente elevada para que não

ocorra condensação dos analitos e o vácuo tem que ser suficiente para prevenir colisões entre os iões durante o seu percurso até ao detector.

O método de ionização por impacto de electrão (Figura 1.17) é o mais comum e consiste no bombardeamento das moléculas do soluto com electrões de alta energia (70 eV) que são produzidos por um filamento de Rénio ou de Tugsténio, que provocam a saída de um electrão da camada de valência da molécula de soluto. Assim, são produzidos iões radicais com carga positiva (ou negativa), designados normalmente como iões moleculares, que como estão num estado de energia muito elevado sofrem uma série de reacções de clivagem e rearranjo intermoleculares das quais resultam os restantes iões do espectro de massa.

Este tipo de ionização é normalmente utilizado em metabolitos com massa molecular baixa ou média, como os habitualmente monitorizados em análises de fluidos orgânicos como o plasma ou a urina, em análises ambientais, e em áreas como a biomedicina e a agricultura.<sup>105, 106</sup>

A ionização química, tal como a ionização por impacto de electrão gera iões utilizando um feixe de electrões, no entanto a diferença está no uso de gases, chamados de gases reagentes (metano, isobutano, amónia), que auxiliam o processo de ionização. Neste tipo de ionização, o feixe de electrões provoca a ionização do gás reagente, sendo estes iões que vão colidir com as moléculas de soluto, formando novos iões. Este processo envolve menor energia que o processo anterior, provocando uma fragmentação mais suave e uma maior estabilidade dos iões formados.<sup>105-107</sup>



**Figura 1.17** - Processo de Ionização por Impacto de Electrão.

Outra das técnicas muito usadas hoje em dia é a da ionização à pressão atmosférica (API), onde estão englobadas as técnicas de ESI e de APCI. Estas técnicas são utilizadas em HPLC-MS e em particular na determinação de moléculas pesadas como os péptidos e proteínas.<sup>112</sup>

Após a ionização os iões produzidos têm que ser separados de acordo com a sua razão massa/carga ( $m/z$ ) o que ocorre no analisador, um dos componentes de um espectrometro de massa, que condiciona fortemente a sua sensibilidade.<sup>105, 106</sup>

Existem diversos tipos de analisadores de massa: quadrupólo, triplo-quadrupólo (QQQ), Armadilha de Iões, Tempo de Vôo (TOF) ou Transformada de Fourier- Ressonância de Ião em Ciclotrão (FT-ICR).

Os dois tipos de analisadores mais usados são o de quadrupólo e o de armadilha de iões. O quadrupolo tem como o próprio nome indica, quatro pólos de cargas opostas paralelos, dois a dois, entre si e que emitem constantemente radiofrequências. Este analisador permite desviar os iões com carga indesejáveis, que são normalmente os iões de carga negativa, que não são produzidos pela fonte de ionização, sendo que estes são desviados da frequência de ressonância dos iões positivos que são acelerados com uma determinada trajectória e velocidade para o detector. A trajectória sofrida pelos iões que chegam ao detector é bastante complexa, pois é influenciada pelas constantes variações da radiofrequência, responsáveis pela movimentação dos iões até ao detector.

As principais vantagens deste analisador são o seu baixo custo quando comparado com outros analisadores e o facto do seu varrimento na gama de massas, ser muito rápido.

Quanto ao analisador de armadilha de iões este “prende” os iões a um determinado campo magnético, em que os iões com razão massa/carga específica circulam em orbitas específica e determinadas pelo analisador. Assim com o aumento da radiofrequência, os iões com  $m/z$  mais baixas são destabilizados e direccionados para o detector. Este tipo de analisadores é muito popular em GC/MS devido à sua alta sensibilidade, pois permite armadilhar os iões com determinada  $m/z$  durante um certo período de tempo, aumentando a razão sinal/ruído.<sup>106</sup>

Como já foi referido, o espectrómetro de massa pode ser operado em modos de aquisição selectivos ou não selectivos:<sup>104-107</sup>

- 1) Varrimento completo (FullScan) - detecção contínua no tempo e numa gama de massas alargada (50 - 600  $u$ ) de todos os analitos que eluem da coluna cromatográfica.

- 2) Monitorização de Ião Seleccionado (SIM) - detecta os analitos que dão origem a dois, três ou mais iões previamente seleccionados num dado intervalo de tempo de retenção ou ao longo de todo o cromatograma. É um modo de aquisição selectivo e sensível, usado para análise quantitativa entre  $\mu\text{g/L}$  a  $\text{pg/L}$ .
- 3) Multidimensional (MSn) - detecta os analitos a partir de n fragmentações de iões seleccionados (que poderão ser iões moleculares ou outros) programadas num dado intervalo de tempo de retenção.

Pode ainda obter-se uma informação selectiva a partir de uma aquisição em modo de varrimento completo, efectuando após a aquisição um processamento do sinal denominado extracção de ião ou pico base. Neste tipo de processamento o perfil de corrente iónica total é reprocessado considerando apenas a contribuição de um ião; como é evidente, a área cromatográfica é substancialmente reduzida mas elimina-se também de forma muito eficiente o ruído da linha de base e o ruído devido a contaminantes co-extraídos, obtendo-se como resultado final uma melhor razão sinal/ruído e portanto uma melhor sensibilidade.<sup>104, 106, 107</sup>

### **1.3.2 Validação do método analítico**

Na validação do método analítico pretende-se determinar de forma estatisticamente significativa as características analíticas do método desenvolvido e a sua aplicabilidade a amostras reais, produzindo resultados fiáveis e interpretáveis.<sup>113</sup>

Os parâmetros cuja determinação é necessária para proceder à validação completa de um método analítico são os seguintes:<sup>107</sup>

- 1) Selectividade /Especificidade
- 2) Calibração analítica
- 3) Intervalo de Linearidade Analítica
- 4) Limiares analíticos: Limites de Detecção e de Quantificação
- 5) Sensibilidade
- 6) Precisão
- 7) Robustez
- 8) Exactidão

### 1.3.2.1 Selectividade/ Especificidade

Define a capacidade que o método tem em identificar e distinguir inequivocamente um analito na presença de outros solutos ou interferentes que possam estar presentes na matriz, respondendo aos analitos de interesse, sem se pretender uma análise quantitativa.

Um método que produz resposta para apenas um analito é chamado específico, por outro lado, um método que produz respostas para vários analitos, mas que pode distinguir a resposta de um analito da resposta de outros, independentemente das características dos interferentes, é considerado selectivo. Estes dois parâmetros estão correlacionados e permitem ser avaliados pela realização de testes de recuperação e pela análise de padrões com concentrações conhecidas. Assim deste modo, o método é considerado específico e selectivo quando se verificam taxas de recuperação próximas de 100%.<sup>114</sup>

Existem parâmetros e testes que permitem avaliar cada um destes factores individualmente. No caso da especificidade há que considerar os seguintes parâmetros: resolução, retenção relativa (factor de separação), factor de capacidade (factor de retenção), factor de simetria e número de pratos teóricos. Na análise da selectividade os testes mais comuns são o teste de Snedecor, o teste de homogeneidade de variâncias e o teste de *t*-student.

### 1.3.2.2 Calibração analítica

A calibração analítica relaciona a resposta de um sistema de medida, como por exemplo a área ou altura do pico cromatográfico, isto é, um factor quantitativo ou numérico com a concentração do analito que originou esse sinal. Este tipo de calibração pode ser feito a partir de:<sup>113, 114</sup>

- Curva de Calibração com padrão externo ou interno
- Curva de Calibração pelo método de adição de padrão à amostra
- Factor de resposta

Cada opção é adequada a diferentes casos, devendo o laboratório seleccionar a mais adequada para a análise em causa.

No caso de se recorrer à opção de efectuar uma curva de calibração, é necessário preparar um conjunto de soluções-padrão com várias concentrações conhecidas que

serão analisadas nas mesmas condições a aplicar à análise das amostras. Para este tipo de calibração recomenda-se o uso da norma ISO 8466-1<sup>115</sup> como referência, designadamente para efectuar regressões lineares pelo método dos mínimos quadrados (Anexo III).

O cálculo das curvas de calibração aplica o método dos mínimos quadrados, que permite encontrar o melhor ajuste possível para o conjunto de dados tentando minimizar a soma dos quadrados das diferenças entre a curva ajustada e os dados. Neste método, define-se que o eixo vertical (eixo yy) representa a medida instrumental do equipamento (área ou altura do pico cromatográfico) e que no eixo horizontal (eixo xx) está representada a concentração dos padrões utilizados; considera-se que os erros associados ao eixo dos xx são desprezáveis relativamente aos valores do eixo dos yy. Assume-se que os erros apresentam uma distribuição normal e que existe homogeneidade de variâncias ao longo da curva de calibração. Segundo a norma referida, são recomendados dez pontos de calibração não podendo ser utilizados menos de cinco pontos de calibração; a sua distribuição deve ser homogénea no intervalo de concentração considerado. De acordo como o método analítico e considerando os critérios laboratoriais, os valores para o coeficiente de determinação ( $R^2$ ) das curvas de calibração devem ser o mais próximo possível da unidade, e não devem ser inferiores a 0,990 de forma a traduzir uma fraca dispersão dos resultados e um bom ajuste dos pontos experimentais à recta de calibração.

Para uma calibração linear ( $y = a + bx$ ) o declive ( $b$ ) é dado pela seguinte expressão:<sup>113,116</sup>

$$b = \frac{\sum[(x_i - \bar{x}) * (y_i - \bar{y})]}{\sum(x_i - \bar{x})^2}$$

E o desvio padrão residual ( $S_y$ ) que representa a dispersão das medidas efectuadas a partir da função de calibração é dado pela seguinte fórmula: <sup>113, 117</sup>

$$S_y = \sqrt{\frac{\sum(y_i - \hat{y}_i)^2}{N - 2}}$$

Sendo  $\hat{y} = a + bxi$

O desvio padrão entre os pontos no eixo dos xx é designado por  $S_{x0}$  ou  $S_0$  e é dado por:

$$S_{x0} = \frac{S_y}{b}$$

O coeficiente de variação (CV) relativo ao desvio padrão  $S_{x0}$  é dado por:

$$CV\% = \frac{S_{x0}}{\bar{x}} \times 100$$

### 1.3.2.3 Intervalo de Linearidade Analítica

A linearidade é entendida como a capacidade que o método tem em fornecer resultados directamente proporcionais à concentração do soluto num determinado intervalo de concentrações conhecidas, isto é, num intervalo de linearidade em que a variação nas respostas do detector deve ser inferior a 5%.

Assim este intervalo pode ser avaliado pela aplicação de um modelo estatístico conforme o que está descrito na norma ISO 8466-1, designado por Fisher/Snedecor ou Teste de Mandel (Anexo IV). Todavia a análise da linearidade também pode ser avaliada a partir da análise de resíduos (Anexo V), que descreve a distância entre os valores dos dados observados e os valores estimados através da regressão linear, no eixo dos yy.<sup>106, 113,115</sup>

Contudo, a linearidade pode ser estudada através de outros testes, como o teste da análise de resíduos, o teste das áreas normalizadas (Anexo VI) e/ou pelo teste de RIKILT (Anexo VII)

A gama de trabalho pode ser definida como sendo o intervalo entre a concentração inferior e a concentração superior do analito na solução padrão ou na amostra, para o qual deve haver um nível adequado de precisão e exactidão na definição do procedimento analítico. A norma ISO 8466-1 avalia a linearidade para modelos lineares, enquanto a norma ISO 8466-2 avalia o mesmo parâmetro mas em modelos polinomiais de 2º grau.<sup>115, 117</sup>

#### 1.3.2.4 Limiares Analíticos

Os limiares analíticos de um método são definidos pelo limite de detecção (LOD) e pelo limite de quantificação (LOQ) (Anexo VIII). O limite de detecção para um determinado analito deve ser entendido como uma concentração que é traduzida por um sinal instrumental diferente do sinal do branco num dado intervalo de confiança estatística (normalmente 95%). Este limite situa-se acima do somatório do sinal médio do branco ( $x_0$ ) somando três vezes o desvio-padrão do branco ( $S_{x_0}$ ) isto é:

$$LOD = 3 \times S_{x_0}$$

O limite de quantificação corresponde à menor concentração da gama de trabalho, em que é possível quantificar o analito na amostra, em que o coeficiente de variação do sinal está reduzido a valores inferiores a 10%. Assim o primeiro padrão da gama de trabalho deve de ser superior ao limite de quantificação.

Este limite situa-se dez vezes superior ao desvio-padrão do branco, ou seja:<sup>114</sup>

$$LOQ = 10 \times S_{x_0}$$

#### 1.3.2.5 Sensibilidade

A sensibilidade traduz-se pela resposta que o detector fornece por unidade de concentração ou por unidade de massa entre dois analitos.

Esta grandeza é expressa pela quantidade mínima detectável, definida por uma concentração do analito para a qual a razão sinal/ruído seja superior a quatro. No caso de o método envolver uma calibração linear, este parâmetro pode ser visto como o declive da curva de calibração (b) em que no eixo dos yy está a resposta do detector (área ou altura do pico) e no eixo dos xx estão as concentrações dos analitos, sendo portanto o seu valor constante ao longo da gama de trabalho.<sup>105,106,113</sup>

### 1.3.2.6 Precisão

A precisão do método analítico define-se como o grau de concordância entre os vários resultados dos ensaios laboratoriais individuais, quando o método envolve leituras de replicadas de padrões ou de amostras (norma ISO 3534)<sup>118</sup>. É avaliado pelo desvio-padrão (SD) ou pelo desvio-padrão relativo (RSD) ou coeficiente de variação (CV), que avaliam a discrepância entre os dados que podem estar associados a erros aleatórios ou contínuos (operador, equipamento, factores ambientais como a temperatura, humidade, tempo entre medições). O teste de homogeneidade de variâncias permite avaliar se os padrões da gama considerada linear (um da gama de concentrações mais baixa e outro da gama de concentrações mais alta) têm valores de variâncias muito diferentes entre si. Também o teste da análise de resíduos permite avaliar a precisão do método, discriminando os valores considerados fora da gama de calibração.<sup>113, 116</sup>

Para avaliar a precisão há que considerar três parâmetros: a repetibilidade, a precisão intermédia e a reprodutibilidade. O primeiro parâmetro expressa a precisão de um método realizado a partir de várias medições sucessivas da mesma amostra em condições de operação idênticas (metodologia, operador, equipamento, reagentes, laboratório, factores ambientais, tempo entre repetições) num curto intervalo de tempo. Este parâmetro pode ser avaliado quantitativamente através da dispersão de resultados produzidos numa análise de soluções-padrão, material de referência ou de brancos a várias concentrações.

A precisão intermédia é definida com base na avaliação da precisão numa dada amostra ou em amostras idênticas, utilizando o mesmo procedimento experimental, no mesmo laboratório, mas definindo previamente quais as condições que se variaram (período de tempo, operador ou equipamento). Este tipo de precisão é usada para assegurar que há resultados concordantes para amostras idênticas analisadas em períodos de tempo distintos por outros operadores e/ou equipamentos.

Por fim, a reprodutibilidade avalia se a precisão de um método é constante ao longo do tempo, usando um procedimento analítico que pode apresentar diferentes condições de operação (diferentes laboratórios, operadores, equipamentos, condições de análise), e que é geralmente avaliado através da participação de ensaios interlaboratoriais ou de ensaios de normalização. Contudo, a reprodutibilidade também pode ser avaliada entre métodos iguais, como é o caso dos ensaios de aptidão onde se pretende avaliar qual o método que apresenta melhores resultados.

### **1.3.2.7 Robustez**

A robustez é definida como a capacidade de um método analítico resistir a pequenas alterações experimentais. O método é considerado robusto se não for afectado por ligeiras alterações dos seus parâmetros (temperatura, fluxo, entre outros), sendo que este parâmetro é avaliado na fase de desenvolvimento do método e depende do tipo de processo em estudo. A avaliação da robustez é importante quando se pretende avaliar que problemas podem afectar a resposta dada pelo equipamento ao método estudado. Este parâmetro pode ser calculado recorrendo ao teste de Youden. Este teste permite não só avaliar a robustez do método, como permite também, avaliar a variação entre os dados e permite comparar resultados interlaboratoriais para o mesmo tipo de amostras. É importante salientar que quanto maior for a robustez de um método, maior será a sua precisão.<sup>116</sup>

### **1.3.2.8 Exactidão**

A exactidão é definida como a concordância entre o resultado de um ensaio e o valor de referência anteriormente aceite (norma ISO 3534). A avaliação da exactidão é portanto a avaliação da combinação de erros sistemáticos e aleatórios.

A exactidão pode ser avaliada através de ensaios de recuperação analítica, permitindo comparar valores esperados com valores observados pelo próprio método. No entanto, este parâmetro também pode ser avaliado a partir de ensaios interlaboratoriais ou através de comparação de resultados com os materiais de referência certificados (MRC). Os ensaios de recuperação também permitem avaliar a exactidão de um método.

### **1.3.2.9 Eficiência de Extracção**

A eficiência de extracção (EE) pode ser descrita como uma função que avalia o nível de modificação que a natureza da amostra introduz na calibração analítica.<sup>113</sup>

A eficiência de extracção de um determinado analito pode ser estimada pela análise de uma amostra, adicionando uma quantidade conhecida desse analito, isto é, fortificando a amostra com uma concentração conhecida de um determinado padrão do analito.

Para avaliar a eficiência de extracção desse analito em amostras reais, devem-se estudar as recuperações do mesmo analito em três situações distintas: numa concentração próxima do limite de detecção, numa concentração próxima da concentração máxima admissível e numa concentração que esteja a meio da gama de trabalho. Assim teremos o cálculo da eficiência de extracção como:

$$EE (\%) = \left( \frac{C_1 - C_2}{C_3} \right) \times 100$$

Onde,

$C_1$  é a concentração determinada na amostra fortificada

$C_2$  é a concentração determinada na amostra não fortificada

$C_3$  é a concentração de fortificação

## Capítulo II - Determinação de pesticidas organofosforados em água por DLLME-GC-MS

### 2.1 Introdução

#### 2.1.1 Pesticidas organofosforados na agricultura

Os pesticidas organofosforados são uma das classes de pesticidas mais estudadas em várias matrizes alimentares, incluindo as águas. Neste trabalho estudaram-se um conjunto de sete pesticidas organofosforados são aplicados em culturas de cereais, frutos e tubérculos (Tabela 2.1).

**Tabela 2.1** - Pesticidas organofosforados estudados e tipo de culturas onde se aplicam.

<b>Substância Activa</b>	<b>Tipo de Cultura</b>
Profos	Cenouras, Cereais, Videira, Citrinos
Diazinão	Trigo, Macieira, Pereira, Citrinos
Clorpirifos metil	Videira
Metil paratião	Soja, Algodão, Milho, Amendoim
Fenclorfos	Macieira
Clorpirifos	Batateira, Macieira, Pereira, Tomateiro, Videira, Citrinos, Pessegueiro, Café
TBPT	Batateira, Algodão, Soja, Cereais

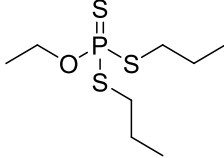
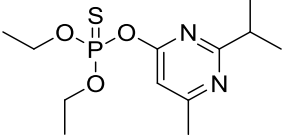
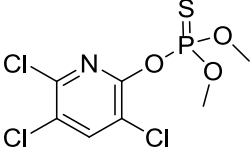
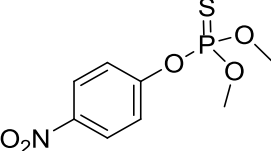
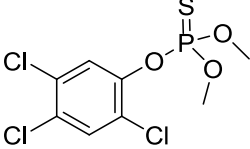
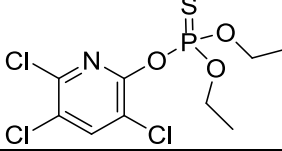
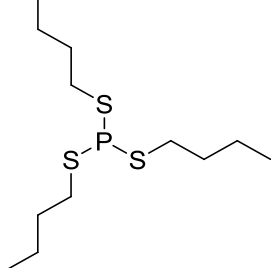
Estes produtos existem no mercado sob diversas formas tais como os sprays, os líquidos miscíveis com água, os pós solúveis, as soluções de óleos, suspensões, concentrados de baixo volume, poeiras, aerossóis, pesticidas granulares, combinações de fertilizantes, impregnações de cera em barras, e muitos outros. E antes da sua aplicação é necessário saber quais as normas de segurança para o manuseamento correcto de cada composto com base na sua estabilidade.<sup>21</sup>

Num contexto legislativo nacional, já existem regras de classificação em termos de segurança, embalagem e rotulagem de substâncias perigosas, encontrando-se estas informações dispostas no Decreto-Lei 27A/2006.<sup>119</sup>

Num contexto ambiental, a quantidade de pesticidas a aplicar depende das condições ambientais, do tipo de doença, do tipo de cultura, da resistência da cultura á doença, da eficiência da prática de protecção e de factores políticos e económicos.

As estruturas moleculares dos pesticidas organofosforados incluídos neste estudo são apresentadas na Tabela 2.2.

**Tabela 2.2** - Estruturas Químicas e N.º de CAS dos pesticidas organofosforados.

<b>Composto</b>	<b>Estrutura Química</b> <sup>120,121</sup>	<b>N.º CAS</b> <sup>120, 121</sup>
<b>Profos</b>		13194-48-4
<b>Diazinão</b>		333-41-5
<b>Clorpirifos metil</b>		5598-13-0
<b>Metil paratião</b>		298-00-0
<b>Fenclorfos</b>		299-84-3
<b>Clorpirifos</b>		2921-88-2
<b>Tributilfosforotritioito (TBPT)</b>		15050-5

Cada um destes pesticidas organofosforados apresenta diversos heteroátomos na sua estrutura, estando sempre presente o fósforo, mas podendo também incluir o enxofre, o oxigénio, o azoto e o cloro. A presença destes átomos confere-lhes polaridade o que se traduz em valores relativamente elevados de solubilidade em água para alguns destes pesticidas (Tabela 2.3).

**Tabela 2.3** - Solubilidade em água, constantes de dissociação ( $pK_a$ ) e constantes de partição octanol/água  $\log K_{ow}$  dos vários pesticidas organofosforados.

Composto	Solubilidade a 20 °C (mg/L)	$pK_a$	Log $K_{ow}$
Profos	700 <sup>121</sup>	Não ionizável <sup>121</sup>	3.59 <sup>121</sup>
Diazinão	60 <sup>121</sup>	2.4 <sup>121</sup>	3.3 <sup>121</sup>
Clorpirifos metil	2.6 <sup>121</sup>	3.71 <sup>121</sup>	4.24 <sup>121</sup>
Metil paratião	55 <sup>121</sup>	Não ionizável <sup>121</sup>	3.0 <sup>121</sup>
Fenclorfos	40 <sup>121</sup>	-	4.775 <sup>121</sup>
Clorpirifos	1.4 <sup>121</sup>	Não ionizável <sup>121</sup>	4.7 <sup>121</sup>
TBPT	2.3 <sup>28,122</sup>	Não ionizável <sup>123</sup>	7.67 <sup>121, 123</sup>

No que se refere à solubilidade em água o profos tem um valor particularmente elevado, enquanto o menos solúvel é o clorpirifos. Apenas o diazinão e o clorpirifos metil são ionizáveis, mas apenas a pHs ácidos (2,4 e 3,7, respectivamente). A constante de partição octanol/água é um parâmetro que se correlaciona com a partição do analito entre solventes orgânicos e soluções aquosa e com a sua mobilidade ambiental, nomeadamente a sua tendência para adsorção a solos e sedimentos e a sua bioconcentração. O  $\log K_{ow}$  está directamente correlacionado com o carácter hidrofóbico do analito e portanto com a sua tendência para ser extraído por um solvente orgânico apolar. Dos analitos incluídos neste trabalho o menos hidrofóbico é portanto o metil paratião, enquanto o mais hidrofóbico é o TBPT.

A determinação dos pesticidas incluídos neste estudo, individualmente ou em grupo, em amostras de água tem sido abordada por diversas técnicas com maior incidência da microextracção em fase sólida (SPME) e extracção em fase sólida (SPE), hifenadas com a espectrometria de massa. Apresentam-se a seguir os limiares analíticos de detecção e quantificação obtidos com estas técnicas para alguns dos pesticidas do grupo estudado neste trabalho (Tabela 2.4).

**Tabela 2.4** – Limiares analíticos (LOD e LOQ) obtidos na determinação de pesticidas organofosforados por SPME-GC-MS e SPE-GC-MS.

Analitos	SPE		SPME		Referência
	<sup>a</sup> LOD (ng/L)	<sup>b</sup> LOQ (ng/L)	<sup>a</sup> LOD (ng/L)	<sup>b</sup> LOQ (ng/L)	
Diazinão	80	-	-	-	124
	500	-	-	-	125
	-	45000	-	-	126
	-	-	17	51	109
Clorpirifos metil	-	49000	-	-	126
Metil paratião	100	-	-	-	124
	-	87000	-	-	126
	-	-	23	69	109
Clorpirifos	-	62000	-	-	126
	-	-	10	35	127
	-	-	100	-	128
	-	-	19	59	109

<sup>a</sup>LOD- Limite de detecção calculado como 3 S/N; <sup>b</sup>LOQ- Limite de quantificação calculado como 10 S/N.

Como se pode verificar na Tabela 2.4 os métodos de SPE apresentam limites de quantificação bastante superiores ao valor máximo admissível para cada pesticida organofosforado (100 ng/L). Já os métodos de SPME se mostram adequados para efectuar a monitorização destes pesticidas em águas apresentando valores de LOQ inferiores a 100 ng/L.

Recentemente surgiram na literatura, algumas aplicações de métodos de microextração em fase líquida (LPME) à determinação de alguns pesticidas organofosforados. Na Tabela 2.5 apresentam-se as condições de extração e os limites de detecção obtidos por DLLME para alguns pesticidas organofosforados. Comparando os valores de LOD obtidos por DLLME (Tabela 2.5) com os obtidos por SPME (Tabela 2.4) verifica-se que os primeiros são 10 a 1000 vezes mais baixos que os segundos demonstrando assim uma maior sensibilidade dos métodos de DLLME relativamente aos outros métodos referidos na literatura.

No entanto, esta sensibilidade é conseguida através de uma redução do volume final de extracto até valores tão baixos como 5 µL ou mesmo 1 µL. Apesar de os autores destes trabalhos referirem a utilização de microseringas de alta precisão na medida destes

volumes, é questionável que se consiga efectuar de forma reproductível a separação de uma fase de 5  $\mu\text{L}$  ou 1  $\mu\text{L}$  relativamente a uma outra fase de 5 mL. Uma imprecisão de 0.5  $\mu\text{L}$  cometida na definição da interface entre as fases (que é perfeitamente admissível) traduz-se num erro de 10% a 50% para volumes sedimentados de 5  $\mu\text{L}$  ou de 1  $\mu\text{L}$ , respectivamente.

**Tabela 2.5** - Condições de extracção e limites de detecção (LODS) obtidos por DLLME para alguns pesticidas organofosforados.

Pesticida	LOD ( $\mu\text{g/L}$ )	$V_{\text{sed}}$ ( $\mu\text{L}$ )	Solvente de extracção	Solvente de dispersão	$V_{\text{disp}}$ ( $\mu\text{L}$ )	$V_{\text{ext}}$ ( $\mu\text{L}$ )	Ref <sup>a</sup>
Clorpirifos	0.005	5	Clorobenzeno	Acetona	1000	12	69
	0.57	1	Tetracloroeto de carbono	Metanol	800	10	129
	5	5	[C <sub>8</sub> MIM][PF <sub>6</sub> ]	Metanol	1000	35	130
Diazinão	0.005	5	Clorobenzeno	Acetona	1000	12	69
Metil paratião	0.17	20	[C <sub>6</sub> MIM][PF <sub>6</sub> ]	-	-	50	75

LOD- Limite de detecção calculado através de 3 vezes da razão sinal/ruído;  $V_{\text{sed}}$  - Volume de fase sedimentada,  $V_{\text{disp}}$  - volume do solvente de dispersão e  $V_{\text{ext}}$  - volume do solvente de extracção.

Por outro lado, ainda que com operadores muito precisos, se obtenha uma boa repetibilidade e mesmo uma boa precisão intermédia, poderão ocorrer diferenças significativas na utilização de métodos com volumes finais de extractos tão reduzidos no âmbito de ensaios interlaboratoriais.

Por outro lado, a automatização da análise é um aspecto a considerar em DLLME, pois sendo o passo de extracção extremamente rápido, o passo limitante do processo analítico é a análise dos extractos.

A concentração do extracto a volumes muito reduzidos aumenta a sensibilidade mas pode causar problemas de evaporação parcial do solvente durante o período no qual os extractos estão colocados no tabuleiro do injector automático.

A forma mais comum de controlar este fenómeno seria a adição de um padrão interno mas dado o pequeno volume dos extractos, essa adição resultaria sempre numa diluição significativa.

Um procedimento alternativo que foi encontrado para minimizar este problema<sup>131,132</sup> é a colocação de alguns microlitros da fase aquosa em equilíbrio com a fase sedimentada sobre esta última, após a sua transferência para o redutor de volume do frasco de injeção, e assim evitar a evaporação do solvente de extracção.

Ainda assim, quando o volume de fase sedimentada se torna igual ou inferior a 5 µL, podem começar a detectar-se problemas de repetibilidade tanto na separação das fases como da sua análise automatizada, o que coloca algumas limitações à robustez dos métodos propostos.

Apesar destas limitações que poderão ser ultrapassadas com o desenvolvimento de métodos de DLLME sensíveis mas com volumes de fase sedimentada um pouco mais elevados esta técnica tem além da sensibilidade, vantagens óbvias relativamente a SPE e a SPME no que diz respeito a custos e a tempo de extracção.

Na Tabela 2.6 apresenta-se uma comparação destes factores para o caso da determinação do pesticida diazinão por DLLME, SPE e SPME.

**Tabela 2.6** - Tempo médio gasto e custos associados a cada técnica extracção do diazinão a partir de amostras de água.

<b>Factores Avaliados</b>	<b>Técnicas de Extracção</b>		
	<b>DLLME</b> (Ref <sup>a</sup> 69)	<b>SPE<sup>1</sup></b> (Ref <sup>a</sup> 126)	<b>SPME</b> (Ref <sup>a</sup> 133)
<b>Tempo médio (min.)</b>	6-10	15-30	20-65
<b>Custos de consumíveis (€)</b>	0.04	2.63	2.34
<b>Consumíveis Contabilizados</b>	Clorobenzeno Acetona	Cartucho ENVI-CAR (3 mL, 250 mg) Acetona Acetato de etilo Hexano	Fibra de Poliacrilato <sup>2</sup> (85 µm) Metanol

<sup>1</sup> Não foi contabilizado o consumo de azoto utilizado na concentração da amostra

<sup>2</sup> Considerando a utilização de cada fibra 50 vezes

Como se pode constatar com este exemplo, a adopção de métodos de DLLME pode representar uma vantagem significativa tanto em termos de tempo de análise como em termos dos custos por análise, para além de poder apresentar uma sensibilidade superior à atingida com as técnicas de SPE ou SPME para os mesmos analitos.

O objectivo deste trabalho foi o desenvolvimento e optimização de um método de DLLME adequado à determinação de um conjunto de pesticidas organofosforados (profos, diazinão, clorpirifos metil, metil paratião, fenclorfos, clorpirifos e TBPT) numa gama de concentrações que incluísse o limite máximo admissível para cada um destes pesticidas e que é de 100 ng/L segundo a Directiva 98/ 83/CE de 3 de Novembro de 1998.<sup>26</sup>

Para além disso, estabeleceram-se alguns objectivos secundários de forma a permitir a automatização da análise, nomeadamente, só foram seleccionadas as condições que permitiam a recolha de volumes reproductíveis de fase sedimentada e nas quais esse volume foi superior a 5µL.

A aplicação de DLLME a este grupo de pesticidas foi estudada utilizando tanto solventes halogenados como solventes não halogenados.

Também no que se refere aos solventes utilizados na dispersão foram testados alguns solventes menos comuns como os alcóois alifáticos, 1-propanol e 2-propanol.

O método optimizado foi posteriormente validado de acordo com os procedimentos detalhados na Norma ISO 3534.<sup>118</sup>

## **2.2 Procedimento Experimental**

### **2.2.1 Solventes e Reagentes**

Utilizou-se em todos os ensaios água ultra pura (Milli-Q, modelo Milipore, Molsheim, França).

Hexano (99%), ciclohexano (99%), a acetona (99.5%), o acetonitrilo (99.9%) e o metanol (99.9%) foram fornecidos por Lab-scan (Dublin, Irlanda); o clorobenzeno (99%) foi adquirido a Panreac (Barcelona, Espanha); o clorofórmio (99.8%), o 1,2-dicloroetano (99.8%), o tetracloreto de carbono (99.9%) e o tetracloroetileno (99.9%) foram adquiridos a Aldrich (Steinheim, Alemanha); o diclorometano (99.99%) foi fornecido por Fischer Scientific (Leicestershire, Reino Unido); o heptano (99%) e o 2-propanol (99.8%) foram adquiridos a Merck (Darmstadt, Alemanha); o octano (99%) foi fornecido por Koch-Light Laboratory (Cambridge, Reino Unido); o 1-propanol ( $\geq 99.5\%$ ) foi adquirido a Fluka (Steinheim, Suíça).

O cloreto de sódio (99.5%) e o ácido clorídrico concentrado (37%) foram adquiridos a Panreac (Barcelona, Espanha); o hidróxido de potássio (85% pureza) foi fornecido por Riedel-de-Haën (Seelze, Alemanha).

### **2.2.2 Amostras Reais**

As amostras reais utilizadas para a validação do método analítico são provenientes da rede pública de abastecimento (água da torneira), de um furo (água de rega) e de um poço.

### **2.2.3 Materiais**

Nos ensaios de microextracção líquido-líquido dispersiva utilizaram-se vials cónicos de vidro, graduados e com rosca e tampa com septo de PTFE, com capacidades de 5 mL e de 10 mL (Ref<sup>as</sup> 27039 e 27479, Supelco).

Na medida e transferência dos solventes de extracção e de dispersão, bem como da fase sedimentada utilizaram-se microseringas de vidro, graduadas, com a capacidade de:

10µL (SGE, Australia); 25 µL, 50 µL, 100 µL e 250 µL (Agilent, Australia); 1000 µL (Ruthe, Portugal).

Os extractos foram colocados em redutores de volume de 100 µL (Ref<sup>ª</sup> 110501) e 300 µL (Ref<sup>ª</sup> 110502) <sup>134</sup>, para frascos de capacidade 1,5 mL (Ref<sup>ª</sup> CVP1-C02-100) <sup>135</sup>, com tampa de capsular, <sup>135</sup> do injector automático.

Durante o trabalho efectuado utilizou-se material de vidro comum como erlenmeyers, funis, balões volumétricos, pipetas volumétricas, gobelés, etc.

Todo o material de vidro utilizado é descontaminado com acetona após a sua utilização seguindo-se uma primeira lavagem em banho de água com um detergente (Deconex 21) e ácido (Deconex 26 Mineral acid) apropriados. De seguida o material é lavado numa máquina de lavagem de material de laboratório, equipada com sistema de passagem final por água destilada (Miele Professional, modelo G 7883). O material volumétrico é posteriormente seco numa estufa a 40 °C (Mettler, Schwabach, Alemanha) enquanto o material não volumétrico é seco numa estufa a 100°C (Mettler, Schwabach, Alemanha).

As microseringas são lavadas com acetona e hexano sob vácuo e secas à temperatura ambiente.

Os frascos onde se efectua a microextração são descontaminados com acetona, lavados com detergente aniónico apropriado (Sodosil RM03, Riedel-de-Haën, Seelze, Alemanha), e lavados sucessivamente com água corrente, água bidestilada e acetona; em seguida são secos em estufa a 40°C.

#### **2.2.4 Preparação de soluções-padrão e construção e rectas de calibração**

Os sete pesticidas organofosforados foram adquiridos sob a forma de uma solução da mistura em hexano, com uma concentração de 1000 mg/L (Chem Service Inc., West Chester, USA, Ref<sup>ª</sup> 622-2JM).

A partir desta solução concentrada prepararam-se, por diluição com hexano, soluções de 100 mg/L, 20 mg/L e de 2 mg/L. Estas soluções foram transferidas para frascos de 2 mL, que foram capsulados e armazenados em caixas plásticas opacas, a uma temperatura inferior a -10 °C.

Durante a optimização do método de DLLME foram construídas rectas de calibração nas gamas de 100 µg/L a 800 µg/L, por diluição da solução de 2 mg/L, com hexano.

As soluções de fortificação utilizadas nos ensaios de DLLME tinham a concentração de 2 mg/L, em metanol.

A solução dos pesticidas em hexano, com a concentração de 2 mg/L, foi diluída com metanol até concentrações finais de 100 µg/L até 1500 µg/L. Estas soluções metanólicas foram então adicionadas a amostras de água, nas quantidades adequadas para preparar os padrões das rectas de calibração na gama de 100 ng/L a 1500 ng/L e nos ensaios de recuperação efectuados a 800 ng/L.

Todas as soluções de concentração inferior a 2 mg/L foram preparadas diariamente. A estabilidade das soluções de fortificação utilizadas foi controlada cromatograficamente com uma frequência semanal.

### **2.2.5 Microextração líquido-líquido dispersiva (DLLME)**

A amostra de água (5 mL) é colocada num frasco de fundo cónico de (5 - 10 mL) utilizando uma pipeta volumétrica. Nos ensaios em que foi avaliado o efeito da força iónica da solução aquosa foi adicionada à amostra de água uma quantidade apropriada de NaCl, pesada com o auxílio de uma balança analítica (modelo AB204-S, Mettler Toledo). Nos ensaios em que foi avaliado o efeito do pH da solução, ajustou-se o pH da amostra de água adicionando quantidades apropriadas de uma solução concentrada de HCl (37%) e efectuando o controlo do pH da solução, com papel indicador (Merck, Darmstadt, Alemanha).

Num copo de 5 mL coloca-se o volume adequado de solvente de dispersão (0.25 mL a 1mL), utilizando microseringas de 250 µL a 1000 µL. Adiciona-se em seguida ao mesmo copo o solvente de extracção (15 µL a 100 µL), utilizando microseringas de 10 µL a 250 µL. A mistura do solvente de dispersão e solvente de extracção é então transferida do copo de mistura para o frasco com a amostra de água, utilizando uma seringa de 1000 µL. A ponta da agulha é colocada a cerca de metade da altura do frasco e a adição da mistura de solventes à amostra de água é efectuada de forma rápida, obtendo-se assim uma boa dispersão dos solventes orgânicos na fase aquosa. Após a dispersão as fases são separadas por centrifugação durante 6 min, a 4000 rpm (Centrífuga J.P Selecta, modelo Mixtasel-BL, Barcelona, Espanha).

A fase sedimentada é removida com uma microseringa de capacidade apropriada (10 µL a 100 µL) e colocada num redutor de volume de 100 µL ou de 300 µL; à fase sedimentada é adicionado um pequeno volume (50 µL a 200 µL) da fase aquosa com a

qual estava em equilíbrio de forma a evitar a evaporação do solvente de extracção durante o processo de injeção automática. O redutor de volume é colocado num frasco de 1.5 mL que é imediatamente capsulado e colocado no tabuleiro do injektor automático do cromatógrafo, para se proceder à sua análise.

### **2.2.6 Análise cromatográfica**

A análise cromatográfica dos extractos foi efectuada num cromatógrafo gasoso (modelo Focus GC, Thermo Scientific) equipado com injektor com e sem repartição (split-splitless), uma coluna analítica TR-5MS (30 m x 2.5 µm x 0.25 mm i.d., Thermo Scientific) e acoplado a um espectrómetro de massa (Polaris Q, Thermo Scientific). A injeção foi efectuada em modo automático utilizando um injektor automático (AS2000). O extracto (1 µL) foi injectado a uma temperatura de 260 °C, em modo sem repartição durante 1 minuto, e velocidade de 30 mL/minuto.

O fluxo do gás de arraste (Hélio com 99.9999% de pureza), foi mantido a 1 mL/minuto. Utilizaram-se temperaturas da interface e da fonte de ionização de 270 °C e 250 °C, respectivamente.

A temperatura do forno foi programada da seguinte forma: temperatura inicial de 80°C durante 2 min.; aquecimento a 15°C/min. até 200°C; aquecimento a 4°C/min. até 220°C, mantendo-se a essa temperatura durante 1 min; aquecimento a 6°C/min. até 240°C; aquecimento a 10°C/min. até 250°C, mantendo-se a essa temperatura durante 2 min.

O tempo total de análise foi de 22 minutos.

A detecção foi feita em modo de varrimento completo numa gama de massas de 45 a 400 *m/z*. Contudo, para uma detecção mais selectiva, optou-se por escolher o modo de selecção do pico base para cada analito (extracção de ião individual), correspondendo ao ião mais intenso do espectro de massa de cada pesticida.

### 2.2.7 Cálculos

O factor de enriquecimento, parâmetro que avalia a partição dos analitos entre as fases, sob diferentes condições de microextração, foi calculado a partir da seguinte expressão:

$$FE = \frac{C_{sed}}{C_0}$$

onde  $C_{sed}$  é a concentração de analitos na fase sedimentada e  $C_0$  a concentração inicial de analitos na fase aquosa.

A avaliação da extensão do processo de microextração é efectuada através do cálculo da percentagem de extração, utilizando a seguinte expressão:

$$EE(\%) = EF \times \frac{V_{sed}}{V_{aq}} \times 100 = \frac{C_{sed}}{C_0} \times \frac{V_{sed}}{V_{aq}} \times 100$$

onde  $C_{sed}$  é a concentração de analitos na fase sedimentada,  $C_0$  a concentração inicial de analitos na fase aquosa,  $V_{sed}$  é o volume de fase sedimentada e  $V_{aq}$  o volume da amostra de água.

## 2.3 Resultados e Discussão dos Resultados

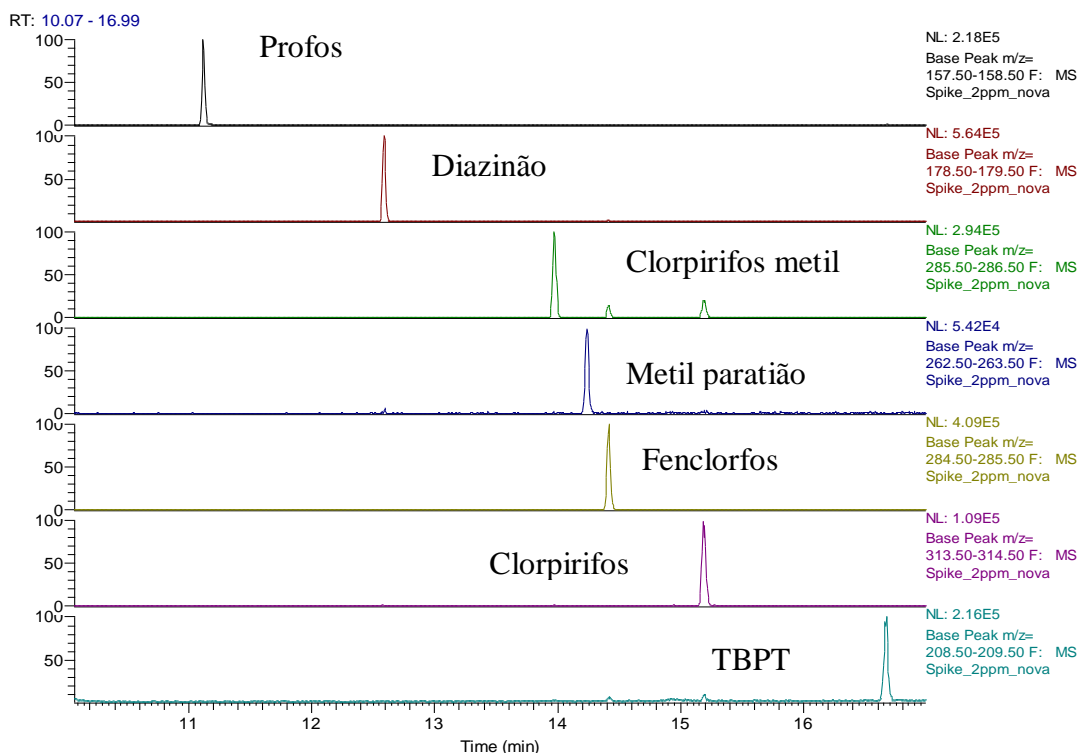
### 2.3.1 Optimização do processo de separação cromatográfica

A selecção das melhores condições de separação cromatográfica dos analitos foi efectuada em modo de varrimento total, utilizando uma solução dos pesticidas em hexano com a concentração de 2 mg/L.

Em seguida, procedeu-se à selecção dos iões mais adequados à detecção selectiva dos analitos em modo de pico base (método de extracção de ião individual). Foram seleccionados os iões com maior razão sinal/ruído que em alguns casos não foi o ião molecular (Tabela 2.7, Figura 2.1).

**Tabela 2.7** – Iões seleccionados para detecção selectiva, iões moleculares e tempos de retenção dos pesticidas organofosforados.

Pesticidas	Tempo de retenção (min)	Ião seleccionado ( $m/z$ )	Ião molecular ( $m/z$ )
Profos	11.12	158	412
Diazinão	12.59	179	304
Clorpirifos metil	13.98	286	322
Metil paratião	14.21	263	263
Fenclorfos	14.40	285	321
Clorpirifos	15.18	314	350
Tributilfosforotritioito (TBPT)	16.66	209	298



**Figura 2.1-** Iões seleccionados para cada analito pelo método de extracção de ião individual.

Construíram-se então rectas de calibração, para cada pesticida, na gama de concentrações de 100 µg/L a 800 µg/L, representando a área do respectivo pico cromatográfico em função da concentração da solução. Utilizaram-se seis pontos de calibração distribuídos na gama de concentrações. As equações das rectas de calibração bem como os respectivos coeficientes de calibração são apresentados na Tabela 2.8. Como a sensibilidade do espectrómetro de massa sofre alterações durante a sua utilização, nomeadamente, em função do grau de limpeza da fonte, foram injectados regularmente (de dois em dois dias), dois padrões da recta de forma a monitorizar alterações na detecção dos analitos. Quando a área dos picos cromatográficos apresentou alterações iguais ou superiores a 10%, repetiu-se o traçado das rectas de calibração.

**Tabela 2.8** - Equações das rectas de calibração e respectivos coeficientes de correlacção para os pesticidas estudados, na gama de 100 µg/L a 800 µg/L.

<b>Pesticidas</b>	<b>Equação da Recta de calibração</b>	<b>Coefficiente de correlacção (R<sup>2</sup>)</b>
Profos	$y = 164.39x + 1153.1$	0.9997
Diazinão	$y = 442.89x + 13703$	0.9946
Clorpirifos metil	$y = 573.96x + 8313.2$	0.9961
Metil paratião	$y = 60.781x + 1286.2$	0.9999
Fenclorfos	$y = 411.54x - 1216.7$	0.9982
Clorpirifos	$y = 129.38x - 1105.1$	0.9991
TBPT	$y = 549.75x - 8345.6$	0.9931

### 2.3.2 Estudo do processo de DLLME

A extracção líquido-líquido dispersiva tem como base o equilíbrio de fases em sistemas ternários de água, um solvente de extracção e um co-solvente (solvente de dispersão). Para que se consiga efectuar com sucesso uma extracção líquido-líquido dispersiva têm portanto que reunir-se as seguintes condições:

- ❖ Efectuar uma mistura dos três componentes do sistema, sendo a água o componente maioritário, o solvente de extracção o componente minoritário e o solvente de dispersão numa quantidade tal que permita a formação de uma emulsão estável. Por outras palavras, as proporções dos três componentes do sistema têm que ser tais que o equilíbrio de fases se situe na zona de transição entre o estado monofásico e o estado difásico.
- ❖ Após a separação de fases, o volume da fase orgânica deverá ser o menor possível para maximizar o factor de enriquecimento.
- ❖ O volume de fase orgânica sedimentada deve ser suficientemente elevado para ser reproductível e será desejável que possa ser injectado automaticamente.
- ❖ O factor de enriquecimento dos analitos na fase orgânica deverá ser elevado.
- ❖ A percentagem de extracção deverá estar situada entre 50% e 120% pois para valores fora desta gama observa-se geralmente uma perda de repetibilidade.

Assim neste trabalho adoptamos a estratégia de abordar em primeiro lugar as questões relacionadas com o equilíbrio de fases e para as combinações dos três componentes do sistema com um comportamento adequado estudar então as questões relacionadas com a partição dos analitos.

### **2.3.2.1 Solventes halogenados**

A utilização de solventes halogenados em DLLME é a opção mais comum encontrada na literatura, e tem as vantagens óbvias de permitir que a fase a recolher seja sedimentada no fundo cónico do frasco de extracção facilitando assim a separação de fases, e de a solubilidade da água nestes solventes ser suficientemente baixa para permitir a obtenção de uma fase orgânica praticamente isenta de água dispensando portanto um passo adicional de secagem. Por outro lado, apesar de serem solventes com maior toxicidade do que os solventes não halogenados, sendo as quantidades utilizadas normalmente inferiores a 50  $\mu\text{L}$  por extracção, as consequências ambientais da sua utilização é diferente da manipulação dos mesmos solventes em volumes mais elevados, como é o caso por exemplo, na extracção líquido-líquido clássica.

Seleccionaram-se seis solventes de extracção halogenados (tetracloreto de carbono, clorobenzeno, clorofórmio, 1,2-dicloroetano, diclorometano e tetracloroetileno), que se caracterizam por possuir diferentes densidades, solubilidades em água momento dipolar ou constante dieléctrica (Tabela 2.9). Estes quatro parâmetros podem afectar directamente tanto o equilíbrio e separação de fases, como a partição dos analitos entre a fase orgânica e a fase aquosa.

**Tabela 2.9** - Densidades, solubilidades em água, momentos dipolares e constantes dielétricas dos solventes halogenados incluídos neste estudo.<sup>121</sup>

<b>Solvente</b>	<b>Densidade a 20 °C (g/mL)</b>	<b>Solubilidade em água a 25°C (g/L)</b>	<b>Momento Dipolar (D)</b>	<b>Constante Dielétrica</b>
Tetracloroeto de Carbono	1.593	0.65	0	2.24
Clorobenzeno	1.106	0.058	1.69	5.69
Clorofórmio	1.489	8.0	1.04	4.81
1,2-dicloroetano	1.256	8.6	1.83	10.42
Diclorometano	1.326	17.6	1.60	8.93
Tetracloroetileno	1.623	0.21	0	2.27

Como se pode observar na Tabela 2.9 os solventes seleccionados exibem uma gama de densidades desde o clorobenzeno com a densidade mais próxima da água (1,106 g/mL) até ao tetracloroetileno com uma densidade de 1,623 g/mL. Esta propriedade deverá ter um reflexo directo na qualidade da emulsão formada e na subsequente separação de fases. Para solventes com uma densidade muito superior à da água, terá que ser utilizada uma maior quantidade de solvente de dispersão para provocar a emulsificação das fases, enquanto os solventes com densidade mais próxima da água, poderão formar uma emulsão estável com uma menor quantidade do solvente de dispersão, e podem mesmo apresentar interfaces instáveis após a centrifugação.

A solubilidade do solvente de extracção em água determina qual o volume de solvente de extracção sedimentado em que pode afectar a partição dos analitos. Estes dois factores afectam de forma inversa a eficiência do processo de extracção, nos seus parâmetros factor de enriquecimento (FE) e percentagem de extracção (% EE).

Se a solubilidade do solvente de extracção em água for relativamente elevada a fase aquosa pode conter uma quantidade de moléculas orgânicas suficiente para promover uma razoável solvatação das moléculas dos solutos, e desta forma impedir a sua migração eficiente para a fase orgânica, mas por outro lado o volume sedimentado será menor o que resulta num melhor factor de enriquecimento dos analitos na fase orgânica. O inverso deverá ocorrer quando a solubilidade do solvente de extracção em água for baixa tendo como resultado um maior volume sedimentado, um menor factor de enriquecimento mas, geralmente uma maior percentagem de recuperação.

Os solventes seleccionados têm também uma diversa gama de solubilidades em água, desde o tetracloreto de carbono com 0.21 g/L até ao diclorometano com uma solubilidade de 17.6 g/L (Tabela 2.9).

O momento dipolar e a constante dielétrica de cada solvente são parâmetros que condicionam a sua capacidade de solvatação de outras moléculas pelo que considerámos interessante incluir neste estudo solventes com valores bastante diferentes destes parâmetros.

Tendo em conta a densidade e a solubilidade em água de cada solvente considerado, é possível calcular a quantidade desse solvente que se dissolveria num determinado volume de água a 25°C. A massa e volume de saturação em 5 mL de água, a 25°C, são apresentados na Tabela 2.10, para os solventes halogenados incluídos neste estudo. Estes valores são apenas indicativos do comportamento real do solvente de extracção, pois não é contabilizado o efeito do solvente de dispersão que pode afectar significativamente a solubilidade do solvente de extracção na fase aquosa. Este cálculo permite no entanto estimar qual a quantidade de solvente de extracção que deverá utilizar para obter um determinado volume de fase sedimentada.

**Tabela 2.10** – Massa ( $m_{sol}$ ) ou volume ( $V_{sol}$ ) de solvente halogenado necessário para saturar 5 mL de água, a 25°C.

<b>Solvente</b>	<b><math>m_{sol}</math> / 5 mL de água (mg)</b>	<b><math>V_{sol}</math> / 5 mL de água (<math>\mu</math>L)</b>
Tetracloreto de Carbono	3,25	2,04
Clorobenzeno	0,29	0,26
Clorofórmio	40,00	26,86
1,2-dicloroetano	43,00	34,24
Diclorometano	88,00	66,37
Tetracloreto de carbono	1,05	0,65

Os solventes de dispersão seleccionados para este estudo foram: a acetona, o acetonitrilo, o metanol, o 1-propanol e o 2-propanol. A acetona, o acetonitrilo e o metanol são os solventes de dispersão mais frequentemente utilizados. A selecção do 1-propanol e do 2-propanol foi motivada pelo facto de serem solventes menos polares que

o metanol mas com a mesma capacidade de estabelecer pontes de hidrogénio com as moléculas de água. Na Tabela 2.11 apresentam-se os valores de densidade, solubilidade em água, momento dipolar e constante dieléctrica dos solventes de dispersão seleccionados.

**Tabela 2.11** - Densidades, solubilidades, momentos dipolares e constantes dieléctricas dos solventes de dispersão incluídos neste estudo.<sup>120</sup>

Solvente de Dispersão	Densidade a 20 °C (g/mL)	Solubilidade em água a 25°C (g/L)	Momento Dipolar (D)	Constante Dieléctrica
Acetona	0.7845	Miscível	2.88	21.01
Acetonitrilo	0.7857		3.93	36.64
Metanol	0.7914		1.70	33.00
1-propanol	0.7997		1.58	20.80
2-propanol	0.7809		1.58	20.18

Os solventes de dispersão seleccionados apresentam densidades semelhantes, situadas na gama de 0.7845 g/mL a 0.7914 g/mL excepto o 1-propanol, ligeiramente mais denso (0.7997 g/mL).

Os momentos dipolares dos solventes de dispersão seleccionados situam-se na gama de 1.58 D até 3.93 D, enquanto as suas constantes dieléctricas variam entre 20.18 e 36.64. O acetonitrilo é o solvente com maior momento dipolar e constante dieléctrica enquanto o 2-propanol é o solvente com menores valores para estes dois parâmetros.

### 2.3.2.1.1 Avaliação do equilíbrio de fases

As diferentes combinações de solventes de extracção e solventes de dispersão foram testadas quanto à qualidade da dispersão produzida e quanto ao volume de fase sedimentada, utilizando as seguintes condições de DLLME: volume de água = 5 mL; volume do solvente de dispersão = 500 µL; volume de solvente de extracção variável (25 µL, 50 µL ou 100 µL).

A dispersão foi classificada como boa quando se formou uma emulsão fina, provocando a turvação homogénea da fase aquosa e essa emulsão era estável permanecendo

inalterada durante períodos iguais ou superiores a cinco minutos. Quando a solução aquosa ficava límpida alguns segundos após a adição dos solventes orgânicos considerou-se que a dispersão foi fraca; quando se observou dispersão, mas a sedimentação da fase orgânica ocorreu espontaneamente sem recurso à centrifugação a dispersão foi classificada como instável (Tabela 2.12). As combinações de solventes que deram origem a dispersões boas ou instáveis foram seleccionadas para os ensaios seguintes, pois em qualquer destes casos ocorre dispersão que se mantém durante alguns segundos e portanto é possível extrair os analitos. A estabilidade da dispersão não é um factor decisivo na eficácia de extracção pois como já foi referido a transferência de analitos entre as fases ocorre de forma praticamente instantânea devido à grande superfície de contacto entre as fases. Já no caso da dispersão fraca, não chega a ocorrer a formação de emulsão pelo que essas combinações de solventes não foram seleccionadas para os ensaios subsequentes.

De acordo com estes critérios foram considerados inadequados do ponto de vista de equilíbrio de fases os solventes de extracção diclorometano e 1,2-dicloroetano que formam dispersões fracas com quase todos os solventes de dispersão sobretudo nos ensaios efectuados com menores volumes do solvente de extracção (25 µL ou 50 µL).

O clorofórmio produz dispersões boas ou instáveis quando foram utilizados os volumes de 50 µL ou 100 µL, nas combinações com os vários solventes de dispersão.

**Tabela 2.12** - Avaliação da qualidade da dispersão para diferentes combinações de solvente de extracção e solvente de dispersão.

Solventes de Dispersão	Solventes de Extracção						Volume do solvente de extracção (µL)
	Tetracloreto de Carbono	Tetracloroetileno	Clorofórmio	1,2-Dicloroetano	Diclorometano	Clorobenzeno	
Acetona	Boa	Boa	Instável	Fraca	Fraca	Boa	25
	Boa	Boa	Boa	Instável	Fraca	Boa	50
	Boa	Boa	Boa	Boa	Fraca	Boa	100
Metanol	Boa	Boa	Instável	Instável	Fraca	Boa	25
	Boa	Boa	Boa	Boa	Fraca	Boa	50
	Boa	Boa	Boa	Boa	Instável	Boa	100
Acetonitrilo	Instável	Boa	Instável	Fraca	Fraca	Boa	25
	Instável	Boa	Boa	Instável	Fraca	Boa	50
	Instável	Boa	Boa	Instável	Instável	Instável	100
1-Propanol	Boa	Boa	Boa	Fraca	Fraca	Boa	25
	Boa	Boa	Boa	Fraca	Fraca	Boa	50
	Boa	Boa	Boa	Instável	Instável	Boa	100
2-Propanol	Boa	Boa	Fraca	Fraca	Fraca	Boa	25
	Boa	Boa	Instável	Fraca	Fraca	Boa	50
	Boa	Boa	Instável	Instável	Instável	Boa	100

O único solvente de extracção que apresenta dispersões boas para todas as combinações testadas foi o tetracloreto de carbono; o clorobenzeno apresenta dispersões boas para todas as combinações testadas excepto no ensaio efectuado com acetonitrilo e com um volume de clorobenzeno de 100  $\mu\text{L}$ , onde a dispersão é instável; também o tetracloreto de carbono apresenta dispersões boas com a maior parte dos solventes de dispersão excepto nas combinações com acetonitrilo, que produziram dispersões instáveis para todos os volumes de tetracloreto de carbono testados.

Na Tabela 2.13 apresentam-se os volumes sedimentados obtidos para cada combinação de solventes após a centrifugação e o volume sedimentado teórico que seria obtido considerando apenas a solubilidade de cada solvente de extracção em água pura a 25°C. O volume sedimentado teórico é a diferença entre o volume adicionado e o volume solúvel em 5 mL de água a 25°C. O volume sedimentado medido é geralmente inferior ao valor teórico pois a presença do solvente de dispersão pode aumentar ligeiramente a solubilidade do solvente de extracção na fase aquosa.

O diclorometano só apresenta fase sedimentada para o volume de 100  $\mu\text{L}$  e mesmo nesse caso obtêm-se volumes medidos substancialmente inferiores ou superiores ao valor teórico, indiciando uma má separação de fases. Este comportamento é consistente com a elevada solubilidade do diclorometano em água. Também devido à sua elevada solubilidade em água, o 1,2-dicloroetano e o clorofórmio não apresentam fase sedimentada nos ensaios efectuados com um volume de 25  $\mu\text{L}$ , mas apenas nos ensaios efectuados com os volumes de 50  $\mu\text{L}$  e de 100  $\mu\text{L}$ . Tanto o tetracloreto de carbono como o tetracloreto de carbono permitem obter fase sedimentada em todos os ensaios realizados.

Da avaliação da qualidade da dispersão produzida e do volume de fase sedimentada recolhida resultou a eliminação dos solventes de extracção diclorometano e 1,2-dicloroetano.

**Tabela 2.13** - Volume de fase orgânica sedimentada para as diferentes combinações de solvente de extracção e solvente de dispersão.

Solventes de Dispersão	Volume Sedimentado ( $\mu\text{L}$ )												Volume de Extracção ( $\mu\text{L}$ )
	Tetracloreto de Carbono		Tetracloroetileno		Clorofórmio		1,2-Dicloroetano		Diclorometano		Clorobenzeno		
	Medido	Teórico	Medido	Teórico	Medido	Teórico	Medido	Teórico	Medido	Teórico	Medido	Teórico	
Acetona	19	23	24	24	5	0	-	0	-	0	18	25	25
	47	48	45	49	25	23	35	16	-	0	45	50	50
	80	98	86	99	80	73	56	66	68	34	75	100	100
Metanol	25	23	22	24	-	0	-	0	-	0	15	25	25
	48	48	47	49	8	23	28	16	-	0	41	50	50
	80	98	78	99	37	73	75	66	-	34	77	100	100
Acetonitrilo	17	23	25	24	10	0	-	0	-	0	16	25	25
	45	48	38	49	33	23	4,5	16	-	0	42	50	50
	75	98	83	99	86	73	48	66	80	34	90	100	100
1-Propanol	12	23	24	24	-	0	-	0	-	0	15	25	25
	36	48	47	49	13	23	6	16	-	0	29	50	50
	83	98	84	99	65	73	50	66	8	34	75	100	100
2-Propanol	12	23	25	24	-	0	-	0	-	0	13	25	25
	30	48	37	49	15	23	9	16	-	0	39	50	50
	82	98	93	99	65	73	44	66	13	34	83	100	100

### 2.3.2.1.2 Avaliação da partição dos analitos

Os factores de enriquecimento dos analitos na fase orgânica foram testados, para todas as possíveis combinações dos solventes de extracção tetracloreto de carbono, tetracloroetileno, clorofórmio e clorobenzeno com os solventes de dispersão previamente referidos (Tabela 2.14) considerando-se o factor de enriquecimento médio de três replicadas. As condições de DLLME foram as seguintes: volume do solvente de extracção, 50  $\mu$ L; volume de solvente de dispersão, 500  $\mu$ L; volume de fase aquosa, 5 ml; e nível de fortificação da fase aquosa, 2  $\mu$ g/L.

As combinações de solventes para as quais se obteve um maior factor de enriquecimento foram as combinações tetracloroetileno/1-propanol e clorofórmio/2-propanol. O sistema clorofórmio/2-propanol foi seleccionado para os ensaios seguintes, pois permite extrair o pesticida TBPT, apesar de ter factores de enriquecimento um pouco inferiores aos do sistema tetracloroetileno/1-propanol para os restantes pesticidas.

As percentagens de extracção correspondentes às diferentes condições testadas são apresentadas na Tabela 2.15, considerando-se igualmente a média das percentagens de extracção para três ensaios.

As percentagens de extracção mais elevadas foram obtidas para o sistema tetracloreto de carbono/acetoneitrilo e as mais baixas para o sistema clorofórmio/metanol.

Consideraram-se aceitáveis para efeitos de optimização do método de extracção as percentagens de extracção superiores a 50% que foram atingidas por diversos pares de solvente de extracção / solvente de dispersão.

O único analito para o qual foram obtidas percentagens de extracção inferiores a 50% em todas as condições testadas foi o TBPT. Este pesticida tem uma baixa solubilidade em água (2.3 mg/L) próxima da solubilidade em água dos pesticidas clorpirifos metil (2.6 mg/L) e clorpirifos (1.4 mg/L) pelo que este parâmetro não explica as diferenças no seu comportamento relativamente aos outros pesticidas.

O TBPT quando em contacto com o oxigénio do ar pode sofrer oxidação do átomo de fósforo dando origem a um trialquilfosfito, que em meio aquoso hidroliza com facilidade para produzir o dialquilfosfonato. Esta reacção de degradação poderá estar na origem das baixas percentagens de extracção e factores de enriquecimento obtidos para este pesticida.<sup>136</sup>

No entanto, optou-se por prosseguir a optimização do sistema de extracção por DLLME incluindo o TBPT para averiguar se noutras condições de extracção era possível melhorar o seu factor de enriquecimento e percentagem de extracção.

**Tabela 2.14** - Factores de enriquecimento dos pesticidas organofosforados em DLLME efectuada com diversas combinações de solventes.

Pesticidas	Solvente de Dispersão	Solvente de Extracção			
		Tetracloroeto de Carbono	Tetracloroetileno	Clorofórmio	Clorobenzeno
Profos	Acetonitrilo	134.09	59.50	38.49	32.39
Diazinão		118.78	60.46	70.48	84.88
Clorpirifos metil		120.65	80.25	74.50	95.24
Metil paratião		118.84	95.77	65.48	69.50
Fenclorfos		122.18	96.35	76.92	117.96
Clorpirifos		121.68	78.34	70.80	121.11
TBPT		38.70	N.D	N.D	12.86
Profos	Acetona	81.93	55.73	102.54	164.96
Diazinão		78.18	78.92	103.24	102.86
Clorpirifos metil		73.49	92.36	98.45	88.07
Metil paratião		88.98	118.65	88.01	126.87
Fenclorfos		70.09	82.53	102.70	89.06
Clorpirifos		72.96	81.07	97.73	89.56
TBPT		29.94	N.D	N.D	17.10
Profos	Metanol	76.26	42.82	237.68	44.99
Diazinão		78.65	58.12	185.09	52.29
Clorpirifos metil		79.03	60.62	182.60	51.36
Metil paratião		113.22	106.67	254.81	77.96
Fenclorfos		68.49	48.66	142.86	55.96
Clorpirifos		65.17	48.94	131.05	63.48
TBPT		N.D	N.D	N.D	N.D
Profos	1-Propanol	146.89	249.02	255.99	95.94
Diazinão		84.07	269.32	176.77	86.61
Clorpirifos metil		83.39	259.17	188.00	88.11
Metil paratião		109.81	194.90	182.68	101.94
Fenclorfos		79.08	294.29	187.57	99.92
Clorpirifos		74.52	275.25	166.80	103.38
TBPT		46.40	N.D	48.48	37.48
Profos	2-Propanol	74.25	43.56	230.61	63.98
Diazinão		67.46	72.31	209.34	86.591
Clorpirifos metil		71.93	89.31	218.45	92.25
Metil paratião		98.72	123.42	203.00	85.50
Fenclorfos		67.93	83.55	205.57	108.12
Clorpirifos		63.78	81.57	190.01	118.00
TBPT		N.D	N.D	33.93	N.D

Condições de DLLME: volume de solvente de extracção = 50 µL; volume de solvente de dispersão = 500 µL; volume de água = 5 mL.

**Tabela 2.15** – Percentagem de extracção dos pesticidas organofosforados em DLLME efectuada com diversas combinações de solventes.

Pesticidas	Solvente de Dispersão	Solvente de Extracção			
		Tetracloroeto de Carbono	Tetracloroetileno	Clorofórmio	Clorobenzeno
Profos	Acetonitrilo	109.81	41.65	29.31	23.37
Diazinão		96.63	52.03	53.73	60.02
Clorpirifos metil		98.01	69.83	56.66	67.52
Metil paratião		96.25	82.69	49.75	49.90
Fenclorfos		99.28	86.62	58.41	84.10
Clorpirifos		98.97	69.02	53.83	86.25
TBPT		31.42	N.D	N.D	8.69
Profos	Acetona	61.70	45.29	49.22	126.12
Diazinão		60.05	63.98	49.56	73.15
Clorpirifos metil		56.24	74.81	47.23	59.46
Metil paratião		66.94	96.25	42.25	94.55
Fenclorfos		53.96	66.86	49.29	58.17
Clorpirifos		56.07	65.73	46.91	58.99
TBPT		22.64	N.D	N.D	12.47
Profos	Metanol	57.21	33.62	27.93	32.57
Diazinão		59.54	45.19	22.47	36.97
Clorpirifos metil		59.94	47.39	22.40	36.00
Metil paratião		85.11	83.41	30.27	57.14
Fenclorfos		51.71	38.17	18.16	39.04
Clorpirifos		48.96	38.35	16.98	44.48
TBPT		N.D	N.D	N.D	N.D
Profos	1-Propanol	111.87	101.22	75.86	63.36
Diazinão		64.71	109.02	54.87	56.61
Clorpirifos metil		64.28	117.42	58.29	57.64
Metil paratião		84.70	138.13	55.97	66.41
Fenclorfos		61.13	11.27	58.41	65.17
Clorpirifos		57.55	119.06	51.41	67.74
TBPT		36.20	N.D	14.98	24.25
Profos	2-Propanol	52.23	34.27	67.75	41.62
Diazinão		47.68	57.37	61.52	58.36
Clorpirifos metil		50.92	71.53	63.98	62.56
Metil paratião		69.65	97.99	60.34	58.99
Fenclorfos		48.19	67.29	60.11	74.08
Clorpirifos		45.19	65.92	55.37	81.02
TBPT		N.D	N.D	10.11	N.D

Condições de DLLME: volume de solvente de extracção = 50 µL; volume de solvente de dispersão = 500 µL; volume de água = 5 mL.

### 2.3.2.1.3 Optimização das condições de DLLME para o sistema clorofórmio / 2-propanol

#### 2.3.2.1.3.1 Variação do volume de clorofórmio

O volume de clorofórmio não foi variado pois para um volume de 50  $\mu\text{L}$  o volume de fase sedimentada recolhida foi cerca de 15  $\mu\text{L}$ , um valor suficientemente baixo para permitir obter um bom factor de enriquecimento. As experiências anteriores demonstraram que com um volume de clorofórmio de 25  $\mu\text{L}$ , já não foi possível recolher fase sedimentada pelo que se considerou que uma redução do volume de clorofórmio poderia prejudicar a reproductibilidade da separação de fases. Por outro lado, um aumento no volume de clorofórmio só contribuiria para diluir o extracto pelo que também não foi considerado vantajoso.

#### 2.3.2.1.3.2 Variação do volume de 2-propanol

A influência do volume do solvente de dispersão (2-propanol) na eficiência da DLLME foi avaliada através de uma série de ensaios nos quais se utilizaram volumes de 2-propanol de 0.25 mL, 0.5 mL, 0.75 mL e 1 mL (Tabela 2.16). O volume de clorofórmio foi de 50  $\mu\text{L}$  e o volume de água foi de 5 mL.

**Tabela 2.16** - Variação dos factores de enriquecimento (EF) dos pesticidas organofosforados em função do volume de 2-propanol ( $V_{\text{disp}}$ ).

Analitos	Factor de enriquecimento (EF)			
	$V_{\text{disp}} = 0.25 \text{ mL}$	$V_{\text{disp}} = 0.5 \text{ mL}$	$V_{\text{disp}} = 0.75 \text{ mL}$	$V_{\text{disp}} = 1 \text{ mL}$
Profos	169.35	230.61	343.33	319.25
Diazinão	223.99	209.34	245.71	258.58
Metil clorpirifos	224.77	218.45	218.18	257.12
Metil paratião	189.83	203.00	324.68	382.31
Fenclorfos	235.34	205.57	171.33	248.99
Clorpirifos	224.36	190.01	175.27	234.99
TBPT	21.33	33.93	N.D	N.D

Os factores de enriquecimento dos pesticidas foram mais elevados para um volume de 2-propanol de 1 mL excepto para o profos (0.75 mL) e para o TBPT (0.5 mL).

As percentagens de extracção obtidas nos ensaios de variação do volume de 2-propanol são apresentadas na Tabela 2.17. Apesar das percentagens de extracção determinadas serem superiores a 50% para todos os volumes de 2-propanol testados, elas são maiores para um volume de 2-propanol de 1 mL, para todos os analitos excepto o TBPT.

**Tabela 2.17** - Variação da percentagem de extracção dos pesticidas organofosforados em função do volume de 2-propanol ( $V_{\text{disp}}$ ).

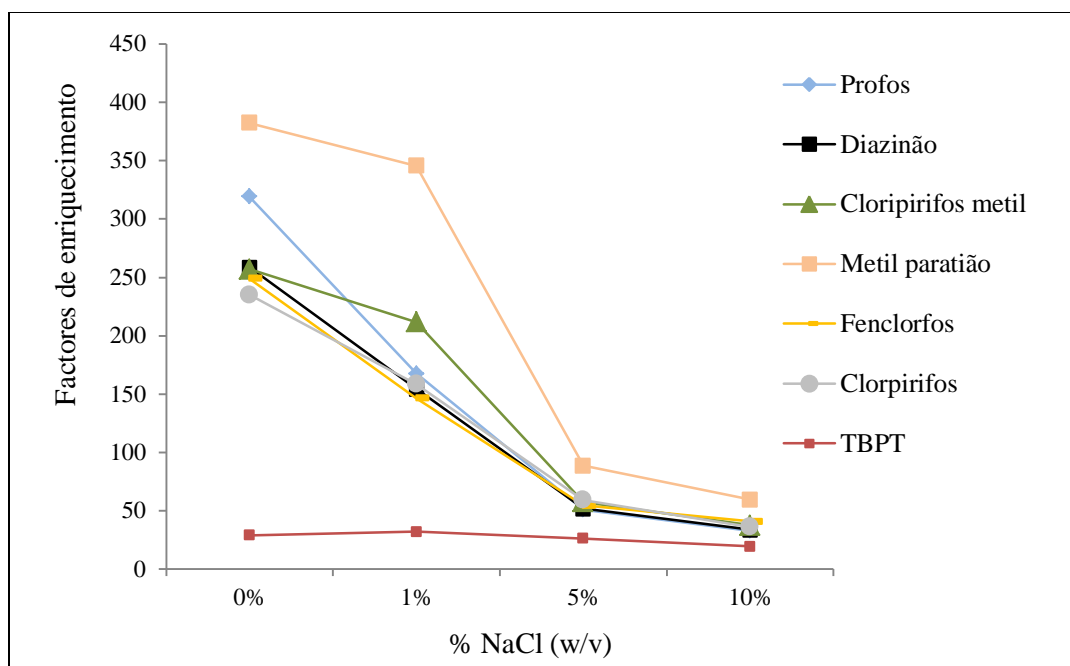
Analitos	% Extracção			
	$V_{\text{disp}} = 0.25 \text{ mL}$	$V_{\text{disp}} = 0.5 \text{ mL}$	$V_{\text{disp}} = 0.75 \text{ mL}$	$V_{\text{disp}} = 1 \text{ mL}$
Profos	55.12	67.75	96.92	99.85
Diazinão	70.64	61.52	69.55	80.85
Metil clorpirifos	72.48	63.98	61.58	80.37
Metil paratião	62.83	60.34	93.19	119.54
Fenclorfos	75.75	60.11	48.44	77.88
Clorpirifos	73.44	55.37	49.07	73.55
TBPT	7.04	10.11	N.D	N.D

### 2.3.2.1.3.3 Efeito da força iónica da fase aquosa (“salting-out”)

O efeito da força iónica da fase aquosa no factor de enriquecimento e na percentagem de extracção dos pesticidas organofosforados foi avaliado através da adição de NaCl à amostra de água de forma a obter concentrações finais de NaCl de 1%, 5%, 10% e 15%. Amostras de água (5 mL) com as concentrações de NaCl referidas, foram extraídas com a mistura de 50  $\mu\text{L}$  de clorofórmio de 1 mL de 2-propanol. O nível de fortificação da fase aquosa foi de 2  $\mu\text{g/L}$  (Figura 2.2, Tabela 2.18).

Tanto os factores de enriquecimento como as percentagens de extracção são máximas, na ausência de NaCl. O aumento da concentração de NaCl provoca um aumento da densidade da fase aquosa que pode prejudicar a separação de fases uma vez que se trata de uma fase orgânica mais densa que a água. Estes resultados indicam também

que a partição destes analitos entre o clorofórmio e a fase aquosa não é favorecida pela adição de NaCl.



**Figura 2.2** - Efeito da força iónica da fase aquosa no factor de enriquecimento dos pesticidas organofosforados, no sistema clorofórmio-isopropanol-água.

**Tabela 2.18** - Efeito da força iónica da fase aquosa na percentagem de extracção dos pesticidas organofosforados, no sistema clorofórmio-isopropanol-água.

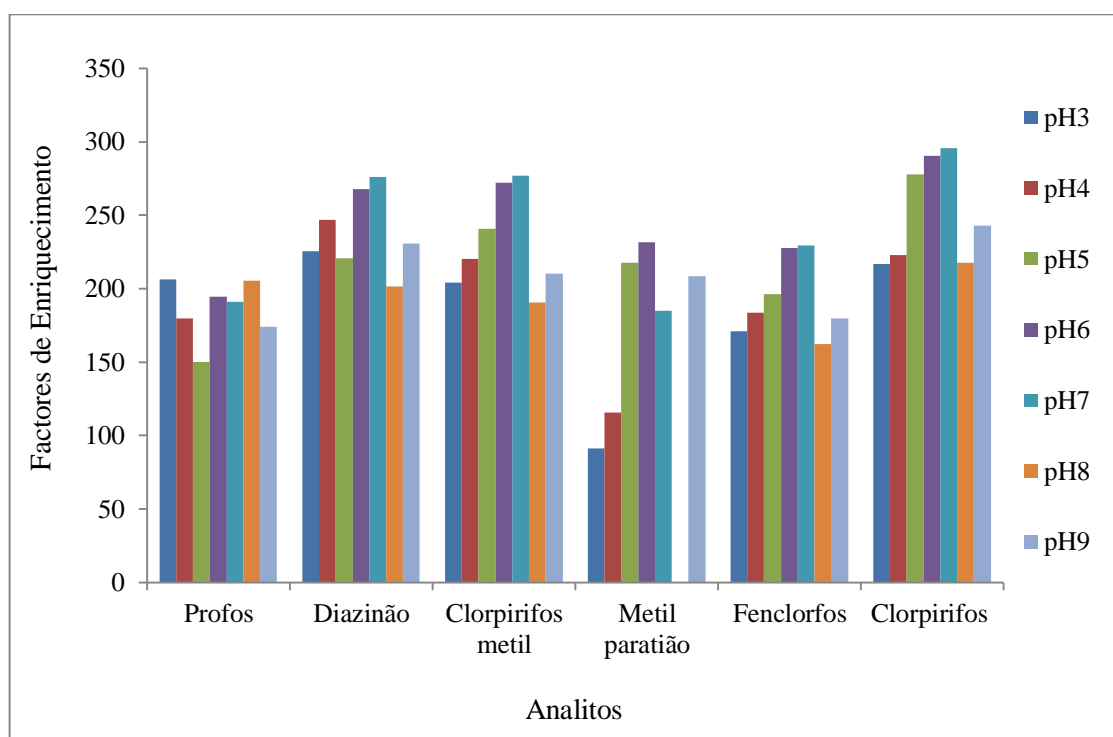
Analitos	% Recuperação com variação da % NaCl			
	0%	1%	5%	10%
Profos	99.85	37.52	29.74	30.66
Diazinão	80.85	37.00	30.26	31.04
Metil clorpirifos	80.37	48.07	33.35	34.79
Metil paratião	119.54	72.57	51.90	55.07
Fenclorfos	77.88	39.90	31.89	37.51
Clorpirifos	73.55	36.87	34.59	33.63
TBPT	N.D	11.13	14.69	18.14

#### 2.3.2.1.3.4 Efeito do pH da fase aquosa

O estudo do pH foi realizado numa etapa anterior à fase de selecção do sistema de solventes que seria utilizado, tendo sido utilizadas as seguintes condições de DLLME: 25  $\mu$ L do solvente de extracção (tetracloreto de carbono) foram adicionados a 1 mL do solvente de dispersão (acetona); a mistura foi injectada na amostra de água (5 mL) fortificada com a mistura de pesticidas uma concentração de 2  $\mu$ g/L. O ajuste do pH da fase aquosa, na gama de pH = 3 a pH = 9, foi efectuado por adição das quantidades apropriadas de uma solução de HCl (2M) para pH ácido e de uma solução de KOH (2N) para pH básico.

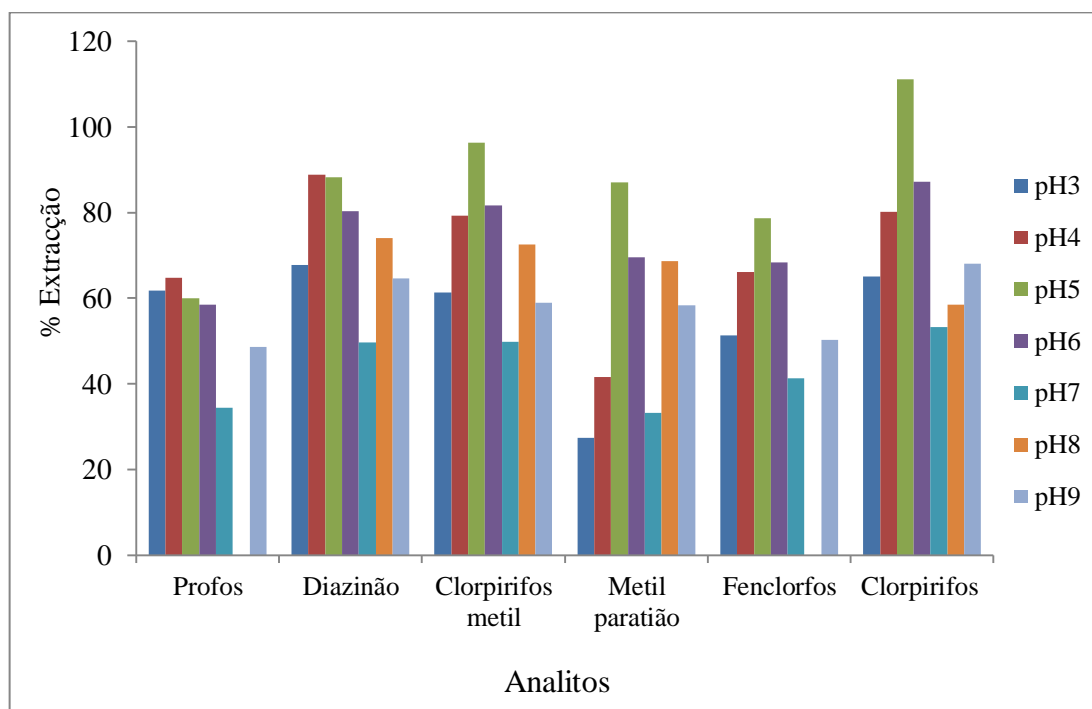
Como o objectivo deste conjunto de ensaios é o de avaliar o estado de ionização dos analitos, e de que forma esse parâmetro afecta a sua extracção, considerámos que os resultados obtidos com o sistema tetracloreto de carbono/acetona são análogos dos que seriam obtidos com outros sistemas de solventes, pelo que não foi considerado necessário repetir esta série de ensaios para o sistema clorofórmio / 2-propanol.

A maior parte dos pesticidas apresentou maiores factores de enriquecimento quando o pH da solução aquosa foi de 6 ou 7 excepto o profos, que foi mais extraído a pH 3.



**Figura 2.3** – Variação do factor de enriquecimento dos pesticidas organofosforados em função do pH da amostra de água.

A percentagem de extracção da maior parte dos pesticidas testados foi maior quando a fase aquosa teve pH 5, seguindo-se os ensaios efectuados a pH 6; as excepções foram os pesticidas profos e diazinão que apresentaram uma maior percentagem de extracção para pH 4 (Figura 2.3).



**Figura 2.4** – Variação da percentagem de extracção dos pesticidas organofosforados em função do pH da amostra de água.

Em suma, o factor de enriquecimento foi geralmente melhor para valores de pH da solução aquosa de 6 ou 7, com uma ligeira diminuição para pH 5, enquanto a percentagem de recuperação foi geralmente melhor para valores de pH da solução aquosa de 5 ou 6, apresentando valores um pouco mais baixos a pH 7. Tendo em conta que o pH da água ultrapura utilizada nos ensaios, apresentou valores de pH entre 5 e 6, optou-se por não efectuar qualquer ajuste do pH das amostras de água, pois o seu pH natural já corresponde às melhores condições de extracção para a maior parte dos analitos. Estes resultados são coerentes com os valores de pKa dos vários pesticidas testados (Tabela 2.3).

### 2.3.2.1.3.5 Efeito da secagem da fase sedimentada

A eventual presença de água na fase sedimentada foi avaliada para o sistema clorofórmio / 2-propanol efectuando a secagem da fase orgânica após a centrifugação. Para tal, alguns peneiros moleculares (dois ou três) foram adicionados à fase sedimentada após a separação da fase aquosa. O volume de fase orgânica foi medido com uma microseringa antes e após a operação de secagem tendo-se observado uma diminuição de volume de 1  $\mu\text{L}$  a 2  $\mu\text{L}$ , o que corresponde a uma diminuição de volume da ordem de 7% a 14%. Esta diminuição pode corresponder apenas ao solvente que é retido nos poros dos peneiros moleculares ou à água residual que foi removida do extracto. Para distinguir estas duas situações avaliou-se o factor de enriquecimento e a percentagem de extracção dos analitos com ou sem secagem da fase orgânica (Tabela 2.19). Tanto os factores de enriquecimento como a percentagem de extracção foi significativamente menor quando se efectuou a secagem da fase orgânica do que quando esta operação não foi efectuada.

**Tabela 2.19** - Efeito da secagem da fase orgânica nos factores de enriquecimento e percentagens de extracção dos pesticidas organofosforados.

Analitos	Factores de enriquecimento		% Extracção	
	Sem secagem	Com secagem	Sem secagem	Com secagem
<b>Profos</b>	319.25	126.91	99.85	30.46
<b>Diazinão</b>	258.58	100.42	80.85	24.10
<b>Metil clorpirifos</b>	257.12	77.93	80.37	18.70
<b>Metil paratião</b>	382.31	118.39	119.54	28.41
<b>Fenclorfos</b>	248.99	88.01	77.88	21.12
<b>Clorpirifos</b>	234.99	74.60	73.55	17.90
<b>TBPT</b>	N.D	31.59	N.D	7.58

Condições de DLLME: volume de clorofórmio = 50  $\mu\text{L}$ ; volume de 2-propanol = 1000  $\mu\text{L}$ ; volume de água = 5 mL.

A única excepção observada foi o analito TBPT que apresenta melhores resultados de extracção quando se efectua a secagem da fase orgânica. Este resultado indica que a água que possa existir na fase orgânica corresponde a uma fracção de volume inferior a 15% e a sua eventual presença não prejudica a determinação da maior parte dos pesticidas. Pelo contrário, o decréscimo acentuado nos factores de enriquecimento e

nas percentagens de extracção podem resultar por exemplo de adsorção dos pesticidas aos peneiros moleculares utilizados no processo de secagem. Já no caso do TBPT, verifica-se alguma melhoria da sua extracção quando a fase orgânica é submetida a secagem; tratando-se de valores muito baixos de factor de enriquecimento e de percentagem de extracção é difícil estabelecer a sua significância mas parecem estar de acordo com a hipótese de que na presença do oxigénio atmosférico e de água, podem ocorrer processos degradativos do TBPT (oxidação e posterior hidrólise do análogo oxidado), que justificam a sua fraca detecção na fase sedimentada.

### **2.3.2.2 Solventes não halogenados**

Os solventes não halogenados têm vantagens relativamente aos solventes halogenados devido à sua menor toxicidade tornando o seu uso prioritário na área da chamada “Química Verde” e suscitando portanto o interesse da sua aplicação em DLLME.

O primeiro problema a defrontar na aplicação de solventes não halogenados em DLLME é o facto de, sendo a fase orgânica menos densa que a aquosa, se obter após a centrifugação das fases, não uma fase sedimentada no fundo cónico do frasco, mas sim um filme fino de fase orgânica sobrenadante; a remoção da fase orgânica, na posição de fase superior no sistema difásico resultaria em erros grosseiros na determinação do volume de fase orgânica separado após a extracção.

Assim propôs-se um sistema alternativo de recolha da fase orgânica sobrenadante que permite a sua separação mais eficiente relativamente à fase aquosa e uma medida mais exacta do seu volume: após a centrifugação a fase aquosa é removida quase na totalidade, recorrendo a uma seringa de 5 mL equipada com uma agulha fina e longa; em seguida repete-se a centrifugação (5 min, 4000 rpm) para promover a acumulação máxima da fase orgânica no fundo cónico do frasco de extracção; remove-se então o que resta de fase aquosa ficando no frasco de extracção apenas a fase orgânica, que é de seguida removida com uma microseringa adequada à determinação do seu volume. Esta técnica permite a recolha de volumes reproductíveis de fase sedimentada com diversas combinações de solventes de extracção e de dispersão pelo que foi adoptada nos ensaios de DLLME com solventes não halogenados.

O único trabalho referenciado na literatura, que descreve a extracção de pesticidas a partir de matrizes aquosas utilizando solventes não halogenados, utiliza uma matriz sólida.<sup>67</sup>

Neste trabalho, apresentam-se pela primeira vez, resultados da aplicação de DLLME com solventes não halogenados para efectuar a extracção de compostos orgânicos a partir de amostras de água, em particular o mesmo conjunto de pesticidas organofosforados cuja extracção foi estudada com solventes halogenados.

Os solventes de extracção seleccionados foram o ciclohexano, o heptano e o octano. O hexano foi testado em alguns ensaios preliminares mas em condições de operação típicas de DLLME onde não ocorria separação de fases pelo que não foi incluído nos ensaios subsequentes. Na Tabela 2.20 apresentam-se algumas propriedades físicas e químicas dos solventes não halogenados seleccionados para os ensaios de DLLME.

**Tabela 2.20** – Densidade, solubilidade em água a 25 °C, momento dipolar e constante dieléctrica dos solventes não halogenados seleccionados para este trabalho.<sup>120</sup>

<b>Solventes</b>	<b>Densidade a 20 °C (g/mL)</b>	<b>Solubilidade em água a 25°C (g/L)</b>	<b>Momento Dipolar (D)</b>	<b>Constante Dieléctrica</b>
Ciclohexano	0.779	0.058	0	2.0243
Heptano	0.6838	0.00242	0	1.9209
Octano	0.703	0.00073	0	1.948

A solubilidade em água a 25°C e a constante dieléctrica são mais baixas do as mesmas propriedades no caso dos solventes halogenados estudados anteriormente pelo que estes três solventes não halogenados têm um bom potencial como solventes de extracção em DLLME. A massa e volume de cada um destes solventes necessários para saturar 5 mL de água (volume típico das amostras em DLLME) são apresentados na Tabela 2.21. Como se pode verificar os volumes de solvente de extracção retidos na fase aquosa estarão na gama de 0,005 µL a 0,372 µL, ou seja, é expectável que a maior parte do solvente de extracção seja recolhido na fase sedimentada.

**Tabela 2.21** – Massa ( $m_{\text{sol}}$ ) ou volume ( $V_{\text{sol}}$ ) de alguns solventes não halogenados necessário para saturar 5 mL de água, a 25°C.

<b>Solvente</b>	<b><math>m_{\text{sol}} / 5 \text{ mL de água}</math> (mg)</b>	<b><math>V_{\text{sol}} / 5 \text{ mL de água}</math> (<math>\mu\text{L}</math>)</b>
Ciclohexano	0,290	0,372
Heptano	0,012	0,018
Octano	0,004	0,005

Os solventes de dispersão seleccionados para os ensaios com solventes de extracção não halogenados foram os mesmos que se utilizaram com os solventes halogenados: acetona, acetonitrilo, metanol, 1-propanol e 2-propanol.

### **2.3.2.2.1 Avaliação do equilíbrio de fases**

O equilíbrio de fases obtido em DLLME com misturas de solventes não halogenados foi avaliado tal como foi efectuado para os solventes halogenados por apreciação da qualidade da dispersão e do volume de fase sedimentada obtida nas diferentes combinações de solventes de extracção e de dispersão. Utilizou-se um volume de amostra de água de 5 mL, um volume de solvente de dispersão de 0.5 mL e um volume de solvente de extracção de 25  $\mu\text{L}$ , 50  $\mu\text{L}$  ou 100  $\mu\text{L}$  (Tabela 2.22).

As dispersões obtidas com os solventes não halogenados foram no geral, boas exceptuando no caso das misturas de 25  $\mu\text{L}$  de heptano com acetona ou com metanol e ainda no caso da mistura de 25  $\mu\text{L}$  de octano com 2-propanol.

Quanto ao volume de fase sedimentada, apesar de as solubilidades em água não justificarem a dissolução na fase aquosa de mais de 0,4  $\mu\text{L}$ , os volumes sedimentados obtidos com as diversas misturas de solventes foram substancialmente inferiores aos volumes obtidos em ensaios equivalentes com solventes halogenados. Verificou-se assim que a média da percentagem do volume de solvente de extracção adicionado que foi recolhida após a centrifugação foi de 43%, para um volume do solvente de extracção de 25  $\mu\text{L}$ , 53% para um volume do solvente de extracção de 50  $\mu\text{L}$  e 59% para um volume do solvente de extracção de 100  $\mu\text{L}$ . Como a percentagem de solvente orgânico recuperado após a extracção aumenta com o volume total de solvente parece haver uma determinada quantidade da fase orgânica que se perde em

qualquer dos ensaios mas que constitui uma fracção cada vez menor do volume total, à medida que este aumenta. Tal poderá efectivamente acontecer, por exemplo, considerando que mesmo após a 2ª centrifugação alguns microlitros da fase sedimentada ficarão na superfície do frasco ou que são inadvertidamente removidos durante a recolha da fase aquosa. No entanto, esta explicação parece ser insuficiente para justificar as baixas percentagens de solvente de extracção recolhido nos ensaios efectuados com os volumes de 50 µL ou de 100 µL. Atendendo às densidades dos solventes não halogenados e dos solventes de dispersão considerados é plausível que a proximidade nas densidades da fase orgânica e da fase aquosa após a extracção, impeça uma separação total das fases ficando alguma fase orgânica emulsificada na fase aquosa. Esta possibilidade está de acordo com a observação de que os sistemas com solventes não halogenados permitiram obter boas dispersões em quase todas as combinações testadas e não foram obtidas emulsões instáveis.

**Tabela 2.22** - Qualidade da dispersão e volume sedimentado para DLLME efectuada com misturas de solventes não halogenados.

Solvente de Dispersão	Solvente de Extracção	$V_{ext}= 25\mu\text{L}$		$V_{ext}= 50\mu\text{L}$		$V_{ext}= 100\mu\text{L}$	
		Dispersão	Vsed (µL)	Dispersão	Vsed (µL)	Dispersão	Vsed (µL)
Acetona	Heptano	Fraca	18	Boa	14	Boa	68
	Octano	Boa	8	Boa	39	Boa	39
	Ciclohexano	Boa	14	Boa	36	Boa	45
Acetonitrilo	Heptano	Boa	8	Boa	21	Boa	60
	Octano	Boa	10	Boa	20	Boa	68
	Ciclohexano	Boa	10	Boa	35	Boa	50
Metanol	Heptano	Fraca	5	Fraca	42	Boa	60
	Octano	Boa	10	Boa	29	Boa	66
	Ciclohexano	Boa	-	Boa	20	Boa	30
1-Propanol	Heptano	Boa	5	Boa	30	Boa	75
	Octano	Boa	6	Boa	12	Boa	75
	Ciclohexano	Boa	15	Boa	18	Boa	80
2-Propanol	Heptano	Boa	10	Boa	20	Boa	77
	Octano	Fraca	10	Boa	34	Boa	60
	Ciclohexano	Boa	22	Boa	27	Boa	30

Como no caso das misturas de solventes não halogenados o aumento da densidade da fase aquosa pode influenciar a separação entre as fases procurou-se testar essa hipótese efectuando a mesma série de experiências mas adicionando previamente NaCl à amostra de água, até uma concentração final de 10% (m/v), (Tabela 2.23).

Nestas condições observou-se que a média da percentagem do volume de solvente de extracção adicionado que foi recolhida após a centrifugação foi de 38%, para um volume do solvente de extracção de 25  $\mu\text{L}$ , 46% para um volume do solvente de extracção de 50  $\mu\text{L}$  e 55% para um volume do solvente de extracção de 100  $\mu\text{L}$ , ou seja, a adição de NaCl não contribuiu para melhorar a separação de fases.

**Tabela 2.23** - Qualidade da dispersão e volume sedimentado para DLLME com misturas de solventes não halogenados, com adição de NaCl (10%).

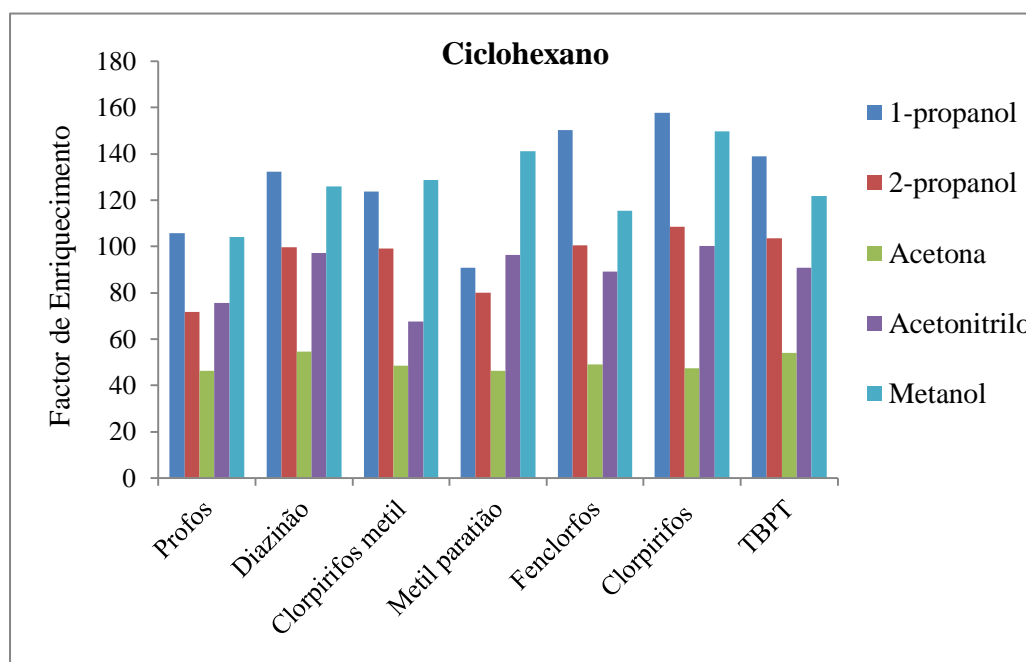
Solvente de Dispersão	Solvente de Extracção	$V_{\text{ext}}= 25\mu\text{L}$		$V_{\text{ext}}= 50\mu\text{L}$		$V_{\text{ext}}= 100\mu\text{L}$	
		Dispersão	Vsed ( $\mu\text{L}$ )	Dispersão	Vsed ( $\mu\text{L}$ )	Dispersão	Vsed ( $\mu\text{L}$ )
Acetona	Heptano	Boa	10	Boa	11	Boa	63
	Octano	Boa	8	Boa	36	Boa	65
	Ciclohexano	Boa	7	Boa	17	Boa	45
Acetonitrilo	Heptano	Boa	5	Boa	20	Boa	45
	Octano	Boa	10	Boa	30	Boa	78
	Ciclohexano	Boa	10	Boa	12	Boa	50
Metanol	Heptano	Boa	8	Boa	30	Boa	60
	Octano	Boa	10	Boa	29	Boa	66
	Ciclohexano	Boa	-	Boa	25	Boa	64
1-Propanol	Heptano	Boa	12	Boa	30	Boa	50
	Octano	Boa	10	Boa	15	Boa	57
	Ciclohexano	Boa	7	Boa	15	Boa	55
2-Propanol	Heptano	Boa	15	Boa	20	Boa	24
	Octano	Boa	12	Boa	30	Boa	47
	Ciclohexano	Boa	-	Boa	25	Boa	50

### 2.3.2.2.2 Avaliação da partição dos analitos

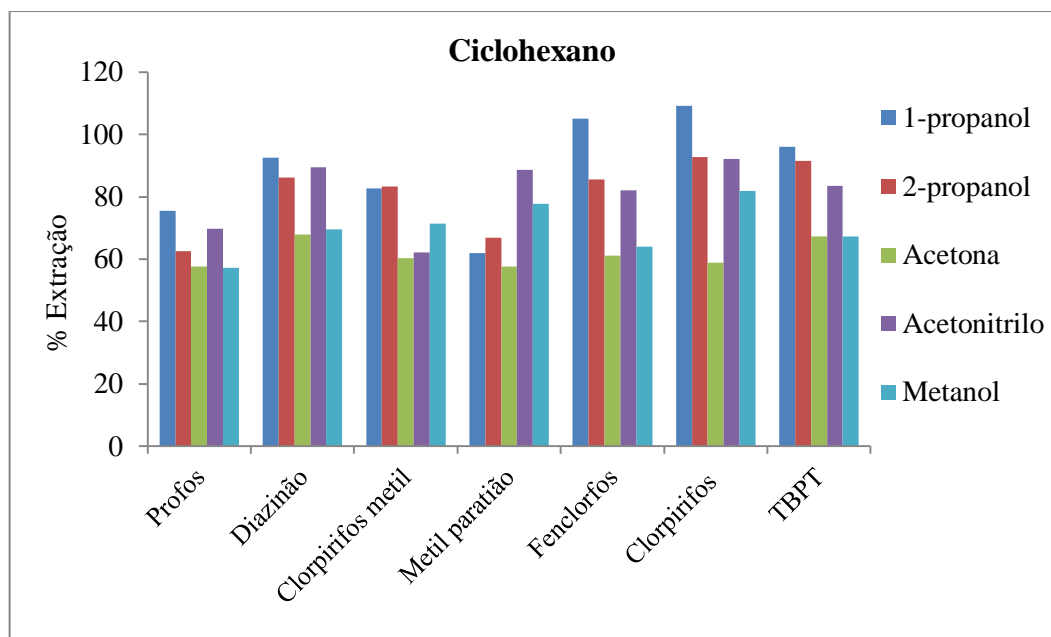
#### 2.3.2.2.2.1 Influência da natureza do solvente de dispersão e da natureza do solvente de extracção em DLLME

O factor de enriquecimento e a percentagem de extracção dos pesticidas organofosforados foram estudados numa série de ensaios nos quais se efectuou DLLME utilizando as possíveis combinações de diferentes solventes de dispersão (acetona, acetonitrilo, metanol, 1-propanol e 2-propanol) com os três solventes de extracção (ciclohexano, heptano e octano). Em cada ensaio, o volume do solvente de extracção foi fixado em 100  $\mu$ L enquanto o volume do solvente de dispersão foi de 0.5 mL.

Quando o solvente de extracção foi o ciclohexano, obtiveram-se os melhores factores de enriquecimento para a maioria dos analitos com os solventes de dispersão 1-propanol e metanol.

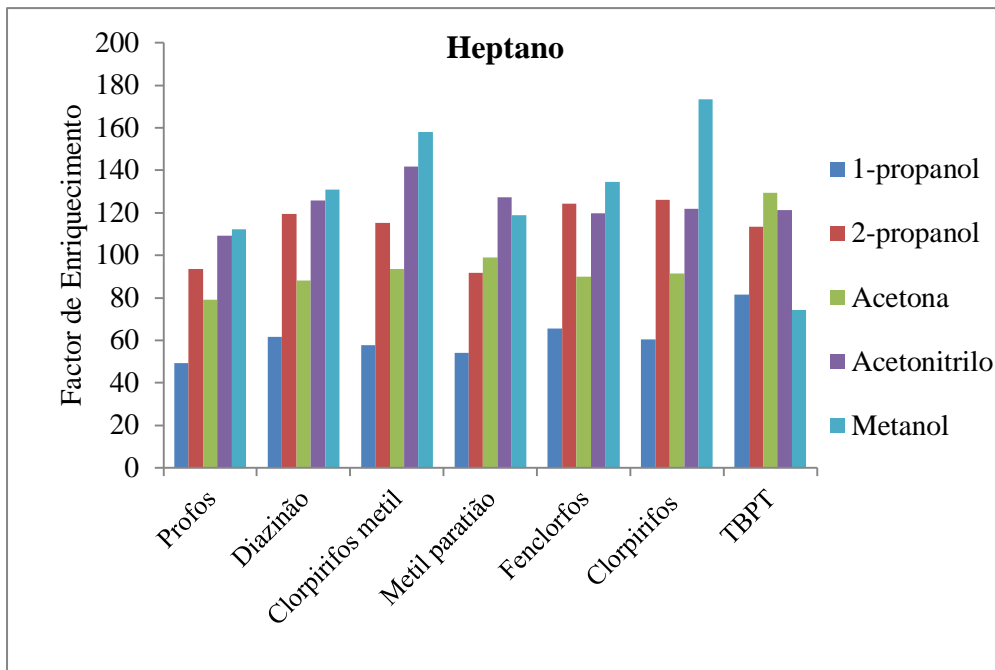


**Figura 2.5** - Factores de enriquecimento obtidos para os pesticidas organofosforados com o solvente de extracção ciclohexano e diferentes solventes de dispersão.

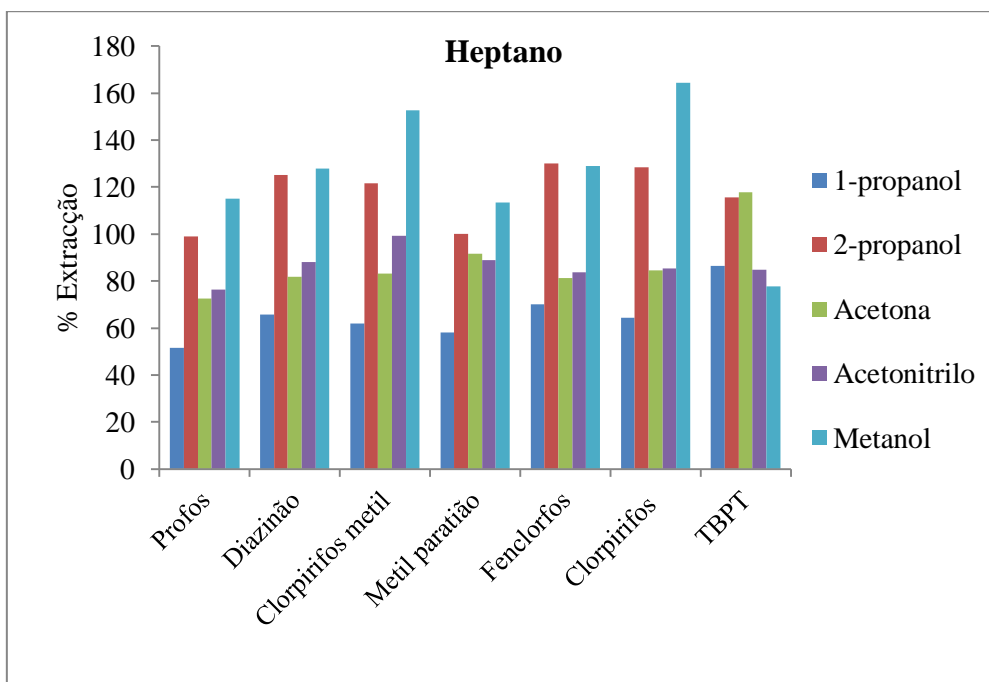


**Figura 2.6** – Percentagens de extração obtidas para os pesticidas organofosforados com o solvente de extração ciclohexano e diferentes solventes de dispersão.

As melhores percentagens de extração foram obtidas nas misturas de 1-propanol ou acetonitrilo com o ciclohexano (Figura 2.6). Assim a combinação ciclohexano/1-propanol, parece ser a mais adequada para a DLLME da maior parte dos pesticidas. Quando o solvente de extração foi o heptano, obtiveram-se os melhores factores de enriquecimento para a maioria dos analitos utilizando metanol como solvente de dispersão.



**Figura 2.7** - Factores de enriquecimento obtidos para os pesticidas organofosforados com o solvente de extracção heptano e diferentes solventes de dispersão.

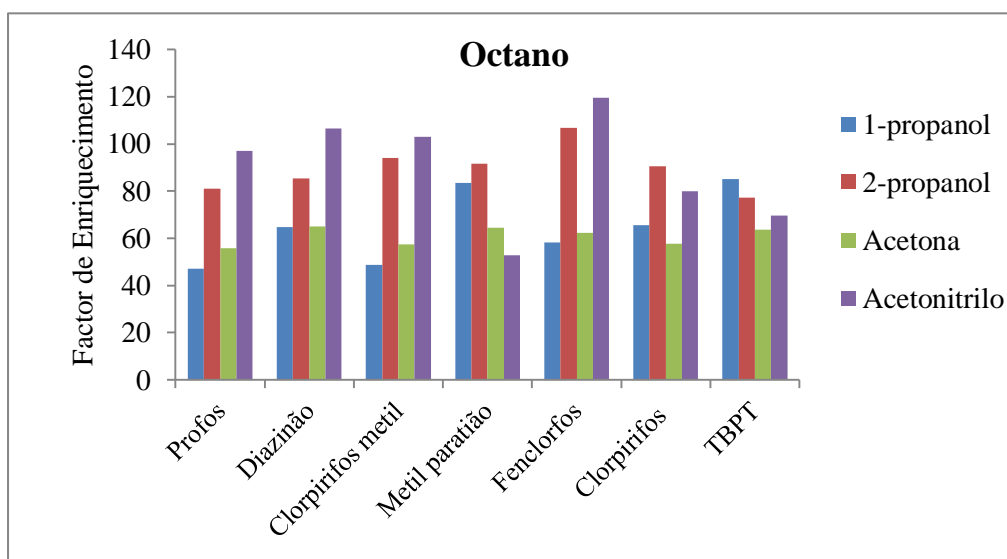


**Figura 2.8** – Percentagens de extracção obtidas para os pesticidas organofosforados com o solvente de extracção heptano e diferentes solventes de dispersão.

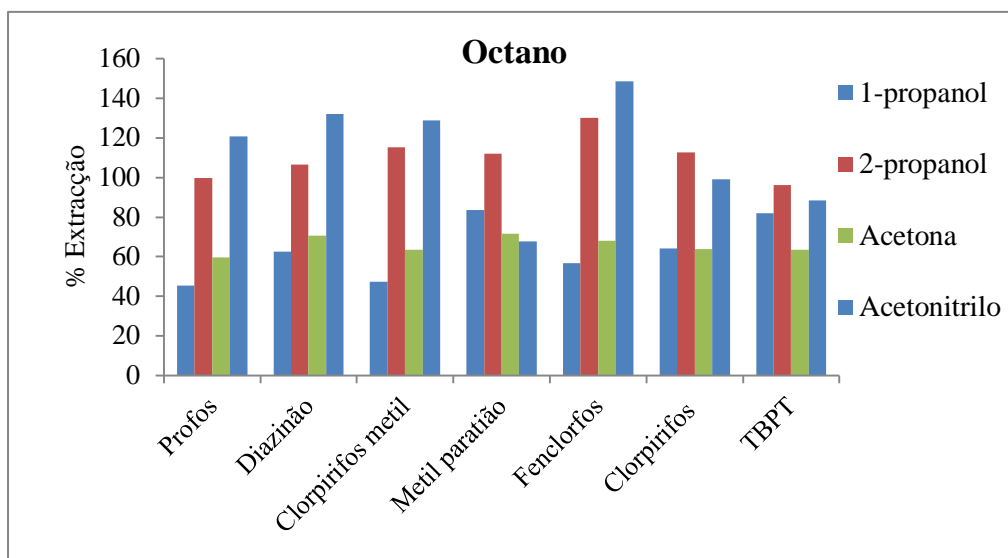
Também quanto à percentagem de extracção, os valores mais elevados foram obtidos com o metanol, sendo que para alguns dos analitos a percentagem de extracção foi um pouco acima de 100%, o que poderá resultar de uma má separação de fases, pois os volumes sedimentados para os ensaios com metanol tiveram um volume sedimentado maior (60  $\mu$ L) do que o volume recolhido nos outros ensaios (50  $\mu$ L), (Figura 2.8).

Assim no caso do heptano, o solvente de dispersão com melhor potencial para DLLME parece ser metanol.

No caso do octano, o solvente de dispersão que produziu melhores factores de enriquecimento foi o acetonitrilo (Figura 2.9); os resultados obtidos com o metanol não foram incluídos pois eram muito superiores a 100%, reflectindo uma importante retenção de água na fase orgânica.



**Figura 2.9** - Factores de enriquecimento obtidos para os pesticidas organofosforados com o solvente de extracção octano e diferentes solventes de dispersão.



**Figura 2.10** – Percentagens de extração obtidas para os pesticidas organofosforados com o solvente de extração octano e diferentes solventes de dispersão.

A percentagem de extração também foi maior para o acetonitrilo do que para os outros solventes de dispersão testados pelo que no caso do solvente de extração octano a melhor combinação de solventes foi octano/acetonitrilo (Figura 2.10).

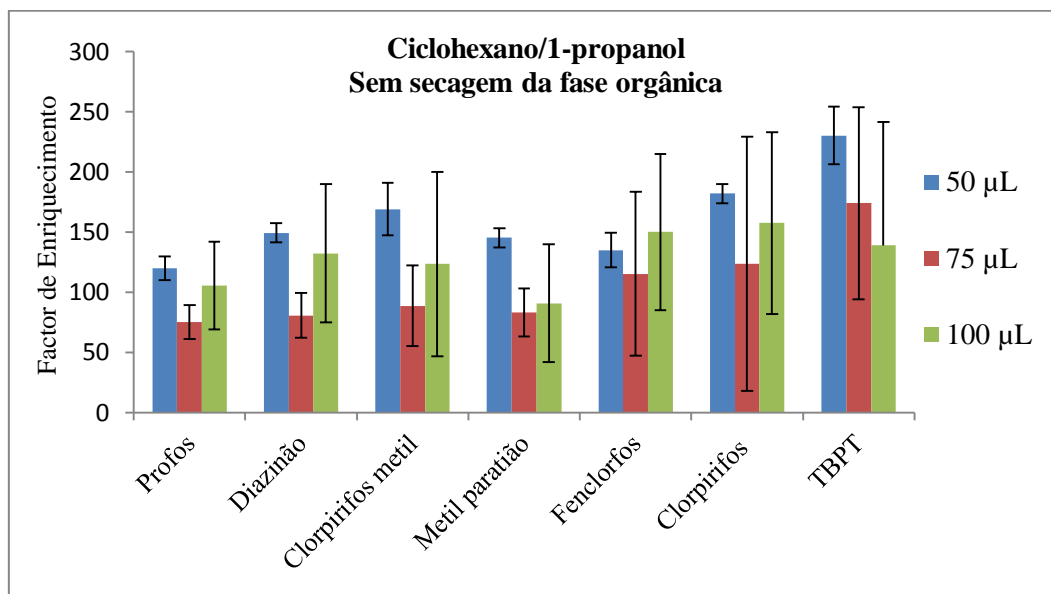
Assim, seleccionaram-se as melhores condições de extração com factores de enriquecimento e percentagens de extração mais elevados para identificar as duas combinações de solventes com maior eficácia em DLLME dos pesticidas: o sistema heptano/metanol e o sistema ciclohexano/1-propanol.

O octano foi eliminado como solvente de extração porque apresentou grande instabilidade nas percentagens de extração obtidas.

#### **2.3.2.2.2 Efeito da variação do volume de extração. Efeito da secagem da fase orgânica**

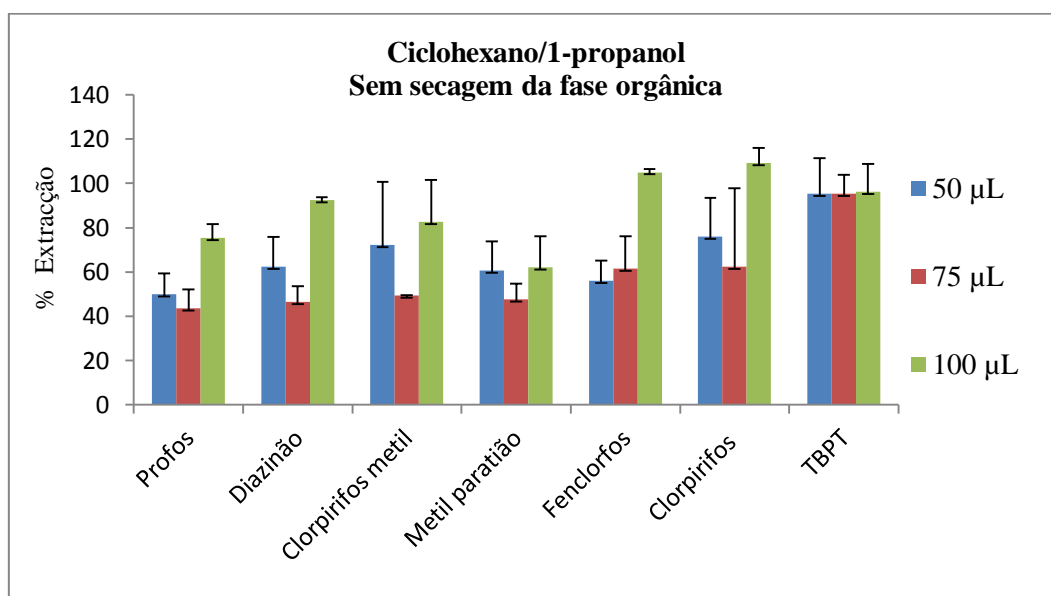
O efeito da variação do volume do solvente de extração na extração dos pesticidas organofosforados foi estudado para os sistemas seleccionados (heptano/metanol e ciclohexano/1-propanol), tendo sido utilizados volumes de 50, 75 e 100  $\mu\text{L}$ . Esta série de ensaios foi efectuada com e sem secagem da fase orgânica com peneiros

moleculares. O volume de solvente dispersante utilizado foi de 0,5 mL e o volume de amostra de água foi de 5 mL com um nível de fortificação de 2 µg/L.



**Figura 2.11** – Efeito da variação do volume do solvente de extracção no factor de enriquecimento dos OPPs, para o sistema ciclohexano/1-propanol.

No caso do sistema ciclohexano/1-propanol, sem secagem da fase orgânica, os melhores factores de enriquecimento foram obtidos com um volume de ciclohexano de 50 µL.



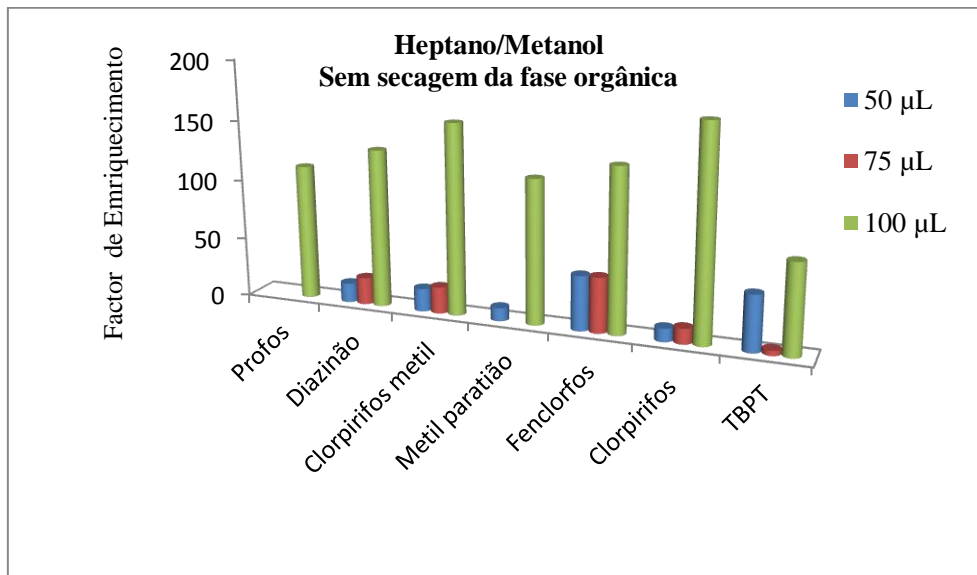
**Figura 2.12** – Efeito da variação do volume do solvente de extracção nas percentagens de extracção dos OPPs, para o sistema ciclohexano/1-propanol.

As percentagens de extracção dos OPPs foram melhores quando se utilizou um volume de extracção de 100  $\mu\text{L}$ . Para volumes de ciclohexano de 50 e de 75  $\mu\text{L}$  as percentagens de extracção foram geralmente superiores a 50% mas melhores para o volume de 50  $\mu\text{L}$ .

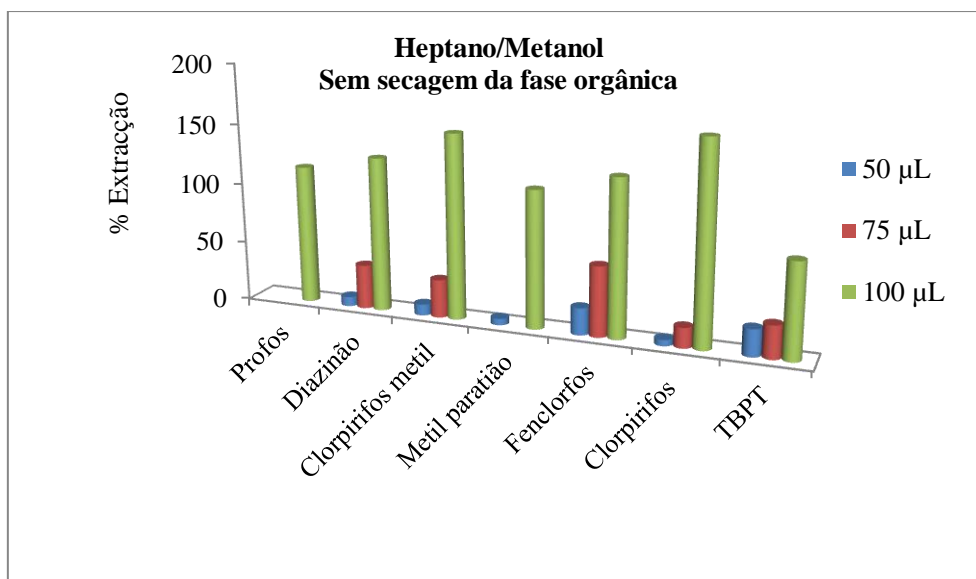
A realização da secagem da fase orgânica, nos ensaios com o sistema ciclohexano/1-propanol não melhorou nem os factores de enriquecimentos dos OPPs nem as suas percentagens de recuperação.

No caso do sistema heptano/metanol efectuou-se também o estudo do efeito do volume do solvente de extracção, utilizando os valores de 50  $\mu\text{L}$ , 75  $\mu\text{L}$  ou 100  $\mu\text{L}$ , mas estudou-se o efeito da secagem da fase orgânica apenas para um volume de heptano de 50  $\mu\text{L}$ .

Nas Figuras 2.13 e 2.14 apresentam-se respectivamente os factores de enriquecimento e as percentagens de extracção dos pesticidas organofosforados, obtidos por DLLME com misturas de heptano e metanol, utilizando as condições anteriormente descritas, nomeadamente variando o volume de heptano e sem efectuar a secagem da fase orgânica.

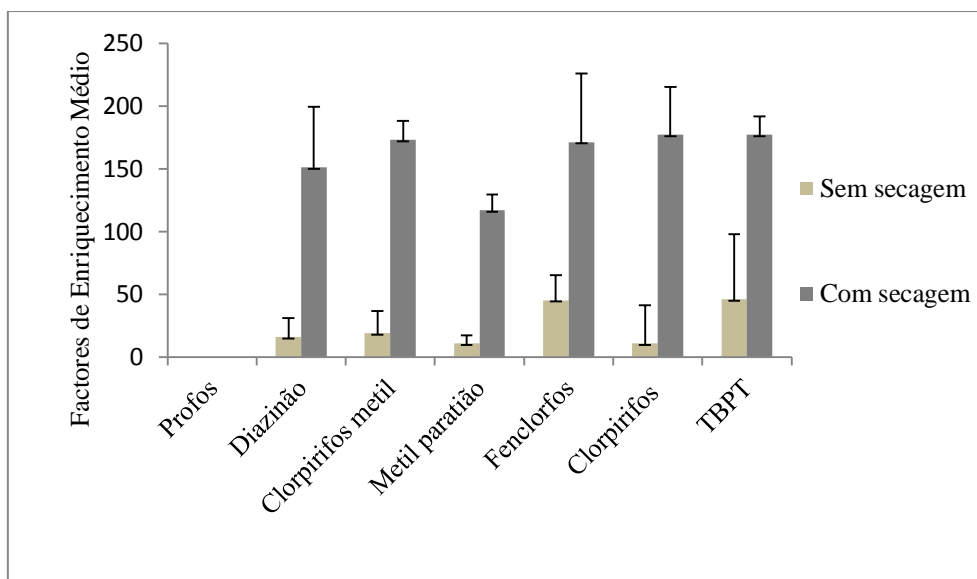


**Figura 2.13** – Efeito da variação do volume do solvente de extracção nas percentagens de extracção dos OPPs, para o sistema heptano/1-propanol.

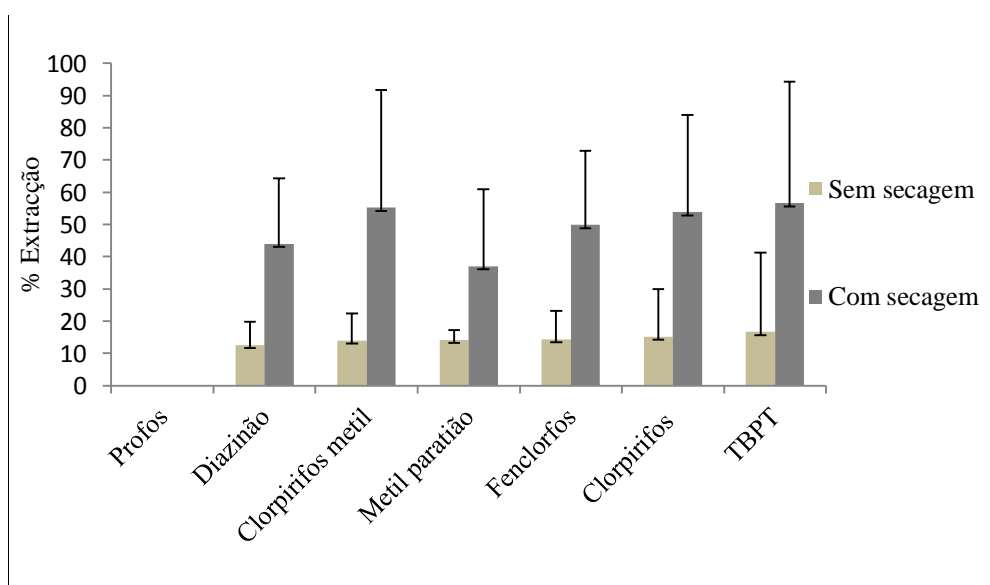


**Figura 2.14** – Efeito da variação do volume do solvente de extração nas percentagens de extração dos OPPs, para o sistema heptano/metanol.

Os factores de enriquecimento dos OPPs foram muito baixos para volumes de heptano de 50 µL e de 75 µL, (<50) passando para valores entre 100 e 150, quando se usam 100 µL de heptano. O mesmo comportamento foi observado no que diz respeito às percentagens de extração dos OPPs. Para averiguar se a baixa eficiência de extração observada para os volumes de 50 µL e 75 µL de heptano estava de alguma forma relacionada com a presença de água na fase orgânica, repetiram-se os ensaios efectuados com 50 µL de heptano, mas efectuando desta vez a secagem da fase orgânica com peneiros moleculares. Ao contrário, do que aconteceu com o sistema ciclohexano/1-propanol, a secagem da fase orgânica resultante da extração efectuada com 50 µL de heptano e 0.5 mL de metanol produziu aumentos muito significativos dos factores de enriquecimento dos OPPs bem como das suas percentagens de extração (Figuras 2.15 e 2.16), representando-se as barras de erro do desvio-padrão associado a duas replicadas para cada ensaio.



**Figura 2.15** - Efeito da secagem da fase orgânica para o sistema de heptano (50  $\mu$ L)/metanol (0.5 mL) nos factores de enriquecimento dos OPPs.

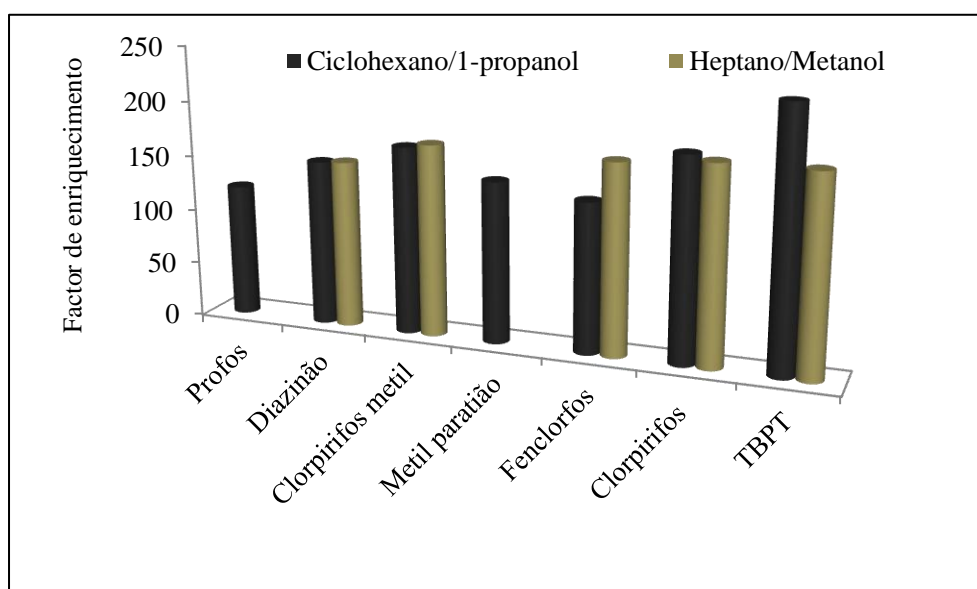


**Figura 2.16** - Efeito da secagem da fase orgânica para o sistema de heptano (50  $\mu$ L)/metanol (0.5 mL) nas percentagens de extração dos OPPs.

Ainda assim no sistema heptano/metanol não foi possível encontrar condições nas quais todos os analitos fossem extraídos pelo que o sistema ciclohexano/1-propanol parece ser mais interessante para uma posterior validação.

A secagem da fase orgânica parece ser um passo vantajoso para as misturas de solventes orgânicos que apresentam grande miscibilidade com a água, como é o caso das misturas que incluem o metanol como solvente de dispersão. No entanto, como a essa miscibilidade estão geralmente associadas eficiências de extração muito baixas, parece ser mais produtivo alterar o solvente de dispersão ou de extração do que efectuar um passo de secagem; a secagem melhora a avaliação da DLLME ao eliminar o efeito da água presente na fase orgânica mas não afecta a migração dos analitos para esta fase.

A partir dos resultados obtidos conclui-se portanto que o melhor sistema de solventes é o sistema ciclohexano/1-propanol para um volume solvente de extração de 50  $\mu\text{L}$ , pois é o sistema que consegue extrair todos os analitos, com maiores factores de enriquecimento (Figura 2.17). A etapa de secagem foi como já se referiu dispensada pois não mostrou melhorar a eficiência de extração para este sistema de solventes.



**Figura 2.17** - Factores de enriquecimento obtidos para os sistemas ciclohexano/1-propanol e heptano/metanol nas melhores condições de extração identificadas para cada um deles.

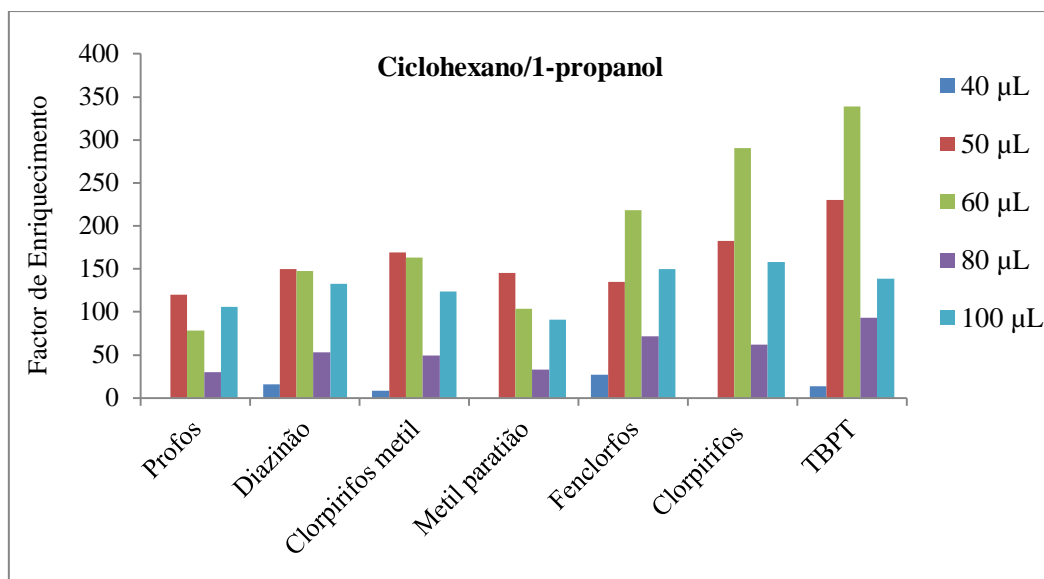
### **2.3.2.2.3 Optimização das condições de DLLME para o sistema ciclohexano/1-propanol**

Apesar de algumas condições de extracção dos pesticidas organofosforados, por DLLME com o sistema de solventes ciclohexano/1-propanol, já terem sido testadas procurou-se nesta secção ampliar a gama de condições utilizadas e os parâmetros estudados de forma a optimizar os factores de enriquecimento e as percentagens de extracção dos pesticidas organofosforados.

#### **2.3.2.2.3.1 Efeito da variação do volume de ciclohexano**

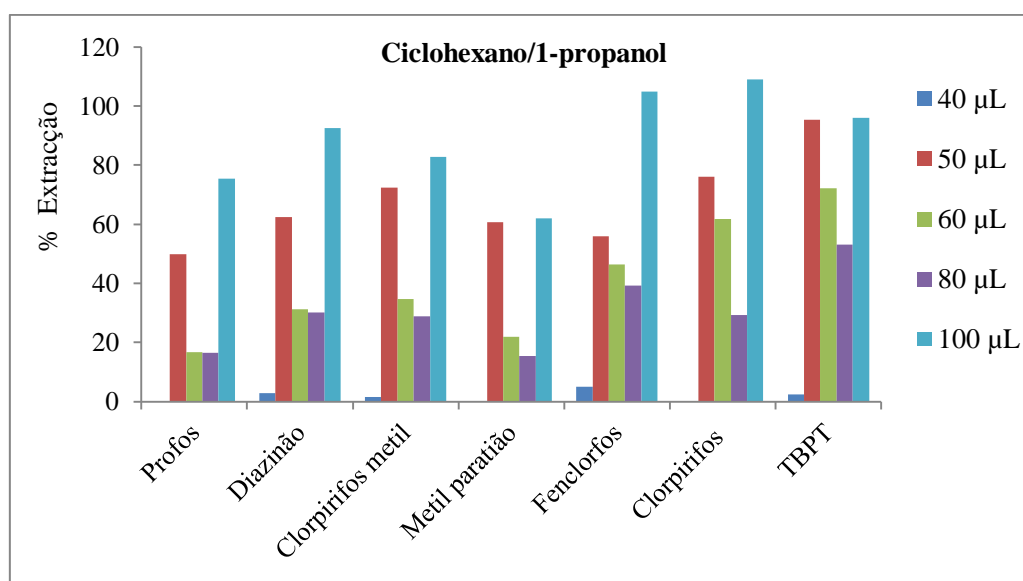
##### **Efeito da adição de NaCl**

Nesta secção pretendeu-se estudar o efeito da variação do volume de ciclohexano na eficiência de extracção dos OPPs, com maior detalhe do que o que tinha sido anteriormente efectuado. Assim, nesta série de ensaios utilizaram-se volumes de ciclohexano de 40  $\mu\text{L}$ , 50  $\mu\text{L}$ , 60  $\mu\text{L}$ , 80  $\mu\text{L}$  e 100  $\mu\text{L}$ , o volume de 1-propanol foi de 0.5 mL e o volume de água foi de 5 mL. Estas determinações foram também repetidas efectuando a adição de NaCl à amostra de água (10% m/v), para avaliar o efeito da força iónica da fase aquosa. O nível de fortificação dos analitos na fase aquosa foi de 2  $\mu\text{g/L}$ . Os factores de enriquecimento dos OPPs nas diversas condições estudadas são apresentados na Figura 2.18.



**Figura 2.18** - Efeito da variação do volume de ciclohexano nos factores de enriquecimento dos OPPs.

Os factores de enriquecimento obtidos com 40 µL de ciclohexano são muito baixos aumentando quando se passa para volumes de 50 µL e de 60 µL, em particular no caso dos pesticidas fenclorfos, clorpirifos e TBPT. Quando se utilizaram volumes de 80 µL ou de 100 µL de ciclohexano o factor de enriquecimento diminuiu substancialmente em relação aos obtidos com volumes menores; este comportamento pode resultar da diluição dos analitos ou da sua menor partição.



**Figura 2.19** - Efeito da variação do volume de ciclohexano nas percentagens de extracção dos OPPs.

O aumento do volume de ciclohexano entre 50  $\mu$ L e 80  $\mu$ L traduziu-se numa redução da percentagem de extracção dos analitos; para um volume de 100  $\mu$ L de ciclohexano a percentagem de extracção aumentou substancialmente (Figura 2.19).

Considerando estes dois parâmetros avaliados, seleccionou-se o volume de ciclohexano de 50  $\mu$ L pois permite obter bons factores de enriquecimento e percentagens de extracção acima de 50%.

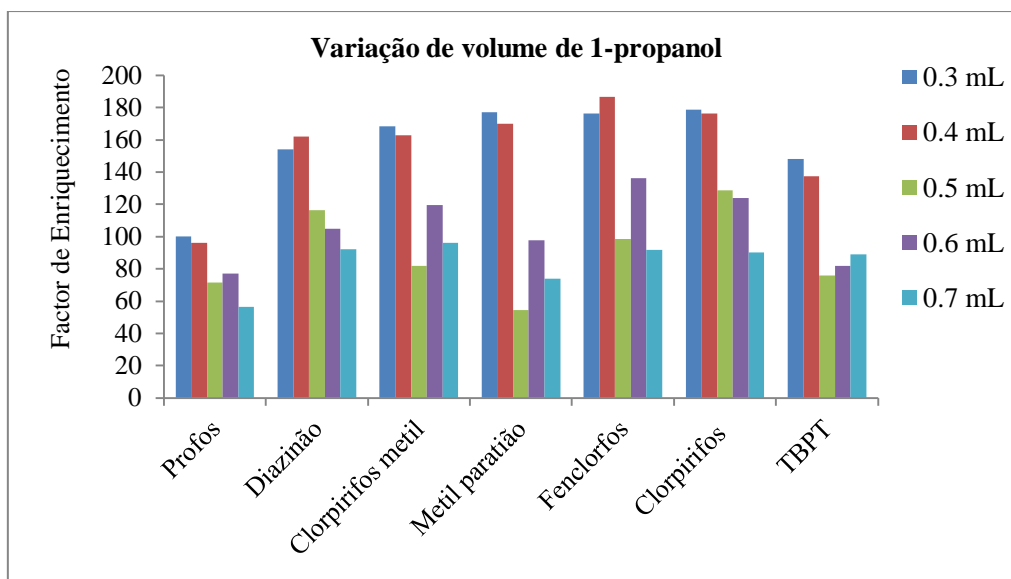
Como já foi referido, esta série de experiências foi repetida nas mesmas condições mas adicionando NaCl até uma concentração de 10% (m/v). Os factores de enriquecimento e as percentagens de extracção obtidos nesta série de experiências com adição de NaCl foram globalmente inferiores aos obtidos sem a adição de sal, embora se observasse por exemplo uma melhoria da eficiência de extracção com o volume de 40  $\mu$ L.

Assim, concluiu-se que o volume de ciclohexano a utilizar nas experiências seguintes seria de 50  $\mu$ L e que a adição de sal não seria efectuada.

#### **2.3.2.2.3.2 Efeito da variação do volume de 1-propanol**

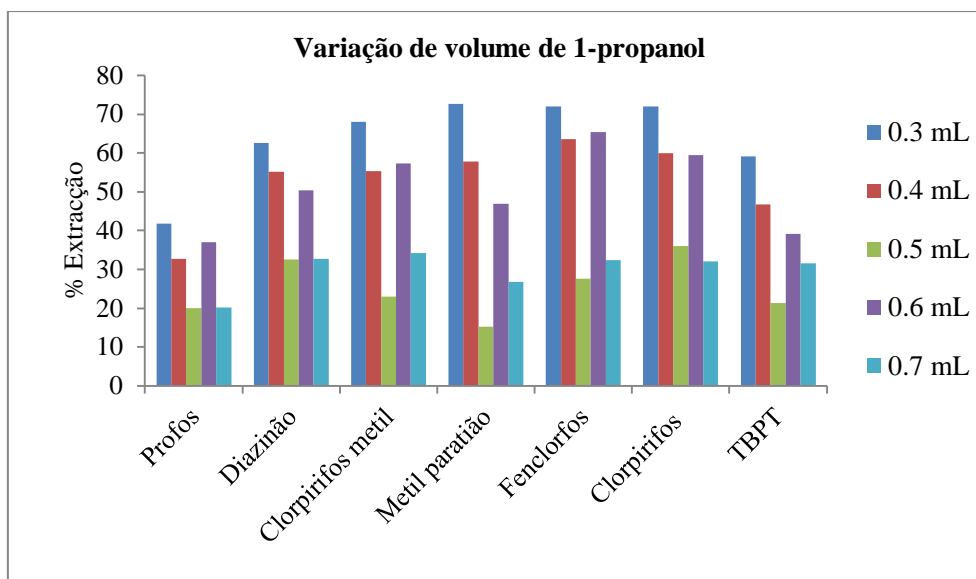
O efeito do volume de 1-propanol foi estudado na gama de 0.3 mL a 0.7 mL com aumentos sucessivos de 0.1 mL em cada ensaio. O volume de ciclohexano utilizado foi de 50  $\mu$ L. A mistura dos dois solventes foi utilizada para efectuar DLLME a partir de amostras de água (5 mL) fortificadas num nível de concentração de 2  $\mu$ g/L.

Os factores de enriquecimento dos OPPs foram maiores nos ensaios efectuados com 0.3 mL ou 0.4 mL de 1-propanol (Figura 2.20). A diferença entre os valores de factores de enriquecimento para estes dois volumes é muito pequena estando certamente dentro da margem de erro experimental.



**Figura 2.20** - Efeito da variação do volume de 1-propanol nos factores de enriquecimento dos OPPs.

Na Figura 2.21 apresentam-se as percentagens de extracção obtidas com diferentes volumes de 1-propanol. Tal como para os factores de enriquecimento, as melhores percentagens de extracção foram obtidas com volumes de 1-propanol de 0.3 mL ou de 0.4 mL, mas desta vez com uma vantagem mais nítida para o volume de 0.3 mL. A tendência geral é a de uma diminuição do factor de enriquecimento e das percentagens de extracção com a diminuição do volume de 1-propanol; os ensaios efectuados com um volume de 0.5 mL apresentam algum desvio a esta tendência, com uma eficiência de extracção inferior aos restantes ensaios, que pode no entanto, resultar de uma incompleta separação e/ou recolha da fase orgânica.



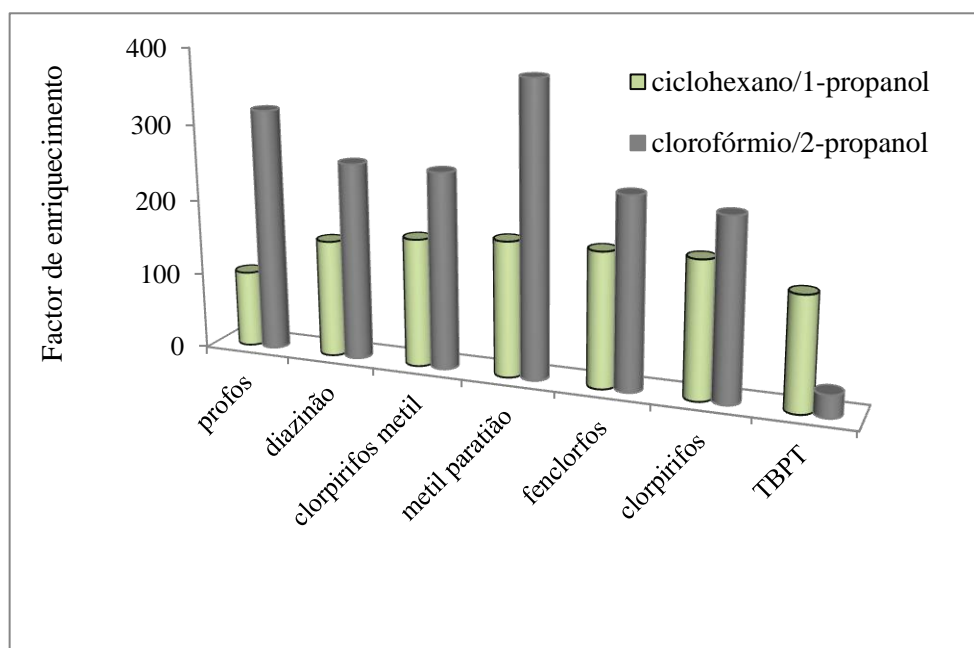
**Figura 2.21** - Efeito da variação do volume de 1-propanol na percentagem de extração.

### 2.3.2.3 Comparação entre solventes halogenados e não halogenados

Após os estudos de optimização realizados para os sistemas de solventes de extração halogenados e não halogenados, associados a vários tipos de solventes de dispersão (acetona, acetonitrilo, metanol, 1-propanol e 2-propanol), pode concluir-se que o melhor sistema é o sistema com o clorofórmio como solvente de extração e o 2-propanol como solvente de dispersão. Para este sistema obtiveram-se factores de enriquecimento na gama de 29 a 320 enquanto para o sistema ciclohexano/1-propanol obtiveram-se valores de 100 a 178 (Figura 2.22).

No entanto, o sistema ciclohexano/1-propanol tem a característica interessante de permitir obter factores de enriquecimento mais homogéneos para os vários pesticidas e em particular apresentar valores comparáveis para o TBPT, que foi muito fracamente extraído em todos os sistemas com solventes halogenados. Também a percentagem de extração do TBPT é maior no sistema ciclohexano/1-propanol relativamente ao método com clorofórmio.

Por outro lado, no que diz respeito aos restantes pesticidas, obtiveram-se percentagens de extração maiores quando se utilizou o sistema clorofórmio/2-propanol do que quando se utilizaram solventes não halogenados (Tabela 2.24).



**Figura 2.22** - Comparação entre os sistemas de solventes halogenados e não halogenados otimizados para o método de microextração líquido-líquido dispersiva.

**Tabela 2.24** – Percentagens de recuperação para os sistemas de solventes otimizados: Ciclohexano/1-propanol Vs. Clorofórmio/2-propanol.

Analitos	Extracção (%)	
	ciclohexano/1-propanol	clorofórmio/2-propanol
Profos	41.76	99.85
Diazinão	62.50	80.85
Clorpirifos metil	68.07	80.37
Metil paratião	72.60	119.54
Fenclorfos	71.95	77.88
Clorpirifos	72.04	73.55
TBPT	59.12	8.73

### **2.3.3 Validação da determinação de pesticidas organofosforados em água por DLLME com clorofórmio/2-propanol**

#### **2.3.3.1 Construção de rectas de calibração**

Foram construídas rectas de calibração para cada pesticida na gama de 100 ng/L a 1500 ng/L. Cada recta de calibração foi construída com um mínimo de seis pontos homogeneamente distribuídos na gama de concentrações, e efectuaram-se duas replicadas por cada ponto. A preparação dos padrões da recta de calibração foi efectuada fortificando água ultra pura (5 mL) com 5 µL de uma solução dos pesticidas em metanol, com uma concentração mil vezes superior à concentração pretendida para o padrão. As diversas soluções de fortificação foram preparadas a partir de uma solução-mãe dos pesticidas em hexano, com uma concentração de 2 mg/L efectuando sucessivas diluições com metanol. Cada padrão foi então sujeito a DLLME com uma mistura de clorofórmio (50 µL) e 2-propanol (1 mL) e o extracto resultante foi analisado por GC-MS. Assim foram determinadas as equações lineares que relacionam a área do pico cromatográfico de cada pesticida com a respectiva concentração, calcularam-se os correspondentes coeficientes de correlação e os coeficientes de variação do método (Tabela 2.25).

**Tabela 2.25** – Gamas de trabalho, equações das rectas de calibração, coeficientes de correlação e coeficientes de variação do método validado.

Analitos	Gama de trabalho (ng/L)	Equações das rectas de calibração	Coefficiente de correlação $R^2$	$CV_m$ (%)
Profos	100-1100	$y = 38.46 x + 668.82$	0.9982	3.84
Diazinão	100-1100	$y = 108.49 x + 2604.45$	0.9979	4.09
Clorpirifos metil	100-1000	$y = 78.87x - 1008.51$	0.9987	3.07
Metil paratião	100-1100	$y = 18.15x + 12.41$	0.9976	4.37
Fenclorfos	100-1000	$y = 99.92x + 2869.62$	0.9973	5.07
Clorpirifos	100-1000	$y = 29.55x + 278.88$	0.9995	2.04
TBPT	500-1500	$y = 16.03x - 24.80$	0.9915	5.14

$CV_m$ - Coeficiente de variação do método

As gamas de trabalho foram ajustadas visualmente e tendo em conta o coeficiente de correlação. Para a maior parte dos analitos foi possível incluir na gama de trabalho o padrão de 100 ng/L que corresponde ao limite máximo admissível para pesticidas organofosforados. Tal não foi no entanto possível para o TBPT cuja gama de trabalho teve um limite inferior de 500 ng/L. Obtiveram-se coeficientes de determinação superiores a 0.995 e coeficientes de variação inferiores a 5.07% para todos os pesticidas excepto o TBPT com valores de 0.9915 e 5.14% para estes parâmetros. Estes resultados demonstram que o método é linear (coeficientes de determinação próximos de um) nas gamas de trabalho estudadas.

### 2.3.3.2 Determinação dos limites de detecção e de quantificação

O limite de detecção e o limite de quantificação de cada pesticida foram determinados por dois métodos diferentes: a partir da recta de calibração e a partir da razão sinal/ruído (Tabela 2.26).

**Tabela 2.26** – Limites de detecção e limites de quantificação dos pesticidas no método validado.

Analitos	LOD <sub>cal</sub> (ng/L)	LOD <sub>S/N</sub> (ng/L)	LOQ <sub>cal</sub> (ng/L)	LOQ <sub>S/N</sub> (ng/L)
Profos	76.64	5.1	255.45	17.0
Diazinão	81.61	3.9	272.02	13.0
Clorpirifos metil	61.21	1.5	204.03	5.1
Metil paratião	87.25	9.1	290.83	30.3
Fenclorfos	90.09	1.9	300.29	6.2
Clorpirifos	36.19	2.5	120.62	8.2
TBPT	155.68	71.4	518.93	238.1

LOD<sub>cal</sub> – Limite de detecção calculado a partir da curva de calibração; LOQ<sub>cal</sub> – Limite de quantificação calculado a partir da curva de calibração; LOD<sub>S/N</sub> – Limite de detecção estimado a partir de 3x da razão S/N; LOQ<sub>S/N</sub> – Limite de quantificação estimado a partir de 10x da razão S/N

Quando o LOD foi calculado pela razão sinal/ruído obtiveram-se valores situados entre 1.5 ng/L e 9.1 ng/L, excepto para o TBPT com um limite de detecção de 71.4 ng/L. Estes valores não são realistas, pois quando se faz a injeção de um padrão da mistura de organofosforados, na concentração obtida através desse cálculo, não é possível detectar nenhum analito. Por outro lado, os LODs calculados pelas rectas de calibração estão sobre-estimados pois no cromatograma obtido a partir de um padrão de 50 ng/L é possível detectar todos os pesticidas excepto o TBPT.

As mesmas considerações aplicam-se ao cálculo do limite de quantificação (LOQ); no caso deste parâmetro há ainda que considerar que os LOQs calculados pelas razões sinal/ruído são menores que o padrão mais baixo das respectivas gamas de trabalho mas o mesmo não ocorre com os LOQs estimados a partir das rectas de calibração. Por outras palavras, se seleccionássemos os LOQs calculados a partir das rectas de calibração teríamos que ajustar as gamas de trabalho ou considerar como valor mais baixo da gama de trabalho para cada pesticida o respectivo LOQ.

Assim tendo em conta os resultados obtidos com padrões vestigiais e tendo em conta que é o método largamente dominante na literatura científica adoptaram-se para os limiares analíticos do método os valores obtidos a partir da razão sinal/ruído.

### **2.3.3.3 Análise da Linearidade, Precisão, Variância entre dados**

Na Tabela 2.27 apresentam-se os resultados do teste de Mandel, o teste de RIKILT, a análise das áreas normalizadas e análise dos resíduos.

O teste de Mandel ou teste de Fisher/Snedecor descrito na norma ISO 8466-1, avalia a linearidade do método, comparando os valores das áreas experimentais calculadas a partir de uma curva de calibração (ajuste linear e polinomial), calculando um valor teste que deve ser inferior ao valor calculado para a função F (função de Fisher). Como os valores teste calculados a partir dos ajustes lineares e polinomiais, são inferiores aos valores do teste F, considera-se que o ajuste é linear para todos os analitos estudados.

Todavia a análise da linearidade também pode ser avaliada a partir da análise de resíduos, que descreve a distância entre os valores das áreas experimentais e os valores das áreas estimadas através da regressão linear. Os desvios observados (%) devem ser o mais próximo de zero, indicando que há proximidade entre as áreas experimentais e as áreas estimadas ao longo da gama de trabalho.

O teste de RIKILT também permite validar a linearidade do método e avaliar a discrepância entre os valores das áreas e as concentrações ( $y_i/x_i$ ), restringindo a razão entre valores de  $y_i/x_i$  entre 90-110 %. Deste modo, os valores que caírem fora deste intervalo têm de ser eliminados e a gama de trabalho deve ser ajustada. Para os resultados obtidos na Tabela 2.27, verifica-se que todos os valores experimentais estão dentro do intervalo estipulado, o que indica que há um bom ajuste linear das concentrações para as áreas experimentais obtidas no método.

O teste das áreas normalizadas também permite avaliar se há um ajuste entre os valores experimentais e os valores de um determinado analito dado como referência. Este é seleccionado, pois apresenta valores da razão entre área experimental e área estimada próximo de um. A normalização entre as áreas e as concentrações experimentais é feita com os valores dados como referência. O intervalo definido como aceitável é entre 90% e 110 %. Para os resultados obtidos, verifica-se que os

valores normalizados estão dentro do intervalo, excepto para o metil paratião que apresenta um ponto, que está um pouco acima do estipulado, indicando que este deve ser eliminado.

Também o teste da análise de resíduos permite avaliar a precisão do método, discriminando os valores considerados fora da gama de calibração.

**Tabela 2.27** - Testes aos parâmetros da validação do método analítico.

Analitos	Análise de Resíduos (%)	RIKILT (%)	Áreas Normalizadas (%)	Teste de Mandel	
				$F_{(N-1, N-3, 95\%)}$	Valor Teste
Profos	[-17; 6]	[93; 106]	[92; 104]	3.58	-7.99
Diazinão	[-20, 6]	[94; 106]	[91; 103]	6.16	-3.99
Clorpirifos metil	[-8; 10]	[93; 112]	[87; 104]	9.01	-2.75
Metil paratião	[-23; 6]	[78; 108]	[94; 130]	6.16	-1.19
Fenclorfos	[-13; 6]	[99; 112]	[94; 107]	9.01	-2.98
Clorpirifos	[-7; 3]	[74; 99]	[96; 102]	9.01	-1.38
TBPT	[-5; 6]	[94; 106]	[96; 108]	9.01	-0.80

N- Número de pontos da recta;  $F_{(N-1, N-3, 95\%)}$ -Valor tabelado da distribuição de Fisher/Snedecor

#### 2.3.3.4 Precisão do método analítico: análise da repetibilidade

Para analisar também a precisão do método de DLLME-GC-MS estudou-se o parâmetro da repetibilidade em três gamas de concentração (100 ng/L, 500 ng/L e 1000 ng/L). Efectuaram-se seis replicadas do processo de DLLME nestas concentrações, nas mesmas condições anteriormente optimizadas e determinou-se a concentração dos analitos no volume sedimentado obtido. A precisão foi avaliada como o desvio padrão relativo da concentração calculada pelas rectas de calibração (Tabela 2.25). O método demonstrou ter uma boa precisão (valores do desvio padrão relativo inferiores a 10%) para os vários analitos, excepto fenclorfos com alguns valores ligeiramente superiores a 10% (Tabela 2.28).

**Tabela 2.28-** Precisão do método de DLLME-GC-MS.

Analitos	Precisão (R.S.D %), n=6		
	100 ng/L	500 ng/l	1000 ng/L
Profos	7.5	9.7	9.8
Diazinão	8.4	7.6	8.1
Clorpirifos metil	9.9	7.9	6.5
Metil paratião	9.3	8.1	8.2
Fenclorfos	10.3	10.1	8.9
Clorpirifos	9.7	9.1	9.2
TBPT	N.D	12.3	9.2

### 2.3.3.5 Exactidão do método analítico. Efeito de matriz.

Para analisar a exactidão do método de DLLME-GC-MS e a sua aplicabilidade a amostras reais de águas, estudou-se o efeito de matriz fortificando cada amostra real com uma concentração dos analitos de 800 ng/L.

As amostras reais a estudar tiveram diferentes proveniências (água de torneira, poço e rega) e de diferentes regiões de Portugal.

A recuperação relativa (RR) foi calculada utilizando a seguinte fórmula:

$$RR (\%) = \frac{C_{est} - C_{real}}{C_{fort}} \times 100$$

Onde  $C_{est}$  é a concentração depois da fortificação da amostra,  $C_{real}$  é a concentração real do analito na amostra e  $C_{fort}$  é a concentração de fortificação do analito na amostra real.

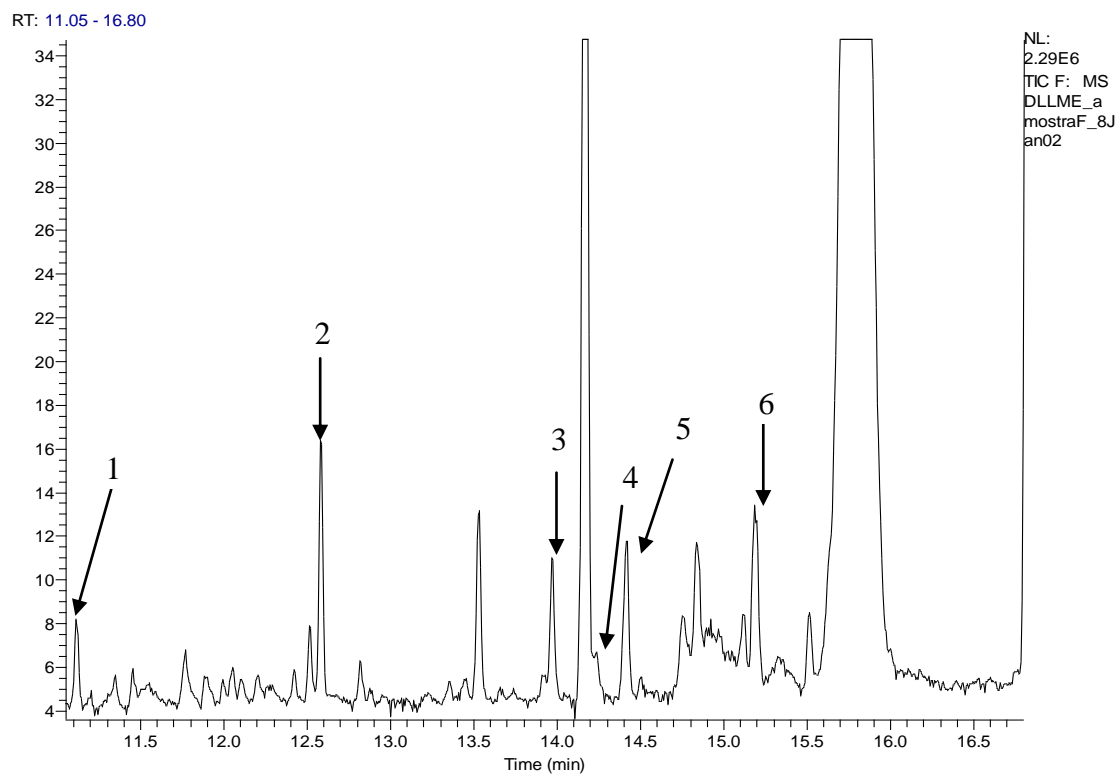
Verifica-se através dos resultados obtidos na Tabela 2.28, que as % RR são superiores a 50% e próximas de 100% para a maioria das amostras. Os pesticidas cuja determinação parece ser mais influenciada por efeito de matriz são o profos e o metil paratião. O TBPT cuja percentagem de extracção já era menor que a dos restantes analitos nos ensaios efectuados em água ultra pura, é particularmente afectado pelo efeito de matriz não sendo mesmo detectado na água da torneira e na água do poço. Este resultado confirma que o método validado não é adequado à determinação do TBPT.

**Tabela 2.29-** Recuperações relativas das quatro amostras reais estudadas e fortificadas com 800 ng/L de cada analito.

Analitos	<b>R.R (%) ± S.D. (n=2)</b>			
	Água da Torneira	Água do poço (Arganil)	Água do poço (Tábua)	Água de rega
Profos	46.1±0.5	80.9±3.6	90.50±3.2	96.0±6.1
Diazinão	90.3±9.0	83.6±5.6	91.36±8.8	100.9±10.2
Clorpirifos metil	105.6±3.8	85.0±6.3	92.25±8.7	108.2±10.9
Metil paratião	48.4±0.6	58.9±1.5	86.89±1.5	92.6±3.2
Fenclorfos	119.8±1.9	77.1±6.5	81.92±8.1	103.8±9.4
Clorpirifos	129.4±8.8	96.8±3.5	93.12±7.9	93.7±2.0
TBPT	N.D	20.5±19.6	N.D	34.6±6.3

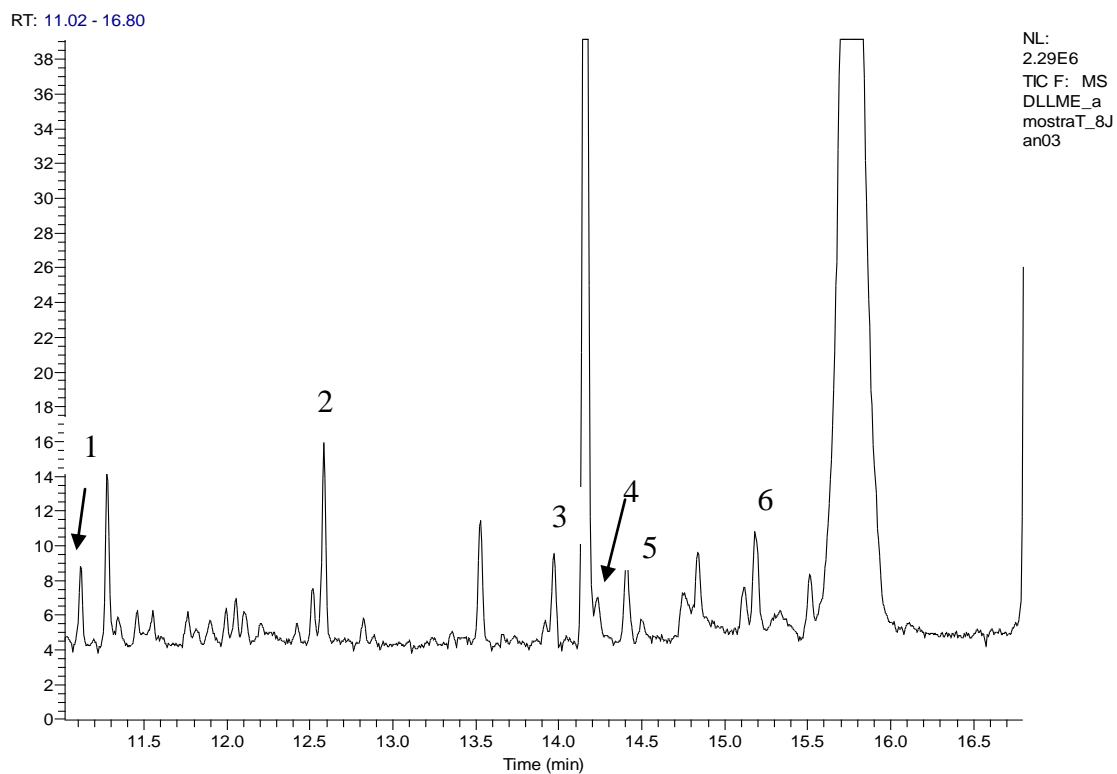
S.D- Desvio padrão; R.R- Recuperação relativa.

A seguir apresentam-se os cromatogramas das amostras reais fortificadas com 800 ng/L de cada pesticida nas condições de microextração anteriormente optimizadas. A identificação de cada analito foi feita recorrendo ao modo de ião extraído a partir do cromatograma de varrimento completo, seleccionando o ião indicado na Tabela 2.7.



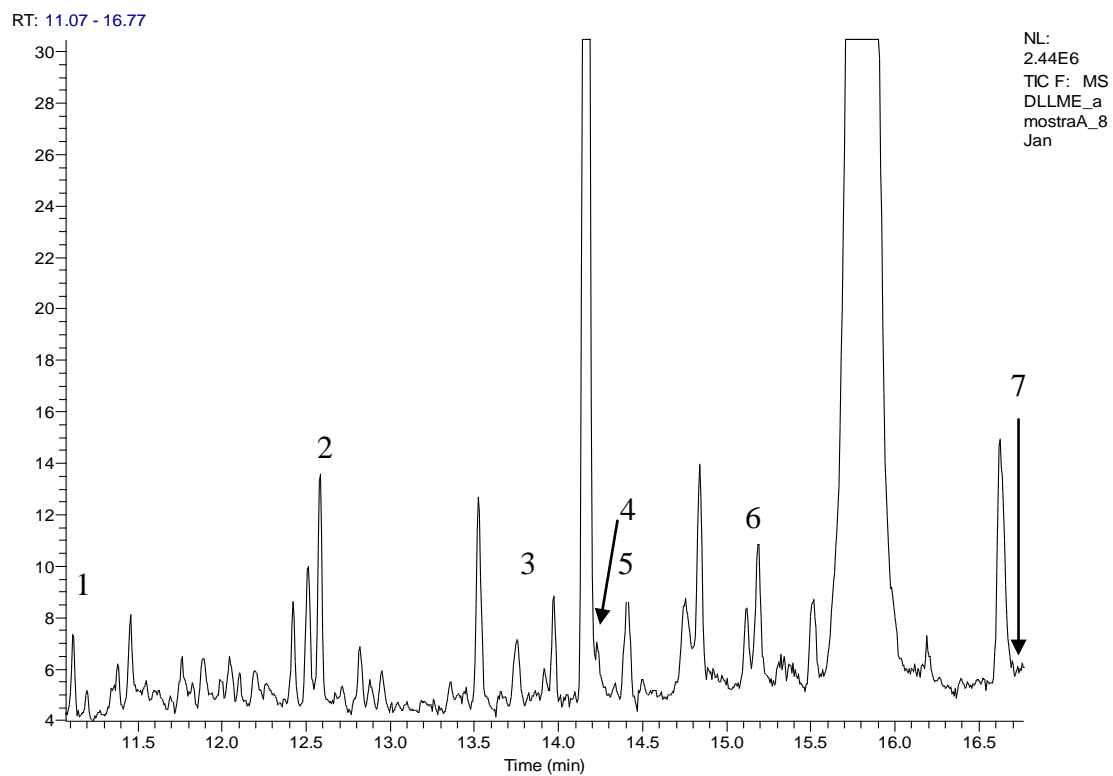
**Figura 2.23-** Cromatograma em modo de varrimento completo para a amostra de água da torneira.

Identificação dos picos cromatográficos: 1-Profos; 2-Diazinão; 3-Clorpirifos metil; 4-Metil paratião; 5-Fenclorfos; 6-Clorpirifos.



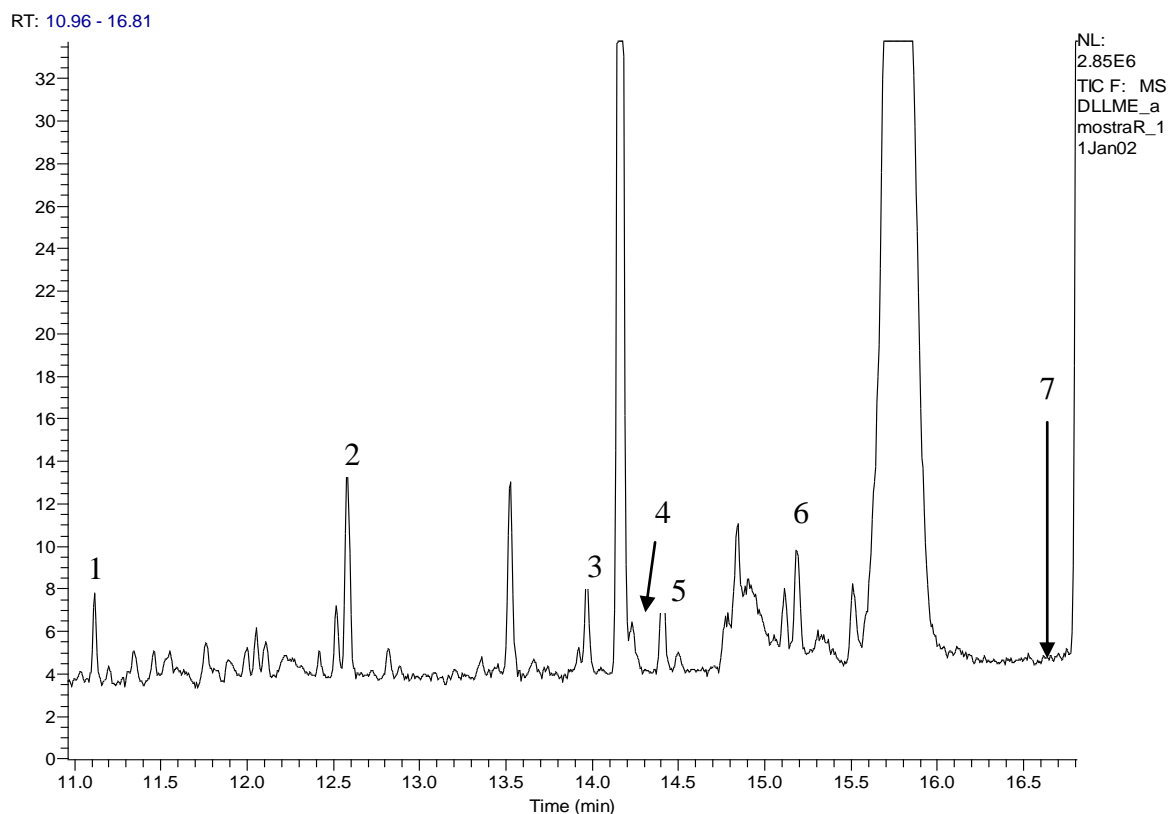
**Figura 2.24-** Cromatograma em modo de varrimento completo para a amostra de água do poço (Tábua).

Identificação dos picos cromatográficos: 1-Profos; 2-Diazinão; 3-Clorpirifos metil; 4-Metil paratíão; 5-Fenclorfos; 6-Clorpirifos.



**Figura 2.25-** Cromatograma em modo de varrimento completo para a amostra de água do poço (Arganil).

Identificação dos picos cromatográficos: 1-Profos; 2-Diazinão; 3-Clorpirifos metil; 4-Metil paratíão; 5-Fenclorfos; 6-Clorpirifos.



**Figura 2.26-** Cromatograma em modo de varrimento completo para a amostra de água de rega.

Identificação dos picos cromatográficos: 1-Profos; 2-Diazinão; 3-Clorpirifos metil; 4-Metil paratião; 5-Fenclorfos; 6-Clorpirifos; 7-TBPT.

Em suma, é possível afirmar que a aplicação deste método de DLLME à extracção dos pesticidas organofosforados de matrizes aquosas é adequado para a maioria dos analitos estudado, no entanto, o mesmo não se poderá concluir para o TBPT, pois os limites de detecção que este apresentou situaram-se muito acima do valor da concentração limite estipulado na legislação. Para este analito, existiram outros sistemas de solventes mais adequados, que permitiram uma extracção mais eficiente, nomeadamente o sistema com um solvente de extracção não halogenado (ciclohexano/1-propanol). Posto isto, e devido à sua rápida degradação em meio oxigenado, será importante estudar no futuro certos aspectos críticos da extracção deste pesticida em matrizes aquosas.

## Capítulo III - Determinação de pesticidas organofosforados em água por SPE-HLLME-GC-MS

### 3.1 Introdução

A microextração em líquido-líquido homogénea é uma técnica relativamente recente<sup>100-103</sup> que foi criada a partir dos princípios da microextração líquido-líquido dispersiva. Inicialmente esta técnica foi aplicada em matrizes sólidas como os sedimentos<sup>100</sup>, estendendo-se rapidamente também a matrizes líquidas.<sup>100,101</sup> No caso de matrizes sólidas é efectuada uma pré-extração dos analitos a partir da matriz sólida, recorrendo a um solvente orgânico miscível com água. Posteriormente a um pequeno volume do extracto bruto ou concentrado adicionam-se alguns microlitros do solvente de extração, obtendo-se uma fase homogénea; a dispersão é provocada injectando essa fase homogénea em alguns mililitros de água.<sup>99,100,101</sup>

Quando se forma a fase homogénea os analitos contidos no solvente de dispersão (solvente miscível com água), podem ser solvatados pelo solvente de extração.

A associação do HLLME à técnica de extração em fase sólida permite conjugar a grande capacidade extractiva da microextração líquido-líquido à pré-concentração resultante da extração em fase sólida e atingir assim a ultraconcentração dos analitos na fase orgânica recolhida após a separação de fases.<sup>137, 138</sup>

No entanto, existem trabalhos cujo objectivo desta associação de técnicas, não foi ultraconcentrar os analitos na fase orgânica, mas sim, limpar o extracto de impurezas possibilitando uma melhor análise das amostras.<sup>139</sup>

Actualmente existem algumas referências bibliográficas que designam esta associação como sendo uma associação da técnica de SPE com DLLME, no entanto, o método que é descrito nestas referências, mostra semelhanças, não com o método de DLLME mas sim, com o método de HLLME, pelo que a designação correcta deverá ser SPE-HLLME.<sup>138, 139</sup>

De entre, as referências citadas existem algumas, que se referem à extração de pesticidas em matrizes aquosas e em sedimentos<sup>99,139,140</sup>. A Tabela 3.1 mostra as condições de extração e os limiares analíticos de diversos analitos extraídos a partir de matrizes aquosas através do método de SPE-HLLME.

**Tabela 3.1-** Condições de extracção e limiares analíticos dos analitos estudados pelo método de associação do SPE com DLLME.

Classe de compostos	LOQ (ng/L)	LOD (ng/L)	EF	Fase estacionária (SPE)	Solvente de Extracção	Solvente de Dispersão	V <sub>disp</sub> (mL)	V <sub>ext</sub> (µl)
Fungicidas <sup>139</sup>	40-200	-	156-254	HLB (30 µm, 10 mg)	Tricloroetano	acetona	1	100
Herbicidas <sup>138</sup>	-	2-6	6593-7873	Si (500 mg)	CCl <sub>4</sub>	acetona	1	25
PBDEs <sup>137</sup>	-	0.03-0.15	6838-9405	C <sub>18</sub>	Tetracloroetileno	acetoneitrilo	1	22
Clorofenóis <sup>140</sup>	-	0.5-50	4390-15840	SDVB (100 mg)	Clorobenzeno	acetona	1	13

Como se pode ver na Tabela 3.1, existe um número muito pequeno de aplicações desta técnica referidas na literatura; o presente trabalho descreve pela 1<sup>a</sup> vez a utilização de SPE-HLLME na determinação de pesticidas organofosforados.

## **3.2 Parte Experimental**

### **3.2.1 Materiais e Solventes**

Nos ensaios de SPE-HLLME utilizaram-se tubos de centrífuga de vidro com fundo cónico, com tampa roscada e septo de PTFE, com capacidades de 15 mL (Corning Life Sciences). Na medida e transferência dos solventes de extracção, bem como da fase sedimentada utilizaram-se microseringas de vidro, graduadas, com a capacidade de: 10 µL (SGE, Australia); 25 µL, 50 µL, 100 µL (Agilent, Australia).

Os extractos foram colocados em redutores de volume de 100 µL (Ref<sup>a</sup> 110501) e 300 µL (Ref<sup>a</sup> 110502)<sup>134</sup>, para frascos de capacidade 1,5 mL (Ref<sup>a</sup> CVP1-C02-100)<sup>135</sup>, com tampa de capsular,<sup>134</sup> do injector automático.

Durante o trabalho efectuado utilizou-se material de vidro comum como erlenmeyers, funis, balões volumétricos, pipetas volumétricas, gobelés, etc. A descontaminação de todo este material, dos frascos de 1,5 mL e dos redutores de volume utilizados, foi feita de acordo com o procedimento anteriormente descrito na parte experimental do Capítulo II (secção 2.2.3).

Os solventes e padrões cromatográficos utilizados são os referidos no Capítulo II, (secções 2.2.1 e 2.2.4)

### **3.2.2 Preparação de soluções-padrão e construção e rectas de calibração**

A solução de fortificação dos pesticidas organofosforados nas amostras aquosas durante a etapa de optimização do método de SPE-HLLME teve a concentração de 500 µg/L em metanol e foi preparada por diluição de uma solução dos pesticidas em hexano com a concentração de 2 mg/L.

Foram construídas rectas de calibração por injeção de padrões dos pesticidas em hexano, com concentrações na gama de 2 mg/L a 10 mg/L; estes padrões foram preparados por diluição com hexano de uma solução concentrada (10 mg/L).

A solução dos pesticidas em hexano, com a concentração de 2 mg/L, foi diluída com metanol até concentrações finais de 100 µg/L. Estas soluções metanólicas foram então adicionadas a amostras de água, nas quantidades adequadas para preparar os padrões das rectas de calibração na gama de 10 ng/L a 100 ng/L e nos ensaios de recuperação efectuados a 100 ng/L.

Todas as soluções de concentração inferior a 2 mg/L foram preparadas diariamente e a estabilidade das soluções de fortificação utilizadas foi controlada cromatograficamente com uma frequência semanal.

### **3.2.3 Método de associação da extracção em fase sólida com a microextracção líquido-líquido homogénea (SPE-HLLME)**

As amostras de água são colocadas em balões volumétricos de 100 mL, 200 mL ou 500 mL e fortificadas a uma concentração final de 500 ng/L. Foi feito um condicionamento prévio da fase estacionária com a eluição dos solventes de acordo com a sua polaridade. Deste modo, eluiu-se em primeiro metanol (99.9% pureza) num volume de 5 mL, seguido de água ultra pura com o mesmo volume. De seguida e após a secagem da fase estacionária, e com o auxílio de uma bomba de vácuo (Edwards, modelo RV5), fez-se a eluição da amostra. Na eluição da amostra, através do método de SPE, utilizando-se cartuchos com fase RP-C<sub>18</sub> a 500 mg em tubos com volume de 6 mL de amostra (Thermo Scientific). Posteriormente, a eluição do analitos foi feita com o solvente de dispersão adequado (acetona, 1-propanol ou 2-propanol) e com volumes de 1 mL a 2 mL, sendo o eluato recolhido nos tubos de centrífuga com fundo cónico, onde se irá efectuar o passo de HLLME. Adiciona-se o solvente de extracção (tetracloreto de carbono, tetracloroetileno ou clorofórmio) num dado volume de extracção (15 µL a 100 µL). A adição de de água (5 mL a 10 mL) é feita após a adição do solvente de extracção, causando a turvação da mistura de solventes.

Após a dispersão as fases são separadas por centrifugação durante 6 min, a 4000 rpm (modelo EBA 20, marca Hettich, Bruchsal, Alemanha). A fase sedimentada é removida com uma microseringa de capacidade apropriada (10 µL a 100 µL) e colocada num redutor de volume de 100 µL ou de 300 µL; à fase sedimentada é adicionado um pequeno volume (50 µL a 200 µL) da fase aquosa com a qual estava em equilíbrio de forma a evitar a evaporação do solvente de extracção durante o processo de injeção automática. O redutor de volume é colocado num frasco de 1.5 mL que é imediatamente capsulado e colocado no tabuleiro do injector automático do cromatógrafo, para se proceder à sua análise.

### **3.2.4 Análise cromatográfica**

As condições da análise cromatográfica durante a fase de optimização e de validação deste método, foram as mesmas utilizadas na optimização e validação do método de DLLME no Capítulo II (secção 2.2.6).

### **3.2.5 Amostras Reais**

As amostras reais utilizadas para a validação do método de SPE-HLLME tiveram a mesma origem que as amostras usadas na validação do método de DLLME.

### **3.2.6 Cálculos**

Os cálculos efectuados durante a optimização e validação do método de SPE-HLLME foram feitos de acordo com as equações referidas na parte experimental do Capítulo II (secção 2.2.7).

### **3.3 Resultados e Discussão**

#### **3.3.1 Desenvolvimento e optimização do processo de SPE-HLLME**

A associação entre extracção em fase sólida (SPE) e microextracção líquido – líquido homogénea (HLLME) foi inicialmente testada utilizando o sistema de solventes que se utilizou no método validado no Capítulo II, ou seja, o sistema clorofórmio/2-propanol.

Nesta estratégia de SPE-HLLME o solvente de dispersão do passo de HLLME é o solvente de eluição da etapa de SPE; assim, e dado que a natureza e volume do solvente de dispersão podem influenciar a recuperação dos analitos na etapa de SPE, decidiu-se testar o método de SPE-HLLME utilizando outros sistemas de solventes que também permitiram obter bons factores de enriquecimento em DLLME e cujos solventes de dispersão podem permitir obter uma maior eficiência no passo de SPE.

##### **3.3.1.1 Efeito da variação do volume das amostras de água (clorofórmio/2-propanol)**

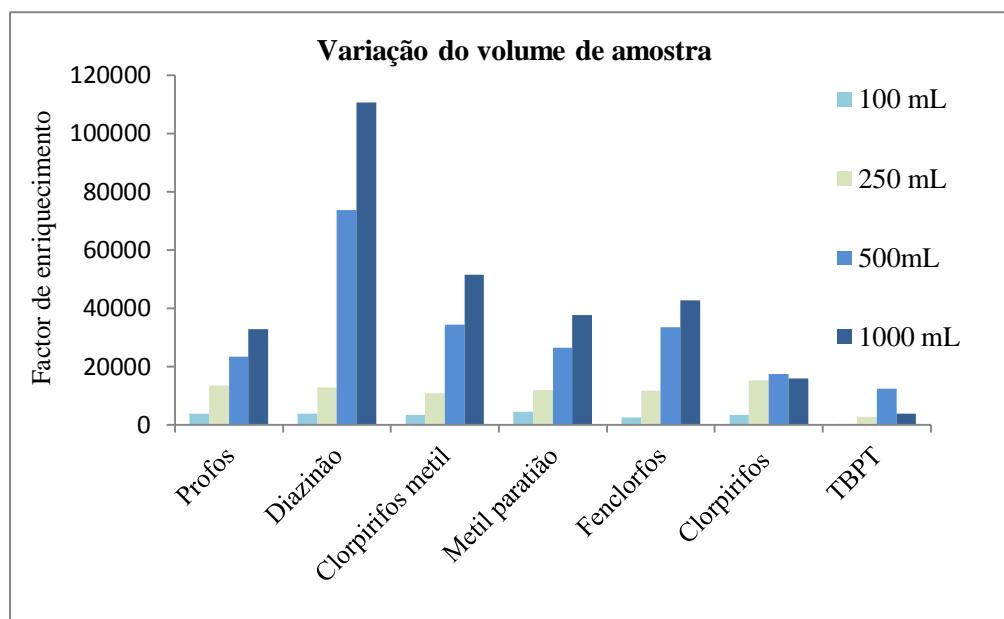
Numa primeira fase da optimização do método de SPE-HLLME, estudou-se o efeito da variação do volume da amostra numa gama de 100 mL a 1000 mL e para uma concentração dos analitos na água de 2 µg/L. O passo de HLLME foi efectuado utilizando o sistema de solventes clorofórmio/2-propanol, nas condições previamente optimizadas.

A extracção em fase sólida foi efectuada utilizando colunas com fase estacionária C<sub>18</sub>, que foram previamente condicionadas. O condicionamento foi feito passando pela coluna e em vácuo, 5 mL dos solventes diclorometano, metanol e água. O aumento de polaridade dos solventes que condicionam a coluna, ajudam a remover as impurezas, caso existam, e a preparar a fase para a etapa de eluição dos analitos.

Após o condicionamento da coluna, foi efectuada a filtração das amostras, sob vácuo, a um fluxo médio de 20 mL/min. De seguida efectuou-se a eluição dos analitos utilizando 1 mL de 2-propanol (solvente de eluição/dispersão), que foi recolhido no tubo de centrífuga onde se vai efectuar o passo de HLLME. Adicionaram-se então ao tubo de centrífuga 50 µL de clorofórmio seguidos de 5 mL de água, após o que se

efectuou a centrifugação das amostras a uma velocidade de 4000 rpm durante 6 minutos.

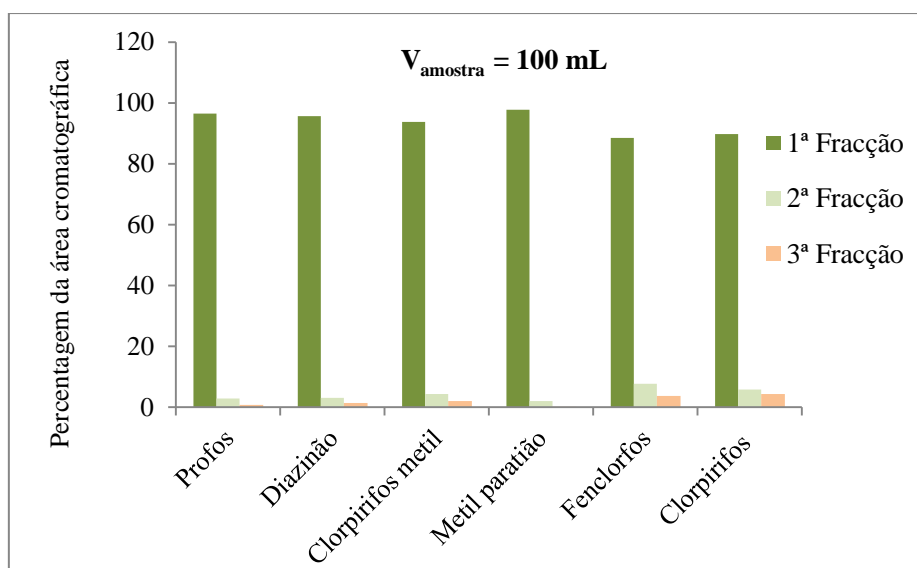
A comparação dos factores de enriquecimento obtidos nesta série de ensaios (Figura 3.1), mostra que, como seria expectável, este parâmetro aumenta com o aumento do volume da amostra, atingindo factores de enriquecimento entre 3754-110596 para um volume de água de 1000 mL. O volume de fase sedimentada, variou entre 15  $\mu$ L e 25  $\mu$ L.



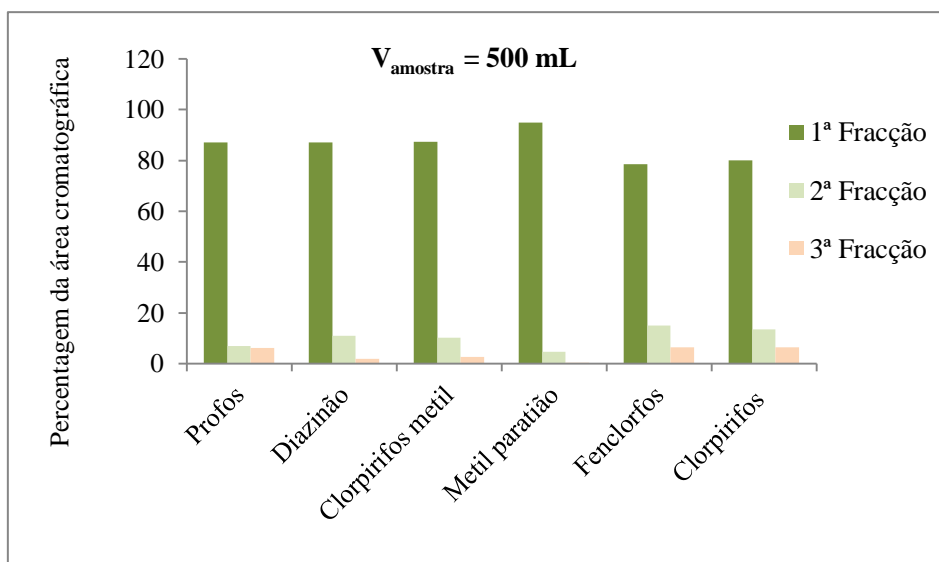
**Figura 3.1-** Efeito da variação do volume de amostra nos factores de enriquecimento.

### 3.3.1.2 Extracção sequencial da mesma amostra

Com intuito de testar se a maior parte dos analitos presentes na coluna de SPE estariam a ser recolhidos no volume de eluente utilizado (1<sup>a</sup> fracção), recolheram-se mais duas fracções com o mesmo volume de eluente (1 mL). Cada fracção recolhida foi submetida a HLLME-GC-MS e determinou-se a área dos picos cromatográficos correspondentes aos vários analitos. Calculou-se então, a percentagem de área cromatográfica de cada fracção, para cada analito, como a razão entre a área do pico cromatográfico de cada fracção e o somatório das áreas obtidas nas três fracções. Os resultados obtidos para os ensaios efectuados com amostras de água com volumes de 100 mL e de 500 mL são apresentados nas Figuras 3.2 e 3.3 respectivamente.



**Figura 3.2** - Percentagem de área cromatográfica obtida para cada analito em três extracções sucessivas de uma amostra de água com 100 mL.



**Figura 3.3** - Percentagem de área cromatográfica obtida para cada analito em três extracções sucessivas de uma amostra de água com 500 mL.

Como se pode observar, tanto para amostras de 100 mL como para amostras de 500 mL, os analitos são maioritariamente extraídos na 1ª fracção, correspondendo a 2ª e 3ª fracções a quantidades inferiores a 10% da quantidade total de analito presente na coluna de SPE. Quando o volume da amostra de água aumenta a percentagem da área cromatográfica da 1ª fracção recolhida diminui, mas continua a ser maioritária; para uma amostra de água com volume de 1000 mL os valores da percentagem de área cromatográfica da 1ª fracção recolhida foram de 65% a 90%. Nos ensaios efectuados

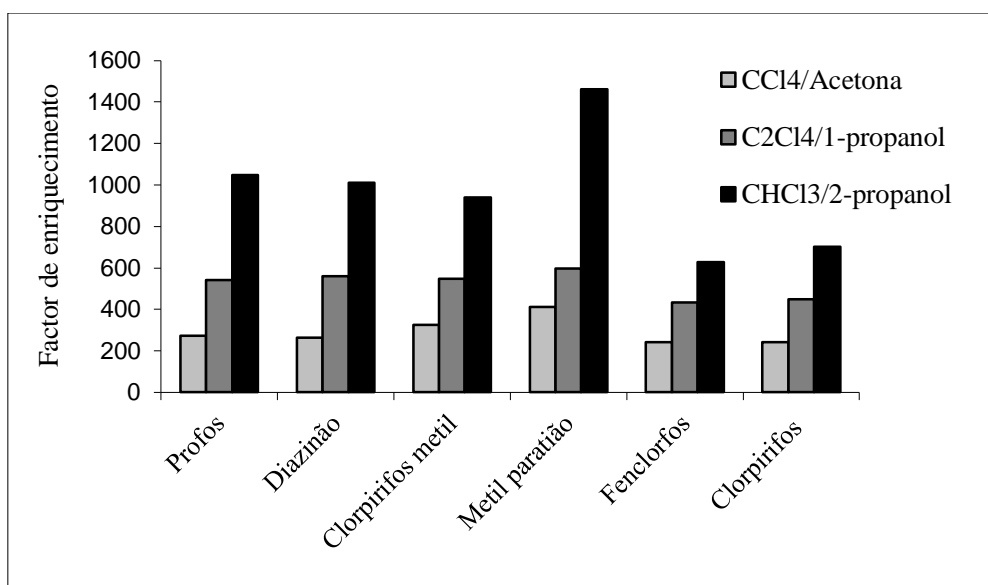
com amostras de água de 250 mL obtiveram-se resultados intermédios relativamente aos obtidos com amostras de 100 mL e de 500 mL.

### **3.3.1.3 Comparação de diferentes sistemas de solventes de extracção/solventes de dispersão**

Os três sistemas de solventes com os quais se tinham obtido bons factores de enriquecimento dos pesticidas organofosforados por DLLME (tetracloreto de carbono/acetona, tetracloroetileno/1-propanol e clorofórmio/ 2-propanol) foram testados em SPE-HLLME.

Como na secção anterior (3.3.1.2), constatou-se que ao fazer a eluição da coluna de SPE com uma segunda fracção de 2-propanol (1 mL), se recuperou ainda uma fracção residual de analitos retidos, posto isto, decidiu-se aumentar o volume de solvente de dispersão a utilizar nestes ensaios para um valor de 2 mL. O volume do solvente de extracção foi ajustado para o valor de 100 µL e o volume de amostra de água foi de 100 mL. A concentração de fortificação foi diminuída para 500 ng/L, uma vez que com 2 µg/L se obtinham extractos tão concentrados que obrigavam a utilização de rectas de calibração em zonas de concentração muito elevadas para GC-MS; por outro lado, uma vez que já era perceptível que este método permitiria atingir limites de detecção e quantificação bastante mais baixos considerou-se adequado prosseguir a optimização dos parâmetros de extracção a uma concentração mais baixa.

Na Figura 3.4 apresentam-se os factores de enriquecimento obtidos para os três sistemas testados. É de notar que, o volume de fase sedimentada foi de 100 µL para os sistemas tetracloroetileno/1-propanol e tetracloreto de carbono/acetona e foi de 50 µL para o sistema clorofórmio/2-propanol. As percentagens de extracção para esta série de ensaios são apresentadas na Tabela 3.2.



**Figura 3.4-** Factores de enriquecimento obtidos com SPE-HLLME utilizando diferentes sistemas de solventes.

Apesar de nas condições testadas se terem obtido volumes elevados de fase sedimentada os factores de enriquecimento foram superiores a 200 para todos os analitos, com os vários solventes testados; para alguns pesticidas atingiram-se factores de enriquecimento superiores a 1000 com o sistema clorofórmio/2-propanol. A eficiência de extracção dos OPPs foi de 31.37% a 73.09% para os sistemas clorofórmio/2-propanol e tetracloroetileno/1-propanol mas ligeiramente mais baixa para o sistema tetracloreto de carbono/acetona.

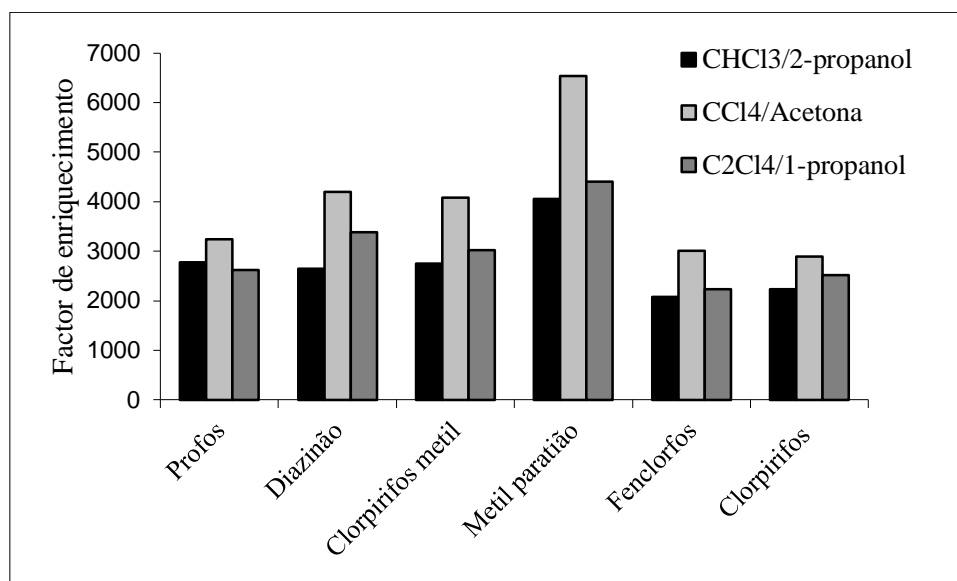
**Tabela 3.2-** Eficiência de extracção (%) dos OPPs por SPE-HLLME-GC-MS com os três sistemas de solventes estudados.

Analitos	CCl <sub>4</sub> /Acetona	C <sub>2</sub> Cl <sub>4</sub> /1-propanol	CHCl <sub>3</sub> /2-propanol
Profos	27.28	54.05	52.39
Diazinão	26.39	55.92	50.55
Clorpirifos metil	32.59	54.70	47.05
Metil paratíão	41.09	59.69	73.09
Fenclorfos	24.22	43.49	31.37
Clorpirifos	24.15	44.78	35.13

### 3.3.1.4 Fixação do volume de fase orgânica sedimentada em 15 $\mu\text{L}$

Para comparar os vários sistemas de solventes numa base normalizada e para reduzir o volume de fase sedimentada obtida de forma a maximizar os factores de enriquecimento decidiu-se ajustar o volume do solvente de extracção de forma a obter um volume sedimentado de cerca de 15  $\mu\text{L}$ . Como se diminuiu o volume dos solventes de extracção decidiu-se efectuar esta série de testes com um volume de solvente de dispersão de 1mL.

Assim o volume ajustado para o tetracloreto de carbono foi de 25  $\mu\text{L}$ , para o tetracloroetileno foi de 20  $\mu\text{L}$  e para o clorofórmio foi de 50  $\mu\text{L}$ . O volume de solvente de dispersão utilizado foi de 1 mL; o volume de amostra de água foi de 100 mL; o nível de fortificação da amostra foi de 500 ng/L. Os factores de enriquecimento obtidos nesta série de ensaios encontram-se representados na Figura 3.5.



**Figura 3.5** - Factores de enriquecimento para um volume de fase sedimentada de 15  $\mu\text{L}$ .

O sistema que permite melhor enriquecimento da fase orgânica é o sistema tetracloreto de carbono/acetona cujos factores de enriquecimento variam entre 2800 e 6600. Deve notar-se a forma como a alteração do volume do solvente de extracção e a sua proporção relativamente ao solvente de dispersão podem alterar a partição dos analitos; o melhor sistema de extracção para um volume de solvente de extracção

constante não foi o mesmo que se identificou nos ensaios com uma fase sedimentada constante.

As percentagens de extracção (Tabela 3.3) foram acima de 50% para todos os analitos, nos três sistemas estudados com valores ligeiramente superiores para o sistema tetracloreto de carbono/acetona.

**Tabela 3.3-** Valores de % Extracção obtidos para os três sistemas estudados considerando um volume de fase sedimentada de 15 µL.

<b>Analitos</b>	<b>CCl<sub>4</sub>/Acetona</b>	<b>C<sub>2</sub>Cl<sub>4</sub>/1-propanol</b>	<b>CHCl<sub>3</sub>/2-propanol</b>
Profos	58.41	41.97	60.95
Diazinão	75.56	54.08	58.28
Clorpirifos metil	73.48	48.35	60.49
Metil paratião	117.65	70.54	89.33
Fenclorfos	54.18	35.67	45.77
Clorpirifos	52.08	40.24	49.11

### **3.3.1.5 Estudo independente de parâmetros de HLLME: volume de solvente de dispersão e do volume de água**

A necessidade de utilizar na etapa de HLLME um volume de solvente de dispersão que seja suficiente para eluir os analitos na etapa de SPE fez com que as condições testadas em SPE-HLLME possam não ser as ideais para a concentração dos analitos na fase orgânica.

Então procurou-se nesta fase de optimização efectuar uma série de ensaios nos quais não se incluiu o passo de SPE, fazendo a fortificação dos analitos directamente no solvente de dispersão. O solvente fortificado foi posteriormente extraído por HLLME de forma análoga ao que se passa no processo de SPE-HLLME completo, de forma a poder avaliar os factores de enriquecimento.

O volume do solvente de dispersão não pode ser muito reduzido (por exemplo até 1 mL) pois verificou-se que com este volume de eluição ainda restavam analitos na coluna de SPE; no entanto decidiu-se testar a situação intermédia ou seja um volume de solvente de dispersão de 1.5 mL. Estes testes foram efectuados para dois volumes

de água (5 mL e 10 mL). Os solventes de dispersão foram fortificados num nível de 500 ng/L. O volume ajustado de tetracloreto de carbono foi de 25 µL, o volume de tetracloroetileno foi de 20 µL e o volume de clorofórmio foi de 50 µL.

Os factores de enriquecimento obtidos com um volume de água de 5 mL são apresentados na Tabela 3.4 e os obtidos com um volume de água de 10 mL são apresentados na Tabela 3.5.

**Tabela 3.4** - Factores de enriquecimento obtidos no estudo de variação do volume de solvente de dispersão, com um volume de água de 5 mL.

Analitos	CHCl <sub>3</sub> (50 µL), 2-propanol		C <sub>2</sub> Cl <sub>4</sub> (20 µL), 1-propanol		CCl <sub>4</sub> (25 µL), Acetona	
	1,5 mL	2 mL	1,5 mL	2 mL	1,5 mL	2 mL
Profos	306	VM	189	135	309	311
Diazinão	266	VM	228	286	359	408
Clorpirifos metil	235	VM	188	163	343	376
Metil paratião	214	VM	N.D	N.D	387	385
Fenclorfos	221	VM	187	147	314	344
Clorpirifos	93	VM	88	N.D	151	274
TBPT	336	VM	164	N.D	N.D	N.D

VM- Volume sedimentado muito baixo; N.D- Não detectado

**Tabela 3.5**- Factores de enriquecimento obtidos no estudo de variação do volume de solvente de dispersão, com um volume de água de 10 mL.

Analitos	CHCl <sub>3</sub> (50 µL), 2-propanol		C <sub>2</sub> Cl <sub>4</sub> (20 µL), 1-propanol		CCl <sub>4</sub> (25 µL), Acetona	
	1,5 mL	2 mL	1,5 mL	2 mL	1,5 mL	2 mL
Profos	N.D	265	458	359	455	464
Diazinão	N.D	262	581	497	661	558
Clorpirifos metil	N.D	243	537	362	545	450
Metil paratião	N.D	202	485	211	N.D	363
Fenclorfos	N.D	273	509	365	511	409
Clorpirifos	N.D	111	446	177	402	313
TBPT	N.D	257	N.D	306	N.D	290

N.D- Não detectado

Quando se utilizou um volume de água de 5 mL, o sistema que produziu melhores factores de enriquecimento foi o sistema tetracloreto de carbono/acetona com um volume de acetona de 2 mL. O mesmo se verificou no caso dos ensaios efectuados com 10 mL de água.

Por outro lado verificou-se que a utilização de um maior volume de água melhorou a partição dos analitos para o sistema tetracloroetileno/1-propanol e para o sistema tetracloreto de carbono/acetona.

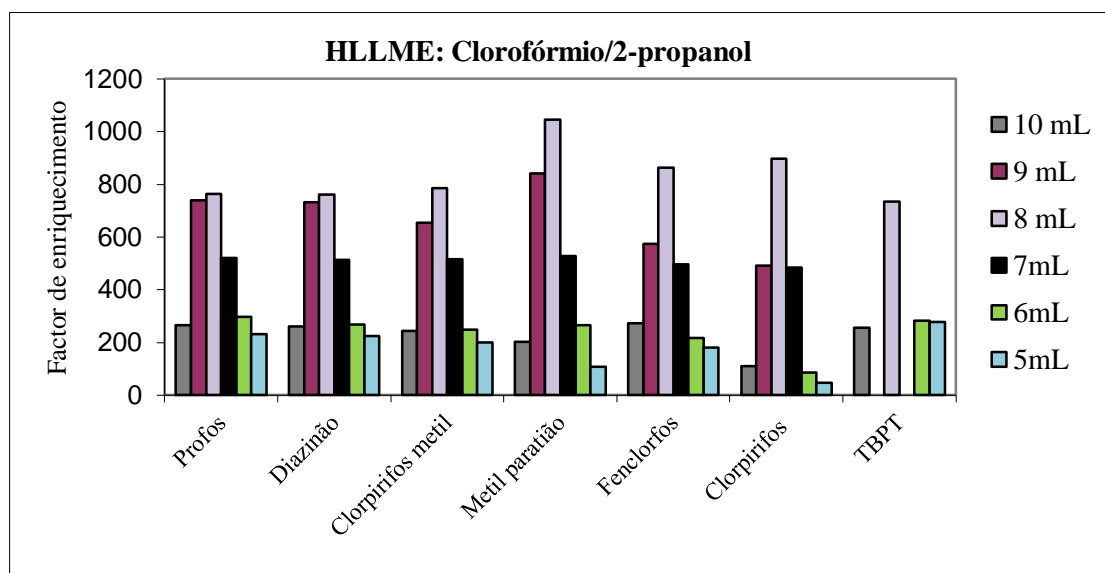
### **3.3.1.6 Estudo da variação do volume de água em HLLME para os sistemas clorofórmio/2-propanol, tetracloroetileno/1-propanol e tetracloreto de carbono/acetona**

Dado que o volume de dispersante utilizado nos ensaios de SPE-HLLME (2 mL), é mais elevado do que o que é habitualmente utilizado em DLLME (0.5 mL a 1 mL), procurou-se investigar se uma alteração no volume de água utilizado no passo de HLLME poderia ter um efeito benéfico na partição dos analitos. Ao aumentar o volume do dispersante sem modificar o volume de água obtêm-se uma fase aquosa com uma maior proporção de solvente orgânico o que pode contribuir para uma maior retenção dos analitos na fase aquosa. Por outro lado, quanto maior for o volume de água maior é a quantidade de solvente de extracção que nela fica retido. Para avaliar o efeito do volume de água com mais pormenor decidiu-se estudar este parâmetro na gama de 5 mL a 9 mL.

Assim efectuou-se uma série de ensaios de HLLME envolvendo os sistemas clorofórmio/2-propanol, tetracloroetileno/1-propanol e tetracloreto de carbono/acetona, nos quais se variou o volume de fase aquosa. O solvente de dispersão foi fortificado com os pesticidas numa concentração de 500 ng/L.

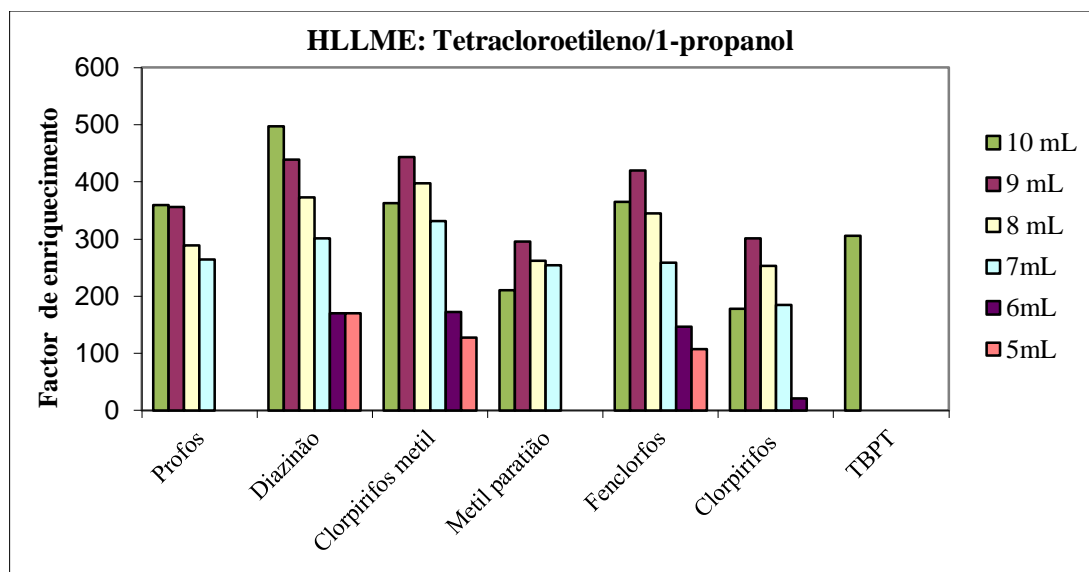
Os volumes dos solventes de extracção foram de 25  $\mu$ L para o tetracloreto de carbono, de 20  $\mu$ L para o tetracloroetileno e de 50  $\mu$ L para o clorofórmio pois foram estes os volumes ajustados previamente para cada solvente, de forma a obter cerca de 15  $\mu$ L de fase sedimentada.

Para o sistema clorofórmio/2-propanol obtiveram-se maiores factores de enriquecimento com um volume de água de 8 mL, seguindo-se os factores de enriquecimento obtidos com 9 mL de água (Figura 3.6).

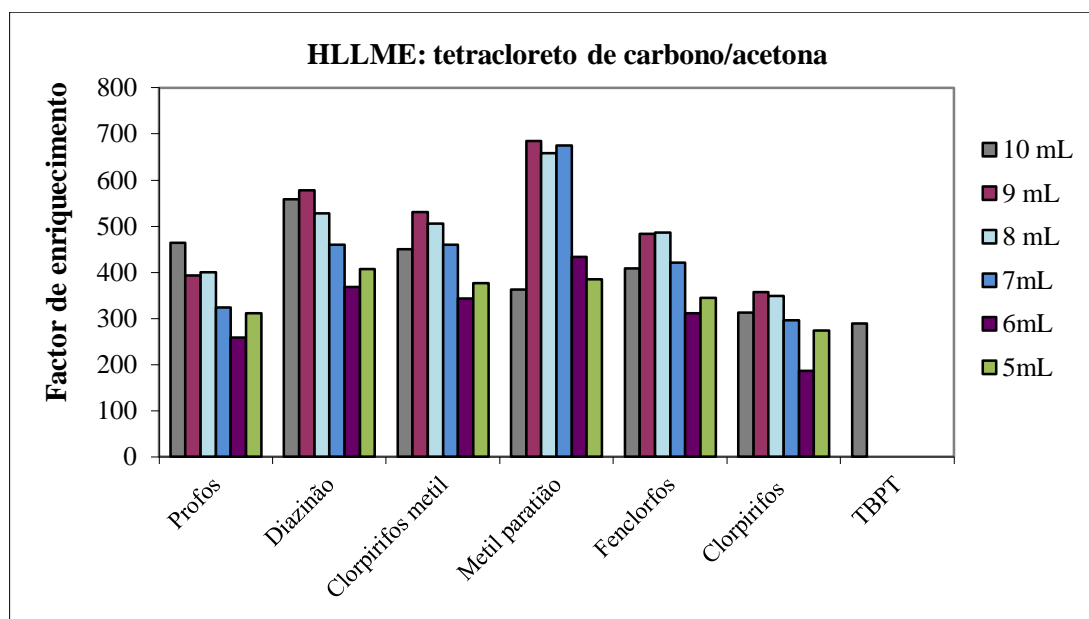


**Figura 3.6** - Variação do volume de fase aquosa em HLLME com o sistema clorofórmio/2-propanol.

Para o sistema tetracloroetileno/1-propanol, obtiveram-se melhores factores de enriquecimento com um volume de água de 10 mL para alguns analitos (profos, diazinão) e com 9 mL de água para outros (clorpirifos metil, metil paratião e clorpirifos). O TBPT só foi detectado quando se utilizaram 10 mL de água, mas o comportamento deste analito é muito irregular passando de um factor de enriquecimento superior a 300 obtido com 10 mL de água para zero quando se utilizaram outros volumes de água (Figura 3.7).



**Figura 3.7** - Variação do volume de fase aquosa em HLLME para o sistema tetracloroetileno/1-propanol.



**Figura 3.8-** Variação do volume de fase aquosa em HLLME para o sistema tetracloreto de carbono/acetona.

Por fim, para o sistema tetracloreto de carbono/acetona, obtiveram-se factores de enriquecimento elevados e próximos entre si, quando se utilizaram volumes de água de 8 mL ou de 9 mL. No caso do pesticida profos, obteve-se um valor de

enriquecimento um pouco mais elevado quando se utilizaram 10 mL de água, e foi também com este volume que foi possível detectar o TBPT (Figura 3.12).

Considerando os resultados obtidos para os diversos sistemas de solventes decidiu-se seleccionar o volume de água de 8 mL que permitiu obter bons factores de enriquecimento para os sistemas tetracloroetileno/1-propanol e tetracloroeto de carbono/acetona e que foi claramente vantajoso no caso do sistema clorofórmio/2-propanol. O TBPT, nem sempre foi detectado com este volume de água, mas o comportamento deste pesticida não é reprodutível e é tão distinto dos restantes que não será considerado no processo de validação.

### **3.3.1.7 Aumento do volume de amostra utilizada em SPE-HLLME com os sistemas clorofórmio/2-propanol, tetracloroetileno/1-propanol e tetracloroeto de carbono/acetona**

O aumento do volume da amostra de água utilizada no passo de SPE aumenta a sensibilidade global do método, mas também aumenta o tempo de filtração na coluna de SPE. Nesta fase de desenvolvimento do método procurou avaliar-se o aumento no factor de enriquecimento que resultaria da duplicação de volume da amostra de água. Amostras de 100 mL e de 200 mL, fortificadas num nível de 500 ng/L, foram filtradas na coluna de SPE e a eluição dos analitos foi feita em ambos os casos com 2 mL de cada um dos solventes de dispersão seleccionados (acetona, 1-propanol e 2-propanol). Os volumes adequados (25 µL, 20 µL e 50 µL) de cada solvente de extracção (tetracloroeto de carbono, tetracloroetileno e clorofórmio) foram adicionados aos respectivos solventes de dispersão. Adicionou-se a cada tubo de extracção 8 mL de água para provocar a dispersão e procedeu-se à centrifugação para separar as fases. Os factores de enriquecimento obtidos em cada um destes ensaios são apresentados na Tabela 3.6 para um volume de amostra de 100 mL e na Tabela 3.8 para um volume de amostra de 200 mL.

**Tabela 3.6-** Factores de enriquecimento e percentagens de extracção para o método SPE-HLLME com um volume de amostra de 100mL.

Analitos	CHCl <sub>3</sub> (50 µL), 2-propanol (2 mL) V <sub>sed</sub> = 8 µL		C <sub>2</sub> Cl <sub>4</sub> (20 µL), 1-propanol (2 mL) V <sub>sed</sub> = 14 µL		CCl <sub>4</sub> (25 µL), Acetona (2 mL) V <sub>sed</sub> = 19 µL	
	E.F.	E (%)	E.F.	E (%)	E.F.	E (%)
Profos	7129	53,9	4187	58,5	1860	27,9
Diazinão	6703	50,7	5742	80,4	3403	51,1
Clorpirifos metil	4380	33,3	4256	59,8	3034	45,5
Metil paratião	6243	47,6	5950	83,5	3257	48,9
Fenclorfos	2893	21,9	2426	34,3	2506	37,6
Clorpirifos	3106	23,5	2560	36,0	2621	39,3
TBPT	2015	15,9	1717	25,7	1624	24,4

**Tabela 3.7-** Factores de enriquecimento e percentagens de extracção para o método SPE-HLLME com um volume de amostra de 200mL.

Analitos	CHCl <sub>3</sub> (50 µL), 2-propanol (2 mL) V <sub>sed</sub> = 7 µL		C <sub>2</sub> Cl <sub>4</sub> (20 µL), 1-propanol (2 mL) V <sub>sed</sub> = 18 µL		CCl <sub>4</sub> (25 µL), Acetona (2 mL) V <sub>sed</sub> = 17 µL	
	E.F.	E (%)	E.F.	E (%)	E.F.	E (%)
Profos	12552	43,9	5377	48,4	6444	54,8
Diazinão	11816	41,4	9083	81,7	11392	96,8
Clorpirifos metil	10229	35,8	9495	85,5	11190	95,1
Metil paratião	13118	45,9	10005	90,0	12649	107,5
Fenclorfos	8630	30,2	8419	75,8	9831	83,6
Clorpirifos	8836	30,9	8738	78,6	10746	91,3
TBPT	3974	13,9	N.D	N.D	3778	32,1

N.D- Não Detectado

Como se pode observar nas Tabelas 3.6 e 3.7, quando se utilizaram amostras de água com 200 mL obtiveram-se factores de enriquecimento superiores aos obtidos para um volume de amostra de 100 mL. Estes factores situaram-se acima de 5000 para muitas das condições e para alguns analitos estes valores chegaram a atingir os 10000.

Assim é possível concluir, que os dois melhores sistemas de extracção/dispersão são os sistemas clorofórmio/2-propanol e tetracloreto de carbono/acetona cujos factores de enriquecimento são mais elevados do que os factores calculados para o sistema tetracloroetileno/1-propanol, e nestes dois sistemas conseguem-se detectar todos os analitos. Além disso, no sistema tetracloroetileno/1-propanol ocorreu a formação de

emulsões em muitos dos ensaios realizados o que dificulta a medição do volume sedimentado, e conseqüentemente a concentração que é medida.

O sistema clorofórmio/2-propanol apresentou factores de enriquecimento comparáveis aos obtidos no sistema tetracloreto de carbono/acetona mas com percentagens de extracção inferiores a 50%.

Assim foi seleccionado para os ensaios subsequentes o sistema tetracloreto de carbono/acetona que além de exhibir factores de enriquecimento elevados, também apresentou boas percentagens de extracção, acima de 90% para a maior parte dos analitos.

### **3.3.1.8 Redução do volume de tetracloreto de carbono no passo de HLLME**

Após selecção do sistema tetracloreto de carbono/acetona tentou-se efectuar uma redução adicional do volume de solvente e conseqüentemente do volume de fase sedimentada de forma a atingir factores de enriquecimento mais elevados. Numa de série de ensaios efectuados com amostras de água de 200 mL, fortificadas num nível de concentração de 500 ng/L, utilizaram-se volumes de tetracloreto de carbono de 25 µL, 20 µL e 15 µL; não é possível testar valores inferiores a 15 µL pois nessas condições deixa de ocorrer separação de fases. Utilizando estes volumes de tetracloreto de carbono obtiveram-se volumes da fase sedimentada entre 17 µL e 7 µL e registou-se um aumento significativo dos factores de enriquecimento (Tabela 3.8). O volume de acetona utilizado no passo de HLLME foi de 2 mL e a dispersão foi induzida pela adição de 8 mL de água.

Apesar de 7 µL ser um volume de fase sedimentada muito baixo está acima do limite de 5 µL que previamente estabelecemos para garantir que é possível transferir quantitativamente a fase orgânica e analisá-la no injector automático de GC.

**Tabela 3.8-** Factores de enriquecimento em SPE-HLLME para o sistema CCl<sub>4</sub>/acetona utilizando diferentes volumes de tetracloreto de carbono.

Analitos	Factor de Enriquecimento		
	V <sub>CCl<sub>4</sub></sub> = 25 µL	V <sub>CCl<sub>4</sub></sub> = 20 µL	V <sub>CCl<sub>4</sub></sub> = 15 µL
Profos	6444	8155	7194
Diazinão	11392	13136	18487
Clorpirifos metil	11190	10451	19272
Metil paratião	12649	17273	20076
Fenclorfos	9831	5872	14778
Clorpirifos	10746	6075	16326
TBPT	3778	N.D	3709

N.D- Não Detectado

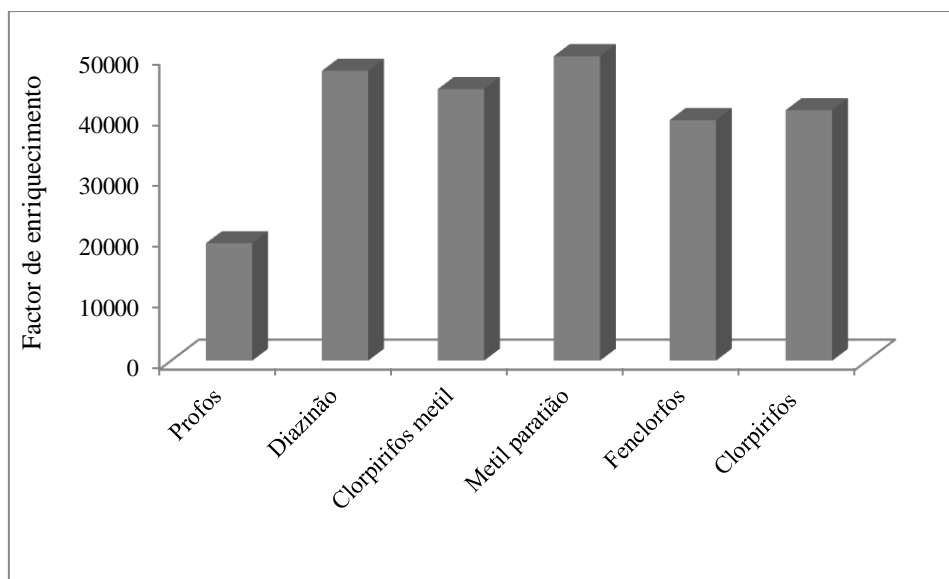
V<sub>CCl<sub>4</sub></sub> – Volume de tetracloreto de carbono

### 3.3.1.9 Aumento do volume de amostra no passo de SPE

Face aos resultados anteriores, o sistema tetracloreto de carbono/acetona com os volumes de 15 µL e 2 mL, respectivamente serão utilizados para a validação do método de SPE-HLLME para a detecção dos pesticidas organofosforados em águas.

Apesar dos bons factores de enriquecimento obtidos até esta fase de optimização, verificou-se que alguns dos analitos ainda não eram detectados na gama baixa dos ng/L; assim decidiu-se efectuar uma modificação adicional do volume da amostra para tentar atingir essa gama.

Assim efectuaram-se ensaios de SPE-HLLME utilizando 500 mL de amostra e as condições de HLLME previamente optimizadas para o volume de 200 mL. O nível de fortificação foi reduzido neste ensaio para 100 ng/L para melhor se adequar à gama de concentrações que se pretendia atingir.



**Figura 3.9-** Factores de enriquecimento para os pesticidas com um volume de amostra de 500 mL e uma concentração de fortificação de 100 ng/L.

Obtiveram-se nestas condições factores de enriquecimento entre 20000 e 50000 para os vários pesticidas (excluindo o TBPT). Com este método otimizado é pois possível determinar os pesticidas organofosforados a níveis inferiores ao limite máximo admissível em águas de consumo (100 ng/L) pelo que se passou a efectuar a respectiva validação.

### **3.3.2 Validação do método de SPE-HLLME-GC-MS para a determinação de pesticidas organofosforados em águas**

#### **3.3.2.1 Estudo da linearidade e gama de trabalho**

A gama de trabalho foi seleccionada tendo em conta os factores de enriquecimento obtidos anteriormente para amostras de água com 500 mL; por outro lado, optou-se por escolher uma gama de concentrações situada abaixo de 100 ng/L (valor limite da legislação para detecção de pesticidas em águas de consumo). Assim estabeleceu-se uma gama de trabalho situada entre 10 ng/L e 100 ng/L e traçaram-se rectas de calibração para cada analito, com cinco pontos homogeneamente distribuídos nesta gama. A Tabela 3.10 mostra os coeficientes de determinação que se situam acima de 0.99, excepto para o metil paratião cujo valor se situa um pouco mais abaixo.

Apresentam-se também na Tabela 3.9 os limites de detecção e de quantificação calculados através das rectas de calibração e através da razão sinal/ruído.

Os LODs e os LOQs calculados pela razão sinal ruído estão na gama dos pg/L, com excepção do LOQ do metil paratião que foi de 1.04 ng/L. Como já se referiu estes limiares analíticos são subavaliados pois a razão sinal/ruído não varia linearmente com a concentração, mas são inferiores à concentração mais baixa da gama de trabalho. Tanto os limites de detecção como os de quantificação calculados a partir das rectas, situam-se acima da primeira concentração da gama de trabalho, excepto para o diazinão, para o fenclorfos e para o clorpirifos cujos valores de LOD se situam abaixo de 10 ng/L. Estes valores também não se confirmam experimentalmente pois todos os analitos foram detectados inequivocamente no padrão de 10 ng/L, demonstrando que os seus LODs são necessariamente inferiores a 10 ng/L e os seus LOQs poderão também situar-se abaixo deste valor. Os coeficientes de variação do método foram mais baixos que 10%, com valores entre 4.02% e 7.58% para todos os analitos, com excepção do metil paratião cujo valor deste parâmetro ficou um pouco acima de 10%.

**Tabela 3.9** - Parâmetros de validação do método de SPE-HLLME-GC-MS optimizado.

Analitos	Gama de trabalho (ng/L)	Coefficiente de correlação, R <sup>2</sup>	CV <sub>m</sub> (%)	LOD <sub>cal</sub> (ng/L)	LOD <sub>S/N</sub> (ng/L)	LOQ <sub>cal</sub> (ng/L)	LOQ <sub>S/N</sub> (ng/L)
Profos	10-100	0.996	6.95	10.8	0.26	36.2	0.85
Diazinão	10-100	0.998	5.03	7.8	0.06	26.1	0.22
Clorpirifos metil	10-100	0.995	7.58	11.8	0.04	39.5	0.15
Metil paratião	10-100	0.986	13.72	21.4	0.31	71.4	1.04
Fenclorfos	10-100	0.998	4.04	6.3	0.06	21.0	0.18
Clorpirifos	10-100	0.998	4.02	6.2	0.11	20.9	0.39

CV<sub>m</sub>- Coeficiente de variação do método; LOD<sub>cal</sub> – Limite de detecção calculado a partir da curva de calibração; LOQ<sub>cal</sub> – Limite de quantificação calculado a partir da curva de calibração; LOD<sub>S/N</sub> – Limite de detecção estimado a partir de 3x da razão S/N; LOQ<sub>S/N</sub> – Limite de quantificação estimado a partir de 10x da razão S/N

### 3.3.2.2 Precisão do método analítico: análise da Repetibilidade

Para analisar a precisão do método de SPE-HLLME-GC-MS estudou-se o parâmetro da repetibilidade na concentração de 100 ng/L que é precisamente o valor limite da legislação para a detecção de pesticidas em águas de consumo. Efectuaram-se cinco replicadas do processo de SPE-HLLME nesta concentração, nas mesmas condições anteriormente optimizadas e determinou-se a concentração dos analitos nos extractos obtidos. A precisão foi avaliada como o desvio padrão relativo da concentração calculada pelas rectas de calibração (Tabela 3.19). O método demonstrou ter uma boa precisão (< 10%) para os vários analitos excepto o profos e o diazinão com valores ligeiramente superiores.

**Tabela 3.10-** Precisão do método de SPE-HLLME-GC-MS.

Analitos	Precisão (R.S.D %), n=5
	Nível de fortificação = 100 ng/L
Profos	11.6
Diazinão	11.4
Clorpirifos metil	7.1
Metil paratião	8.7
Fenclorfos	8.5
Clorpirifos	8.9

R.S.D. – Desvio Padrão Relativo

### 3.3.2.3 Ensaio de recuperação em amostras reais

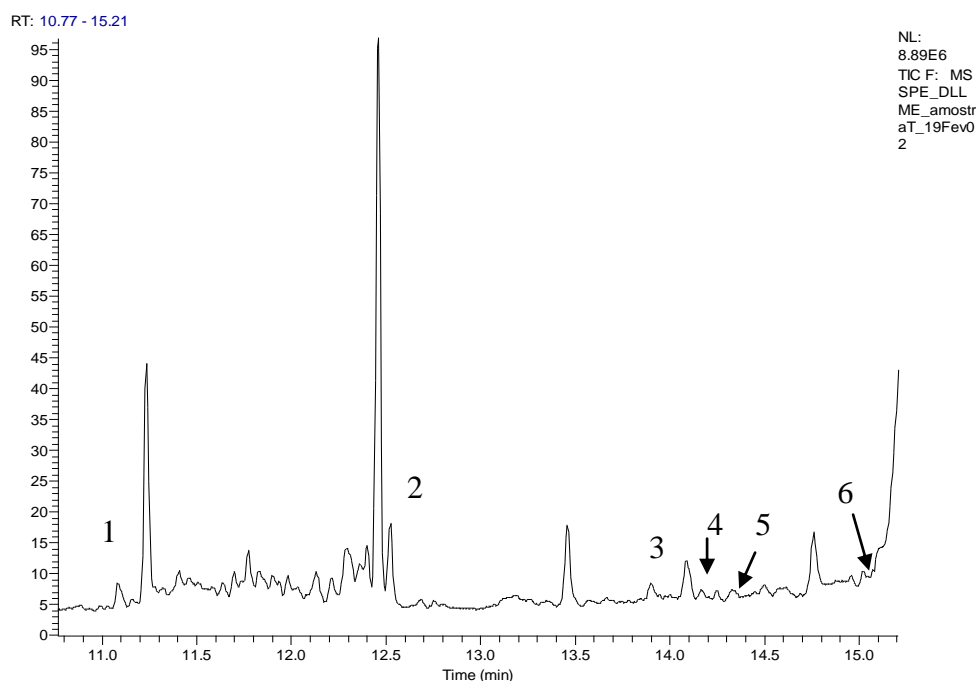
Para verificar a precisão do método de SPE-HLLME em amostras reais, efectuaram-se ensaios de recuperação dos analitos em três amostras de águas destinadas a consumo humano (água da rede de distribuição pública, água de rega e água de poço). As amostras foram fortificadas com a mistura dos pesticidas organofosforados a um nível de concentração de 100 ng/L e extraídas por SPE-HLLME sendo os correspondentes extractos analisados por GC-MS. O perfil cromatográfico (corrente iónica total) obtido, para a água da torneira é apresentada na Figura 3.10. As recuperações relativas são apresentadas na Tabela 3.11. Estas recuperações, são apresentadas a título de exemplo pois não foi possível efectuar replicadas desta

determinação. Ainda assim pode observar-se um efeito de matriz mais acentuado no caso da água do poço e da água da torneira.

**Tabela 3.11** - Ensaio de recuperação do método de SPE-HLLME aplicado a amostras reais de água de rega e de consumo.

Analitos	R.R (%)		
	Água da Torneira	Água de rega	Água de Poço
Profos	101.44	70.02	178.87
Diazinão	52.53	75.47	256.94
Clorpirifos metil	52.39	79.59	219.90
Metil paratião	67.59	88.31	120.74
Fenclorfos	30.91	90.61	227.86
Clorpirifos	37.99	95.57	102.53

O cromatograma do varrimento completo para a amostra de água da torneira encontra-se abaixo indicado para a amostra de água da torneira.



**Figura 3.10-** Cromatograma da extração dos pesticidas a partir de uma amostra da água da torneira utilizando o método de SPE-HLLME-GC-MS.

Identificação dos picos cromatográficos: 1-Profos; 2-Diazinão; 3-Clorpirifos metil; 4-Metil paratião; 5-Fenclorfos; 6-Clorpirifos

## Capítulo IV

### Conclusões e Perspectivas para o Futuro

Após a optimização de diversos parâmetros do método de microextracção líquido-líquido dispersiva, concluiu-se que o sistema de solventes de extracção/dispersão que permitia extrair os pesticidas, com maior eficiência da fase aquosa, foi o sistema clorofórmio/2-propanol com os volumes de extracção de 50  $\mu$ L e 1 mL de volume de 2-propanol. Nas condições seleccionadas, este foi o sistema que ao longo do trabalho, apresentou boa reprodutibilidade e um volume de fase sedimentada que possibilitou a automatização do processo, minimizando os erros de injeção de volume e de reprodutibilidade que pudessem daí advir.

Este método permitiu determinar seis pesticidas organofosforados no nível de 100 ng/L (limite máximo admissível para águas de consumo), num tempo de preparação de amostra inferior a 15 minutos e com um consumo mínimo de solventes orgânicos.

No estudo da determinação de pesticidas organofosforados por DLLME utilizando solventes não-halogenados obtiveram-se factores de enriquecimento inferiores aos obtidos com solventes halogenados, mas ainda assim atingiram-se valores suficientemente elevados para demonstrar o elevado potencial da utilização destes solventes em posteriores ensaios de DLLME.

Por outro lado obtiveram-se eficiências de extracção mais homogéneas para os vários pesticidas testados, em particular conseguiu-se com estes solventes efectuar a extracção do pesticida TBPT de forma reprodutível e com bons factores de enriquecimento.

A utilização destes solventes em DLLME não está descrita na literatura pelo que os resultados obtidos neste trabalho abrem novas perspectivas de substituição dos solventes halogenados em microextracção líquido-líquido.

O método de DLLME-GC-MS optimizado para a extracção dos pesticidas organofosforados, foi proposto para validação, demonstrando um bom desempenho analítico na gama de concentrações de 100 ng/L a 1500 ng/L. Nomeadamente, este método apresentou limites de detecção entre 36 ng/L a 90 ng/L situando-se abaixo da

legislação definida para águas superficiais destinadas a consumo humano, cujo limite se situa na concentração de 100 ng/L. No entanto, para um dos analitos, o TBPT, este limite não foi a baixo de 155 ng/L, situando-se acima do limite legislado. Ainda assim, e tendo em conta eventuais dificuldades de detecção originadas pela oxidação deste analito em matrizes aquosas e quando este se encontra em contacto com o ar, foi possível quantificá-lo para uma concentração de 518 ng/L.

Para os restantes analitos, os limites de quantificação situaram-se entre 120 ng/L e 518 ng/L, estando estas concentrações acima da primeira concentração da gama de trabalho. Contudo, e comparando estes valores com valores dos limites de detecção e de quantificação usualmente calculados em toda a literatura, através da razão sinal/ruído, verificou-se que na realidade os LODs e LOQs calculados através da recta de calibração são calculados por defeito, pois injectando um padrão abaixo do valor limite estipulado (limite de detecção), é possível detectarem-se ainda os analitos em estudo.

No entanto, os limiares analíticos calculados a partir da razão sinal/ruído apresentaram valores bastante inferiores (limites de detecção entre 1.5 ng/L e 9.1 ng/L e limites de quantificação entre 5.1 ng/L e 30.3 ng/L) que estão claramente abaixo da primeira concentração da gama de trabalho para todos os analitos, excepto para o TBPT, demonstrando que estes limiares analíticos são sobre-estimados em relação aos LODs e LOQs calculados a partir das rectas de calibração.

A reprodutibilidade foi testada em três concentrações da gama de trabalho, ou seja, numa concentração baixa (100 ng/L), numa concentração intermédia (500 ng/L) e numa concentração da gama alta (1000 ng/L), mostrando valores de R.S.D entre 7.5 % e 10.3 %, entre 7.6 % a 12.6 % e entre 6.5 % a 9.8 %, respectivamente. Estes dados confirmam que existiu precisão do método de extracção dos pesticidas organofosforados de matrizes aquosas.

As recuperações relativas obtidas para as amostras reais, mostraram valores entre 46% a 129% para a água da torneira, em que se demonstra que existe efeito de matriz, pois o TBPT não é detectado, e alguns dos analitos apresentam valores acima de 100%.

Os testes realizados, nomeadamente o teste de RIKILT e o teste das áreas normalizadas demonstram que existe um bom ajuste linear das concentrações definidas da gama de trabalho cujo limite devia estar compreendido entre 90% e 110%. Este limite foi cumprido para ambos os testes, excepto para o clorpirifos e para o metil

paratião, onde há a recomendação de ajustar a gama de trabalho eliminando a concentração cujo valor de  $y_i/x_i$  se situa em 78% e 74%, respectivamente.

No teste de análise de resíduos, demonstra-se que existe boa linearidade dos pontos ajustados às rectas de calibração, para a maioria dos pontos definidos.

Também o teste de Mandel, descreve que existe boa correlação entre os valores estimados através da função de Fisher e os valores teste calculados a partir das rectas de calibração.

No estudo da optimização do método de SPE-HLLME é importante salientar os resultados deste trabalho constituem a 2ª aplicação deste método a pesticidas e a 1ª aplicação desta metodologia a pesticidas organofosforados.

Pretendeu-se nesta parte do trabalho desenvolver este método, optimizando alguns parâmetros como o volume dos solventes de extracção e de dispersão, o volume de água adicionado ao extracto após o SPE e a variação do volume de amostra. Com a optimização destes parâmetros concluiu-se que as condições óptimas de extracção dos pesticidas de matrizes aquosas se atingiram utilizando um volume de amostra de 500 mL, usando o tetracloreto de carbono como solvente de extracção e a acetona como solvente de dispersão, para os volumes de 25  $\mu$ L e 2 mL, respectivamente.

Com 500 mL de volume de amostra, conseguiram-se obter factores de enriquecimento acima de 10000, demonstrando que este método conseguiria chegar a limites de detecção e de quantificação na gama de concentrações de pg/L. Nesta associação do SPE ao HLLME foi possível efectuar a eluição dos pesticidas num pequeno volume de eluente (cerca de 1 a 2 mL) e não foi necessário recorrer à secagem da fase estacionária de SPE, pois de seguida ocorre o passo de HLLME que envolve adição do solvente de extracção e de água. Neste passo, ocorre nova concentração dos analitos num pequeno volume de fase orgânica que é passível de ser injectado automaticamente em GC.

Deste modo, os limites de detecção deste método situaram-se entre 40 pg/L e 310 pg/L e os limites de quantificação ficaram entre 150 pg/L a 1040 pg/L, mostrando que estes limites se encontram abaixo da concentração mais baixa da gama de trabalho e da concentração limite estabelecida na legislação.

Nos testes de reprodutibilidade feitos na concentração de 100 ng/L, demonstrou-se que o método é reprodutível pois obtiveram-se valores de R.S.D entre 7.1% e 11.6%. As recuperações relativas estudadas em amostras reais de águas de superfície e subterrâneas situaram-se entre 30.9% e 101.4%, para uma concentração de fortificação de 100 ng/L, demonstrando que existe precisão do método de SPE-HLLME nas condições estabelecidas.

---

## Bibliografia

1. Reunião Informal dos Ministros do Ambiente da União Europeia, Escassez de Água e Seca; 31.08.2007.
2. Machado A. A.C.S., “A água na Terra (I): A importância da água no funcionamento do planeta”; *Revista indústria da água*; 1º trimestre (1994).
3. Decreto-Lei n.º 226-A/2007, Diário da República n.º 105, Série I-A, 31.05.2007.
4. Machado M.D.S.F., “*Uso Sustentável da Água: Actividades Experimentais para a Promoção e Educação Ambiental no Ensino Básico*”; Tese de Mestrado; Universidade do Minho (2006) 58-103.
5. Henriques M.L.G.S., “*Hormonas Naturais e de Síntese, Bisfenol A, Octifenol e Nonilfenol em Águas para Consumo Humano: Optimização do Método de Análise por SPE-LC-ESI-MS/MS*”, Tese de Mestrado, Faculdade de Farmácia (2008) 1-158.
6. W.H.O (World Health Organization),” Guidelines for Drinking Water Quality”, Chemical Aspects, 2ª Ed., Génève (1993) 145-196.
7. Havelaar J.M. Melse; “Quantifying public health risk in the WHO Guidelines for Drinking-Water Quality”; RIVM report n.º 734301022/2003, 2003, 2-49.
8. W.H.O,” Guidelines for Drinking-Water Quality”, Volume 1 (“Recommendations”), 3ª Ed, Génève (2006).
9. Portaria n.º 209/2004, Diário da República, Série I, 3.03.2004.
10. W.H.O, “Water supply for rural areas and small communities”, N.º 42, Volume 3 (1959).
11. Ministério do Ambiente e do Ornamento do Território, Instituto da Água; Programa nacional para o uso eficiente da água (2001) 1-9.
12. Decreto-Lei n.º 178/2006, Diário da República, 1ª Série, N.º 171, 6526, 5.09.2006.
13. Directiva 2008/98/CE do Parlamento Europeu e do Conselho, Jornal Oficial da União Europeia, L 312/3, 22.11.2008.
14. Decreto-Lei n.º 149/2004, Diário da República, Série I-A, N.º 145, 22.06.2004.
15. Decreto-Lei n.º 236/98, Diário da República- I Série A, N.º 176, 1-8-1998, p. 3676.
16. Directiva 91/271/CEE do Parlamento Europeu e do Conselho, Jornal Oficial da União Europeia, L135, 21.05.1991.
17. Decreto-Lei n.º 198/2008, Diário da República, Série I-A, N.º 195, 7130, 08.10.2008.

---

**18.** Comissão de Coordenação e de Desenvolvimento Regional de Lisboa e Vale do Tejo; Tramitação da Licença de Descarga de Águas Residuais, (2005).

**19.** Directiva 91/414/EEC do Parlamento Europeu e do Conselho de 15 de Julho de 1991, relativa aos locais de armazenamento dos pesticidas, *Jornal Oficial das Comunidades Europeias*, L 230, 19.8.1991.

**20.** Decreto-Lei N.º 306/2007, Diário da República, Série I, N.º 164, 5747, 27-08-2007.

**21.** Ware George W., W.H. Freeman, *Pesticides: theory and application*, W.H. Freeman & Company, (1983).

**22.** Portal da União Europeia, [http://europa.eu/index\\_pt.htm](http://europa.eu/index_pt.htm).

**23.** Abakerli R. B., E. F. Fay, P. Rembischevski; A.M., K. Godoy, A.A. Maximiano, A. Bonifácio; “Regras para nomenclatura dos nomes comuns dos agrotóxicos”; Pesticidas”, *R. Ecotoxicol. e Meio Ambiente*, 13 (2003) 29-36.

**24.** Ministério da Agricultura do Desenvolvimento Rural e das Pescas, Pesticidas a pesquisar em 2009 em águas para consumo humano (2008).

**25.** Instituto Regulador de Águas e Resíduos; Controlo Operacional em Sistemas Públicos de Abastecimento (2007) 11-35.

**26.** Directiva 98/83/CE do Parlamento Europeu e do Conselho de 3 de Novembro de 1998, relativa à qualidade da água destinada ao consumo humano, *Jornal Oficial das Comunidades Europeias*, L 330/32, 5.12.98.

**27.** Decisão N.º 2455/2001/CE do parlamento Europeu e do Conselho, que estabelece a lista das substâncias prioritárias no domínio da política da água, *Jornal Oficial das Comunidades Europeias*, L 331/1, 15.12.2001.

**28.** Directiva 2000/60/CE do parlamento Europeu e do Conselho de 23 de Outubro de 2000, que estabelece um quadro de acção comunitária no domínio da política da água, *Jornal Oficial das Comunidades Europeias*, L 327/1, 22.12.2000.

**29.** Directiva 2008/105/CE do parlamento Europeu e do Conselho, *Jornal Oficial da União Europeia*, L 348/84, 24.12.2008.

- 
- 30.** Directiva 2006/118/CE do Parlamento Europeu e do Conselho de 12 de Dezembro de 2006 relativa à protecção das águas subterrâneas contra a poluição e a deterioração, *Jornal Oficial da União Europeia*, L 372/19, 27.12.2006.
- 31.** Decreto-lei n.º 46/94, Diário da República N.º 44, Série I-A, 22.02.1994.
- 32.** L.M.L. Nolett, *Food Analysis by HPLC*, Marcel Dekker Inc., 2ª Ed., (2000).
- 33.** Guillot, S., M.T. Kelly, H. Fenet, M. Larroque “Evaluation of solid-phase microextraction as an alternative to the official method for the analysis of organic micro-pollutants in drinking water” *Journal of Chromatography A*, 1101 (2006) 46–52.
- 34.** Barrionuevo, W. R., F.M. Lanças “Comparison of Liquid–Liquid Extraction (LLE), Solid-Phase Extraction (SPE), and Solid-Phase Microextraction (SPME) for Pyrethroid Pesticides Analysis from Enriched River Water” *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 69 (2002) 123–128
- 35.** Frank, T. C., L. Dahuron, B.S. Holden, W. D. Price, A. F. Seibert, L. C. Wilson Eds, *Perry’s chemical engineer’s handbook*, 8th Edition, McGraw-Hill, (2008).
- 36.** J. R. Dean, *Extraction methods for environmental analysis*, Wiley, (1998).
- 37.** Portal da Sigma Aldrich: <http://www.sigmaaldrich.com/>
- 38.** Kuster, M., M. J. López de Alda, C. Barata, D. Raldúa, D. Barceló “Analysis of 17 polar to semi-polar pesticides in the Ebro river delta during the main growing season of rice by automated on-line solid-phase extraction-liquid chromatography–tandem mass spectrometry” *Talanta*, 75 (2008) 390-401.
- 39.** Ahmadi, F., A. A.r Shahsavari, M. Rahimi-Nasrabadi “Automated extraction and preconcentration of multiresidue of pesticides on a micro-solid-phase extraction system based on polypyrrole as sorbent and off-line monitoring by gas chromatography–flame ionization detection” *Journal of Chromatography A*, 1193 (2008) 26–31.
- 40.** Chanbasha Basheer , Anass Ali Alnedhary, B.S. Madhava Rao Hian Kee Leea, “Determination of carbamate pesticides using micro-solid-phase extraction combined with high-performance liquid chromatography” *Journal of Chromatography A*, 1216, Issue 2, (2009) 211-216.
- 41.** Wang, S., P. Zhao, G. Min, G. Fang “Multi-residue determination of pesticides in water using multi walled carbon nanotubes solid-phase extraction and gas chromatography–mass spectrometry” *Journal of Chromatography A*, 1165 (2007) 166–171.
- 42.** Faria, AM, L. Maldaner, CC Santana, IC Jardim, CH Collins. “Poly(methyltetradecylsiloxane) immobilized onto silica for extraction of multiclass pesticides from surface waters” *Analytica Chimica Acta*, 582, (2007) 34-40.
- 43.** J. Pawliszyn, *Solid Phase Microextraction: Theory and Practice*, Wiley-VCH, (1997).

- 
44. SPME mode, Portal da Brechbühler AG, <http://www.brechbuehler.ch/SPME-Mode.204.0.html>
45. SPME fibers and Holders, Portal da Sigma-Aldrich, <http://www.sigmaaldrich.com/analytical-chromatography/analytical-products.html?TablePage=9645336>
46. S. Anne, O. Briand, S. Morville, P. Mirabel, M. Millet, “Analysis of trace levels of pesticides in rainwater by SPME and GC-tandem mass spectrometry after derivatisation with PFFBr” *Anal. Bioanal. Chem.*, 387 (2007) 359–368.
47. D. Chunzhou, Z. Zengb, M. Yanga, “Determination of organochlorine pesticides and their derivations in water after HS-SPME using polymethylphenylvinylsiloxane-coated fiber by GC-ECD” *Water Research*, 39 (2005) 4204–4210.
48. Twister – Stir bar sorptive extraction, Portal da Gerstel, <http://www.gerstel.com/en/twister-stir-bar-sorptive-extraction.htm>
49. Sánchez-Avila J., J. Quintana, F. Ventura, R. Tauler, C. M. Duarte, S. Lacorte, “Stir bar sorptive extraction-thermal desorption-gas chromatography–mass spectrometry: An effective tool for determining persistent organic pollutants and nonylphenol in coastal waters in compliance with existing Directives” *Marine Pollution Bulletin*, 60 (2010) 103–112.
50. Huang X., J. Lina, D. Yuana, R. Hu, “Determination of steroid sex hormones in wastewater by stir bar sorptive extraction based on poly(vinylpyridine-ethylene dimethacrylate) monolithic material and liquid chromatographic analysis” *Journal of Chromatography A*, 1216 (2009) 3508–3511.
51. Lambropoulou D. A., T.S. A. Albanis, “Liquid-phase micro-extraction techniques in pesticide residue analysis” *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*, 70 (2007) 195–228.
52. Leea J., H. K. Leea, K. E. Rasmussenb, S. Pedersen-Bjergaard, “Environmental and bioanalytical applications of hollow fiber membrane liquid-phase microextraction: A review”, *Anal. Chim. Acta*, 624 (2008) 253–268.
53. Portal da Web of Science: [http://isiwebofknowledge.com/products\\_tools/multidisciplinary/webofscience/](http://isiwebofknowledge.com/products_tools/multidisciplinary/webofscience/)
54. Jeannot M.A., F.F. Cantwell, “Solvent Microextraction into a Single Drop”, *Analytical Chemistry* 68 (1996) 2236–2240.
55. Cortada C., L. Vidal, R. Pastor, N. Santiago, A. Canals, “Determination of organochlorine pesticides in water samples by dispersive liquid-liquid microextraction coupled to gas chromatography-mass spectrometry”, *Analytica Chimica Acta*, 649 (2009) 218–221.
56. Zhang M., J. Huang, C. Wei, B. Yu, X. Yang, X. Chen; “Mixed liquids for single-drop microextraction of organochlorine pesticides in vegetables”; *Talanta*, 74 (2008) 599–604.

- 
57. Bagheri H. , M. Naderi, “Immersed single-drop microextraction–electrothermal vaporization atomic absorption spectroscopy for the trace determination of mercury in water samples” *Journal of Hazardous Materials*, 165 (2009) 353-358.
58. Batlle R., C. Nerín, “Application of single-drop microextraction to the determination of dialkyl phthalate esters in food simulants” *Journal of Chromatography A*, 1045 (2004) 29-35.
59. Zanjani M.R. K., Y. Yamini, S. Shariati, J.A. Jönsson, “A new liquid-phase microextraction method based on solidification of floating organic drop”, *Analytica Chimica Acta*, 585 (2007) 286–293.
60. Sarafraz-Yazdi A., A.H. Amiri, Z. Eshaghi, “BTEX determination in water matrices using HF-LPME with gas chromatography–flame ionization detector” *Chemosphere*, 71 (2008) 671–676.
61. Basheer C. , H.K. Lee, J.P. Obbard, “Determination of organochlorine pesticides in seawater using liquid-phase hollow fibre membrane microextraction and gas chromatography–mass spectrometry” *Journal of Chromatography A*, 968 (2002) 191-199.
62. Zhang J., T. Su, H.K. Lee, “Development and application of microporous hollow fiber protected liquid-phase microextraction via gaseous diffusion to the determination of phenols in water” *Journal of Chromatography A*, 1121 (2006) 10-15.
63. Psillakis E., N. Kalogerakis, “Hollow-fibre liquid-phase microextraction of phthalate esters from water” *Journal of Chromatography A*, 999 (2003) 145-153.
64. Dadfarnia S., A.M. Salmanzadeh, A.M.H. Shabani, “A novel separation/preconcentration system based on solidification of floating organic drop microextraction for determination of lead by graphite furnace atomic absorption spectrometry”, *Analytica Chimica Acta*, 623 (2008) 163–167.
65. Yamini Y. , M. Rezaee, A. Khanchi, M. Faraji, A. Saleh, “Dispersive liquid-liquid microextraction based on solidification of floating organic drop followed by inductively coupled plasma–optical emission spectrometry as a fast technique for the simultaneous determination of heavy metals” *Journal of Chromatography*, (2009).
66. Moinfar S., M.R.M. Hosseini, “Development of dispersive liquid-liquid method for the analysis of organophosphorous pesticides in tea”, *Journal of Hazardous Materials*, 169 (2009) 907-911.
67. Jahromi E. Z., A. Bidari , Y. Assadi , M.R.M. Hosseini, M.R. Jamali, “Dispersive liquid–liquid microextraction combined with graphite furnace atomic absorption spectrometry Ultra trace determination of cadmium in water samples”, *Analytica Chimica Acta* , 585 (2007) 305–311.

- 
68. Tsai W.C, S. Huang; “Dispersive liquid-liquid microextraction with little solvent consumption combined with gas chromatography-mass spectrometry for the pretreatment of organochlorine pesticides in aqueous samples”, *Journal of Chromatography A*, 1216 (2009) 5171-5175
69. Berijani S., Y. Assadi, M. Anbia, M.R.M. Hosseini, E. Aghae, “Dispersive liquid-liquid microextraction combined with gas chromatography-flame photometric detection – Very simple, rapid and sensitive method for the determination of organophosphorous pesticides in water”, *Journal of Chromatography A*, 1123 (2006) 1-9.
70. Zhao E., W. Zhao, L. Han, S. Jiang, Z. Zhou, “Application of dispersive liquid-liquid microextraction for the analysis of organophosphorus pesticides in watermelon and cucumber”, *Journal of Chromatography A*, 1175 (2007) 137-140.
71. López M. G., I. Rodríguez, R. Cela, “Development of a dispersive liquid-liquid microextraction method for organophosphorus flame retardants and plasticizers determination in water samples”, *Journal of Chromatography A*, 1166 (2007) 9-15.
72. Fu L., X. Liu, J. Hu, X. Zhao, H. Wang, X. Wang, “Application of dispersive liquid-liquid microextraction for the analysis of triazophos and carbaryl pesticides in water and fruit juice samples”, *Analytica Chimica Acta*, 632 (2009) 289-295.
73. Rezaee M., Y. Assadi, M. M. Hosseini, E. Aghae, F. Ahmadi, S. Berijani, “Determination of organic compounds in water using dispersive liquid-liquid microextraction”, *Journal of Chromatography A*, 1116 (2006) 1-9.
74. Liu Y., E. Zhao, W. Zhu, H. Gao, Z. Zhou, “Determination of four heterocyclic insecticides by ionic liquid dispersive liquid-liquid microextraction in water samples”, *Journal of Chromatography A*, 1216 (2009) 885-891.
75. Zhou Q., H. Bai, G. Xie, J. Xiao, “Trace determination of organophosphorus pesticides in environmental samples by temperature-controlled ionic liquid dispersive liquid-phase microextraction”, *Journal of Chromatography A*, 1188 (2008) 148-153.
76. Wald G., D. Albers, T. McCabe, “Analysis by desorption of volatile impurities from an ionic liquid solution in an unmodified gas chromatograph inlet”, *Journal of Chromatography A*, 1216 (2009) 5927-5930.
77. Ravelo-Pérez L. M, J. Hernández-Borges, M. Asensio-Ramos, M.A. Rodríguez-Delgado, “Ionic liquid based dispersive liquid-liquid microextraction for the extraction of pesticides from bananas”, *Journal of Chromatography A*, 1216 (2009) 7336-7345.

---

**78.** Nagaraju D., S. Huang, “Determination of triazine herbicides in aqueous samples by dispersive liquid-liquid microextraction with gas chromatography-ion trap mass spectrometry”, *Journal of Chromatography A*, 1161 (2007) 89-97.

**79.** Li Y., G. Wei, J. Hu, X. Liu, X. Zhao, X. Wang, “Dispersive liquid-liquid microextraction followed by reversed phase-high performance liquid chromatography for the determination of polybrominated diphenyl ethers at trace levels in landfill leachate and environmental water samples”, *Analytica Chimica Acta*, 615 (2008) 96–103.

**80.** Bidari A., E.Z. Jahromi, Y. Assadi, M.R.M. Hosseini, “Monitoring of selenium in water samples using dispersive liquid-liquid microextraction followed by iridium-modified tube graphite furnace atomic absorption spectrometry”, *Microchemical Journal*, 87 (2007) 6–12.

**81.** Farajzadeh M.A., M. Bahram, B.G. Mehr, J.A. Jönsson, “Optimization of dispersive liquid-liquid microextraction of copper (II) by atomic absorption spectrometry as its oxinate chelate: Application to determination of copper in different water samples”, *Talanta*, 75 (2008) 832–840.

**82.** Naser M. T. i, M.R.M. Hosseini, Y. Assadi, A. Kiani, “Rapid determination of lead in water samples by dispersive liquid-liquid microextraction coupled with electrothermal atomic absorption spectrometry”, *Talanta*, 75 (2008), 56–62.

**83.** Shamsipur M., M. Ramezani, “Selective determination of ultra trace amounts of gold by graphite furnace atomic absorption spectrometry after dispersive liquid-liquid microextraction”, *Talanta*, 75 (2008) 294–300.

**84.** Shokoufi N., F. Shemirani, Y. Assadi, “Fiber optic-linear array detection spectrophotometry in combination with dispersive liquid-liquid microextraction for simultaneous preconcentration and determination of palladium and cobalt”, *Analytica Chimica Acta*, 597 (2007) 349–356.

**85.** Birjandi A. P., A. Bidari, F. Rezaei, M.R.M. Hosseini, Y. Assadi, “Speciation of butyl and phenyltin compounds using dispersive liquid-liquid microextraction and gas chromatography-flame photometric detection”, *Journal of Chromatography A*, 1193 (2008) 19–25.

**86.** Liang P., J. Xu, Q. Li, “Application of dispersive liquid-liquid microextraction and high-performance liquid chromatography for the determination of three phthalate esters in water samples”, *Analytica Chimica Acta*, 609 (2008) 53–58.

**87.** Farahani H., P. Norouzi, R. Dinarvand, M.R. Ganjali, “Development of dispersive liquid-liquid microextraction combined with gas chromatography-mass spectrometry as a simple,

---

rapid and highly sensitive method for the determination of phthalate esters in water samples”; *Journal of Chromatography A*, 1172 (2007) 105–112.

**88.** Chen H., J. Ying, J. Huang, L. Liao, “Dispersive liquid–liquid microextraction followed by high-performance liquid chromatography as an efficient and sensitive technique for simultaneous determination of chloramphenicol and thiamphenicol in honey”, *Analytica Chimica Acta*, 632 (2008) 80–85.

**89.** Yazdi A.S., N. Razavi, S.R. Yazdinejad, “Separation and determination of amitriptyline and nortriptyline by dispersive liquid–liquid microextraction combined with gas chromatography flame ionization detection”, *Talanta*, 75 (2008) 1293–1299.

**90.** Farajzadeh M.A., M. Bahrama, J.A. Jönsson, “Dispersive liquid–liquid microextraction followed by high-performance liquid chromatography–diode array detection as an efficient and sensitive technique for determination of antioxidants”, *Analytica Chimica Acta*, 591 (2007) 69–79.

**91.** Fattahi N., Y. Assadi, M.R.M. Hosseini, E.Z. Jahromi, “Determination of chlorophenols in water samples using simultaneous dispersive liquid–liquid microextraction and derivatization followed by gas chromatography–electron-capture detection”, *Journal of Chromatography A*, 1157 (2007) 23–29.

**92.** Fariña L., E. Boido, F. Carrau, E. Dellacassa, “Determination of volatile phenols in red wines by dispersive liquid–liquid microextraction and gas chromatography–mass spectrometry detection”, *Journal of Chromatography A*, 1157 (2007) 46–50.

**93.** Melwanki M. B., M. Fuh, “Partitioned dispersive liquid–liquid microextraction An approach for polar organic compounds extraction from aqueous samples”, *Journal of Chromatography A*, 1207 (2008) 24–28.

**94.** Fattahi N., S. Samadi, Y. Assadi, M.R.M. Hosseini, “Solid-phase extraction combined with dispersive liquid–liquid microextraction–ultra preconcentration of chlorophenols in aqueous samples”, *Journal of Chromatography A*, 1169 (2007) 63–69.

**95.** Rezaei F, A. Bidari, A.P. Birjandi, M.R.M. Hosseini, Y. Assadi, “Development of a dispersive liquid–liquid microextraction method for the determination of polychlorinated biphenyls in water”, *Journal of Hazardous Materials*, 158 (2008) 621–627.

**96.** Kozani R. R., Y. Assadi, F. Shemirani, M.R.M. Hosseini, M.R. Jamali, “ Part-per-trillion determination of chlorobenzenes in water using dispersive liquid–liquid microextraction combined gas chromatography–electron capture detection”, *Talanta* 72 (2007) 387–393.

- 
97. Fan Y.C., Z.L. Hu, M.L. Chen, C.S. Tu, Y. Zhu, "Ionic liquid based dispersive liquid-liquid microextraction of aromatic amines in water samples", *Chinese Chemical Letters* 19 (2008) 985-987.
98. Chiang J., S. Huang, "Simultaneous derivatization and extraction of anilines in waste water with dispersive liquid-liquid microextraction followed by gas chromatography-mass spectrometric detection", *Talanta* 75 (2008) 70-75.
99. Wang X., X. Zhao, X. Liu, Y. Li, L.Fu, J. Hu, C. Huang, "Homogeneous liquid-liquid extraction combined with gas chromatography-electron capture detector for the determination of three pesticide residues in soils", *Analytica Chimica Acta* 620 (2008) 162-169.
100. Tavakoli L., Y.Yamini, H. Ebrahimzadeh, S.Shariati, "Homogeneous liquid-liquid extraction for preconcentration of polycyclic aromatic hydrocarbons using a water/methanol/chloroform ternary component system", *Journal of Chromatography A*, 1196-1197 (2008) 133-138.
101. Ebrahimzadeh H., Y. Yamini, F. Kamarei, S. Shariati, "Homogeneous liquid-liquid extraction of trace amounts of mononitrotoluenes from waste water samples", *Analytica Chimica Acta* 594 (2007) 93-100.
102. Ghiasvand A.R., S. Shadabi, E. Mohagheghzadeh, P. Hashemi, "Homogeneous liquid-liquid extraction method for the selective separation and preconcentration of ultra trace molybdenum", *Talanta*, 66 (2005) 912-916.
103. James A. T., A. J. P. Martin, "Gas-liquid partition chromatography: the separation and micro-estimation of volatile fatty acids from formic acid to dodecanoic acid", *Biochemical Journal*, 50 (1952) 679-690.
104. Kitson F.G., B.S. Larsen, C.N. McEwen, *Gas Chromatography and Mass Spectrometry*, Academic Press (1996).
105. Günzler H., A. Williams, *Handbook of Analytical Techniques*, Volume I, Wiley-VCH (2001).
106. Grob R. L., *Modern practice of gas chromatography*, 3<sup>a</sup> Ed., John Wiley & Sons Inc. (1995).
107. Fowles I.A., *Gas Chromatography*, 2<sup>a</sup> Ed., John Wiley and Sons (1995).
108. Agilent Technology Inc., *Fundamentals of Gas Chromatography*, Manual Part Number G1176-90000 (2002).

- 
- 109.** Beceiro-González E., Concha-Graña, A. Guimarães, C. Gonçalves, S. Muniategui-Lorenzo, M.F. Alpendurada, “Optimisation and validation of a solid-phase microextraction method for simultaneous determination of different types of pesticides in water by gas chromatography–mass spectrometry”, *Journal of Chromatography A*, 1141 (2007) 165-173.
- 110.** Oh-Shin Y., M. Ko; H. Shin, “Simultaneous quantification of insecticides including carbaryl in drinking water by gas chromatography using dual electron-capture and nitrogen-phosphorus detection”, *Journal of Chromatography A*, 769 (1997) 285-291.
- 111.** Leong M., S. Huang, “Dispersive liquid-liquid microextraction method based on solidification of floating organic drop for extraction of organochlorine pesticides in water samples”, *Journal of Chromatography A*, 1216 (2009) 7645-7650.
- 112.** Portal da Shimadzu, <http://www.shimadzu.com>
- 113.** Funk W., V. Dammann, G. Donnevert, *Quality Assurance in Analytical Chemistry*, VCH (1995).
- 114.** Instituto Português de Acreditação, *Guia para acreditação de laboratórios químicos*, 14.09.2005.
- 115.** ISO 8466-1:1990, “*Water Quality- Calibration and Evaluation of Analytical Methods and Estimation of Performance Characteristics. Part 1: Statistical Evaluation of the Linear Calibration Function*”, (1990).
- 116.** Miller J.C, J.N Miller, *Statistics for Analytical Chemistry*, 3<sup>a</sup> Ed., Ellis Hordwood PTR Prentice Hall (1993).
- 117.** ISO 8466-2:1990, “*Water Quality- Calibration and Evaluation of Analytical Methods and Estimation of Performance Characteristics. Part 2: Calibration Strategy for Non-Linear Calibration Function*”, (1990).
- 118.** ISO 3534-1:2006, “*Statistics- Vocabulary and Symbols. Part 1: General statistical terms and terms used in probability*”, (2006).
- 119.** Decreto-Lei n.º 27-A/2006, Diário da República N.º 139, Série I-A, 10.02.2006.
- 120.** Lide D. R., *Handbook of Chemistry and Physics*, 88<sup>th</sup> Ed., CRC Press (2007).
- 121.** EPA 500 Series Methods for Drinking Water.
- 122.** Pinsuwan S., An Li, and Samuel H. Yalkowsky, “Correlation of Octanol/Water Solubility Ratios and Partition Coefficients”, *Journal of Chemical & Engineering Data*, 40 (1996) 623-626.

- 
123. Portal da EPA, <http://epa.gov/HPV/pubs/summaries/ssstriph/c16678rs.pdf>
124. Ballesteros E., M. J. Parrado, Continuous solid-phase extraction and gas chromatographic determination of organophosphorus pesticides in natural and drinking waters, *Journal of Chromatography A*, 1029 (2004) 267-273.
125. Ahmadi F., A.A. Shahsavari, M. Rahimi-Nasrabadi, “Automated extraction and preconcentration of multiresidue of pesticides on a micro-solid-phase extraction system based on polypyrrole as sorbent and off-line monitoring by gas chromatography-flame ionization detection”, *Journal of Chromatography A*, 1193 (2008) 26-31.
126. Huang Z., Y. Li, B. Chen, S. Yao, “Simultaneous determination of 102 pesticides residues in Chinese teas by gas chromatography-mass spectrometry”, *Journal of Chromatography B*, 853 (2007) 154-162.
127. Reyzer M.L., J.S. Brodbelt, “Analysis of fire and pesticides in water by solid-phase microextraction and gas chromatography/mass spectrometry or high-performance liquid chromatography/mass spectrometry”, *Analytica Chimica Acta* 436 (2001) 11-20.
128. Cháfer-Pericás C., R. Herráz-Hernández; “In-tube solid-phase microextraction-capillary liquid chromatography as a solution for the screening analysis of organophosphorus pesticides in untreated environmental water samples”, *J. Chrom. A*, 1141 (2007) 10-21.
129. Xiong J., B. Hu; “Comparison of hollow fiber liquid phase microextraction and dispersive liquid-liquid microextraction for the determination of organosulfur pesticides in environmental and beverage samples by gas chromatography with flame photometric detection”, *Journal of Chromatography A*, 1193 (2008) 7-18.
130. He L., X. Luo, H. Xie, C. Wang, X. J., K. Lu, “Ionic liquid-based dispersive liquid-liquid microextraction followed high-performance liquid chromatography for the determination of organophosphorous pesticides in water sample”, *Analytica Chimica Acta*, 655 (2009) 52-59.
131. Alves A., M. Gonçalves, M. Bernardo, B. Mendes, “Determination of organophosphorous pesticides in water samples using dispersive liquid-liquid microextraction”, *Chemosphere*, Manuscript Number: CHEM18836, artigo de revisão.
132. Bernardo M., M. Gonçalves, N. Lapa, B. Mendes, “Determination of alkylphenols in eluates from pyrolysis solid residues using dispersive liquid-liquid microextraction”, *Chemosphere*, Manuscript Number: CHEM17957, artigo em revisão.
133. Su P., S. Huang, “Determination of organophosphorus pesticides in water by solid-phase microextraction”; *Talanta*, 49 (1999) 393-402.

---

**134.** Specanalitica- Equipamentos Científicos, Lda:  
<http://www.specanalitica.com/scid/webspec/default.asp>

**135.** Labbox: <http://www.labbox.com/es/>

**136.** US EPA HPV Challenge program- Test Plan Submission, (2008).

**137.** Liua X, J. Lib, Z. Zhao, W. Zhang, K. Lin, C. Huang, X. Wang,” Solid-phase extraction combined with dispersive liquid–liquid microextraction for the determination for polybrominated diphenyl ethers in different environmental matrices”, *Journal of Chromatography A*, 1216 (2009) 2220–2226.

**138.** Zhao R., C. Diao, Q. Chen, X. Wang, “Sensitive determination of amide herbicides in environmental water samples by combination of solid-phase extraction and dispersive liquid–liquid microextraction prior to GC-MS”, *Journal of Separation Science*, 32 (2009) 1069–1074.

**139.** Montes R., I. Rodríguez, M. Ramil, E. Rubí, R. Cela, “Solid-phase extraction followed by dispersive liquid–liquid microextraction for the sensitive determination of selected fungicides in wine”, *Journal of Chromatography A*, 1216 (2009) 5459–5466.

**140.** Fattahi N., S. Samadi, Y. Assadi, M.R.M. Hosseini, “Solid-phase extraction combined with dispersive liquid–liquid microextraction-ultra pre-concentration of chlorophenols in aqueous samples”, *Journal of Chromatography A*, 1169 (2007) 63–69.