

UNIVERSIDADE FEDERAL DO MARANHÃO
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E TECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

JOSÉ CREDICIOMAR SILVA DE OLIVEIRA

**ANÁLISE DE CONTAMINANTES AMBIENTAIS EM ECOSSISTEMAS
AQUÁTICOS, EMPREGANDO EXTRAÇÃO EM FASE SÓLIDA E TÉCNICA
CROMATOGRÁFICA E ESPECTROMÉTRICA.**

São Luís
2009

JOSÉ CREDICIOMAR SILVA DE OLIVEIRA

**ANÁLISE DE CONTAMINANTES AMBIENTAIS EM ECOSSISTEMAS
AQUÁTICOS, EMPREGANDO EXTRAÇÃO EM FASE SÓLIDA E TÉCNICA
CROMATOGRÁFICA E ESPECTROMÉTRICA.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química, como parte dos requisitos para obtenção do Título de Mestre em Química, Área de concentração Química Analítica.

Orientadora: Prof^a Dra. Gilvanda Silva Nunes.

São Luís
2009

JOSÉ CREDICIOMAR SILVA DE OLIVEIRA

**ANÁLISE DE CONTAMINANTES AMBIENTAIS EM ECOSISTEMAS
AQUÁTICOS, EMPREGANDO EXTRAÇÃO EM FASE SÓLIDA E TÉCNICA
CROMATOGRÁFICA E ESPECTROMÉTRICA.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química, como parte dos requisitos para obtenção do Título de Mestre em Química, Área de concentração Química Analítica.

Aprovada em _____ de _____ de _____ .

BANCA EXAMINADORA

Prof^a Dra. Gilvanda Silva Nunes
(Orientadora)

Prof^o Dr. Ozelito Possidônio de Amarante Junior
(CEFET-MA)

Prof^a Dra. Sônia Maria Carvalho Tanaka
(CPGQUIM-UFMA)

Dedicatória

A Deus ...

*Por meus pais: Maria Jimar de Oliveira Silva e José Abel
Silva.*

Por meu irmão: José Hoang-ti de Oliveira Silva.

*Por todo amor, carinho, paciência e por estarem sempre presentes
em minha vida.*

Oliveira, José Crediciomar Silva de.

Análise de contaminantes ambientais em ecossistemas aquáticos, empregando extração em fase sólida e técnica cromatográfica e espectrométrica / José Crediciomar Silva de Oliveira. — São Luís, 2009.

81 f. : il.

Orientador (a): Gilvanda Silva Nunes.

Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Química, Centro de Ciências Exatas e Tecnologia, Universidade Federal do Maranhão, 2009.

1. Contaminantes ambientais – Análise. 2. Ecossistemas aquáticos. 3. Cromatografia. 4. Temefós. 5. Espectrômetro. I. Título.

AGRADECIMENTOS

Ao meu Senhor, Jesus Cristo, único e verdadeiro líder em toda a história da humanidade.

Aos meus pais, pelo apoio, dedicação, compreensão e por terem mostrado que, através da educação, podemos formar uma sociedade mais humana.

Ao meu irmão, pelo apoio, companheirismo e incentivo em todos os momentos de minha vida.

Aos meus primos, Gilson, Leila, Antonio Filho, Antonio Marcos e Helber, pelo companheirismo nos momentos difíceis em minha vida.

À Profa. Dra. Gilvanda Silva Nunes, pela orientação sempre firme, paciência e pelas valiosas informações científicas.

Ao Centro de Ciências Exatas e Tecnologia da UFMA, pelo apoio institucional e pela oportunidade oferecida.

Aos amigos integrantes do Laboratório NARP, pelo companheirismo.

Aos meus amigos: Gladson, Adilton, Rogério, Osvaldo, Adalberto, Diogo, Glene, Marconiel, Arine, Janieyd, Rose e Luciana aos quais agradeço pela lealdade e agradável convívio, pelas conversas e pelos momentos agradáveis compartilhados.

À Profa. Dra. Teresa Cristina Rodrigues dos Santos, pela co-orientação sempre presente para a melhoria dessa dissertação.

Ao Prof. Dr. Ozelito e as amigas Lucia e Daniele pela colaboração no desenvolvimento deste trabalho.

Ao CNPq, pela concessão da bolsa e apoio financeiro.

MUITO OBRIGADO!

“A mente que se abre a uma
nova idéia jamais voltará ao
seu tamanho original”.

(Albert Einstein)

RESUMO

Muitos contaminantes orgânicos e inorgânicos estão presentes na água em baixas concentrações. Devido a isso, tem crescido o interesse em otimização e desenvolvimento de técnicas de preparo de amostra que viabilizem a pré-concentração dos analitos presentes na matriz para adequação ao sistema de detecção. Neste trabalho, foi empregada a extração em fase sólida (SPE) para extrair e pré-concentrar inseticida e metais pesados em água. O inseticida estudado foi o organofosforado (OF) temefós. Para a identificação e quantificação do temefós foi utilizada a cromatografia a líquido de alta eficiência (HPLC/CLAE) com coluna analítica C₁₈ Varian, 250 mm x 4,6 mm d.i, tamanho de partícula 5µm de diâmetro de poro. A fase móvel utilizada foi ACN:H₂O, 85:15, v/v, e a detecção foi feita por um detector de arranjo de fotodiodo. O melhor volume de amostras utilizado na extração foi de 100 mL com cartuchos de C₁₈ (fator de pré-concentração de 100 vezes). Os estudos de recuperação foram realizados em dois níveis de fortificação (10 e 20 µg.L⁻¹). As recuperações médias variaram de 100 a 101%. Os coeficientes de variação compreenderam a faixa de 2,83 a 4,37%. O limite de detecção e quantificação do método foi de 4,8x10⁻³ e 1,46x10⁻³ mg.L⁻¹ respectivamente. Após o desenvolvimento do método, o mesmo foi aplicado em amostras de água para consumo humano. Para a determinação das concentrações dos metais Cd e Pb, foi utilizado um espectrômetro de massas com plasma acoplado indutivamente (ICP-MS), Varian (Modelo 700ES). Os estudos de recuperação foram realizados nas concentrações de 0,5 e 2,0 mg.L⁻¹ para Cádmio e Chumbo, respectivamente. As recuperações médias foram de 86,1% para Cádmio e 75,5% para Chumbo. Após a otimização do método este foi aplicado em amostras de água superficial.

Palavras-chaves: Temefós. Cromatografia. Extração em fase sólida. Cádmio. Chumbo. ICP-MS.

ABSTRACT

Many organic and inorganic contaminants are present in the interest in optimization and developing techniques of sample preparation has increased to make possible pre-concentration of these analytes from this medium to be adequate for the detection system to be used. In this work solid phase extraction (SPE) was used to extract and pre-concentrate pesticide and heavy metals in water. The pesticide studied was organophosphorus (OP) temephos. For the identification and quantification of the temephos high performance liquid chromatography (HPLC) with an analytical column C₁₈ Varian, 250 mm x 4,6 mm d.i, particle size 5µm was used. The mobile-phase used was ACN:H₂O 85:15 v/v and detection used diode array spectrophotometer. The Best volumes of samples used in the extraction was 100 mL with cartridges of C₁₈ (pre-concentration factor of 100 times). The recovery studies were performed at two levels of fortification (10 e 20µg.L⁻¹). The average recoveries were between 100 to 101%. The coefficients variation. Was found of less 4,5%. The limits of detection and quantification of the method were $4,8 \times 10^{-3}$ and $1,46 \times 10^{-3}$ mg.L⁻¹ respectively. After the development of the method was applied in water samples for human consumption. For determination of the concentrations of studied metals inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS), Varian (model 700ES) was used. The recovery studies were performed with fortification of 0,5 and 2,0 mg.L⁻¹ for cadmium and lead respectively. The average recoveries were 86,1% for cadmium and 75,5% for lead. After optimization of the method was applied in superficial water samples.

Keywords: Temephos. Chromatography. Solid phase extraction. Cadmium and Lead. ICP-MS.

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO I

Figura 1-	Localização do Município de Centro Novo do Maranhão.....	20
Figura 2-	Estrutura química do temefós.....	23
Figura 3-	Formula estrutural do temefós e seus produtos de degradação.....	24
Figura 4-	Etapas envolvidas no processo de extração e Pré-concentração do inseticida.....	26
Figura 5-	Esquema do procedimento de pré-concentração.....	27
Figura 6-	Espectro de máxima absorção na região do UV para o inseticida estudado temefós.....	41
Figura 7-	Cromatograma de identificação do inseticida temefós. Condições cromatográficas: coluna C ₁₈ , marca Varian 5µm (250x4,6mm d.i); FM: ACN:H ₂ O 85:15 v/v; F=1 mL/min; volume de injeção 20µL; Detecção: DAD 200-400 nm.	42
Figura 8-	Valores de recuperação variando-se o pH da amostra, em vazão de 2 mL/min, usando cartuchos de C ₁₈	44
Figura 9-	Curva analítica obtida para o inseticida em estudo.....	46
Figura10-	Cromatogramas do inseticida temefós após SPE, usando cartuchos de C ₁₈ , em concentrações de 10µg/L(A) e 20µg/L(B). Condições cromatográficas: Idem às apresentadas na Fig. 6.....	47

CAPÍTULO II

Figura 1-	Esquema de funcionamento de um espectrofotômetro de massas com plasma acoplado indutivamente.....	61
Figura 2-	Localização da bacia do Tibirí e definição dos locais de amostragem.....	65
Figura 3-	Localização do Igarapé do Sabino e do aterro da Ribeira (verde claro).....	66
Figura 4-	Localização do aterro da Ribeira e dos pontos de coleta no Igarapé do Sabino.....	67
Figura 5-	Curva analítica para o metal pesado Cádmio (Cd).....	70
Figura 6-	Curva analítica para o metal pesado Chumbo (Pb).....	70
Figura 7-	Variação dos teores de Chumbo encontrado nas amostras de água do Igarapé do Sabino, em função da localidade e do tempo.....	72
Figura 8-	Variação dos teores de Cádmio encontrado nas amostras de água do Igarapé do Sabino, em função da localidade e do tempo.....	73

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO I

Tabela 1-	Classificação toxicológica dos agrotóxicos em função da DL ₅₀	17
Tabela 2-	Exemplo de adsorventes utilizados em SPE.....	28
Tabela 3-	Identificação das amostras de água e dos locais de coleta de água.....	40
Tabela 4-	Efeito do pH da amostra de água, sobre a eficiência do método de extração.....	43
Tabela 5-	Recuperações (%) para diferentes volumes de amostras utilizados durante o procedimento de extração.....	45
Tabela 6-	Parâmetros de validação obtidos para o método desenvolvido para análise do inseticida temefós em água, usando SPE com cartuchos de C ₁₈ e determinação por CLAE.....	46
Tabela 7-	Recuperações e precisões do método proposto.....	48
Tabela 8-	Resíduos do inseticida temefós encontrados nas amostras de água coletadas na cidade de Centro Novo do Maranhão.....	49

CAPÍTULO II

Tabela 1-	Identificação dos locais de coleta das amostras.....	63
Tabela 2-	Condições operacionais do sistema ICP-MS.....	68
Tabela 3-	Valores de recuperação variando o tipo de adsorvente utilizado na extração dos metais.....	69

LISTA DE ABREVIATURAS

ACN	Acetonitrila
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
C ₁₈	Grupo Octadecil
CCD	Cromatografia em camada delgada
CFS	Cromatografia por Fluido Supercrítico
CG	Cromatografia a gás
CLAE/EM	Cromatografia a Líquido de Alta Eficiência acoplado ao Espectro de Massas
CONAMA	Conselho Nacional do Meio Ambiente
CV	Coeficiente de Variação
DAD	Detector Arranjo de Diodo
DDT	Diclorodifeniltricloro-etano
DL	Dose Letal
EC	Comunidade Européia
EPA	Agência de Proteção Ambiental
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FM	Fase Móvel
FUNASA	Fundação Nacional de Saúde
ICH	<i>International Conference on Harmonization</i>
ICP	<i>Inductively Coupled Plasma</i>
INMETRO	Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial
LD	Limite de Detecção
LD*	Limite de Detecção do Método
LQ	Limite de Quantificação
LQ*	Limite de Quantificação do Método

MPs	Metais Pesados
MS	Ministério da Saúde
NARP	Núcleo de Análise de Resíduos de Pesticidas
ND	Não Detectável
OP	Organofosforado
pH	Potencial Hidrogeniônico
PLL	Partição Líquido-Líquido
R	Recuperação
r	Coeficiente de Correlação
RSD	Estimativa do Desvio Padrão Relativo
SPE	Extração em Fase Sólida
t _R	Tempo de Retenção
UV	Ultravioleta
VMPs	Valores Máximos Permitidos

SUMÁRIO

CAPÍTULO I	17
1 - INTRODUÇÃO	18
2 – REVISÃO DE LITERATURA:	21
2.1 – CLASSIFICAÇÃO E TOXICIDADE DOS AGROTÓXICOS:	21
TABELA 1. CLASSIFICAÇÃO TOXICOLÓGICA DOS AGROTÓXICOS EM FUNÇÃO DA DL₅₀.	21
2.2 – A IMPORTÂNCIA DO CONTROLE DE QUALIDADE DAS ÁGUAS:	21
2.3 – ÁREA DE ESTUDO	22
2.3.1 - O MUNICÍPIO DE CENTRO NOVO DO MARANHÃO: LOCALIZAÇÃO E PROBLEMÁTICA DE INTOXICAÇÃO POR AGROQUÍMICOS:	22
2.4 – O INSETICIDA ORGANOFOSFORADO TEMEFÓS	26
2.4.1 – TOXICIDADE E RISCOS DE INTOXICAÇÃO	26
2.4.2 – DEGRADAÇÃO DO PRINCÍPIO ATIVO	27
2.4.3 - MÉTODOS DE ANÁLISE DO INSETICIDA TEMEFÓS	29
2.5 – ASPECTOS ANALÍTICOS NA DETERMINAÇÃO DE RESÍDUOS DE PESTICIDAS	31
2.5.1 - EXTRAÇÃO EM FASE SÓLIDA (SPE)	31
2.5.2 - CROMATOGRAFIA A LÍQUIDO DE ALTA EFICIÊNCIA (HPLC)	33
2.5.3 - VOLUME DE RUPTURA (V_R)	34
2.5.4 - ANÁLISE POR HPLC	34
2.5.5 – PROCEDIMENTOS USUAIS PARA OTIMIZAÇÃO DE UMA METODOLOGIA ANALÍTICA	35
2.5.5.1 – EXATIDÃO	35
2.5.5.2 - PRECISÃO	36
2.5.5.3 - LIMITE DE DETECÇÃO (LD)	36
2.5.5.4 - LIMITE DE QUANTIFICAÇÃO (LQ)	37
2.5.5.5 – LINEARIDADE	37
2.5.5.6 – ROBUSTEZ	37
3 – OBJETIVOS	39
3.1 – GERAL	39
3.2 – ESPECÍFICOS	39
4 – PARTE EXPERIMENTAL	40
4.1 – MATERIAIS E MÉTODOS	40
4.1.1 – REAGENTES E SOLVENTES	40
4.1.2 – ANÁLISE CROMATOGRÁFICA	40

4.1.3 – EXTRAÇÃO EM FASE SÓLIDA	40
4.1.4 – DEFINIÇÃO DOS PARÂMETROS ANALÍTICOS	41
4.1.4.1 - AVALIAÇÃO DO pH DA AMOSTRA	41
4.1.4.2 - DETERMINAÇÃO DO VOLUME DE CAPACIDADE DO ADSORVENTE	41
4.1.4.3 – CURVA ANALÍTICA	41
4.1.4.4 – DETECTABILIDADE	41
4.1.4.5 – ENSAIOS DE RECUPERAÇÃO	42
4.1.4.6 – PRECISÃO	42
4.1.4.7 – LINEARIDADE E FAIXA LINEAR:	42
4.1.5 – APLICAÇÃO DO MÉTODO PARA ANÁLISES DE AMOSTRA REAIS:	42
5 – RESULTADOS E DISCUSSÃO	44
5.1 - OBTENÇÃO DO ESPECTRO DE ABSORÇÃO NO UV DO INSETICIDA	44
5.2 – OTIMIZAÇÃO DA SEPARAÇÃO CROMATOGRÁFICA DO TEMEFÓS	44
5.3 - ESTUDO DA EXTRAÇÃO EM FASE SÓLIDA DO INSETICIDA	46
5.3.1 - AVALIAÇÃO DO pH DA AMOSTRA:	46
5.2.2 - DETERMINAÇÃO DO VOLUME DE RUPTURA	47
5.2.3 - CURVA ANALÍTICA, DETECTABILIDADE E INTERVALO LINEAR	48
5.2.4 - RECUPERAÇÃO E PRECISÃO DO MÉTODO	49
5.2.5 - APLICAÇÃO DO MÉTODO PARA ANÁLISE DE AMOSTRAS REAIS	51
6- CONCLUSÃO	52
7- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	53
CAPÍTULO II	58
1 – INTRODUÇÃO	58
2 – REVISÃO DE LITERATURA	61
2.1 – CONSIDERAÇÕES SOBRE OS METAIS PESADOS ESTUDADOS	61
2.1.1 – CÁDMIO (Cd)	61
2.1.2 – CHUMBO (Pb)	61
2.2 – ASPECTOS DA TÉCNICA ANALÍTICA EMPREGADA NESTE ESTUDO	63
2.2.1 - ESPECTROSCOPIA DE MASSAS COM PLASMA ACOPLADO INDUTIVAMENTE	63
3 – OBJETIVO	65
3.1 – GERAL	65
3.2 – ESPECÍFICOS	65
4 – PARTE EXPERIMENTAL	66

4.1 – MATERIAIS E MÉTODOS	66
4.2 – INSTRUMENTAÇÃO	66
4.3– OTIMIZAÇÃO DA METODOLOGIA DE EXTRAÇÃO DOS METAIS PESADOS	67
4.4 – APLICAÇÃO DO MÉTODO PARA ANÁLISE DE AMOSTRAS REAIS	67
4.4.1 - CARACTERIZAÇÃO DA ÁREA DE ESTUDO E AMOSTRAGEM	67
FIGURA 2 – LOCALIZAÇÃO DA BACIA DO TIBIRI E DEFINIÇÃO DOS LOCAIS DE AMOSTRAGEM (SILVA, 2001).	68
FIGURA 3 – LOCALIZAÇÃO DO IGARAPÉ DO SABINO E DO ÁTERRO DA RIBEIRA (VERDE CLARO) (CAMPOS, 1998).	69
5 – RESULTADOS E DISCUSSÃO	72
5.1 - ESTUDO DA EXTRAÇÃO EM FASE SÓLIDA	72
5.1.1 - AVALIAÇÃO DE DIFERENTES ADSORVENTES UTILIZADOS NO PROCESSO DE EXTRAÇÃO	72
5.1.2 – CURVAS ANALÍTICAS	73
5.1.3 – DETERMINAÇÃO DE Pb E Cd NAS AMOSTRAS DE ÁGUA	74
6- CONCLUSÃO	78
7- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	79

CAPÍTULO I

ANÁLISE DO INSETICIDA ORGANOFOSFORADO TEMEFÓS EM ÁGUAS NATURAIS: OTIMIZAÇÃO DE METODOLOGIA ANALÍTICA.

CAPÍTULO I

1 – INTRODUÇÃO:

Na tentativa de defender a agricultura contra pragas que atacam as plantações, os agrotóxicos foram criados. A utilização de agrotóxicos teve início na década de 20 e durante a segunda guerra mundial, eles foram utilizados até como armas químicas. Na guerra do Vietnã, por exemplo, o herbicida conhecido como “Tordon” (agente laranja) foi utilizado como desfolhante, provocando a morte de centenas de pessoas e séria contaminação ambiental (Amarante *et al.*, 2005).

No Brasil, a utilização de agrotóxicos tornou-se evidente em ações de combate a vetores agrícolas na década de 60, tendo sido utilizados os organoclorados também no combate aos vetores da malária. Como representante da classe, tem-se o diclorodifeniltricloroetano(DDT). Mais tarde, na década de 80, os organoclorados foram banidos pelo Ministério da Agricultura, devido à sua elevada persistência no ambiente (Amarante *et al.*, 2003).

A Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) define agrotóxicos e afins como sendo “produtos e agentes de processos físicos, químicos ou biológicos, destinados ao uso nos setores de produção, no armazenamento e no beneficiamento de produtos agrícolas, nas pastagens, na proteção de florestas nativas ou plantadas, e de outros ecossistemas e de ambientes urbanos, hídricos e industriais, cuja finalidade seja alterar a composição da flora ou da fauna, a fim de preservá-las da ação danosa de seres vivos considerados nocivos, bem como as substâncias e produtos empregados como desfolhantes, dessecantes, estimuladores e inibidores de crescimento” (ANVISA, 2007).

Além de agredir o ambiente, a saúde também pode ser prejudicada pela exposição a estas substâncias. Quando mal utilizados, os agrotóxicos podem provocar três tipos de intoxicação: aguda, subaguda e crônica. Na intoxicação aguda, os sintomas surgem rapidamente. Na intoxicação subaguda, os sintomas aparecem aos poucos: dor de cabeça, dor de estômago e sonolência. Já a intoxicação crônica pode surgir meses ou anos após a exposição e pode levar a paralisia e doenças, como o câncer.

No Brasil, alguns inseticidas vêm sendo utilizados pela saúde pública como estratégia para combater o mosquito *aedes aegypti*, transmissor da dengue. Porém, o uso freqüente desses compostos pode levar ao desenvolvimento de resistência do mosquito, comprometendo o controle e favorecendo a transmissão da doença. Além disso, esses compostos, em sua maioria, apresentam produtos de degradação que, por sua vez, podem possuir toxicidade mais elevada que o composto de origem, característica essa evidenciada no

inseticida organofosforado (OF) temefós, utilizado no programa de erradicação do *aedes aegypti*.

O programa de erradicação do *aedes aegypti* define o temefós como “inseticida organofosforado adequadamente formulado para ser adicionado em água, potável ou não” mostrando a desconsideração dos aspectos relativos à natureza inseticida e a toxicidade deste produto (Augusto e Neto, 2007). O temefós apresenta dificuldade na sua detecção, em decorrência de sua baixa estabilidade no meio aquático. Deste modo, faz-se necessário o desenvolvimento de metodologias analíticas que possam detectar e quantificar a presença dos resíduos desses compostos no ambiente aquático.

Na atualidade, são necessários métodos analíticos que possibilitem o uso dos equipamentos com sensibilidade próxima ao seu limite de quantificação. A aplicação de métodos analíticos em amostras onde o(s) analito(s) encontra(m)-se em concentrações baixas resulta, na maioria das vezes, na obtenção de um sinal tão pequeno que pode não ser distinguido do ruído ou até mesmo na não obtenção do sinal (Castro, 2002).

A utilização de uma técnica de pré-concentração analítica com o objetivo de transferir o analito para uma nova fase (adsorvente), sendo retirado deste por meio de um solvente, com volume acentuadamente menor, torna possível, na maioria das vezes, a aplicação de técnica instrumental escolhida para a sua determinação. Além disso, pode-se evitar a interferência de espécies com propriedades similares às do analito e, portanto, causar alteração na intensidade do sinal medido. Tal estratégia torna possível expandir o potencial relativo à sensibilidade da técnica, além de melhorar a seletividade, quando necessário. Assim, a combinação de uma ferramenta analítica com a pré-concentração/separação amplia a faixa de aplicação de forma substancial.

Esta parte do trabalho objetivou desenvolver um método analítico rápido e miniaturizado para determinação de resíduos do inseticida organofosforado temefós em águas, empregando, na etapa de preparo de amostra, a extração em fase sólida do inglês, *solid phase extraction* (SPE), com detecção final por cromatografia a líquido de alta eficiência do inglês *high performance liquid chromatography* (HPLC) com detecção por arranjo de fotodiodos do inglês *diode array detection* (DAD). Posteriormente, o método otimizado foi utilizado no estudo da contaminação em águas naturais subterrâneas destinadas ao abastecimento.

A escolha do inseticida estudado neste trabalho deu-se em decorrência do expressivo uso do mesmo pela Fundação Nacional de Saúde (FNS) em campanhas de saúde pública no combate às larvas do mosquito *Aedes aegypti*.

2 – REVISÃO DE LITERATURA:

2.1 – Classificação e Toxicidade dos Agrotóxicos:

Os agrotóxicos são classificados, de acordo com o uso, por exemplo, como acaricidas, fungicidas, herbicidas e inseticidas. Idealmente, eles devem apresentar uma ação tóxica específica para um dado organismo alvo, sem, no entanto afetar outros (Bolognesi e Morosso, 2000). Existem casos onde a ação é específica, como por exemplo, os inseticidas sistêmicos. Contudo, na sua grande maioria, estes compostos agem como venenos, atingindo todo o ecossistema, a fauna, a flora e os seres humanos. Logo, o uso de agrotóxicos necessita de cuidadosa seleção e criteriosa manipulação, bem como meios de aplicação que possam minimizar os efeitos para os organismos “não-alvos”. Além disso, muitos agrotóxicos são persistentes, podendo ser bioacumulados nos organismos vivos (Younes e Galal-Gorchev, 2000).

A toxicidade dos agrotóxicos é expressa em termos do valor da Dose Letal (DL_{50}), por via oral, representada por miligramas do produto tóxico por quilo de peso vivo ($mg.Kg^{-1}$), necessário para eliminar 50% dos animais-teste. Assim, para fins de prescrição das medidas de segurança contra riscos para a saúde humana, os produtos são enquadrados em função do DL_{50} , inerente a cada um deles, conforme mostra a Tabela 1 (Faria, 2004).

Tabela 1. Classificação toxicológica dos agrotóxicos em função da DL_{50} .

Classe Toxicológica	Descrição
I	Extremamente tóxicos ($DL_{50} < 50$ mg/kg de peso vivo)
II	Muito tóxicos ($DL_{50} = 50$ a 500 mg/kg de peso vivo)
III	Moderadamente tóxicos ($DL_{50} = 500$ a 5000 mg/kg de peso vivo)
IV	Pouco tóxicos ($DL_{50} > 5000$ mg/kg de peso vivo)

2.2 – A Importância do Controle de Qualidade das Águas:

A presença de pesticidas nas águas leva à contaminação química, que traz vários problemas à saúde pública. As consequências que se pode ter com a contaminação por pesticidas estão diretamente relacionadas à toxicidade do composto, ao grau de contaminação e ao tempo de aplicação. As principais vias de entrada de compostos orgânicos no organismo

humano e animal são: gastrointestinal, respiratória e dérmica (Queiroz, 2001). A maior parte dos pesticidas, por sua lipofilicidade é amplamente acumulada no organismo em tecidos lipídicos, no fígado, nos rins, no cérebro e no coração (Bizuik *et al.*, 1996).

Órgãos de outros países, tais como a Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (US-EPA) e a Comunidade Européia (EECC) estabeleceram limites em relação às concentrações de pesticidas encontrados em águas destinadas ao abastecimento. Os níveis permitidos pela Comunidade Européia, por exemplo, são determinados pela Directiva de Água Potável (80/778/EEC), que determina que a concentração máxima tolerável de um pesticida individual não deve exceder $0,1 \mu\text{g.L}^{-1}$ e que a concentração total de pesticidas não exceda de $0,5 \mu\text{g.L}^{-1}$, em água potável (EECC, 1980).

Com base nas propriedades fundamentais, que caracterizam o grau de toxicidade de um agrotóxico em contaminar águas superficiais, tais como solubilidade em água ($>30 \text{ mg.L}^{-1}$), coeficiente de adsorção linear do agrotóxico no solo, K_{ob} (<5 , usualmente <1), coeficiente de adsorção à matéria orgânica K_{oc} ($< 300\text{-}500 \text{ mL/g}$), e coeficiente de partição octanol/água, K_{ow} (< 300), a US-EPA elaborou uma lista de agrotóxicos “prioritários”. O termo se aplica a todas as substâncias que são identificadas em fontes de águas em concentrações acima de $0,1 \mu\text{g.L}^{-1}$, que são relevantes à saúde pública (suspeitos de serem carcinogênicos ou mutagênicos) e que são algumas vezes encontrados em água potável (Much *et al.*, 1990).

A Organização Mundial de Saúde (OMS), por sua vez, também tornou público os requisitos para as concentrações de resíduos de agrotóxicos, fornecendo informações sobre métodos analíticos para a determinação de agrotóxicos e seus produtos de degradação em águas (WHO, 1987).

Com base no que foi exposto, verifica-se que é de suma importância para a população em geral o desenvolvimento de método que possam possibilitar a detecção e a quantificação de resíduos de agrotóxicos no ambiente, em níveis de sensibilidade que atendam às exigências da legislação.

2.3 – Área de Estudo:

2.3.1 - O município de Centro Novo do Maranhão: localização e problemática de intoxicação por agroquímicos:

Centro Novo do Maranhão é uma cidade recém-emancipada, com população, predominantemente rural de aproximadamente 16.170 habitantes, assim distribuídos: 4.500 hab na sede (27,8% - zona urbana), e o restante (72,2% - zona rural), pertencente a sete povoados e

a dois distritos rurais conhecidos como Chega-Tudo e Limão, distantes da sede aproximadamente 38 Km. A ligação dos distritos e povoados com a sede dá-se por estradas de difícil acesso, sobretudo na época das chuvas. Centro Novo do Maranhão encontra-se próximo aos municípios Governador Nunes Freire e Maranhãozinho, estando também perto da cachoeira Magoari, que faz divisa com o Pará. (Figura 1).

A população de Centro Novo do Maranhão possui uma cultura de décadas, baseada na agricultura familiar do arroz, do feijão, do milho e da mandioca. Há anos os trabalhadores rurais utilizam agrotóxicos para a proteção das lavouras, mas somente depois de 1994 teve início o uso intensivo dos pesticidas organofosforados, em especial do inseticida tamaron (princípio ativo: metamidofós). O inseticida metamidofós tem classificação toxicológica II, considerado altamente tóxico pelo Ministério da Saúde (MS).

Na região em estudo, o desconhecimento em relação aos pesticidas é tamanho, que o uso e a comercialização tornaram-se banalizados. Qualquer pessoa, de qualquer idade (incluindo menores), muitas vezes sem qualquer escolaridade, pode comprar, preparar e aplicar os produtos, além de descartar as suas embalagens onde melhor lhe aprouver. Um dos maiores agravantes: os produtos são facilmente adquiridos no comércio local (quitandas e mercadinhos), sendo inclusive comercializados a granel e armazenados nos mesmos locais onde são guardados muitos dos alimentos comercializados, como o arroz, o feijão, o milho e os hortifrutigranjeiros.

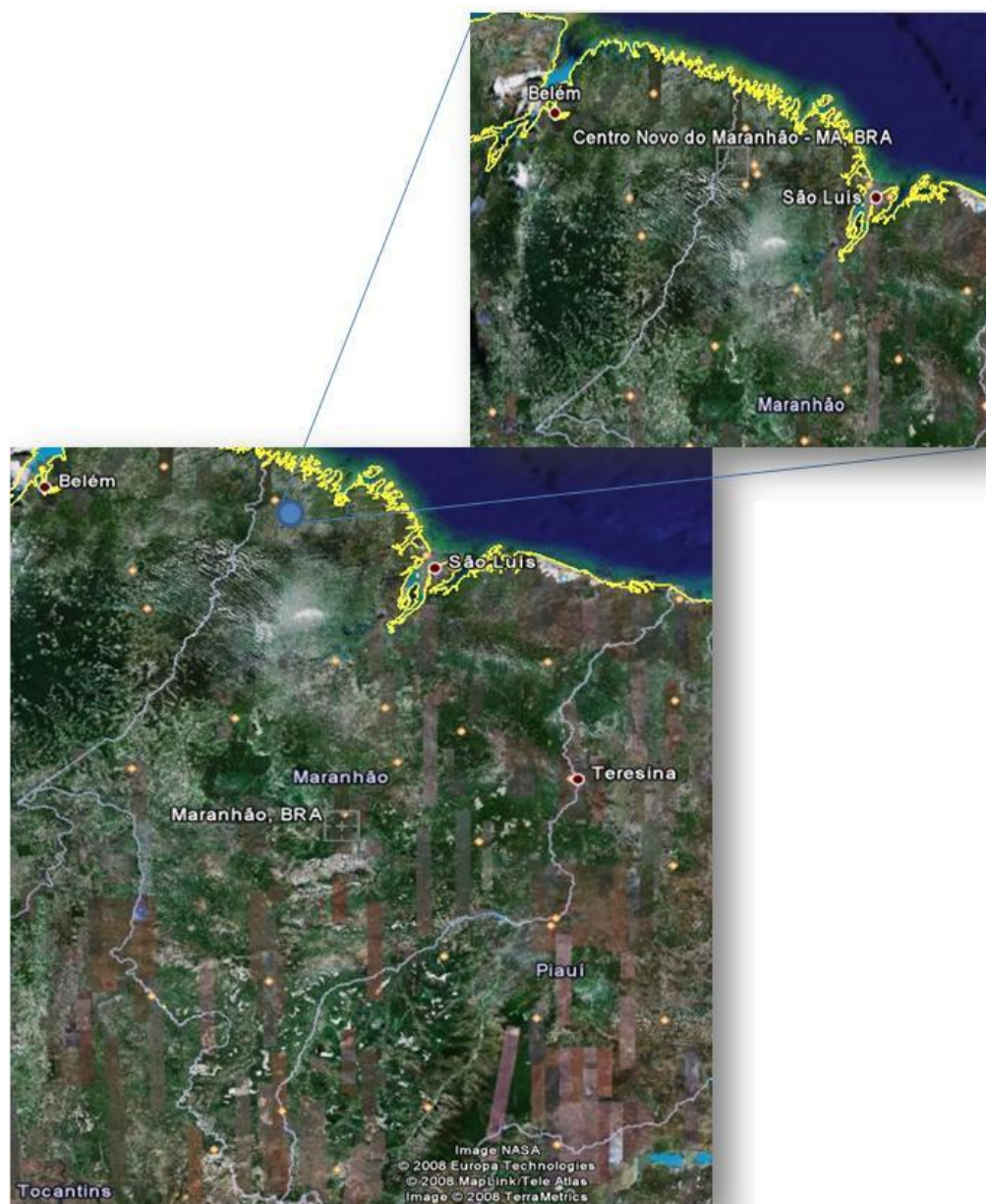


Figura 1- localização do Município de Centro Novo do Maranhão (Imagem NASA, 2008)

A falta de conhecimento com relação aos perigos dos agrotóxicos, entretanto, não é observada somente na população, composta, na sua maioria, de pessoas que sequer possuem o primeiro grau completo. É observada também nos agentes de saúde, que adicionam o pesticida **Abate®** (princípio ativo: temefós), um inseticida organofosforado (OP) de classificação toxicológica III (moderadamente tóxico) nos reservatórios da cidade, sem nenhum critério. Estes reservatórios são constituídos de poços tipos cacimbão e artesianos, e são usados pelos moradores para o consumo. A aplicação do Abate visa ao controle da dengue, mas tem sido realizada de forma indiscriminada e sem a menor necessidade, já que se tratam, na maioria das vezes, de reservatórios fechados e profundos, onde o risco de desenvolvimento das larvas do mosquito *Aedes aegypti* é mínimo.

Casos de pacientes apresentando estranhos sintomas começaram a aparecer por volta do ano 2000, neste município. Os sintomas, que vêm se manifestando até hoje em dezenas de pessoas (cerca de 60, no total), são os seguintes: edemas de membros inferiores, dores abdominais, cefaléia, fraqueza muscular, falta de ar, cansaço, perda de coordenação motora e, em alguns casos mais extremos, vômito, diarreia, forte irritabilidade e sinais de depressão.

No final de 2005, uma família inteira (família Mesquita), composta de sete pessoas, procurou a prefeitura da cidade de Centro Novo do Maranhão, manifestando sérios problemas de saúde. A prefeitura buscou apoio dos órgãos de saúde do estado, porém mesmo tendo atendimento primário, em São Luís, dois membros dessa mesma família, ambos jovens (15 e 22 anos) evoluíram a óbito no mesmo ano. Os demais membros foram submetidos a exames de fezes e urina, e colocados em observação. Os sintomas eram semelhantes aos já mencionados.

Diante desses fatos, a Agência Estadual de Vigilância Sanitária ligada à ANVISA, contactou o Núcleo de Análise de Resíduos de Pesticidas (NARP/UFMA), que se prontificou a realizar as análises de algumas amostras de água e de alimentos na região. O presente estudo faz parte do trabalho preliminar, realizado na região. Entretanto, para se ter confiabilidade nos resultados de análise do organofosforado temefós, foi realizado esta etapa de otimização do método analítico.

2.4 – O Inseticida Organofosforado Temefós:

O temefós (*o,o,o',o'*-tetramethyl *o,o'*-thiodi-*p*-phenylene diphosphorothioate) (Figura 2), também conhecido comercialmente como **Abate®**, é um inseticida organofosforado de toxicidade moderada a alta, dependendo do organismo vivo. Trata-se de um composto com massa molar de 466,5g/mol; densidade de 1,32g/cm³; coeficiente octanol-água de 4,90; estabilidade entre pH 5 a 7, e solubilidade em água de 3.10⁻⁵g/L e, em hexano, de 9,6g/L. Desde

meados da década de 90, este inseticida vem sendo utilizado, efetivamente, na saúde pública, em especial no controle das larvas dos mosquitos *anopheles*, *aedes* e *culex* (Braga, 2001; FNS, 1999). Tem sido usado também no controle de pulgas em cães e gatos (Tomlin, 1994).

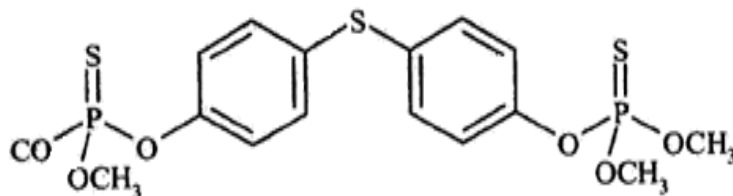


Figura 2- Estrutura química do inseticida temefós

O temefós, assim como a grande maioria dos OFs, é tóxico para vários organismos, afetando diretamente o sistema nervoso, através da inibição da enzima acetilcolinesterase. Tal inibição provoca o acúmulo da acetilcolina nas fibras nervosas, o que impede a transmissão de novos impulsos, provocando a sinapse e levando a uma série de efeitos no organismo, tais como convulsões, tremores, parada respiratória, podendo chegar ao coma e à morte (OSHA, 2006).

2.4.1 – Toxicidade e riscos de intoxicação:

Devido à sua toxicidade para alguns organismos, caso não haja cuidados durante a aplicação, o temefós pode apresentar graves riscos à saúde dos seres humanos e animais, sobretudo quando presente em concentrações acima do tolerado para os organismos, seja na água, no solo, no ar ou nos alimentos. No caso de intoxicação aguda, os sintomas apresentados são típicos de intoxicação com outros organofosforados, podendo incluir náusea, salivação excessiva, dificuldade na respiração e perda da coordenação motora. Os valores de dose letal (DL_{50}) orais relatadas para o temefós variam de 1.226 a 13.000 mg.kg^{-1} para ratos; já para formulações em pó (2%) a DL_{50} para cães e gatos é de 5.000 mg.kg^{-1} (ECOTOXINET, 1996).

Segundo estudos toxicológicos realizados em seres humanos expostos ao temefós, numa dose oral de 256 mg.kg^{-1} por 5 dias ou 64 mg.kg^{-1} por 4 semanas não resultaram em nenhum sinal de inibição da colinesterase. Ratos, coelhos e porcos *guinea* toleram exposições ao temefós de 10 mg/kg/dia por um período prolongado (5 a 129 dias); porém, observou-se certa inibição da enzima colinesterase (Gallo, 1999).

Testes com várias espécies de animais silvestres indicaram que o temefós é altamente tóxico a algumas espécies de pássaros e apresenta moderada toxicidade para outras.

Assim O DL₅₀ para o temefós varia de 18,9 mg.kg⁻¹ para codornizes da Califórnia, até 240 mg.kg⁻¹ para a perdiz *chukar* (Hudson e Tucker, 2000).

O temefós mostrou uma larga escala de toxicidade aos organismos aquáticos, dependendo da formulação. A espécie mais sensível de peixe é a truta, com DL₅₀ que varia de 0,16 mg.L⁻¹ a 3,49 mg.L⁻¹ (Johson e Finley, 1980).

2.4.2 – Degradação do princípio ativo:

Alguns pesticidas sofrem modificações na estrutura química durante o período em que permanecem no meio onde foram aplicados, ou mesmo na água, onde são carregados. Essas mudanças dependem de alguns fatores, tais como condições climáticas, pH e solubilidade, resultando em alterações químicas, físicas e biológicas e favorecendo a formação dos produtos de degradação. Como já mencionado, alguns destes produtos podem, por vezes, ser mais tóxicos do que o composto de origem (Lacorte *et al.*, 1997).

No ambiente aquático, o temefós é conhecido por possuir moderada toxicidade. Contudo, mediante degradação ocorrem à formação de suas formas oxo e sulfóxido, além de seus isômeros (Figura 3), que são compostos com elevado potencial de inibição da colinesterase. O temefós sulfóxido tem sido identificado em amostras de água e sedimento, sob condições aeróbicas e anaeróbicas (TEMEPHOS RED, 2006). Em estudo feito nos campos de arroz do Delta do Ebro (Espanha), vários produtos de degradação do temefós foram observados logo em seguida ao tratamento com o inseticida. O isômero do temefós, o temefós oxo e temefós sulfóxido foram detectados imediatamente após a aplicação do inseticida, indicando oxidação e isomerização como importante rota de transformação para o temefós. No caso do isômero do temefós sulfóxido, o aparecimento ocorreu uma hora após a aplicação do inseticida, apresentando um pequeno acréscimo em função do tempo. Temefós sulfóxido e seu isômero persistiram por mais tempo nos campos, com o aumento da concentração do isômero ocorrendo concomitantemente com o decréscimo na concentração do temefós sulfóxido. Em 11 horas após a aplicação do inseticida a substância originalmente aplicada não foi detectada (Lacorte *et al.*, 1996).

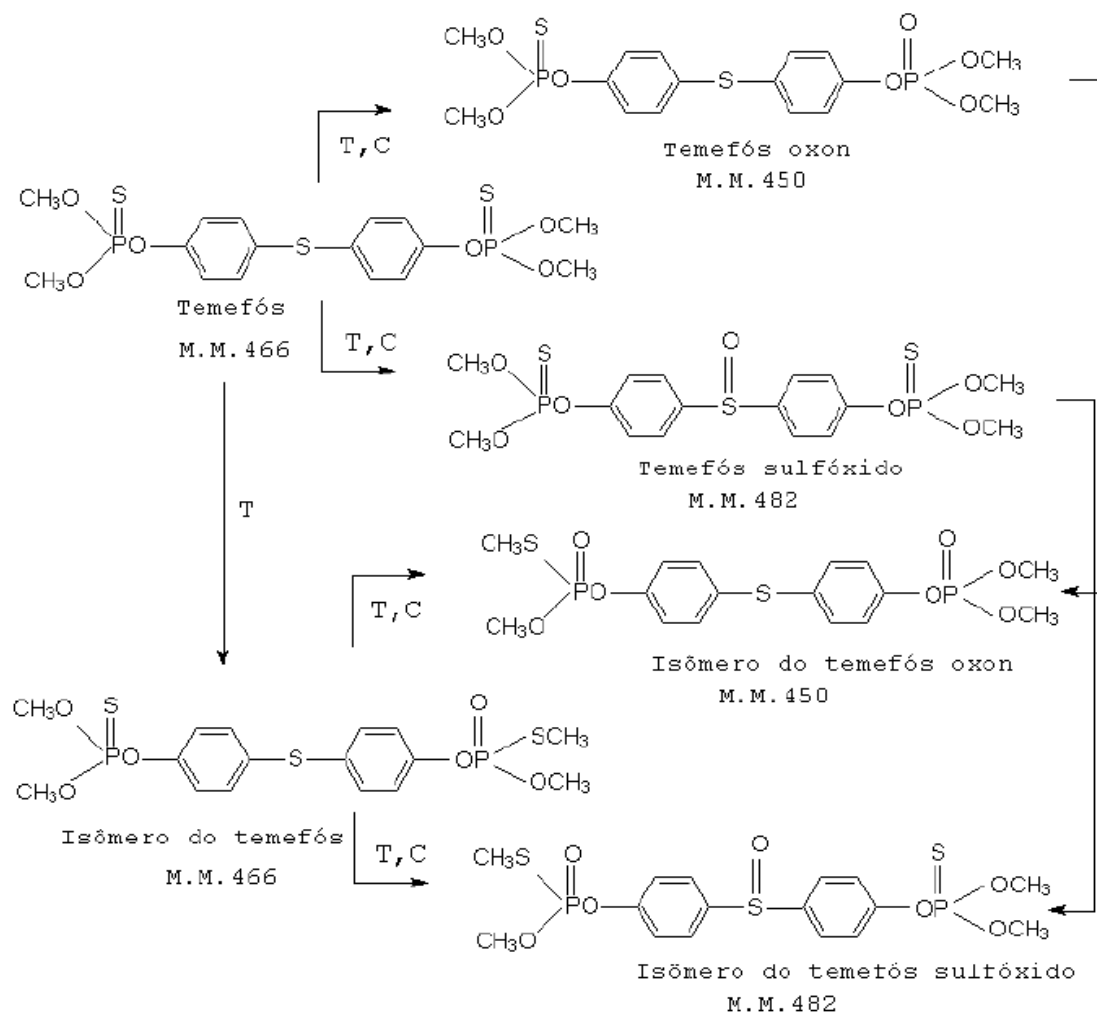


Figura 3- Fórmula Estrutural do Temefós e seus Produtos de Degradação (Santos, 1999)

Apesar do temefós apresentar valores de K_{oc} e K_{ow} relativamente elevados (K_{oc} entre 200 e 500 $\text{cm}^3 \cdot \text{g}^{-1}$ e $\log K_{ow} = 4,9$), o estudo feito por Lacorte *et al*, (1996) mostrou que o inseticida não é fortemente adsorvido pelos constituintes do solo, nem acumulado nos organismos aquáticos presentes nos campos de arroz. O modo como o inseticida foi aplicado e as baixas concentrações devem ter contribuído para os resultados observados nos campos (Santos, 1999).

2.4.3 - Métodos de análise do inseticida temefós:

O método mais empregado para detecção e quantificação do inseticida organofosforado temefós em matrizes ambientais é a cromatografia a líquido de alta eficiência (do inglês, *High Performance Liquid Chromatography* HPLC). Esta técnica é precisa e reprodutiva, apresentando baixos limites de detecção; contudo, a amostra geralmente necessita

ser submetida a um pré-tratamento, baseado na extração do princípio ativo, seguida de purificação dos extratos.

Lacorte *et al.* (1997) identificaram fenthion, temefós e seus produtos de transformação em água, via cromatografia a líquido com detecção por espectrometria de massas (do inglês HPLC/MS). Foram utilizados discos de sílica modificados com grupamentos octadecil (C₁₈) para a obtenção e purificação dos extratos cromatográficos. Em estudo anterior (Lacorte e Barceló, 1995), temefós também foi identificado por HPLC/MS, tendo sido observada uma linearidade entre 0,050 e 2 µg.L⁻¹, com limite de detecção (LD) de 0,038 µg.L⁻¹ e coeficiente de correlação linear (R²) de 0,9920, sendo que a curva analítica foi construída mediante metodologia de adição de padrão interno. Os mesmos autores estudaram, ainda, a persistência do temefós e seus produtos de transformação em água proveniente de culturas de arroz, via cromatografia a líquido com detector por arranjo de fotodiodo (HPLC/DAD), e obtiveram um índice de recuperação na ordem de 90%, com um coeficiente de variação (CV) de 8% (Lacorte *et al.*, 1996).

Devido à sua baixa solubilidade, o temefós forma uma película em forma de um filme na superfície da água quando o inseticida é aplicado, dificultando o processo de amostragem e, conseqüentemente, a sua detecção. Assim, é necessária a realização de algumas etapas antes da análise propriamente dita, tais como filtração, extração e pré-concentração. A Figura 4 esquematiza as etapas de preparo de uma amostra de água, para análise do composto, antes da determinação cromatográfica.

A filtração visa a remover possíveis partículas em suspensão presentes na matriz. O processo de extração e pré-concentração pode ser realizado via extração em fase sólida (SPE), onde o objetivo principal é passar, através de um cartucho, um grande volume de amostra, a fim de aprisionar somente o analito, deixando passar o solvente e os possíveis interferentes. Numa etapa seguinte, elui-se o analito de interesse com pequena quantidade de solvente, de forma que o composto esteja bem mais concentrado neste extrato que na amostra original. Este tipo de procedimento é muito comum na análise de amostras de interesse em química ambiental, nas quais, usualmente, o analito encontra-se extremamente diluído. Após a etapa de pré-concentração, o extrato possuirá um teor apropriado para ser analisado diretamente por uma técnica instrumental adequada.



Figura 4 - Etapas envolvidas no processo de extração e pré-concentração do inseticida.

2.5 – Aspectos Analíticos na Determinação de Resíduos de Pesticidas:

2.5.1 - Extração em fase sólida (SPE):

Diversos contaminantes encontram-se presentes na água em nível de traços. Nos últimos anos tem sido crescente o interesse no desenvolvimento de novas técnicas de preparo de amostra que viabilizem a pré-concentração de analitos, possibilitando melhor detecção pelas técnicas empregadas. A extração em fase sólida (SPE) é uma das alternativas mais importantes para o preparo de amostras.

Vários são os procedimentos realizados no preparo da amostra por SPE utilizando cartuchos, variando o volume da amostra, o tipo de adsorvente utilizado, o processo de ativação dos cartuchos e o volume utilizado na etapa de eluição. A Figura 5 apresenta a seqüência de um procedimento de extração em fase sólida direcionado para a pré-concentração de analitos e o *clean-up* (limpeza, ou remoção de interferentes) da amostra (Lanças, 2004).

As etapas realizadas no procedimento SPE são as seguintes: i e ii) acondicionamento do cartucho; iii) adição da amostra; iv) remoção de possíveis interferentes e v) eluição do analito. Dependendo do modo de operação, poderão ocorrer pequenas variações nas etapas envolvidas.

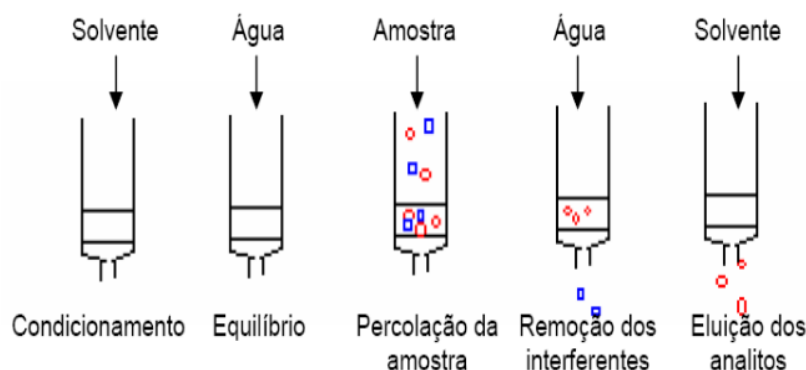


Figura 5- Esquema do procedimento de pré-concentração (Lanças, 2004).

O procedimento SPE surgiu em meados da década de 70, visando à eliminação de alguns problemas analíticos, tais como o uso de grandes volumes de solventes orgânicos, a difícil automação e, geralmente a pequena repetitividade e reprodutividade dos métodos convencionais de extração, em especial extração líquido-líquido (Lanças, 2004).

A necessidade de extrair analitos mais polares tornou o procedimento SPE uma das alternativas propostas pela US-EPA para a análise de compostos em nível de traços presentes em água, visto que muitos analitos polares são solúveis em água e, como consequência, a

técnica de extração líquido-líquido não apresenta boas recuperações desses compostos (Hennion, 1999).

O adsorvente (fase sólida) mais utilizado na extração de agrotóxicos (medianamente polares) de amostras de água contém a sílica modificada com o grupamento C₁₈. As etapas envolvidas no mecanismo de retenção dos compostos são a adsorção do analito sobre o suporte e a partição, devido às interações apolares entre as ligações C-H do grupo C₁₈ e a ligação C-H do analito (Junker-Bucheit e Witzenbacher, 1996).

Atualmente, diversos adsorventes encontram-se disponíveis comercialmente. Em geral, os materiais de recheio empregados para SPE são similares aos usados em cromatografia a líquido (Tabela 2). Logo, carvão ativado, alumina, sílica gel, fase quimicamente ligada e polímeros (por exemplo, o copolímero de estireno entrecruzado com divinilbenzeno), têm sido utilizados para fins de extração dos compostos em matrizes as mais variadas (águas, efluentes, extratos vegetais, etc.). Os grupos mais freqüentemente usados como adsorventes à base de sílica quimicamente ligada podem ser divididos em três categorias: i) fase normal; ii) fase reversa, e iii) troca iônica.

Tabela 2. Exemplos de adsorventes utilizados em SPE.

MODERADAMENTE POLARES	
C ₁₈	Octadecilsilano
C ₈	Octilsilano
C ₂	Etilsilano
Ph	Fenilsilano
POLARES	
Al	Alumina
Si	Sílica
CN	Cianopropilsilano
TROCA IÔNICA	
PRS	Sulfonilpropilsilano
CBA	Carboximetilsilano
SAX	Trimetilaminopropilsilano

A extração em SPE empregando fase normal usualmente substitui a adsorção em extrações de solutos polares que podem sofrer adsorção irreversível e não serem eluídos do cartucho. A amostra é aplicada em um solvente de baixa polaridade e os analitos são retidos em maior ou menor grau (dependendo da polaridade) na fase sólida. Em seguida, um solvente polar,

como em adsorção, é aplicado para romper a interação do analito com a fase sólida polar e eluir os analitos (Lanças, 2004).

Na SPE utilizando fase reversa acontece o oposto: a fase móvel apresenta maior polaridade que a fase sólida, que retém os compostos apolares presentes em solventes polares. Conseqüentemente, os analitos retidos serão eluídos com um solvente de menor polaridade. Uma vez que o aumento do tamanho das cadeias hidrocarbônicas aumenta o caráter apolar do adsorvente, em muitos casos o uso de fases do tipo C₁₈ pode acarretar em uma retenção de analitos apolares maior que a desejada. Neste caso, empregam-se adsorventes contendo cadeias menores, como por exemplo, octil (C₈) que proporcionará menor retenção (Lanças, 2004).

2.5.2 - Cromatografia a líquido de alta eficiência (HPLC):

A cromatografia é um método de separação que encontra aplicação em todos os ramos da ciência. Foi introduzida e divulgada pelo botânico russo Mikhail Tswett no início do século 20 (Skoog, 2002). Em suas diferentes modalidades, esta técnica representa cerca de 70% das separações em Química Analítica realizada hoje em dia (Neto, 2003).

A cromatografia está fundamentada na partição dos analitos entre duas fases, uma estacionária e outra móvel. A distribuição, exclusão, partição ou adsorção seletiva dos componentes é um processo de equilíbrio dinâmico e as moléculas dos analitos ora estão retidos na fase estacionária ora deslocando-se com a fase móvel (Neto, 2003). A fase estacionária pode ser um sólido ou um líquido impregnado a um sólido, e a fase móvel, um fluido líquido ou gasoso. Durante a passagem da fase móvel sobre a fase estacionária, os componentes da mistura são distribuídos pelas duas fases de tal forma que cada um deles é seletivamente retido pela fase estacionária, o que resulta em migrações diferenciais destes (Collins, 2006).

A cromatografia a líquido de alta eficiência (HPLC) é uma técnica de separação fundamentada na distribuição dos componentes de uma mistura entre duas fases imiscíveis: a fase móvel (líquida) e a fase estacionária (contida em uma coluna geralmente de inox). As separações são alcançadas por partição, adsorção, troca iônica, exclusão por tamanho ou interações esterioquímicas, dependendo do tipo da fase estacionária utilizada. Quando comparada com a cromatografia a gás (CG) a técnica HPLC apresenta como principal vantagem a separação de amostras não-voláteis e termolábeis, que não podem ser separadas por CG (Mc Nair, 1997).

Vários fatores químicos e físico-químicos influenciam na separação cromatográfica e dependem da natureza química das substâncias a serem separadas, da composição e do fluxo da fase móvel, da composição e da área superficial da fase estacionária.

O equipamento utilizado consiste de reservatório que contém a fase móvel, bomba com a finalidade de carrear a fase móvel pelo sistema cromatográfico, injetor para introduzir a amostra no sistema, coluna cromatográfica, detector e dispositivo de captura de dados, como um computador, integrador ou registrador.

Os sistemas cromatográficos utilizados atualmente consistem-se de bombas de fluxo, controladas por microcomputador, que podem ser programadas para variar a relação de componentes da fase móvel, como é necessário para cromatografia realizada com gradiente de solvente, ou quando se trabalha com mistura na forma isocrática.

2.5.3 - Volume de ruptura (V_R):

O volume de ruptura é definido como sendo o volume máximo de amostra que pode ser percolado por um tubo de extração, de maneira que não ocorra perda do analito de interesse e que não influencie de forma negativa na recuperação. Em outras palavras, é o volume que possibilita que uma recuperação teórica seja o mais próximo possível a 100%.

O volume de ruptura depende das interações entre o analito, e o solvente da amostra e do tipo de adsorvente. Em relação à fase reversa, o volume de ruptura depende da hidrofobicidade do analito e da massa do adsorvente utilizado. Este é um parâmetro importante em SPE, pois indica qual o volume máximo de amostra que pode ser pré-concentrado, sendo que dois fatores podem ser responsáveis pelo volume de ruptura: retenção insuficiente do analito pelo adsorvente e sobrecarga do adsorvente (Faria, 2004).

2.5.4 - Análise por HPLC:

Grande parte dos métodos de extração em fase sólida desenvolvidos para análise de compostos polares utiliza a HPLC ou CG como técnicas instrumentais para determinação dos analitos de interesse numa amostra. Entretanto, métodos como cromatografia em camada delgada (CCD) e cromatografia por fluido supercrítico (CFS) já estão bem desenvolvidos (Wells e Yu, 2000).

A detecção realizada na região do ultravioleta (UV) em um único comprimento de onda ou em vários comprimentos de onda, que faz uso de um detector por arranjo de fotodiodos (DAD), é comumente empregado em HPLC. A detecção eletroquímica (Jauregui e Galceran, 1997) e por espectrometria de massas (Aguilar *et al.*, 1998) também é apresentada na literatura, esta ultima com a finalidade adicional de confirmar picos de substâncias presentes na amostra.

Os limites de detecção em HPLC estão em torno de alguns $\mu\text{g.L}^{-1}$, e são geralmente comparáveis aos obtidos via cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (GC-MS) (Wells e Yu, 2000).

2.5.5 – Procedimentos usuais para otimização de uma metodologia analítica:

Para garantir que um método analítico destinado à quantificação de resíduos de pesticidas produza informações confiáveis e interpretáveis sobre a amostra, ele deve ser submetido a uma avaliação, denominada de *validação*. Um processo de validação bem realizado e documentado propicia às agências reguladoras evidências objetivas de que o método proposto e o sistema são adequados para o uso desejado (Ribani *et al.*, 2004).

No Brasil, duas agências são credenciadas para verificar a eficiência de laboratórios de ensaios: a ANVISA e o INMETRO (Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial) (Ribani *et al.*, 2004).

Em 1987, a Agência para Alimentos e Drogas dos Estados Unidos (FDA) através do “*Guideline for Submitting Samples and Analytical Data for Method Validation*”, reconheceu as especificações descritas a seguir, como as principais etapas a serem realizadas para o processo de validação de métodos. Esses termos também são conhecidos como parâmetros de desempenho analítico ou figuras de mérito (Lacorte e Barceló, 1995).

2.5.5.1 – Exatidão:

A exatidão representa o grau de concordância entre os valores individuais encontrados e um valor tido como referência. A exatidão é expressa como o percentual de resposta, obtida através do ensaio de uma quantidade conhecida da substância em análise, incorporando em um meio de composição definida, geralmente constituído de padrões certificados.

Para avaliar a exatidão de um método, as diretrizes da ICH (*International Conference on Harmonization*) recomendam a coleta de dados referentes a um mínimo de nove determinações sobre um mínimo de três diferentes concentrações, cobrindo a variação específica (por exemplo, três concentrações, análise em triplicata de cada). Os dados obtidos devem ser registrados como o percentual de resposta da quantidade conhecida adicionada, ou como a diferença entre a média e o valor, com os respectivos intervalos de confiança.

2.5.5.2 – Precisão:

A precisão representa o grau de repetitividade entre os valores de análises individuais, quando o procedimento é aplicado diversas vezes em uma mesma amostra homogênea, nas mesmas condições de trabalho. Geralmente é expressa mediante o coeficiente de variação (CV) em uma quantidade significativa de amostras.

A precisão pode ser analisada em três diferentes níveis: repetitividade, precisão intermediária e reprodutividade (Hubert, 1999 ; Causon, 1987).

A repetitividade, também conhecida como precisão intra-ensaios, corresponde aos resultados encontrados mediante várias reproduções de um método, em iguais condições, com curto intervalo de tempo. Essa determinação pode ser avaliada com no mínimo nove determinações dentro do intervalo de três diferentes concentrações e três replicatas cada, ou com no mínimo seis determinações para uma única concentração teste. A precisão intermediária expressa a variação, no mesmo laboratório, que envolve diferentes dias, diferentes analistas e diferentes equipamentos, entre outros parâmetros. A reprodutividade refere-se aos resultados obtidos em estudos de colaboração entre laboratórios (Hubert, 1999 ; Causon, 1987).

2.5.5.3 - Limite de detecção (LD):

O limite de detecção (LD) representa a menor concentração da substância em análise que pode ser detectada, com certo limite de segurança, utilizando um determinado procedimento experimental. O LD pode ser calculado mediante três maneiras diferentes: método visual, método relação sinal-ruído (geralmente três vezes) e método baseado em parâmetros da curva analítica (Ribani *et al*, 2004).

No método visual, o limite de detecção é determinado utilizando a matriz com a adição de concentrações conhecidas do analito de interesse, até a visualização da menor concentração detectável, em que seja possível distinguir entre sinal e ruído. Já no método da relação sinal/ruído, o sinal de amostras contendo o analito em concentrações muito baixas é comparado com o sinal de uma amostra branco, estabelecendo uma relação sinal-ruído (por exemplo, 3:1). No método baseado em parâmetros da curva analítica, o limite de detecção pode ser determinado através da fórmula abaixo.

$$LD = 3,3 \times \frac{s}{A} \text{ (Eq.1)}$$

Onde: s=desvio padrão da resposta; A= coeficiente angular do gráfico de calibração.

2.5.5.4 - Limite de quantificação (LQ):

O limite de quantificação (LQ) representa a menor concentração da substância em análise que pode ser medida, com certo grau de confiabilidade, utilizando-se um determinado procedimento experimental. Assim como o LD o LQ pode ser expresso como uma concentração, sendo que a precisão e exatidão das determinações também devem ser registradas (Ribani, 2004). Pode ser estimado por meio do sinal/ruído, do desvio-padrão e por processos estatísticos (Brito *et al*, 2003).

Segundo (Harris, 2001) a determinação do valor do LQ do método representa um compromisso entre os parâmetros exatidão e precisão a serem conseguidos, de tal forma que, quanto menor o nível de concentração dos analitos, maior será a variação dos resultados, tornando o método menos preciso. Concentrações maiores para o LQ deverão ser registradas quando houver necessidade de maior precisão (Ribani *et al*, 2004).

O LQ também pode ser estabelecido seguindo os mesmos métodos utilizados para o LD, sendo que para o LQ a relação sinal-ruído adotada é de 10:1 e a equação utilizada é demonstrada abaixo.

$$LQ = 10 \times \frac{s}{A} \text{ (Eq.2)}$$

Onde: s=desvio padrão da resposta; A= coeficiente angular do gráfico de calibração.

2.5.5.5 – Linearidade:

A linearidade refere-se à capacidade do método de gerar resultados linearmente proporcionais à concentração do analito, enquadrados em faixa analítica especificada. Esse parâmetro pode ser demonstrado pelo coeficiente de correlação do gráfico analítico, que não deve ser estatisticamente diferente da unidade, observando que a inclinação da reta ou coeficiente angular deverá ser diferente de zero (Hubert, 1999 ; Causon, 1987).

2.5.5.6 – Robustez:

A robustez mostra a capacidade de um método de não ser afetado por uma pequena modificação em seus parâmetros. A robustez do método é analisada através de parâmetros modificados, tais como temperatura, força iônica, composição da fase móvel, entre outros, e a respectiva determinação de seu efeito (caso ocorra) sobre os resultados e serem obtidos com a metodologia (Ribani *et al*, 2004).

3 – OBJETIVOS:

3.1 – Geral:

Esta primeira etapa do trabalho objetivou desenvolver um método simples, rápido e eficiente para determinação do inseticida organofosforado temefós em água, empregando a extração em fase sólida (SPE), com posterior análise por cromatografia a líquido de alta eficiência com detector por arranjo de fotodiodos (HPLC/DAD).

3.2 – Específicos:

- ✓ Avaliar o uso de cartuchos constituídos de fase C₁₈ quimicamente ligada à sílica, para extrair e pré-concentrar o inseticida em amostras de água;
- ✓ Desenvolver e validar um método para determinação do inseticida em água, através das seguintes figuras de mérito: precisão, recuperação, curva analítica, linearidade e detectabilidade (limites de detecção e quantificação);
- ✓ Aplicar o método para análise de amostras reais, provenientes de águas subterrâneas coletadas no município de Centro Novo do Maranhão, e
- ✓ Avaliar, através dos resultados, a possibilidade de ocorrência de contaminação de águas subterrâneas, na região estudada.

4 – PARTE EXPERIMENTAL

4.1 – Materiais e Métodos

4.1.1 – Reagentes e solventes:

Os solventes utilizados neste trabalho (acetonitrila e metanol) foram de grau cromatográficos ambos obtidos da Merck (Alemanha). A água utilizada para o preparo das soluções foi purificada em sistema Direct Q (resistividade de 18,2 MΩ.cm a 25°C).

O inseticida selecionado neste trabalho foi o organofosforado temefós (99,7% de pureza, da Pestanal). O padrão foi preparado em metanol, na concentração de 1000 mg.L⁻¹ (solução-estoque). Esta solução-estoque foi mantida em freezer, a 4°C, para evitar degradação do princípio ativo, por no máximo 3 meses. Preparou-se solução de trabalho a partir de diluições em metanol da solução-estoque, utilizando-se tais soluções para fortificar as amostras (concentrações 10 e 20 µg.L⁻¹).

4.1.2 – Análise cromatográfica:

Foi utilizado um Cromatógrafo a líquido equipado com coluna analítica de 250 mm de comp. x 4,6 mm d.i., recheada com adsorvente C₁₈, e partículas de 5 µm de diâmetro de poro (Varian), bomba binária (modelo Varian Pro Star 210), detector DAD (Varian Pro Star modelo 335) e injetor Rheodyne®, com alça de amostragem de 20 µL.

Os reagentes utilizados na fase móvel foram: água deionizada, obtida de um sistema Direct Q e acetonitrila grau cromatográfico (15:85 v/v), obtida da Merck.

4.1.3 – Extração em fase sólida:

Foram utilizados cartuchos tipo seringa com capacidade de 3 mL (STRACTA™ C₁₈ – E 500mg/3mL). A técnica de pré-concentração da amostra utilizada no trabalho foi a extração em fase sólida (SPE). Os cartuchos foram condicionados com 2 mL de metanol e, em seguida, 5 mL de água deionizada. Passou-se um volume de 100 mL da amostra, sob vácuo, (vazão de 2 mL/min) através do cartucho. A seguir, efetuou-se a secagem do cartucho sob vácuo. Após a secagem, os compostos retidos na fase adsorvente foram eluídos com 1 mL de metanol. Uma alíquota de 20 µL foi posteriormente injetada no sistema HPLC/DAD.

4.1.4 – Definição dos parâmetros analíticos:

4.1.4.1 - Avaliação do pH da amostra:

Na literatura não existem muitos trabalhos com descrição de um procedimento de extração em fase sólida do inseticida estudado, mediante utilização de cartuchos de C₁₈. Por isso, foi feito um estudo da influência do pH da amostra fortificada sobre recuperação do inseticida. O pH foi avaliado no intervalo de 3 a 7.

4.1.4.2 - Determinação do volume de capacidade do adsorvente:

Para a determinação do volume de ruptura do adsorvente, diferentes volumes (50, 100, 200, 300 mL) de amostras de água deionizada, fortificadas com 10 µg.L⁻¹ de temefós, foram submetidas ao procedimento de extração em fase sólida. Com os resultados de recuperação obtidos, foi possível avaliar o volume ideal de amostra que forneceria melhores recuperações do inseticida estudado.

4.1.4.3 – Curva analítica:

Foram obtidas curvas analíticas do pesticida na faixa de 0,5–2,5 mg.L⁻¹, injetando-se 20 µL de cada concentração, em triplicata, e, em seguida, plotando-se o gráfico de área x concentração do inseticida em estudo, até que se atingisse o patamar onde a resposta não apresentasse mais nenhuma variação.

4.1.4.4 – Detectabilidade:

Neste trabalho, para a determinação dos limites de detecção (LD) e de quantificação (LQ) foram construídas curvas analíticas com soluções nas concentrações de 0,5, 1,0, 1,5, 2,0 e 2,5 mg.L⁻¹ do inseticida, preparadas em metanol. Deste modo, foi obtida a equação da reta para o inseticida em questão. Os valores de desvio padrão estimados e do coeficiente angular foram utilizados nas equações 1 e 2 abaixo, empregadas no cálculo dos limites de detecção e de quantificação do instrumento. Para os cálculos dos limites de detecção e de quantificação (LD* e LQ*, respectivamente), o LD e o LQ do instrumento foram divididos pelo fator de pré-concentração alcançado, no caso, 100.

$LD = 3,3 \times SD/a$ (Eq.1) ; onde: SD = estimativa do desvio padrão do coeficiente linear

$LQ = 10 \times SD/a$ (Eq.2) a = coeficiente angular

4.1.4.5 – Ensaios de recuperação:

Amostras de água Direct Q foram fortificadas com concentrações conhecidas (10 e 20 $\mu\text{g.L}^{-1}$) do pesticida temefós e, em seguida, submetidas ao processo de extração. Cada experimento foi realizado em triplicata. A partir daí, os extratos finais foram injetados no sistema HPLC, tendo sido registrados os valores de áreas para cada nível de concentração estudada. A recuperação (R) foi calculada através da equação abaixo:

$$R (\%) = \text{Concentração encontrada} \times 100 / \text{Concentração esperada} \quad (\text{Eq.3})$$

4.1.4.6 – Precisão:

Neste trabalho, foi determinada a média da repetitividade, através do cálculo dos coeficientes de variação (CV%). Essa determinação foi feita a partir de um mínimo de seis determinações (dois níveis de concentração, 10 e 20 $\mu\text{g.L}^{-1}$, três repetições cada um).

4.1.4.7 – Linearidade e Faixa linear:

A faixa linear foi obtida, plotando-se a curva analítica (concentração x área do pico); quando a reta começou a sofrer um desvio de linearidade, este valor de concentração foi tomado como sendo o valor máximo a ser determinado. O valor mínimo da faixa correspondeu, então, ao limite de quantificação do instrumento.

4.1.5 – Aplicação do método para análises de amostra reais:

Foram coletadas e analisadas amostras de água, provenientes de seis poços do tipo cacimão, coletados em residências localizadas na cidade de Centro Novo do Maranhão, onde havia pelo menos um caso de pessoa com os sintomas de intoxicação descritos no item 2.3.1, e de dois poços de residências onde não havia nenhum caso (amostra-controle). A Tabela 3 apresenta detalhes sobre as amostras coletadas e sua localização.

Tabela 3. Identificação das amostras de água e dos locais de coleta de água

Amostra	Descrição
P1	Poço cacimba, da família Mesquita (casa hoje abandonada), na sede – 7 casos
P2	Poço cacimba, da casa do Sr. Marinaldo Luiz, na sede – 1 caso
P3	Poço cacimba, da casa do Sr. Santos da Silva, na sede – 1 caso

P4	Poço cacimba, da casa da Sra. Bárbara Damiana, no distrito de Limão – 1 caso
P5	Poço cacimba, da casa do Sr. Osmando Vieira, no distrito de Limão – 1 caso
P6	Poço cacimba, da casa do Sr. Antonio Isaac da Silva, na sede – 2 casos
C1	Amostra controle 1 – sede (município de Centro Novo do Maranhão)
C2	Amostra controle 2 – Distrito de Limão

P = Ponto; C = Controle

As amostras foram coletadas em frascos de vidro âmbar e mantidas a uma temperatura de 4°C. No laboratório do NARP, as amostras foram tratadas seguindo o procedimento SPE já descrito, tendo sido os extratos enviados a análise por HPLC/DAD. Os extratos permaneceram sob refrigeração por no máximo duas semanas, antes da análise cromatográfica.

4.1.6 – Análises estatísticas:

Foi aplicado o teste t, para comparação de médias, utilizando o programa Excel (da Microsoft). O mesmo programa foi utilizado para determinação das curvas de regressão linear apresentadas.

5 – RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 - Obtenção do Espectro de Absorção no UV do inseticida:

Na Figura 6 é apresentado o espectro de absorção em 3D na região do UV e o comprimento de onda de máxima absorção, obtido na faixa de 200 a 400 nm para o inseticida estudado, utilizando para tal fim o detector por arranjo de diodos do próprio sistema HPLC. A máxima absorção do composto foi verificada em 230nm.

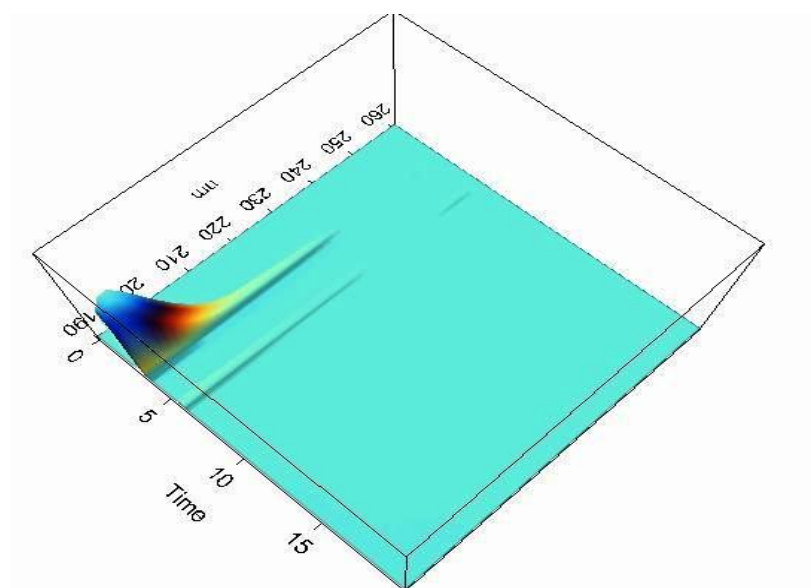


Figura 6- Espectro de máxima absorção na região do UV para o inseticida temefós.

Comparando-se o λ_{max} obtido pela varredura de comprimento de onda do sistema HPLC/DAD, com o espectro de absorção obtido com o espectrofotômetro UV-Vis Cary (Varian), percebe-se um ligeiro deslocamento do valor do λ_{max} do temefós, tendo sido encontrado $\lambda_{\text{max}} = 250$ nm com o espectrofotômetro Cary.

Para fins analíticos, optou-se por trabalhar dentro do valor de $\lambda_{\text{max}} = 230$ nm, que apresentou maior sensibilidade (maior absorbância) para o sistema cromatográfico utilizado, estando de acordo com o valor fixado por Lacorte e seus colaboradores (1997).

5.2 – Otimização da Separação Cromatográfica do Temefós:

A Figura 7 apresenta um cromatograma contendo o pico de identificação do inseticida OP temefós, obtido com uma amostra padrão, eluído com uma fase móvel (FM) constituída de uma mistura de acetonitrila (ACN) : água (H₂O) (85:15).

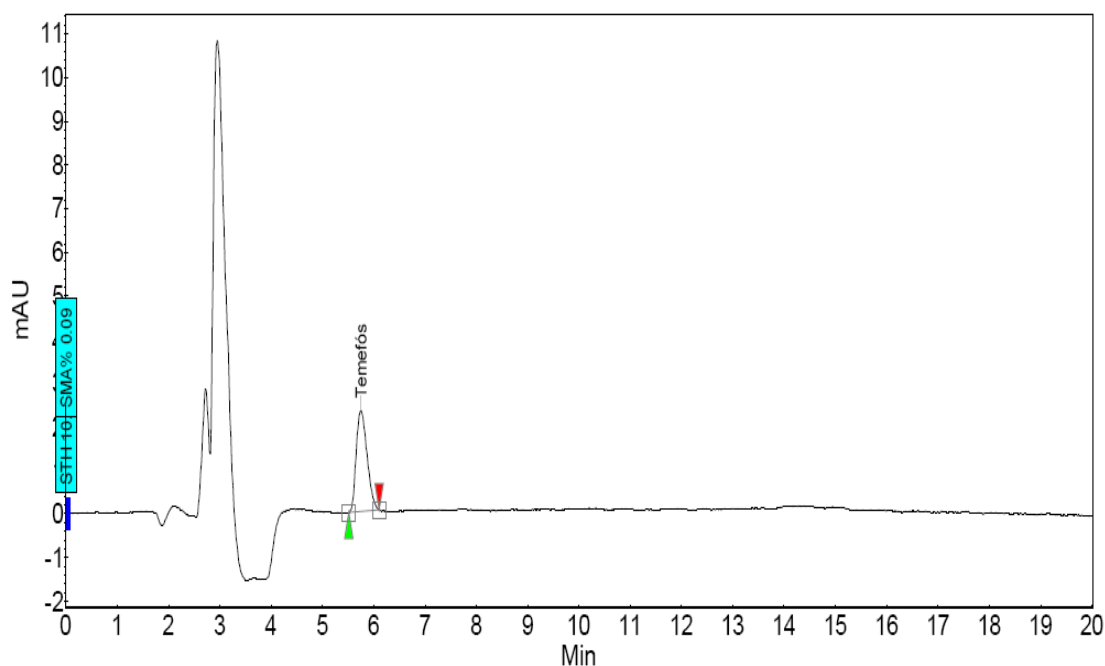


Figura 7. Cromatograma de identificação do inseticida temefós. Condições cromatográficas: coluna C_{18} , marca Varian $5\mu m$ (250 x 4,6 mm d.i); FM: ACN:H₂O 85:15 v/v; F=1 mL/min; volume de injeção: 20 μ L; detecção: DAD 200 – 400 nm.

Observou-se que o tempo (médio) de retenção (t_R) do composto esteve em torno de 5,8 min, e o cromatograma apresentou-se limpo, com pico bastante simétrico e perfeita linha de base. Baixos valores de t_R são ideais, do ponto de vista de economia do solvente. Entretanto, apresenta o inconveniente de, no caso de haverem picos de co-extrativos em amostras reais, estes, em geral, serem eluídos logo nos primeiros 5 min, o que pode resultar em sobreposição do pico de interesse.

Quando comparado com os resultados apresentado por Lacorte e Barceló (1995), verifica-se que o método proposto apresentou resultados satisfatórios, com tempo de retenção menor, proporcionando menor tempo de análise, conseqüentemente redução no uso de solventes. No presente trabalho, picos de co-extrativos, quando presentes apareceram em tempos inferiores a 5 min.

Apesar da ampla utilização do temefós em programa de saúde pública, em especial no combate ao mosquito *Aedes Aegypt*, não se encontrou na literatura pesquisada métodos específicos para a detecção e quantificação dos resíduos desse composto em amostras de água destinada ao abastecimento público.

Embora a técnica por HPLC/DAD apresente resultados desejáveis na determinação do temefós, é de fundamental importância o uso de técnicas complementares como HPLC-MS na identificação dos produtos de degradação, visto que tais produtos apresentam toxicidades

mais elevadas que o seu precursor. No presente trabalho, por limitação instrumental, não foi possível empregar esta técnica para detecção dos metabólitos.

5.3 - Estudo da Extração em Fase Sólida do Inseticida

5.3.1 - Avaliação do pH da amostra:

A Tabela 4 apresenta os valores de recuperação obtidos para o método de extração utilizando cartuchos de C₁₈ variando-se o pH da amostra. Foram utilizados, neste estudo, um volume de 100 mL de cada amostra de água, fortificada na concentração de 10 µg.L⁻¹. A Figura 8 ilustra o efeito do pH sobre a eficiência do procedimento de extração.

Tabela 4. Efeito do pH da amostra de água, sobre a eficiência do método de extração

Valores de pH	Recuperação (%)* (n = 3)	CV(%)
3	97,00	2,54
4	97,00	1,94
5	99,40	2,10
6	100,00	0,48
7	101,00	0,84

*Média de 3 repetições

Considerando que não houve diferença estatística significativa ($P < 0,5$) entre a eficiência dos procedimentos de extração em pH 6 e 7, optou-se por trabalhar com amostras mais próximas à neutralidade (pH 7,0).

O composto apresentou valores de recuperação satisfatórios em toda a faixa de pH, o que demonstra a sua elevada estabilidade em meio ácido. Além disso, pode ser verificada a sua adequada interação com o adsorvente, caracterizada pela grande tendência a ficar adsorvido na fase (C₁₈). Isto proporcionou excelentes valores de recuperação na região de pH entre 3 e 7.

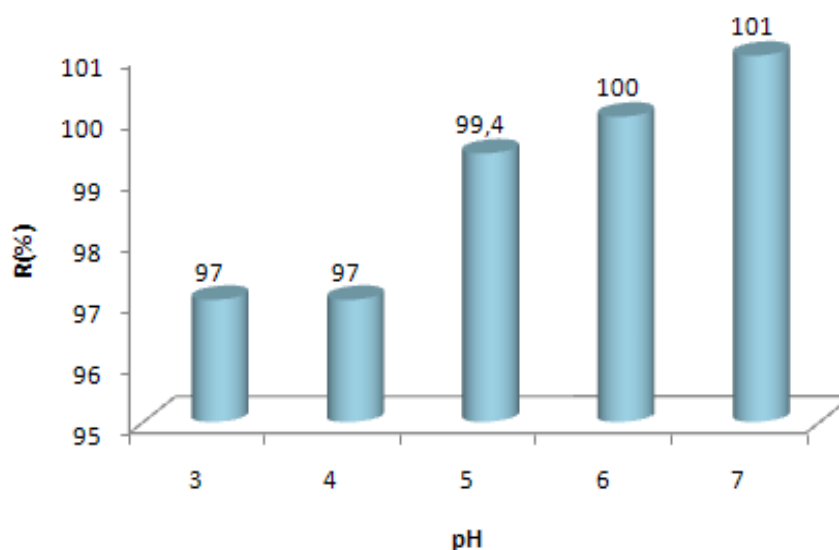


Figura 8. Valores de recuperação variando-se o pH da amostra, em vazão de 2mL/min, usando cartuchos de C₁₈.

Lacorte *et al* (1997), utilizando a técnica HPLC/MS para identificação dos inseticidas fenthion e temefós em amostra de água, não mencionaram nenhum resultado com relação ao estudo de pH para esses compostos. A falta de um criterioso controle de pH, neste trabalho poderia ter ocasionado valores de recuperação mais baixos para o método analítico, já que em meio mais alcalino o temefós tende a se degradar rapidamente.

5.2.2 - Determinação do volume de ruptura:

A Tabela 5 apresenta os resultados de recuperação e os coeficientes de variação obtidos para o inseticida temefós, utilizando diferentes volumes de amostra fortificada e empregando cartuchos C₁₈ na SPE.

Tabela 5. Recuperações (%) para diferentes volumes de amostras utilizados durante o procedimento de SPE

Volume Amostra (mL)	Recuperação (%)*	CV(%) (n=3)
50	100,03	1,98
100	101,01	2,83
200	96,35	2,26
300	109,81	4,03

*Média de 3 repetições

Os resultados indicaram que, utilizando-se cartuchos C₁₈, uma faixa ampla de volume de amostra pode fornecer recuperações satisfatórias, estendendo-se até 300 mL. No entanto, buscou-se trabalhar com um valor intermediário que apresentasse um bom fator de pré-concentração. O melhor volume de amostra é sempre menor que o volume de ruptura “*breathrough*”; assim, determinou-se que melhor volume de amostra a ser utilizada nos experimentos seria de 100 mL. A retomada dos resíduos com um volume de 1 mL de metanol permitiu um fator de pré-concentração de 100 vezes, possibilitando também um tempo de pré-concentração mais rápido.

5.2.3 - Curva Analítica, Detectabilidade e Intervalo Linear:

A Figura 9 apresenta a curva analítica do temefós e a Tabela 6 apresenta os resultados de validação do método desenvolvido para análise do inseticida temefós em água, utilizando SPE para a pré-concentração e HPLC/DAD para a quantificação.

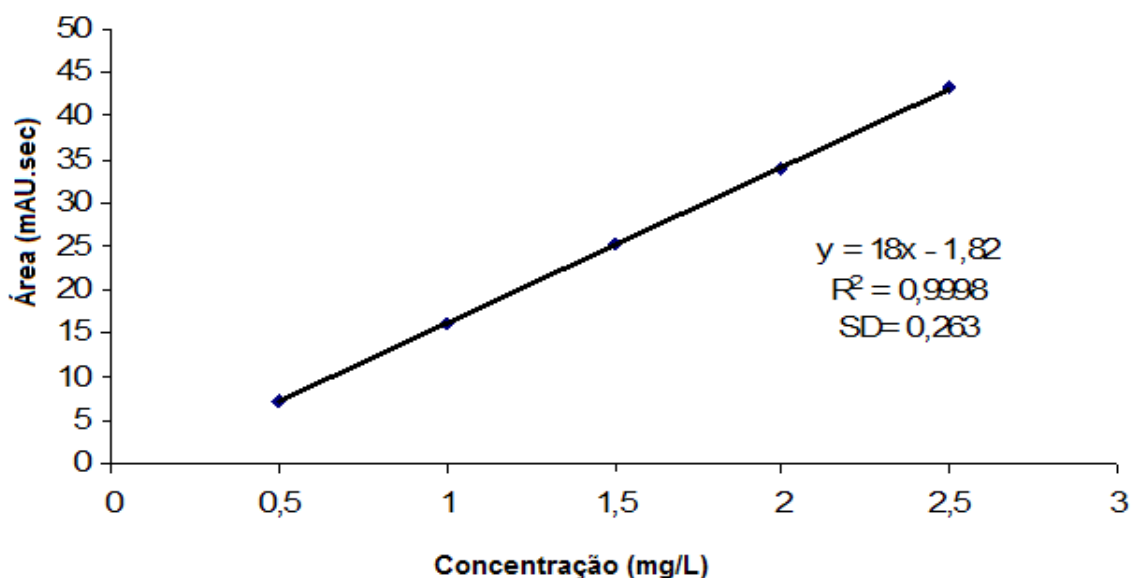


Figura 9- Curva analítica obtida para o inseticida em estudo.

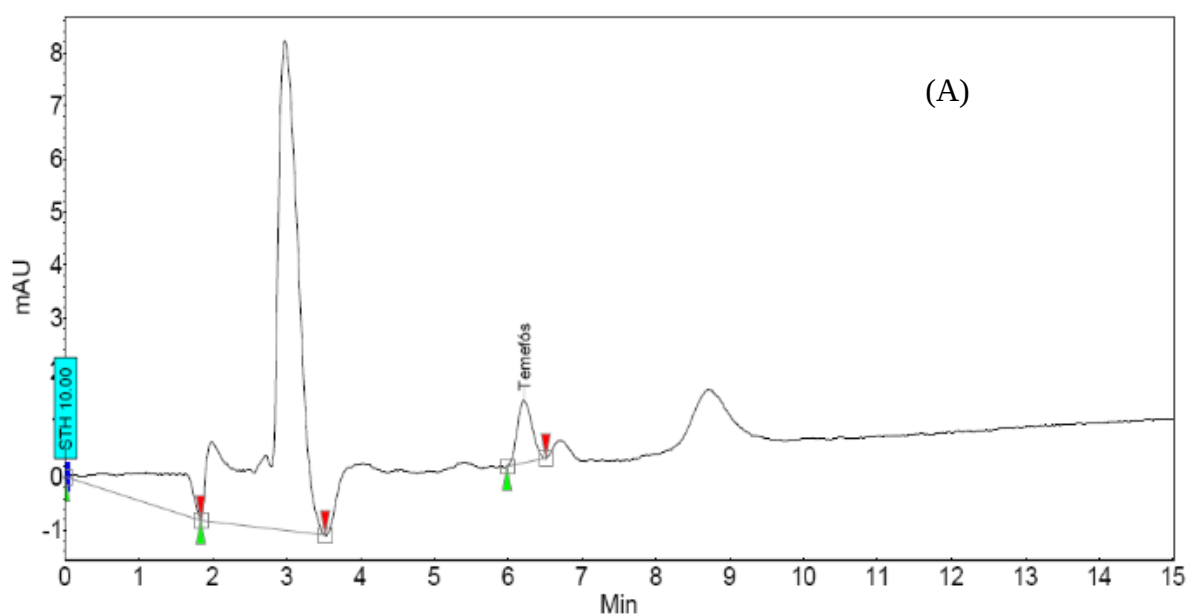
Tabela 6. Parâmetros de validação obtidos para o método desenvolvido para análise do inseticida temefós em água, usando SPE com cartuchos C₁₈ (N=3) e determinação por HPLC.

Pesticida	Interv. Linear µg.L ⁻¹	LD µg.L ⁻¹	LQ µg.L ⁻¹	LD* µg.L ⁻¹	LQ* µg.L ⁻¹	Coef. Linear	Coef. Angular	R
Temefós	50 – 300	48	146	0,48	1,46	-1,82	18	0,9998

A curva analítica apresentou boa linearidade, com um coeficiente de correlação superior a 0,99. O coeficiente angular da curva evidenciou uma boa sensibilidade. Os limites de detecção e quantificação do método também foram adequados, o que permite que amostras contendo o inseticida em concentração próximo de $5 \mu\text{g.L}^{-1}$ sejam possíveis de ser analisados. Evidentemente, se o volume da amostra a ser usado for maior (200 mL, por exemplo), o fator de pré-concentração dobrará e a sensibilidade do método também, o que será bastante útil na análise de amostras reais que, em geral, apresentam concentrações mais baixas.

5.2.4 - Recuperação e precisão do método:

As Figuras 10A e 10B mostram os cromatogramas obtidos após SPE para as amostras reais fortificadas com o inseticida em estudo nas concentrações de 10 e $20 \mu\text{g.L}^{-1}$, respectivamente.



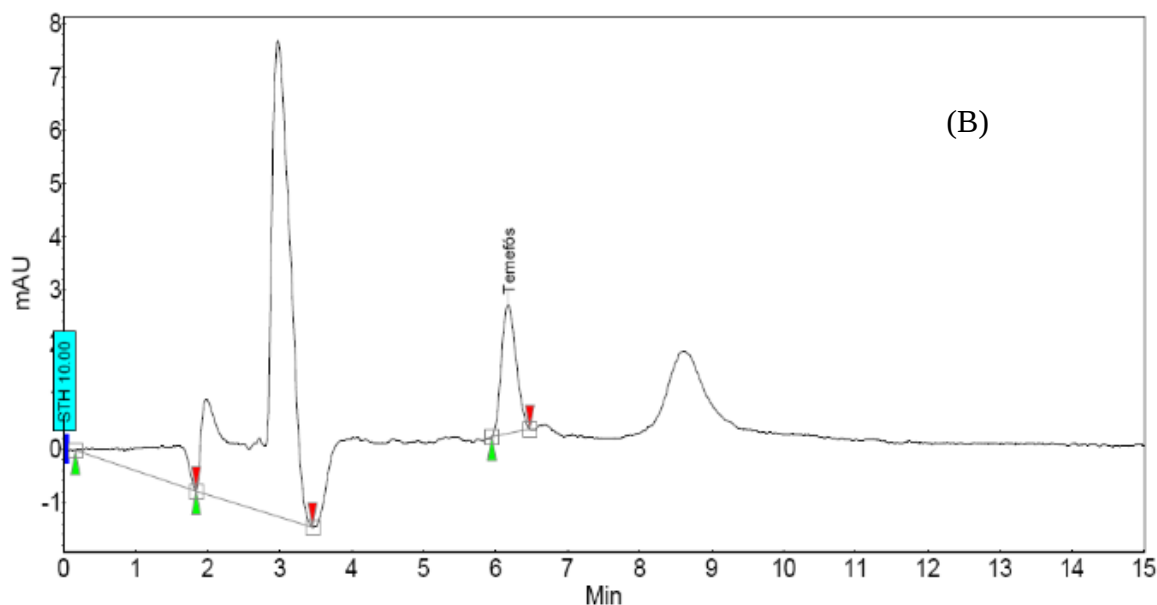


Figura 10. Cromatogramas do inseticida temefós após SPE, usando cartuchos C_{18} , em concentrações de $10\mu\text{g/L}$ (A) e $20\mu\text{g/L}$ (B). Condições cromatográficas similares às apresentadas na Figura 7.

Observando-se os cromatogramas do extrato de SPE da amostra fortificada, percebe-se que o método proposto possibilita a quantificação do analito, com o mínimo de interferências.

Quanto ao pico que aparece próximo ao tempo de 9 min, acredita-se ser de algum interferente presente no material adsorvente ou na água deionizada utilizada para o preparo das amostras.

A Tabela 7 apresenta os valores de recuperação e precisão (repetitividade) do método de extração e purificação proposto.

Tabela 7. Recuperações e precisões do método proposto

Nível de Fortificação	Recuperação (%)	Repetibilidade (CV%)
$10\mu\text{g.L}^{-1}$	101	2,83
$20\mu\text{g.L}^{-1}$	100,02	4,37

De maneira geral, foram obtidos valores de recuperação adequados para o inseticida em estudo, pois estão compreendidos dentro do limite considerado aceitável pela literatura para análise de pesticidas em água, que é de 70 – 120%, os valores de precisão também foram satisfatórios, uma vez que são aceitáveis valores de até 20% para análise em nível de resíduos.

5.2.5 - Aplicação do método para análise de amostras reais:

O método desenvolvido foi empregado na análise de amostras reais provenientes do Município de Centro Novo do Maranhão, em pontos de amostragem definidos na Tabela 3. Os teores encontrados nas amostras são apresentados na Tabela 8.

Tabela 8. Resíduos do inseticida temefós encontrados nas amostras de água coletadas na cidade de Centro Novo do Maranhão

Amostra de água	Concentração de temefós ($\mu\text{g L}^{-1}$)
P1	30
P2	20
P3	11
P4	10
P5	7
P6	40
C1	25
C2	40

P = Ponto e C = Controle

Em todos os poços, foram detectados resíduos do inseticida temefós, composto classificado como de moderada toxicidade. Infelizmente, a Portaria 518/2004 do MS, que trata da potabilidade da água destinada ao consumo humano, não estipula valores máximos permitidos (VMPs) para este composto. Vale ressaltar que a Portaria encontra-se completamente defasada em relação à legislação internacional, que não descrimina os produtos e é bem mais restrita.

6- CONCLUSÃO

O método baseado no procedimento de extração em fase sólida e cromatografia a líquido com detector de arranjo de fotodiodo para análise do inseticida organofosforado temefós em amostras de água foi desenvolvido.

A técnica de extração em fase sólida possibilita efetuar as etapas de extração e pré-concentração simultaneamente; minimizando a manipulação da amostra; requer pequeno volume de amostra, adsorventes e solventes orgânicos e oferece significativa economia de reagentes e tempo.

Este estudo mostrou que para extração do inseticida selecionado utilizando SPE, os melhores resultados foram obtidos usando cartuchos de C₁₈, volume da amostra de 100 mL, pH próximo a neutralidade e eluição com metanol com fluxo de 1 mL/min.

Com relação às amostras coletadas em Centro Novo do Maranhão, foram detectados resíduos do inseticida organofosforado temefós, composto de moderada toxicidade.

Os resultados obtidos sugerem uma possível intoxicação da população de Centro Novo do Maranhão, pelo temefós, utilizado nas campanhas contra a dengue.

Do ponto de vista ambiental e analítico, o estudo dos produtos de degradação do inseticida temefós é igualmente importante, pois esse composto apresenta baixa persistência no ambiente, e degrada-se em no máximo 12 h. Seus metabolitos são igualmente tóxicos, em especial o temefós-sulfoxido, que é produto majoritário na rota de degradação.

7- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Agência Nacional de Vigilância Sanitária-ANVISA- <http://www.anvisa.gov.br>. Acessado em 12 de Maio 2007.

Aguilar, C.; Ferrer, I.; Borral, F.; Marce, R.M.; Barceló, D. Comparison of automated on-line solid-phase extraction followed by liquid chromatography–mass spectrometry with atmospheric pressure chemical ionization and particle beam mass spectrometry for the determination of a priority group of pesticides in environmental Waters. *J. Chromatogr. A*, 794 (1998) 147.

Amarante Júnior, O. P. de.; Santos, T. C. R. dos.; Nunes, G. S.; Ribeiro, M. L. Breve revisão de métodos de determinação de resíduos do herbicida ácido 2,4- diclorofenoxiacético (2,4-d). *Quím. Nova*, v.26, n.2, p. 223-229, 2003.

Amarante Júnior, O.P. de; Ribeiro, M.L. Desenvolvimento de método simples para a determinação de resíduos de diuron por cromatografia a líquido em amostras de laranja. **Pesticidas: Rev. Ecotoxicol. e Meio Ambiente**, v.15, p. 15-20, 2005.

Augusto, L.G.S, Neto,H.F.C. Dengue: insustentabilidade do peaa. Disponível em: <http://www.cepis.org.pe/bvsair/e/repindex/rep78/pagina/text/vii-020.pdf>. Acessado em setembro de 2007

Bolognesi, C; Morosso, G. *Trends Food Chem. Toxicol.* 38 (2000) 182.

Braga, I.A et al. *Aedes aegypti* Resistance to temefós during 2001 in several municipalities in the states of Rio de Janeiro, Sergipe and Alagoas, Brasil.

Causon, R. Validation of chromatographic methods in biomedical analysis: viewpoint and discussion. *J. Chromatogr. B.* v. 689, 175-180, 1987.

Brito et al. Validação de métodos analíticos: estratégia e discussão. **Pesticidas: Rev. Ecotoxicol. E Meio Ambiente**, v.13, p. 129-146, 2003.

Collins, C.H.; Braga, G.L.; Bonato, P.S. **Fundamentos de Cromatografia**. Campinas; Editora da UNICAMP, 2006.

ECOTOXINET 1996 <http://extoxnet.orst.edu/pips/temephos.htm>, acessado em 18 de Julho 2006.

EEC Drinking water guideline 80/779/EEC, EEC N°. L229 (1980) 11-29.

Faria, L. J. S “Avaliação de Diferentes Sorventes na Extração em Fase Sólida de Pesticidas em Água. Desenvolvimento e Validação de Metodologia”. Dissertação de Mestrado, Instituto de Química da UNICAMP, Campinas, SP, 2004.

Fundação Nacional de Saúde-Reunião técnica para discutir status de resistência de *aedes aegypti* e definir estratégias a serem implantadas para monitoramento da resistência no Brasil, Ministério da Saúde, Brasília, 1999.

Gallo, M.A. and Lawryk, N.J. **Organic Phosphorus Pesticides in Handbook of Pesticide Toxicology** 1999.

Harris, D.C. **Análise Química Quantitativa**. 5ª ed., LTC Editira, 2001.

Hennion, M.C. Solid-phase extraction: method development, sorbents, and coupling with liquid chromatography. *J. chromatogr A*, 856 (1999) 5.

Hubert, P. et al. The SFSTP guide on the validation of chromatographic methods for drug bioanalysis from the Washington Conference to the laboratory. *Anal. Chim. Acta*, v. 391, p. 135-139, 1999.

Hudson, R.H; Tucker, R.K. and Haegele. M.A. **Handbook of Toxicity of Pesticides to Wildlife** 2000.

Jauregui, O.; Galceran, M.T. Determination of phenols in water by on-line solid-phase disk extraction and liquid chromatography with electrochemical detection. *Anal. Chim. Acta*, 340 (1997) 191.

Johson, W.W.; Finley, M.T. **Handbook of Acute Toxicity of Chemicals to Fish and Aquatic Invertebrates**. Resource Publication 137. U.S. Department of Interior, Fish and Wildlife Service, Washington, DC, 1980. 5-17.

Junker-Bucheit, A.; Witzenbacher, M. J. Pesticide monitoring of drinking water with the help of solid-phase extraction and high-performance liquid chromatography. *J. chromatogr A*, 737 (1996) 67.

Lacorte, S.; Barceló, D. Determination of organophosphorus pesticides and their transformation products in river waters by automated on-line solid-phase extraction followed by thermospray liquid chromatography-mass spectrometry. *J. chromatogr A*, 712 p.103-112. 1995.

Lacorte, S.; Ehresmann, N.; Barceló, D. Persistence of Temephos and Its Transformation Products in Rice Crop Field Waters. *Environ. Sci. Technol.*, v.30 p.917-923. 1996.

Lacorte, S.; Jeanty, G.; Marty, J. L.; Barceló, D. Identification of fenthion and temephos and their transformation products in water by high-performance liquid-chromatography with diode array detection and atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometric detection. *J. Chromatogr. A*, 777 P.99-114, 1997.

Lanças, F.; **Extração em Fase Sólida (SPE)**, 4ª ed., RiMa: São Carlos, 2004. Bizuik, M; Przyjazny, A; Czerwinski, J; Wergowski, M, Occurrence and determination of pesticides in natural and treated Waters *J. Chromatogr. A*. 754 (1996) 103.

Ribani, M; Bottoli, C.B.G; Collins, C.H; Jardim, I.C.S; Melo, Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos L.F.C, *Quim. Nova*, 27 (2004) 771.

McNair, H.M.; Miller, J.M. **Basic Gas Chromatography**, New York: J. Wiley, 1997.

Much, D. J; Graves, R. L; Maxey, R. L; Engel, T. M, Methods development and implementation for the National Pesticide Survey. *Environ. Sci. Technol.* 24 (1990) 1446.

Neto, F.R.A.; Nunes, D.S.S. **Cromatografia – Princípios básicos e técnicas afins**. Rio de Janeiro: Editora Interciência Ltda, 2003.

OSHA Occupational Safety e Health Administration
www.osha.gov/dts/slte/methods/partial/pv2056/2056.html, [acessado em 16 de Julho 2006.]

Queiroz, S. C. N. “Determinação Multirresidual de Pesticidas em água por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com Ênfase em Detecção por Espectrometria de Massas e Novos Sorventes para Extração em Fase Sólida”. Tese de Doutorado, Instituto de Química da UNICAMP, Campinas, SP, 2001.

Skoog, D.A.; Holler, F.J.; Nieman, T.A. **Princípios de Análise Instrumental**. 5º ed. Porto Alegre: BOOKMAN Companhia editora, 2002.

TEME PHOSRED http://permanent.access.gpo.gov/1ps18069/www.epa.gov/oppsrrd1/reds/temephos_red.htm.
Acessado em 01 de Setembro 2006.

Tomlin, C. **The Pesticide Manual**: a world compendium, incorporating the agrochemicals handbook. 10th ed. Great Britain: Crop Protection Publications, 1994. p. 462-463.

Wells, M.J.M.; Yu, L.Z. Solid-phase extraction of acidic herbicides. *J. chromatogr A*, 885 (2000) 241.

WHO, Drinking Water Quality: Guidelines for Selected Herbicides, Environmental Health Criteria, N°27, 1987.

Younes, M; Galal-Gorchev, H. Pesticides in Drinking Water-A Case Study *Food Chem. Toxicol.* 38 (2000) S87.

CAPÍTULO II

DETERMINAÇÃO DE METAIS PESADOS EM ÁGUAS SUPERFICIAIS: OTIMIZAÇÃO DE METODOLOGIA ANALÍTICA

CAPÍTULO II

1 – INTRODUÇÃO

Dentre as várias formas de contaminação ambiental resultante das atividades agrícolas e industriais, a contaminação com metais pesados (MPs) tem despertado grande preocupação aos pesquisadores, aos órgãos governamentais envolvidos com problemas relacionados às causas ambientais e à comunidade em geral. A água, é um dos mais importantes fatores da preservação da vida, mas está sendo cotidianamente contaminada com despejos de resíduos industriais e urbanos além de diversos outros fatores relacionados às atividades humanas.

Os metais apresentam-se como alguns dos elementos mais abundantes da crosta terrestre e as fontes naturais desses metais, presentes nos solos e ambientes aquáticos, são os minerais metálicos. A erosão das rochas (processo natural) e/ou mineração e atividades industriais (processos antropogênicos) são os fenômenos responsáveis pela distribuição dos metais nos compartimentos aquático, atmosférico e terrestre (Solomons *et al.*, 1995).

A tabela periódica apresenta mais de 90 elementos, do hidrogênio ao trans-urânicos, sendo que somente 20 não são classificados como metais. Dentre os metais, 59 podem ser classificados como metais pesados. Contudo, apenas 17 deles são tóxicos e, ao mesmo tempo, encontram-se no ambiente em concentrações acima do nível de toxicidade permitida por organismos de controle, como a Agência de Proteção Ambiental dos EUA. (US-EPA).

Entre os 17 MPs, 9 estão sendo introduzidos no ambiente a uma velocidade que excede enormemente os processos geológicos naturais (Weiss *et al.*, 1975 ; Chapman, 1978). Na lista da US-EPA, estão listados como agentes poluentes principais, os seguintes metais: As, Be, Cd, Cr, Cu, Hg, Ni, Pb, Sb, Se, Ag, Tl e Zn.

A poluição dos sistemas aquáticos por MPs é um importante fator que afeta tanto o ciclo geoquímico desses elementos quanto a qualidade ambiental. Nos últimos anos, especialmente na década de 90, a poluição do solo por MPs tem merecido especial atenção, sendo mundialmente reconhecida como problema que pode representar sérios riscos à saúde humana e à qualidade do ambiente (Moreira e Moreira, 2004).

Os MPs podem danificar toda e qualquer atividade biológica, por isso há, teoricamente, tantos tipos de respostas biológicas a esses metais quantos forem os tipos de atividades biológicas. Contudo, o acesso variado aos componentes biológicos faz com que certos tipos de respostas predominem. Por exemplo, todos os sistemas enzimáticos são potencialmente suscetíveis aos metais pesados (Moreira e Moreira, 2004).

Na sua grande maioria, os MPs são perigosos nas suas formas catiônicas, e também quando ligados a cadeias curtas de átomos de carbono. Do ponto de vista bioquímico, o mecanismo de sua ação tóxica deriva da forte afinidade dos cátions pelo enxofre. Assim, os grupos sulfidrilas, -SH, que ocorrem comumente nas enzimas, controladoras das velocidades de reações metabólicas de importância crítica no corpo humano, ligam-se rapidamente aos cátions de MPs ingeridos ou a moléculas contendo tais metais (Baird, 1999).

Os MPs geralmente apresentam-se em baixas concentrações, proporcionando dificuldade no processo de detecção e quantificação. Devido a esses problemas, pesquisadores têm procurado desenvolver métodos analíticos rápidos e eficientes para a extração, detecção e quantificação desses elementos presentes em água.

A extração em fase sólida (SPE), seguida de técnicas espectrofotométricas como, espectroscopia de absorção atômica e espectroscopia de massas com plasma indutivamente acoplado tem proporcionado resultados satisfatórios na análise de metais em água.

Menegário e Giné (1998) propuseram um sistema para determinação multielementar de diferentes metais presentes em água de rio por espectroscopia de massas com plasma acoplado (ICP-MS). Entretanto, os resultados para alguns isótopos dos elementos Ti, Zn, Cu, Cr, As e Se foram potencialmente afetados por interferências, principalmente de espécies poliatômicas de S e Cl, presentes nas amostras naturais. A solução do problema foi a separação e pré-concentração por meio de resinas.

Dressler *et al.* (1998) determinaram os metais pesados Cu, As, Se, Cd, In, Hg e Pb em amostras de água e em materiais biológicos, via pré-concentração *on line* dos analitos a partir da complexação em sal de amônio em uma solução de ácido nítrico. Os analitos foram imobilizados em cartucho de C₁₈ ou em minicolunas de sílica, e posteriormente eluídos com metanol. Daí, foram analisados via ICP-MS. Os fatores de pré-concentração variaram de 5 a 61 vezes, dependendo do analito, e a sensibilidade do método foi adequada para a maioria dos metais.

Li *et al.* (2006), analisando amostras ambientais, detectaram traços de Cd e Pb mediante microextração e posterior determinação por ICP-MS. Avaliaram os efeitos do pH, do fluxo da amostra, do tempo de extração, etc. Os limites de detecção foram 4,6 pg.mL⁻¹ e 2,9 pg.mL⁻¹, para Cd e Pb, respectivamente.

Ghaedi *et al.* (2006) realizaram estudos de pré-concentração dos MPs Ni, Co, Cu e Pb, via extração em fase sólida seguida de eluição com solução de HNO₃ 2 mol.L⁻¹. Foram

obtidas recuperações de 98,8% para o Pb. Avaliaram o efeito do pH e definiram o pH 6 como ideal para a extração dos analitos.

Estafiej e Pyrzynska (2007) avaliaram a presença de MPs em amostras de água após extração em fase sólida e, diferente de Ghaedi *et al.* (2006) observaram que o pH 8 apresentou melhores resultados de recuperações, que foram de 102,9 e 93,4%, para o Cd e Pb, respectivamente.

A espectroscopia de massas com plasma acoplado (ICP-MS) tem apresentado diversas vantagens na determinação de MPs, tais como sensibilidade, baixo limite de detecção, capacidade em análise multielementar e ampla faixa linear (Li, *et al.* 2006).

Neste trabalho, foi desenvolvida e otimizada uma metodologia analítica envolvendo extração em fase sólida, seguida de detecção por (ICP-MS) para a determinação dos teores dos metais cádmio (Cd) e chumbo (Pb) em amostras de água. Foram testados dois adsorventes e o método foi depois aplicado às análises de águas subterrâneas coletadas no Igarapé do Sabino, afluente do rio Tibiri, em São Luís-Ma.

2 – REVISÃO DE LITERATURA:

2.1 – Considerações sobre os Metais Pesados estudados

2.1.1 – Cádmio (Cd)

O cádmio (Cd), elemento metálico raro na natureza, foi descoberto por Friedrich Stronhmeyer, em 1917, durante estudos envolvendo fundição de minérios que contém zinco (Zn). Ele é obtido como subproduto nos processos de produção de (Zn), a partir de minérios de zinco, chumbo (Pb) ou cobre (Cu), não sendo encontrado na forma de metal livre. Acredita-se que o mineral mais conhecido que o contém está na forma de sulfeto, sulfeto de cádmio (CdS), acompanhado sempre em pequenas proporções de sulfeto de zinco (ZnS) (Hicks *et al*, 1999).

O Cd é um metal extremamente tóxico, apresentando riscos à saúde quando consumido em concentrações superiores a $5\mu\text{g.L}^{-1}$. É visto como um dos principais poluentes para o mundo. Este metal pode contaminar sistemas aquáticos através da erosão do solo, de descargas na atmosfera devidas às operações industriais, vazamentos de aterros, pelo uso de lodo de esgoto e fertilizantes na agricultura.

Uma outra forma de ocorrer contaminação dá-se em decorrência de lançamento de efluentes industriais nos ambientes aquáticos. Como consequência da contaminação dos rios, os solos próximos podem ser atingidos pelo Cd através de irrigação para propósitos agrícolas, lançamentos de sedimentos dragados ou inundações (Biscaro, 2007).

O Cd é um elemento de vida biológica longa (10 a 30 anos) e de lenta excreção pelo organismo humano. O órgão alvo primário nas exposições ao Cd a longo prazo é o rim. Os efeitos tóxicos provocados por este metal compreendem, principalmente, distúrbios gastrointestinais, após a ingestão do agente químico. A inalação de doses elevadas produz intoxicação aguda, caracterizada por pneumonite e edema pulmonar (Roman, 2002).

2.1.2 – Chumbo (Pb)

O chumbo (Pb) é um metal pesado extremamente tóxico e que chega até os seres humanos principalmente pelo ar, pela água e pela cadeia alimentar, de forma cumulativa. Os efeitos tóxicos, entre outros, incluem sintomas como náuseas, perda da coordenação, hiperatividade, confusão mental e perda de memória.

A toxicidade do Pb gera desde efeitos claros (clínicos), até efeitos sutis (bioquímicos), estes últimos envolvendo vários sistemas de órgãos e atividades bioquímicas.

Nas crianças, os efeitos críticos atingem o sistema nervoso, enquanto que nos adultos com exposição ocupacional excessiva ou mesmo acidental, os sintomas envolvem a neuropatia periférica e a nefropatia crônica. Em situações raras, os efeitos sobre a síntese da heme proporcionam indicadores de exposição ao Pb na ausência de consequências quimicamente perceptíveis. Também os sistemas gastrointestinal e reprodutivo são alvo da intoxicação pelo chumbo (Saxena e Singh, 1997; Saxena e Singh, 1994; Goyer, 1991). Em casos mais severos, a incorporação deste elemento químico pode levar a pessoa ao estado de coma e à morte.

Nos últimos anos, especial atenção tem sido direcionada aos estudos epidemiológicos relacionados aos possíveis efeitos neurotóxicos do Pb nas crianças, especialmente naquelas com desvio de comportamento. Na população adulta, esforços consideráveis têm sido voltados no sentido de avaliar os efeitos cardiovasculares provocados pelo Pb e o seu envolvimento na hipertensão. Além disso, vários estudos têm favorecido a compreensão dos efeitos bioquímicos desse metal, facilitando o reconhecimento precoce de alterações significativas e para a suavização de consequências potencialmente adversas. Tais estudos mostram que os efeitos do Pb são os mesmos para a população em geral e para a população exposta ocupacionalmente. Contudo, é importante diferenciar entre adultos e crianças, devido às diferenças de suscetibilidade entre esses dois grupos (WHO, 1995).

Quando o Pb é lançado no ambiente, tem um longo tempo de residência, comparado a outros poluentes. Como resultado, tende a acumular-se em solos e sedimentos, onde, devido à sua baixa solubilidade, pode permanecer acessível à cadeia alimentar e ao metabolismo humano por muito tempo.

O Pb tem a tendência de formar compostos com ânions de baixa solubilidade, como hidróxidos, carbonatos e fosfatos. Portanto, a quantidade de chumbo que permanece em solução em águas de superfícies é relativamente baixa. Além disso, uma fração significativa de Pb insolúvel pode ser incorporada em material particulado ou como íons sorvidos ou como cobertura de superfície em sedimentos, ou ainda pode ser transportada como parte da matéria orgânica. A maior parte do Pb é retida nos solos e sedimentos e muito pouco é transportado em águas de superfície ou subterrânea. No entanto, o retorno para as águas de superfície, como resultado da erosão de partículas do solo contendo Pb ou através da conversão de sulfato de chumbo relativamente solúvel na superfície do solo/sedimento, pode ocorrer. Assim como pode acontecer com o movimento vertical do Pb para águas subterrâneas, através da lixiviação (Baird, 1999).

2.2 – Aspectos da Técnica Analítica Empregada neste Estudo

2.2.1 - Espectroscopia de Massas com Plasma Acoplado Indutivamente:

A espectrometria de massas é uma ferramenta analítica instrumental que permite separar espécies iônicas pela razão entre a carga e a massa. Sua capacidade de identificação é usada para íons de elementos, compostos simples e moléculas muito complexas, como os biopolímeros de altas massas moléculas, às vezes de massas >100.000 u. É possível utilizá-la tanto em análise qualitativa, por proporcionar uma identificação do elemento pelo espectro de massas que gera, como em análise quantitativa, por ser um processo que ocorre proporcionalmente à concentração das espécies. Esta técnica é considerada de grande sensibilidade, podendo chegar a detectar espécies em nível de pg.g^{-1} (Houk, 1980).

A espectroscopia de massas é conhecida como uma técnica universal, visto que serve para analisar misturas de substâncias sólidas, líquidas e gasosas, e também consegue separar e detectar as espécies na presença de matrizes complexas. Os espectros obtidos durante as análises são gerados de forma rápida, facilitando a sua aplicação no controle de processos em tempo real (Caruso, 2004).

A espectroscopia de massas é utilizada para obter informações sobre a constituição estrutural, a cinética, as características físico-químicas e quânticas em moléculas orgânicas. Em análises inorgânicas, a sua capacidade de detecção de isótopos permite determinar a composição elementar e isotópica. A determinação de composição isotópica constitui-se em ferramenta de pesquisa nas áreas clínica, geoquímica, geocronológica, paleoambiental, agrônoma, ambiental e de alimentos (Caruso, 2004).

A espectrometria de massas com fonte de plasma tem sido bastante descrito na literatura (B`hymer e Caruso, 2004; B`hymer *et al.*, 2000; Caruso e Montes-Bayon, 2003; Montes-Bayon *et al.*, 2003). O acoplamento da fonte de plasma apresenta a capacidade de quantificar individualmente cada isótopo, abrangendo elementos desde lítio (Li) até urânio (U) (Tompson, 1989).

Na espectroscopia de massas aplicada como método analítico, faz-se necessária a utilização de uma fonte de energia para formar íons, além de um sistema para transportar estes íons de forma representativa para o espectrômetro, que serão separados e encaminhados para o detector (Figura 1). Na condução dos íons, o caminho livre médio deve ser suficientemente longo, para que estes cheguem ao detector sem que haja colisões, as quais causariam perda ou transformações dos íons. O caminho livre médio depende do tamanho dos íons e da temperatura,

e é inversamente proporcional ao vácuo no meio. O transporte dos íons dá-se em trajetórias dependentes de sua razão carga/massa e pela ação de campo elétrico ou magnético (B`hymer & Caruso, 2006).

O plasma com acoplamento indutivo (ICP, do inglês, *Inductively Coupled Plasma*) forma-se numa tocha de quartzo, cujo extremo é centralizado no interior de uma bobina de indução eletromagnética que é alimentada por uma fonte de radiofrequência. A tocha é constituída por três tubos concêntricos com entradas de gás independente em cada seção anular. Na seção central, é introduzido o gás que permite o transporte da amostra na forma de aerossol, já na seção intermediária, um fluxo de gás auxiliar é utilizado para estabilizar o plasma no decorrer da introdução da amostra, e na seção anular externa, é introduzido, tangencialmente, o gás com o qual o plasma é gerado (B`hymer e Caruso, 2006).

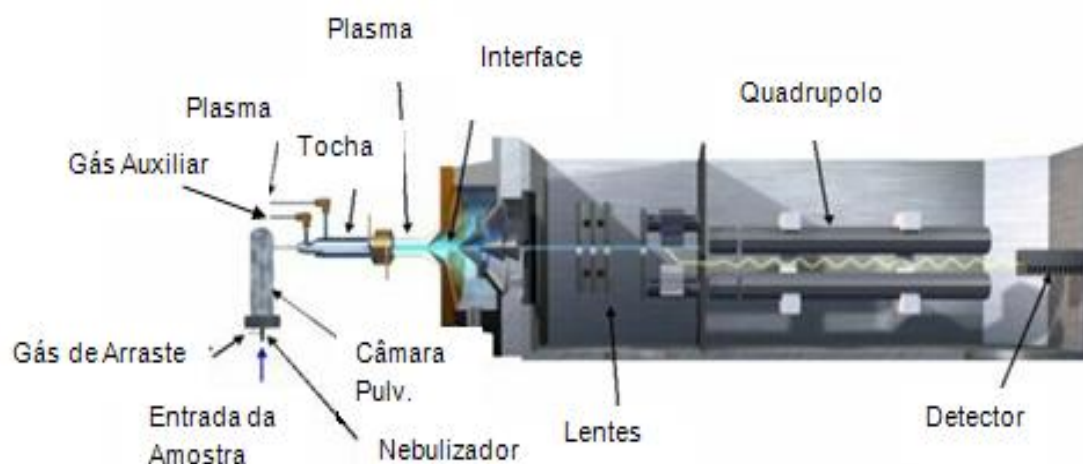


Figura 1. Esquema de funcionamento de um espectrofotômetro de massas com plasma acoplado indutivamente (ICP-MS) (Agilent Technologies, 2008)

3 – OBJETIVO:

3.1 – Geral

Este trabalho tem como objetivo aperfeiçoar um método simples, rápido e eficiente para determinação de metais pesados em água, empregando a extração em fase sólida e posterior análise por espectroscopia de massas com plasma acoplado indutivamente.

3.2 – Específicos

- ✓ Avaliar, na etapa de extração/pré-concentração dos MPs (Cd e Pb) em amostras de água, o uso de dois tipos de resinas trocadoras de cátions (Sephadex[®] e Chelex-100[®]);
- ✓ Otimizar uma metodologia analítica simplificada e verificar a sua eficiência, em termos de recuperação;
- ✓ Aplicar a metodologia para análise de amostras reais (águas superficiais provenientes do Igarapé do Sabino), e
- ✓ Avaliar os níveis de contaminação por MPs, no sistema aquático estudado.

4 – PARTE EXPERIMENTAL:

4.1 – Materiais e Métodos:

Foram utilizados os seguintes reagentes: ácido nítrico P.A. (65% pureza, Vetec); soluções estoque a 1000 mg.L⁻¹ dos MPs Pb²⁺ e Cd²⁺ (Carlo Erba). Como fase estacionária para SPE, foram utilizadas as resinas trocadoras de cátions, uma fortemente ácida (Chelex- 100[®]), de coloração amarelo-castanha, constituída de um hidrogel de estireno-divinilbenzeno contendo grupamentos ácidos aminodiacéticos (Lab. Biorad, Califórnia, EUA), e o Sephadex[®] A-25, obtida do fabricante Sigma (Alemanha). A água utilizada para todos os procedimentos foi deionizada em sistema Direct-Q (Millipore Co.). Toda a vidraria e materiais utilizados para as análises dos metais pesados foi lavada abundantemente com água destilada, antes de serem imersos em solução de HNO₃ a 20% (v/v) (para material de amostragem) e 5 mol.L⁻¹ (para vidrarias de uso em análises), durante 3 dias. Após este período, o material foi enxaguado com água deionizada, seco ao ar e embalado com filme de PVC, antes do uso.

Foram preparadas soluções-estoques de 1000 mg.L⁻¹ dos metais em água contendo 0,1% (v:v) de HNO₃. As soluções de trabalho foram diluídas a partir destas, com solução de HNO₃ a 0,1% (v/v).

4.2 – Instrumentação:

Para a determinação das concentrações dos MPs, foi utilizado um espectrômetro de massas com plasma acoplado indutivamente (ICP-MS) do fabricante Varian (Modelo 700ES), nas seguintes condições operacionais apresentadas na Tabela 1.

Tabela 1. Condições operacionais do sistema ICP-MS

Fluxo do plasma	15,9 L/min
Fluxo auxiliar	1,53 L/min
Fluxo do gás	0,17 L/min
Fluxo do nebulizador	0,91 L/min
Poder RF	1,34 kW
Rotação da bomba	4 rpm
Atraso do estabilizador	10 s

Os limites de detecção, fornecidos pelo instrumento, para os MPs Cd e Pb foram de $0,012 \mu\text{g.L}^{-1}$ e $0,016 \mu\text{g.L}^{-1}$, respectivamente. Tais LDs foram obtidos mediante cálculo que considera três vezes o ruído do instrumento.

4.3– Otimização da Metodologia de Extração dos Metais Pesados:

Empregou-se o estudo de recuperação dos MPs, partindo-se de certa concentração do analito presente na amostra fortificada e a concentração que, de fato, foi determinada pelo método analítico empregado. Este experimento consistiu na adição de quantidades conhecidas dos metais à amostra de água deionizada, seguida da sua extração utilizando diferentes adsorventes. Em seguida, os teores dos MPs foram analisados por ICP-MS.

Foram testadas as capacidades de retenção dos cartuchos com uma solução contendo uma mistura dos metais Pb e Cd, em meio ácido.

Inicialmente, os cartuchos foram preparados com dois diferentes tipos de adsorventes: um com resina Chelex-100[®] e outro com Sephadex[®]. A seguir, amostras de mesma concentração do MP foram percoladas através dos cartuchos. Após a etapa de pré-concentração, secou-se cada cartucho, utilizando vácuo, e os analitos foram eluídos, utilizando-se 30 mL de HNO_3 4 mol.L⁻¹. Após a etapa de pré-concentração, as amostras foram analisadas via ICP-MS.

4.4 – Aplicação do Método para Análise de Amostras Reais:

4.4.1 - Caracterização da área de estudo e amostragem:

O Igarapé do Sabino (sub-bacia do Sabino) é um afluente da margem direita do Rio Tibiri. A Bacia do Tibiri localiza-se no Município de São Luís-Ma, na parte sudeste da Ilha do Maranhão, entre as coordenadas $02^\circ 35'$ e $02^\circ 43'$ Sul e $44^\circ 10'$ e $44^\circ 18'$ W de Greenwich. Limita-se a leste com a bacia do rio Tijupá e a bacia do rio Jeniparana, a Oeste com o Distrito Industrial de São Luís, ao norte com o Aeroporto Marechal Cunha Machado e o Parque de Exposição Agropecuária, e ao sul com a baía de São José, onde deságua (Figura 2).

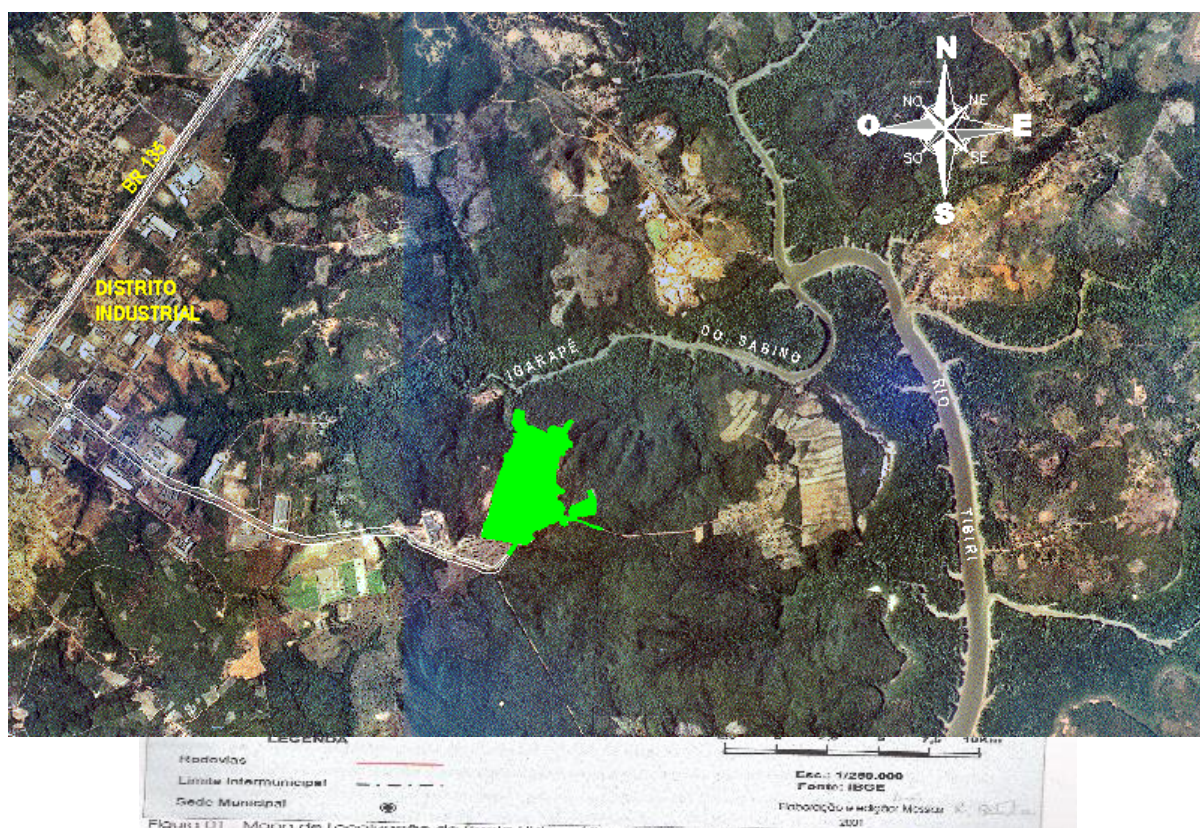


Figura 2 – Localização da Bacia do Tibiri e definição dos locais de amostragem (Silva, 2001).

4.4.2- Amostragem:

Os locais de coleta da água na Sub-bacia do Sabino foram estabelecidos de forma a assegurar que a amostragem fosse significativa para a caracterização do sistema aquático. Foram escolhidos quatro pontos de coletas, todos ao longo do canal principal (Sabino), conforme se pode observar na Figura 3. Nesta figura, encontra-se destacado (em cor verde claro) o aterro sanitário da Ribeira, que se encontra bem próximo ao Igarapé. A Tabela 2 apresenta uma descrição detalhada dos pontos de amostragem.

O monitoramento ambiental foi realizado escolhendo-se 4 pontos da sub-bacia do Sabino (Igarapé) para coletas das amostras (Figura 4). O primeiro ponto no alto curso; o segundo e o terceiro, no médio curso, e o quarto, no baixo curso, onde o igarapé deságua no rio principal (Tibiri). Os locais de amostragem foram estabelecidos de forma a assegurar que a amostra fosse significativa para a caracterização do sistema, no que se refere à concentração dos MPS selecionados para esse estudo.

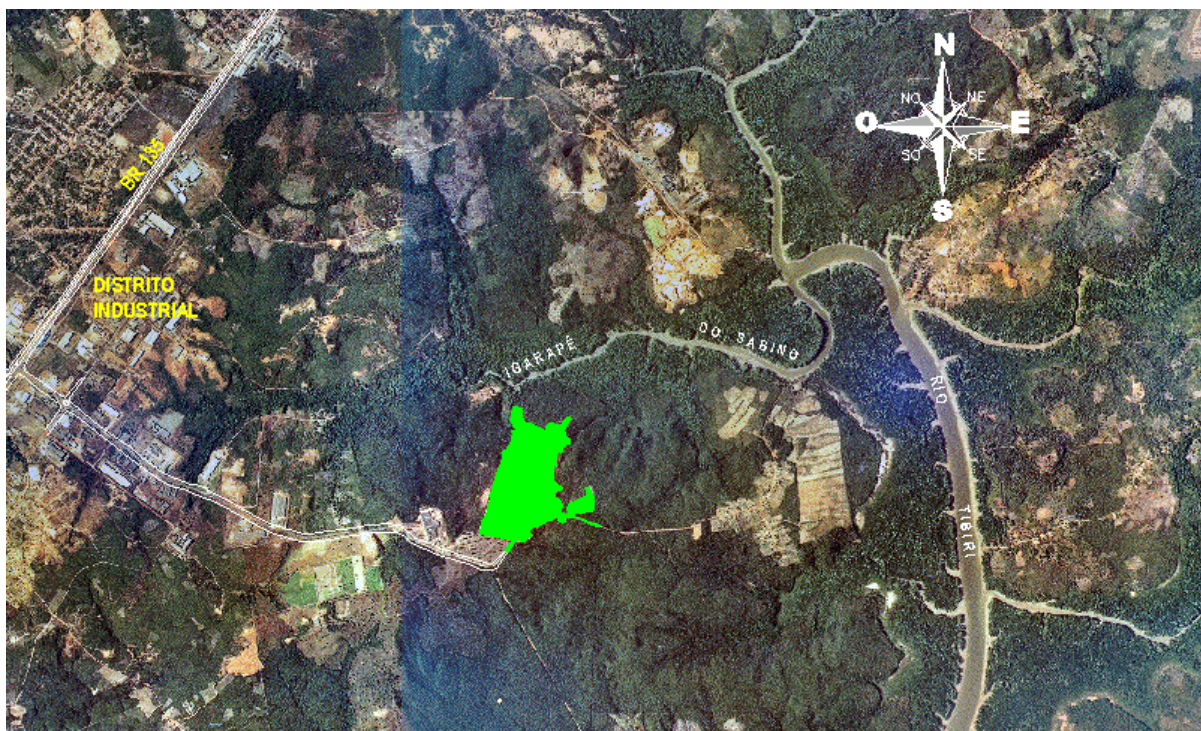


Figura 3 – Localização do Igarapé do Sabino e do Aterro da Ribeira (verde claro) (Campos, 1998).

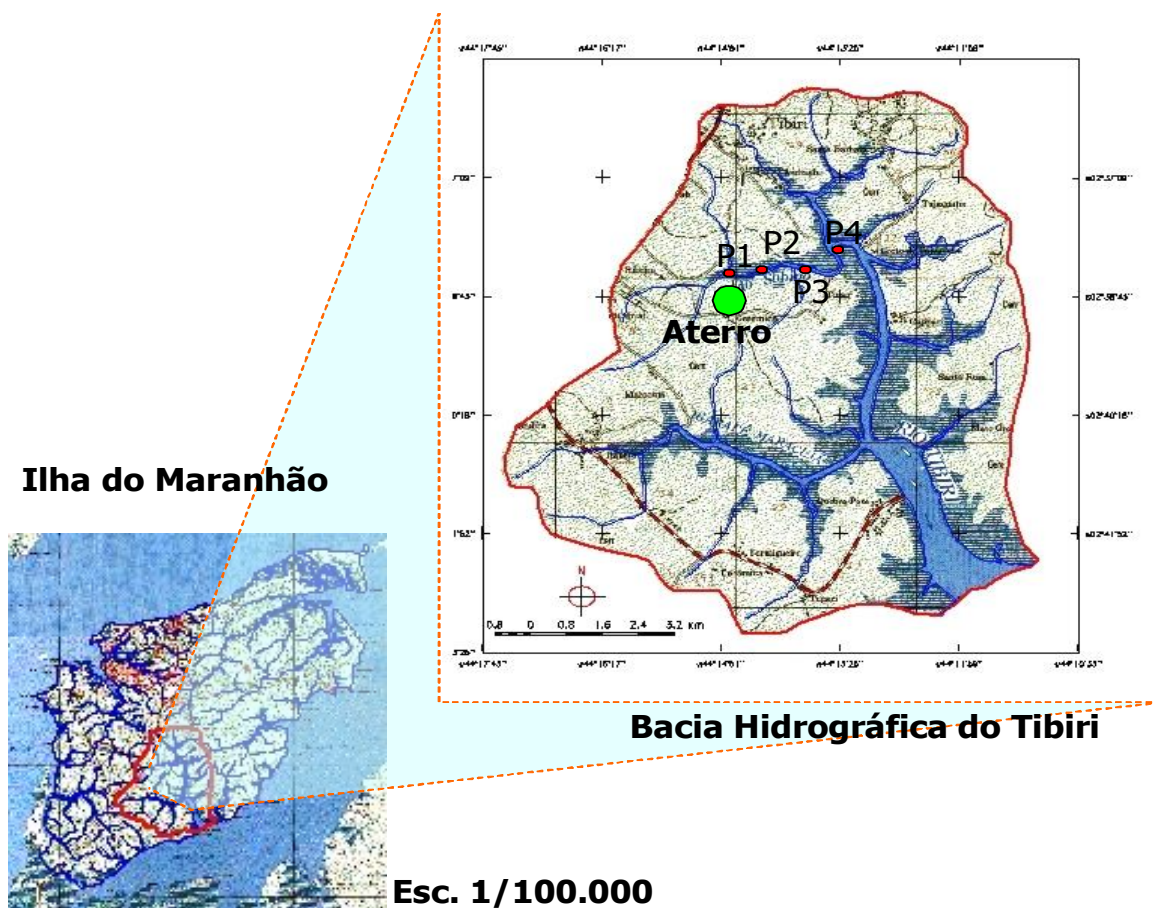


Figura 4 – Localização do Aterro da Ribeira e dos pontos de coleta no Igarapé do Sabino (Campos, 1998).

4.4.3- Preparo de amostras:

Uma vez no laboratório, as amostras de água anteriormente coletadas no Igarapé do Sabino foram filtradas em membrana de acetato de celulose, 0,45µm de porosidade, para a remoção de possíveis partículas em suspensão. Posteriormente, foram submetidas à etapa de pré-concentração, tendo sido 200 mL das amostras percoladas através do cartucho recheado com a resina trocadora de cátion. Em seguida, os analitos foram eluidos através da passagem de um volume de 30 mL de HNO_3 4 mol.L⁻¹. Após essa etapa, as amostras foram analisadas via ICP-MS.

Tabela 2. Identificação dos locais de coletas das amostras

Locais de coletas	Descrição
Ponto 1	● Próximo ao Aterro da Ribeira, onde os efluentes do Aterro são lançados na água, a jusante do aterro. Coordenadas Geográficas: 02° 38' 49,1" S e 44° 14' 50,8" W de Gmt.
Ponto 2	● Coordenadas Geográficas: 02° 38' 31" S e 44° 14' 18,5" W de Gmt.
Ponto 3	● Próximo ao lugar chamado Campina. Coordenadas Geográficas: 02° 38' 34,9" S e 44° 13' 73,8" W de Gmt.
Ponto 4	● Na foz do rio Sabino, onde ele deságua no rio Tibiri. Coordenadas Geográficas: 02° 38' 14,1" S e 44° 13' 48,4" W de Gmt.

5 – RESULTADOS E DISCUSSÃO:

5.1 - Estudo da Extração em Fase Sólida

5.1.1 - Avaliação de diferentes adsorventes utilizados no processo de extração:

A Tabela 3 apresenta os valores de recuperação obtidos para o método de extração utilizando cartuchos preparados com os adsorventes Sephadex® e com o Chelex-100®. Foi utilizado, neste estudo, o volume de amostra de água de 200 mL, fortificada com 0,5 mg.L⁻¹ e 2 mg.L⁻¹ de Cd e Pb, respectivamente.

Tabela 3. Valores de recuperação variando o tipo de adsorvente utilizado na extração dos MPs

Metais	Sephadex®		Chelex-100®	
	Rec. (%)	CV (%)	Rec. (%)	CV (%)
Cádmio	ND	-	86,1	3,5
Chumbo	14,8	5,8	75,5	1,93

ND = Não detectado; Rec. = Recuperação; CV = Coeficiente de variação

A análise de MPs pode ser facilitada pela sua pré-concentração, uma vez que, em amostras reais, estes contaminantes podem encontrar-se em teores muito abaixo do limite de detecção do instrumento, seja por espectroscopia de absorção atômica, seja por ICP-MS.

Analisando a Tabela 3, pode-se observar que os valores das recuperações são mais satisfatórios quando se trabalha com resina trocadora de cátions Chelex-100®, com recuperações médias de 86,1% e 75,5% de recuperação para Cd e Pb, respectivamente. O adsorvente Sephadex não forneceu bons resultados na pré-concentração (baixos resultados de recuperação) para o Pb e nenhuma detectabilidade para o Cd. Acredita-se que a ineficiência do Sephadex, como material adsorvente para os MPs em estudo, esteja relacionada com a presença de ligações glicosídicas em sua estrutura, sendo esse tipo de ligação susceptível ao ataque ácido. O mesmo apresentou propriedades de entumescimento, dificultando a percolação da amostra pelo cartucho de extração. Assim, na etapa final do trabalho, por ocasião das amostras reais, optou-se pelo uso da resina Chelex-100® como fase adsorvente.

5.1.2 – Curvas analíticas:

As curvas correspondentes para os MPs estudados estão apresentados nas Figuras. 5 e 6. Observou-se linearidade satisfatória para ambos os casos. Através das curvas pode-se avaliar também a sensibilidade do método para cada metal, já que quanto maior a inclinação da curva, mais sensível é o método.

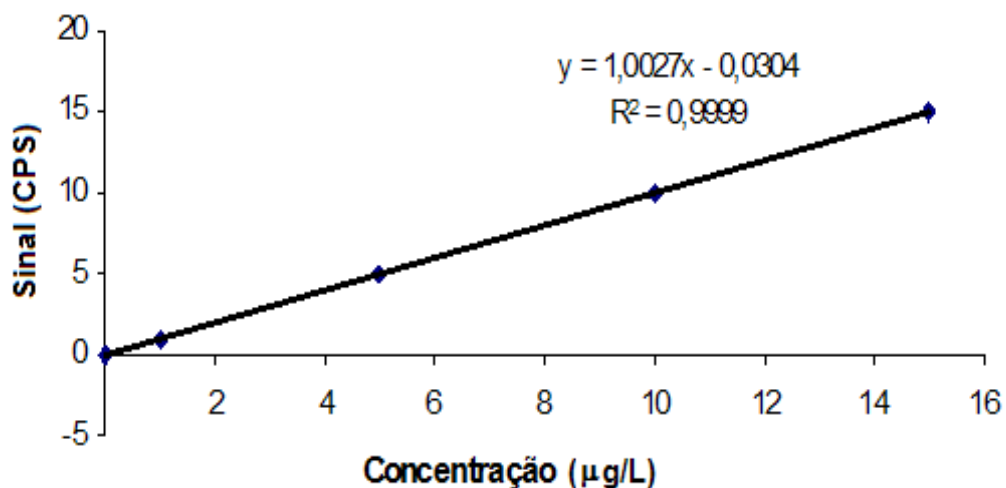


Figura 5: Curva analítica obtida para o metal pesado cádmio (Cd).

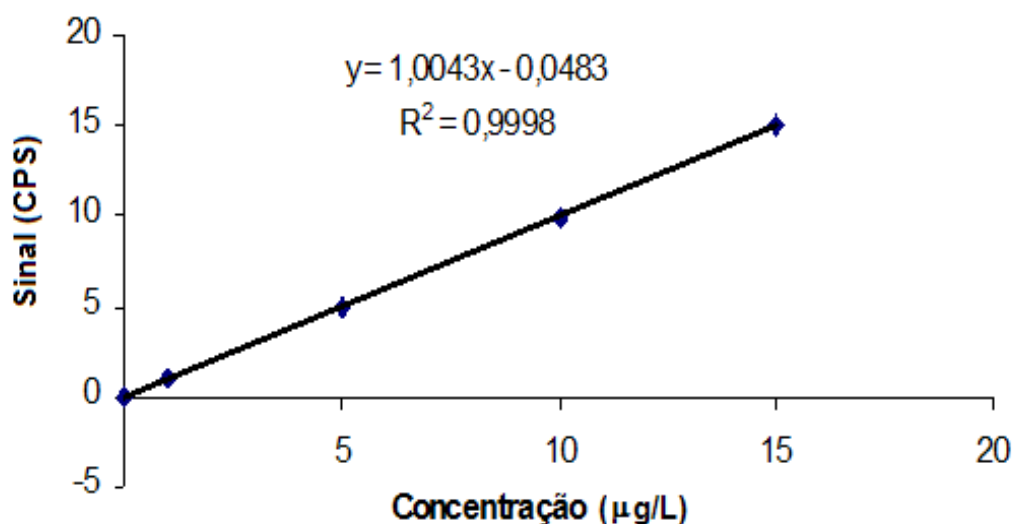


Figura 6: Curva analítica obtida para o metal pesado chumbo (Pb).

5.1.3 – Determinação de Pb e Cd nas amostras de água:

Foi realizado um monitoramento dos teores dos MPs nas águas do Igarapé do Sabino de Fev/2006 a Jan/2007.

Como pode ser visto na Figura 7, o Pb foi encontrado na grande maioria dos meses do ano, com o agravante de que sua concentração esteve próxima ao limite estabelecido pela legislação ambiental (Resolução do CONAMA nº. 357 de 03/2005), em alguns meses. Acredita-se que a presença deste metal tóxico em concentrações elevadas esteja relacionada à proximidade do Igarapé do Sabino ao Aterro Municipal da Ribeira, onde são depositadas, diariamente toneladas de lixo provenientes do Município de São Luís-MA.

Os principais usos do chumbo estão direcionados às indústrias extrativas, petrolífera, de baterias, tintas e corantes, cerâmica, cabos, tubulações e munições. A presença de chumbo e cádmio no solo e em águas superficiais e subterrâneas próximas de aterros origina-se na grande maioria de baterias e pilhas que são depositadas nos mesmos, sem que haja um acondicionamento adequado, fato que tem preocupado os pesquisadores e o meio científico em geral.

O líquido que escorre do lixo no processo de decomposição – o chamado chorume, de caráter ácido. Uma parte dele infiltra no solo e pode chegar a atingir as camadas mais profundas e até contaminar os lençóis freáticos. Se o Igarapé recebe MPs, o fitoplâncton e o zooplâncton alimentam-se também desses elementos: os crustáceos são contaminados ao se alimentarem deles e os peixes, por sua vez, também são intoxicados pelos metais. Pode-se inferir que o homem que se alimenta do peixe daquele corpo d'água, também esteja sendo contaminado lentamente. O Pb encontrado em muitas das amostras analisadas, é capaz de ocasionar sérios problemas aos seres vivos; os sintomas são mascarados e as doenças não são detectadas facilmente.

Nos ecossistemas aquáticos, algumas populações de invertebrados são mais sensíveis que outras, e a estrutura das comunidades podem ser diversamente afetadas pela contaminação por Pb; no entanto, populações de áreas poluídas podem mostrar maior tolerância ao Pb em relação às de área não-poluídas (WHO, 1995).

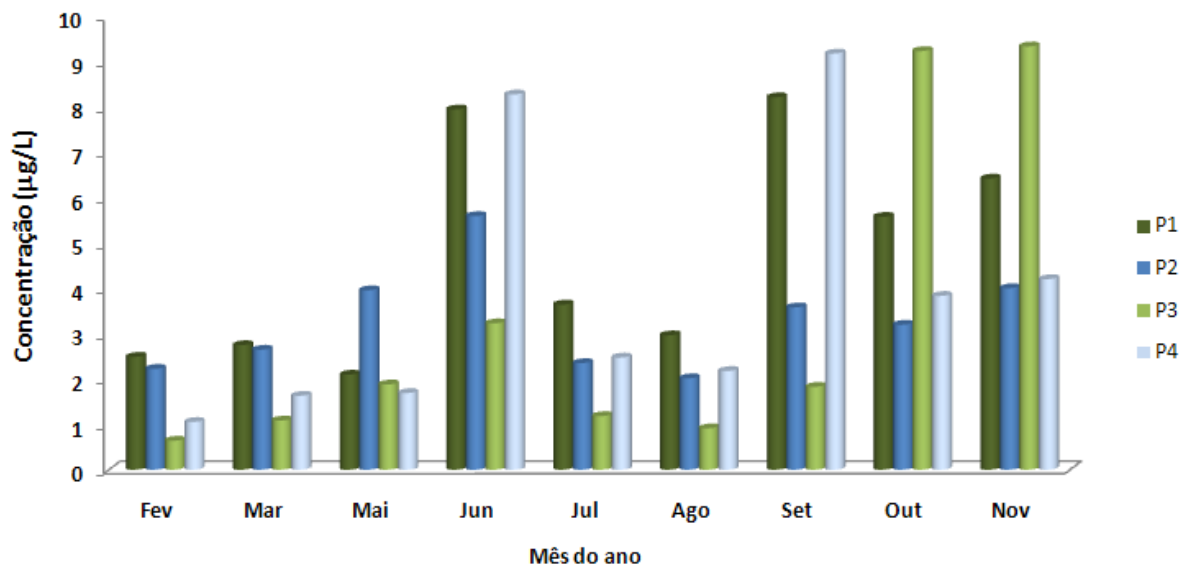


Figura 7: Variação dos teores de Pb encontrado nas amostras de água do Igarapé do Sabino, em função da localidade e do tempo.

O sistema nervoso, a medula óssea e os rins são considerados órgãos críticos para o Pb, pois a presença desse metal no organismo interfere nos processos genéticos ou cromossômicos e produz alteração na estabilidade da cromatina em cobaias, inibindo o reparo de DNA e atuando como promotor do câncer. Alguns casos de contaminação por Pb foram evidenciados em Bauru (SP), onde uma indústria de baterias e acumuladores de eletromotivos lançava seus efluentes ricos em Pb no manancial da região (Poluição por Chumbo em Bauru, 2003).

Pela Figura 8, pode-se observar que o mesmo ocorreu com o metal Cd, cujos teores excederam o recomendado pela legislação ambiental brasileira, em alguns meses do ano.

Sousa *et al.* (2004), em estudos realizados no Igarapé dos Tanques (RO), detectaram concentrações altas dos metais pesados Hg, Mn, Zn, Cr, Cu, Pb, Co, Fe, e Cd em amostras de sedimentos e particulados em suspensão, caracterizando uma contaminação considerável nesse sistema aquático.

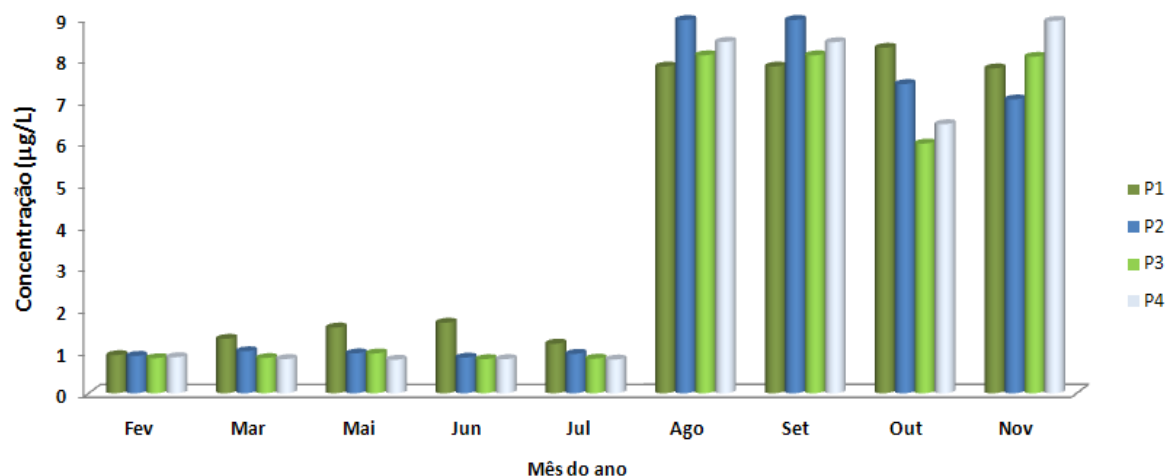


Figura 8: Variação dos teores de Cd encontrado nas amostras de água do Igarapé do Sabino, em função da localidade e do tempo.

No Igarapé do Sabino, em alguns meses do ano de 2006, os teores encontrados para os metais em estudo nas amostras de água estiveram próximos ou acima dos valores estabelecidos pela resolução CONAMA, como foi observado. Este fato é preocupante, pois evidencia uma séria contaminação, tanto nos organismos que vivem naquele ecossistema aquático, como na população ribeirinha que se alimenta desses indivíduos. Acredita-se que os MPs encontrados nas amostras de água do Igarapé do Sabino têm como origem pilhas e baterias que são lançadas no aterro da ribeira sem nenhum acondicionamento adequado.

Yabe e Oliveira (1998), em um estudo sazonal objetivando caracterizar a bacia do rio Cambé, no município de Londrina, Brasil, analisaram vários MPs em água superficial e observaram que, ao longo do ano de 1997, as concentrações de Pb extrapolaram em grande proporção os níveis máximos permitidos. Durante todo o percurso amostrado, houve a presença sistemática dos elementos Pb, Ni, e Cd, introduzidos por fontes cujas origens está na urbanização e na industrialização.

Fernandes *et al.* (2007) avaliaram a concentração de metais pesados em áreas olerícolas no Estado de Minas Gerais e constataram a presença de diversos metais, embora os teores tenham sido, de forma geral, baixos. Os teores de Cd observados foram de 0,001 mg/L.

Santos *et al.* (2006) detectaram a presença de MPs na Baía de Paranaguá, Paraná, Brasil, com teores que variaram de 0,019 a 0,020 mg/L para Pb e 0,055 a 0,107 mg/L para o Cu. Evidenciaram a importância na avaliação de sedimentos que apresentam características de

indicadores para análise de MPs porque permanecem, enquanto as águas estão sempre se renovando.

De acordo com os resultados aqui apresentados, é de extrema preocupação a situação do ecossistema aquático estudado, no tocante à manutenção da qualidade do corpo d'água e da biota. As atividades antrópicas, provenientes do Aterro e do Distrito Industrial, tem favorecido este processo de degradação e de maneira sistemática, levando ao desequilíbrio ecológico, refletindo negativamente em todo o Igarapé.

No caso específico do Aterro Municipal da Ribeira, acredita-se em uma necessidade de um processo operacional mais eficiente, visto que não estão sendo levados em consideração os princípios voltados para uma preservação ambiental. Dessa forma, há necessidade de ações que revertam o estado de degradação em que se encontra o ecossistema aquático do Igarapé do Sabino, bem como ações dos órgãos competentes para que o Aterro não continue sendo degradado.

6- CONCLUSÃO:

O método baseado na extração em fase sólida e espectroscopia de massas com plasma indutivamente acoplado para a análise dos teores dos MPs Cádmio e Chumbo em amostras de águas superficiais foi otimizado. A técnica de extração em fase sólida possibilita efetuar as etapas de extração e pré-concentração simultaneamente; minimizando manipulação da amostra; elimina possíveis interferentes e reduzindo o tempo de análise.

Este estudo mostrou que para a extração dos MPs selecionados utilizando SPE, os melhores resultados foram obtidos com resinas trocadoras de cátions e eluição com HNO_3 4 mol/L. já os resultados obtidos com a resina Sephadex não foram satisfatórios.

No que se refere às amostras analisadas oriundas do Igarapé do Sabino, foram detectados teores dos MPs em praticamente todos os meses do ano, estando, em alguns casos, acima dos limites estabelecidos pela Resolução CONAMA nº 357 de 03/2005. Possivelmente, os organismos aquáticos que vivem no Igarapé do Sabino estão contaminados pelos referidos metais pesados.

Diante dos resultados obtidos, ressalta-se a importância de medidas corretivas e contensivas urgentes pelos órgãos competentes.

7- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

Agilent Technologies. Disponível em:
[HTTP://www.chem.agilent.com/scripts/generic.ASP?Ipage=455&indcol=N&prodcol=y](http://www.chem.agilent.com/scripts/generic.ASP?Ipage=455&indcol=N&prodcol=y).
Acessado em Março de 2008.

Bhymer, C.; Brisbin, J.A.; Sutton, K.L.; Caruso, J.A, Am. Lab. 32 (2000) 17.

Bhymer, C.; Caruso, J.A, Selenium speciation analysis using inductively coupled plasma-mass spectrometry. *J. Chromatogr. A*, 1114 (2006) 1-20.

Bhymer, C.; Caruso, J.A, Arsenic and its speciation analysis using high-performance liquid chromatography and inductively coupled plasma mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* 1045 (2004) 1.

Baird, C. **Química Ambiental**, 2 ed. São Paulo ARTMED, 1999.

Biscaro, P.A.; Menegário, A.A.; Tonello, P.S.; Caldorin, R. *Quim. Nova*, vol. 30, n. 2, p. 323-326, 2007.

Campos, A.E.L. **Estudo Ambiental sobre o Aterro Sanitário da Ribeira-São Luis-Ma. São Luis**, 1998.

Chapman, G. Toxicological considerations of heavy metals in the aquatic environment, Oregon State University, WRI, Corvallis, 1978.

Dressler, V.L.; Pozebon, D.; Curtius, A.J. Determination of heavy metals by inductively coupled plasma mass spectrometry on-line separation and preconcentration. *Spectrochimica Acta Part B* p. 1527-1539, 1998.

Fernandes, R.B.A.; Luz, W.V.; Fontes, M.P.F.; Fontes, L.E.F. Avaliação da concentração de metais pesados em áreas olerícolas no Estado de Minas Gerais. *R. Eng. Agríc. Ambiental*, v.11, n.1, p. 81-93, 2007.

Ghaedi, M.; Ahmedi, F.; Shokrollahi, A. *Journal Hazardous Materials* v.142, p. 272-278, 2007.

Goyer R.A. Toxic effects of metals-lead. Em: Amdvr Mo, Dull J, Klassen Cd. Eds. Casareh and Doulls toxicology-the Basic Science of poisons 4^a ed. New york: Pergamon press; 1991 p. 639-646.

Hicks, T.J.; Doctor's Data. Elementos do cabelo. Disponível em: http://www.nossoplaneta.com.br/artigos/mig_rev.html Acessado em Julho de 2004.

Houk, R.S.; Fassel, V.A.; Flesch, G.D.; Svec, H.J.; Gray, A.L.; Taylor, C.E. Inductively Coupled Argon Plasma as an ion source for mass spectrometric determination of trace elements, *Anal.Chem*, v.52, p. 2283-2289, 1980.

Li, L.; Bu, B.; Xia, L.; Jiang, Z. Determination of trace Cd and Pb in environmental and biological samples by ETV-ICP-MS after single-drop micro extraction. *Talanta* v. 70, p. 468-473, 2006.

Menegário, A.A.; Giné, M.F. Determinação multi-elementares de metais, sulfato e cloreto em amostras de águas por espectrometria de massas com fonte de plasma (ICP-MS). **Quim. Nova**, vol. 21, n. 4, 1999.

Montes-Bayon, M.; Denicola, K.; Caruso, J.A, Liquid chromatography–inductively coupled plasma mass. *J. Chromatogr. A* 1000 (2003) 457.

Moreira F.R.; Moreira J.C. Os efeitos do chumbo sobre o organismo humano e seu significado para a saúde. *Ver panam salud pública*. 2004; 15 (2): 119 – 29.

Roman, T.R.N.; Lima, E.G.; Azoubel, R.; Batigália, F. Toxicidade do Cádmio no homem. *HB Científica* v.9, n.1, p.43-48, 2002.

Salomons, W.; Forstner, U.; Mader, P. Heavy metals: problems and solutions. Springer, Heidelberg, 1995.

Santos, D.M.; Bossin, J.A.T.; Preussler, K.H.; Vasconcelos, E.C.; Carvalho-Filho, M.A.S. Avaliação de metais pesados na Baía de Paranaguá, PR, Brasil, sob influencia das atividades antrópicas. *J. Braz. Soc. Ecotoxicol.* V.1, n.2, p.157-160, 2006.

Saxena, R.; Singh, A.K. Pyrocatechol Violet immobilized Amberlite XAD-2 synthesis and metal-ion uptake properties suitable for analytical applications. *Anal. Chim. Acta* 340 (1997) 285.

Saxena, R.; Singh, A.K.; Sami, S.S. Synthesis of a chelating polymer matrix by immobilizing Alizarin Red-S on Amberlite XAD-2 and its application to the preconcentration of lead(II), cadmium(II), zinc(II) and nickel(II). *Anal. Chim. Acta* 295 (1994) 19

Silva, Q.D. **Proposta de Zoneamento Geoambiental da Bacia Hidrográfica do Tibiri, São Luis-Ma.** Fortaleza, 2001.

Stafiej, A.; Pyrzynska, K. Solid Phase Extraction of metal ions using carbon nanotubes, *Microchem. J* (2007)

Tompson, M.; Walsh, J.N, A Handbook of Inductively Coupled Plasma Spectrometry, Chapman & Hall, New York, 1989, 224p.

Vela, N.P.; Olson, L.K.; Caruso, J.A, *Anal. Chem.* 65 (1993) A585

Weiss, H.; Bertine, K.; Kolse, M.; Goldberg, F. D. The chemical compositions of a Greenland glacier. *Geochim. Cosmochim. Acta*, 29 (1975), 1.

World Health Organization. Environmental Health Criteria 165: inorganic lead. Em: IPCS (International Programme on Chemical Safety). Geneva: WHO; 1995.

Yabe, M.I.S.; Oliveira, E. de. Metais pesados em águas superficiais como estratégia de caracterização de bacias hidrográficas. *Quim. Nova* v. 21, n.5, p. 551-556, 1998.