



Universidade de Aveiro
2008

Departamento de Química

Maria Inês Azevedo
Costa Amaral Bandeira

Métodos de Extracção de Aldrin de Solos



**Maria Inês Azevedo
Costa Amaral Bandeira**

Métodos de Extração de Aldrin de Solos

Dissertação apresentada à Universidade de Aveiro para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Química Analítica e Controlo de Qualidade, realizada sob a orientação científica do Dr. Valdemar Esteves do Departamento de Química da Universidade de Aveiro

o júri

Presidente

Doutor João António Baptista Pereira de Oliveira
professor associado do Departamento de Química da Universidade de Aveiro

Doutora Paula Cristina de Oliveira Rodrigues Pinto
investigadora do Instituto de Investigação da Floresta e Papel

Doutor Valdemar Inocêncio Esteves
professor auxiliar do Departamento de Química da Universidade de Aveiro (Orientador)

agradecimentos

Quero prestar o meu sincero agradecimento a todos aqueles que contribuíram de alguma forma, para a realização desta tese, em especial:

Ao Doutor Valdemar Esteves, o meu orientador;

Ao Doutor Fernando Domingues, pela cedência do HPLC;

Ao grupo de Química Analítica e Ambiental;

À Dra. Teresa Caldeira;

Às colegas de laboratório, em especial à Carina, Aida, Marília e Raquel;

À Marta, à Marise e à Catarina e a todos os meus amigos;

Ao Ivo;

À minha família.

palavras-chave

aldrin, solos, extracção assistida por ultra-sons, tensioactivos

Resumo

Nas últimas décadas, o uso abundante de pesticidas tem sido uma das alternativas mais viáveis e eficazes no combate a pragas. No entanto, estes compostos representam um problema para a saúde pública e meio ambiente, devido aos seus efeitos tóxicos que se reflectem na bioacumulação ao longo da cadeia alimentar. Com este trabalho pretendeu-se estudar a extracção do aldrin, um insecticida organoclorado, de solos. Foram realizados estudos, mediante extracção assistida por ultra-sons, com soluções de diferentes tensioactivos e solventes orgânicos como extractantes, tendo sido seleccionados a mistura de tensioactivos POLE:Brij76 7:3, a 5% (m/v), e o acetato de etilo. As determinações do pesticida foram feitas por HPLC-UV. De um modo geral as recuperações obtidas com o acetato de etilo foram mais elevadas que do que as obtidas com os tensioactivos. No entanto, os solventes orgânicos apresentam inúmeras desvantagens, entre as quais elevado custo, toxicidade e maior variabilidade dos resultados. Foram ainda testadas outras metodologias de extracção do aldrin de solos, nomeadamente a utilização do ponto de turvação dos tensioactivos.

keywords

aldrin, soils, ultrasound-assisted extraction, surfactants

abstract

In recent decades, the abundant use of pesticides has been one of the most viable and effective alternatives in combating pests. However, these compounds pose a problem for public health and environment due to its toxic effects as reflected in bioaccumulation along the food chain. In this work it was studied extraction of aldrin, an organochlorine insecticide, from soil. Studies were conducted, by ultrasound-assisted extraction, with solutions of different surfactants and organic solvents, as extracting agents, and it were selected the mixture of surfactants POLE: Brij76 7:3, 5% (w/v) and ethyl acetate. Determinations of pesticide were made by HPLC-UV. In general, recoveries obtained from ethyl acetate were higher than those obtained with surfactants. However, organic solvents have many disadvantages, including high cost, toxicity and greater variability of results. It was also tested other methods for extracting aldrin from soils, including the use of cloud point of surfactants.

Índice

CAPÍTULO 1 – INTRODUÇÃO

1

1.1. Pesticidas	2
1.1.1. Pesticidas no Meio Ambiente	3
1.1.2. Propriedades dos Pesticidas	4
1.1.3. Pesticidas Organoclorados	5
1.1.3.1. Aldrin	7
1.2. Tensioactivos	8
1.2.1. Características Gerais	8
1.2.2. Tensioactivos Não Iónicos	10
1.2.2. Áreas de Aplicação dos Tensioactivos	11
1.2.4. Tensioactivos e Meio Ambiente	12
1.2.5. Tensioactivos vs Solventes Orgânicos	13
1.3. Extracção de Pesticidas	13
1.3.1. Extracção por Ultra-Sons	14
1.3.1.1. Ultra-Sons	17
1.3.1.1.1. Cavitação	17
1.3.1.2. Equipamento	19
1.3.2. Extracção por Ponto de Turvação	19
1.4. High Performance Liquid Chromatography (HPLC)	22
1.5. Enquadramento do Trabalho	23

2.1. Reagentes	25
2.2. Material	26
2.3. Enriquecimento dos Solos	28
2.4. Método de Análise (HPLC)	28
2.5. Preparação da Solução Stock e dos Padrões	29
2.6. Métodos de Extracção de Aldrin Adsorvido a Solos	29
2.6.1. Extracção Assistida por Ultra-Sons	29
2.6.2. Extracção com Agitação	30
2.6.3. Extracção por Ponto de Turvação	30
2.6.3.1. Estudos Relacionados com a Formação do Ponto de Turvação	30
2.6.3.2. Efeito dos Sais na Temperatura de Ponto de Turvação	31
2.7. Tratamento Estatístico dos Resultados.....	31

3.1. Caracterização do Aldrin.....	33
3.2. Extracção Assistida por Ultra-Sons – Optimização de Processos.....	35
3.2.1. Selecção do Tensioactivo	35
3.2.1.1. Tratamento Estatístico dos Resultados.....	37
3.2.2. Estudo da Influência do Tempo de Extracção na Recuperação	40
3.2.2.1. Tratamento estatístico dos Resultados	41
3.2.3. Estudo da concentração do Tensioactivo na Extracção do Aldrin Adorvido... ..	42
3.2.3.1. Tratamento Estatístico dos Resultados.....	44
3.2.4. Extracção Sequencial.....	45
3.3. Extracção por Ultra-Sons com Solventes Orgânicos	46
3.3.1. Tratamento Estatístico dos Resultados.....	49

3.3.2. Comparação dos Solventes Orgânicos com os Tensioactivos como Extractantes.....	51
3.4. Extracção com Agitação.....	51
3.4.1. Comparação da Extracção por Ultra-Sons e com Agitação.....	52
3.5. Influência das Fertilizações na Extracção do Aldrin.....	53
3.5.1. Extracção com POLE:Brij76, 7:3.....	54
3.5.1.1. Tratamento Estatístico dos Resultados.....	54
3.5.2. Extracção com Acetato de Etilo.....	55
3.5.2.1. Tratamento Estatístico dos Resultados.....	56
3.5.3. Comparação dos Extractantes nas Diferentes Fertilizações.....	58
3.6. Extracção por Ponto de Turvação.....	61
3.6.1. Diagrama de Fases.....	61
3.6.2. Influência da Força Iónica do Meio no Ponto de Turvação.....	62
3.6.3. Optimização do Processo de Separação de fases na Extracção por Ponto de Turvação.....	64
3.7. Extracção com Sais – Formação de Fases.....	66
CAPÍTULO 4 – CONCLUSÕES	69
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	71

Lista de Figuras

Figura 1 – Possíveis destinos dos pesticidas após a sua entrada no meio ambiente. (adaptado de Ref. [12])	4
Figura 2 – Estrutura Química do Aldrin.....	7
Figura 3 – Formação de agregado micelar [31].....	8
Figura 4 – Estrutura dos tensoactivos: a) POLE e b) Brij76.....	10
Figura 5 – Representação esquemática de um diagrama de fases de um tensoactivo em solução. L – uma fase e 2L – duas fases [36].	20
Figura 6 – Etapas da extracção por ponto de turvação [73].	21
Figura 7 – Aparelho de HPLC utilizado.....	28
Figura 8 – Banho de ultra-sons utilizado para a extracção.....	29
Figura 9 – Agitador end-over-end	30
Figura 10 – Cromatograma típico do aldrin, em solução aquosa de tensoactivos.	34
Figura 11 – Gráfico referente às extracções de aldrin utilizando diferentes tensoactivos/mistura de tensoactivos e respectivo intervalo de confiança.	37
Figura 12 – Gráfico referente às extracções de aldrin de um solo utilizando diferentes concentrações de tensoactivo e respectivo intervalo de confiança das determinações analíticas.....	44
Figura 13 – Gráfico referente à extracção do aldrin por ultra-sons (t=15min), com a mistura POLE:Brij76 7:3, a 5%. (Vtensoactivo=8mL, m(solo)=2g, passos de extracção=2).	46
Figura 14 – Gráfico referente às recuperações de aldrin obtidas, após extracção por ultra- sons, com recurso a solventes orgânicos e respectivo intervalo de confiança.	48
Figura 15 – Gráfico comparativo da extracção por U.S. com tensoactivos e com acetato de etilo, e respectivos intervalos de confiança.....	58
Figura 16 – Diagrama de fases referente à mistura de tensoactivos, POLE:Brij76, 7:3.	62

Figura 17 – Influência da variação da concentração de diferentes sais na temperatura de CP, para a concentração 1% de POLE:Brij76 7:3.	63
Figura 18 – Volume de fase orgânica obtido em função do volume de acetonitrilo adicionado. (a) – na ausência de solos; (b) – na presença de solos.	67

Lista de Tabelas

Tabela 1 – Tabela resumo da pesquisa realizada sobre a extracção de analitos orgânicos de matrizes sólidas, com recurso ao Ultra-Sons	16
Tabela 2 – Percentagem de matéria orgânica presente nos solos com diferentes fertilizações	27
Tabela 3 – Parâmetros referentes às duas curvas de calibração.	34
Tabela 4 – Resultados obtidos para a extracção assistida por ultra-sons (t=15min), com diferentes tensioactivos e concentração de 5% (Vtensioactivo=8mL, m(solo)=2g). DPR – desvio padrão relativo; I.C. – intervalo de confiança; n – número de extracções.....	36
Tabela 5 – Tabela ANOVA referente à comparação das variâncias da extracção por ultra-sons, das diferentes soluções tensioactivos. (SQ – soma dos quadrados; <i>gl</i> – grau de liberdade; MQ – Média dos quadrados; valor P – probabilidade (p<0.05))	38
Tabela 6 – Resultados obtidos para a extracção assistida por ultra-sons com diferentes tempos, com a mistura POLE:Brij76, na proporção de 7:3, com concentração de 5% (Vtensioactivo=8mL, m(solo)=2g). DPR – desvio padrão relativo; I.C. – intervalo de confiança; n – número de extracções	40
Tabela 7 – Teste <i>t</i> referente à comparação das médias dos dois tempos em estudo.	42
Tabela 8 – Resultados obtidos para a extracção por ultra-sons (t=15min), com a mistura POLE:Brij76, na proporção de 7:3, com diferentes concentrações (Vtensioactivo=8mL, m(solo)=2g). DPR – desvio padrão relativo; I.C. – intervalo de confiança; n – número de extracções	43
Tabela 9 – Testes <i>t</i> referentes às comparações das médias das percentagens de recuperação do aldrin, com as diferentes concentrações da mistura de tensioactivos estudadas... ..	45
Tabela 10 – Resultados obtidos para a extracção por ultra-sons (t=15min), com diferentes solventes (Vsolvente=8mL, m(solo)=2g). DPR – desvio padrão relativo; I.C. – intervalo de confiança; n – número de extracções.	47
Tabela 11 – Índice de Polaridade dos solventes utilizados na extracção do aldrin.	49

Tabela 12 – Tabela ANOVA referente às variâncias obtidas, utilizando a extracção por Ultra-Sons, com diferentes solventes. (SQ – soma dos quadrados; <i>gl</i> – graus de liberdade; MQ – Média dos quadrados; valor P – probabilidade ($p < 0.05$)).....	50
Tabela 13 – Resultados obtidos para a extracção com agitação a diferentes tempos, com a mistura de tensioactivos POLE:Brij76 7:3, com concentração de 5% (Vsolvente=8mL, m(solo)=2g). DPR – desvio padrão relativo; I.C. – intervalo de confiança; n – número de extracções.....	52
Tabela 14 – Comparação das médias das percentagens de recuperação do aldrin obtidas com os ultra-sons e com a agitação.	53
Tabela 15 – Resultados obtidos para a extracção do aldrin, com a mistura de tensioactivos, 7:3, com concentração de 5%, das fertilizações mais elevadas dos diferentes solos e do controlo (Vsolvente=8mL, m(solo)=2g). DPR – desvio padrão relativo; I.C. – intervalo de confiança; n – número de extracções.....	54
Tabela 16 – Tabela ANOVA referente às variâncias dos diferentes solos estudados, utilizando a extracção por Ultra-Sons, com a mistura de tensioactivos. (SQ – soma dos quadrados; <i>gl</i> – graus de liberdade; MQ – Média dos quadrados; valor P – probabilidade ($p < 0.05$)).....	55
Tabela 17 – Resultados obtidos para a extracção do aldrin, com solvente, acetato de etilo, das fertilizações mais elevadas dos diferentes solos e do controlo ([aldrin]=5 mg/L, Vsolvente=8mL). DPR – desvio padrão relativo; I.C. – intervalo de confiança; n – número de extracções.....	56
Tabela 18 – Tabela ANOVA referente às variâncias dos diferentes solos estudados, utilizando a extracção por Ultra-Sons, com solvente orgânico. (SQ – soma dos quadrados; <i>gl</i> – graus de liberdade; MQ – Média dos quadrados; valor P – probabilidade ($p < 0.05$)).....	57
Tabela 19 – Dados referentes à quantidade de matéria orgânica, em %, presente nos quatro solos com a recuperação do aldrin, em %, para o POLEBrij76 7:3 e para o acetato de etilo.	59
Tabela 20 – Resultados obtidos para a extracção do aldrin, com acetato de etilo, e com a mistura de tensioactivos, para o solo com a fertilização COM III (não calcinado e	

calcinado). DPR – desvio padrão relativo; I.C. – intervalo de confiança; n – número de extracções	60
Tabela 21 – Testes <i>t</i> referentes às comparações das médias das percentagens de recuperação do aldrin, dos solos calcinados e não calcinados, obtidas para o acetato de etilo e para a mistura de tensioactivos.....	61
Tabela 22 – Equações das rectas acima obtidas e respectivo coeficiente de correlação.	67
Tabela 23 – Percentagem de recuperação do aldrin e respectivos desvio padrão relativo, e intervalo de confiança. DPR – desvio padrão relativo; I.C. – intervalo de confiança; n – número de extracções.....	68

Lista de Abreviaturas

AE	Álcoois Etoxilados
ACN	Acetonitrilo
ANOVA	Análise de Variância
Brij76	Éter Estiril Poli(óxido de etileno)
C _c	Concentração Crítica
CMC	Concentração Micelar Crítica
COM	Fertilização de Compostagens de Lixos Domésticos
CP	Ponto de Turvação (<i>Cloud Point</i>)
CPE	Extracção por Ponto de Turvação (<i>Cloud Point Extraction</i>)
DDT	Diclorodifeniltricloroetano
DPR	Desvio Padrão Relativo
EC	Electroforese Capilar
EPA	Agência de Protecção Ambiental (<i>Environmental Protection Agency</i>)
FYM	Fertilização com Estrume Animal
GC/ECD	Cromatografia de Gás com Detector de Captura Electrónica (<i>Gas Chromatography with electron capture detector</i>)
<i>gl</i>	Graus de Liberdade
H ₀	Hipótese do nulo
HCB	Hexaclorobenzeno
HCH	Hexaclorociclohexano
HLB	Balanço Hidrofílico-Lipofílico

HPLC	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (<i>High Performance Liquid Chromatography</i>)
I.C.	Intervalo de Confiança
LC/MS/MS	Cromatografia Líquida com Espectrometria de Massa
LD	Limite de Detecção
LQ	Limite de Quantificação
M.D.S.	Mínima Diferença Significativa
MAE	Extracção Assistida por Microondas (<i>Microwave-Assisted Extraction</i>)
MAME	Extracção Micelar Assistida por Microondas (<i>Microwave-Assisted Micellar Extraction</i>)
MEKC	Cromatografia Micelar Electrocinética (<i>Micellar Electrokinetic Chromatography</i>)
MIN	Fertilização Mineral
MQ	Média dos Quadrados
N	Número de Agregação
n	Número de Extracções
P	Probabilidade
PAHs	Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos
POLE	Éter Lauril Poli(óxido de etileno)
POP	Poluente Orgânico Persistente
SFE	Extracção com Fluido Supercrítico (<i>Supercritical Fluid Extraction</i>)
SLU	Fertilização com Lamas de Estação de Tratamento
SPE	Extracção em Fase Sólida (<i>Solid Phase Extraction</i>)

SPME	Microextração em Fase Sólida (<i>Solid Phase Microextraction</i>)
SQ	Soma dos Quadrados
T _c	Temperatura Crítica
TLC	Cromatografia em Camada Fina (<i>Thin Layer Chromatography</i>)
U.S.	Ultra-Sons
UV/Vis	Ultra-Violeta/Visível

CAPÍTULO 1

INTRODUÇÃO

Nas últimas décadas, o aumento significativo da utilização de pesticidas, originou melhorias na qualidade dos alimentos, e na manutenção das culturas [1]. Conseguiu-se assim, aumentar a produtividade e consequentemente baixar os custos de produção dos produtos alimentares, o que contribuiu para o desenvolvimento económico dos países. Em contrapartida, o uso abusivo e a venda indiscriminada dos pesticidas aumentou a preocupação da comunidade científica, e da população em geral, acerca dos seus potenciais efeitos adversos. Neste sentido têm-se feito esforços para diminuir a sua utilização, através do uso de pesticidas biodegradáveis, ou outros produtos naturais para esse efeito. Apesar da diminuição do uso destes poluentes, as quantidades de pesticidas presentes no meio ambiente ainda são significativas, podendo afectar a população humana, uma vez que esta se encontra no topo da cadeia alimentar. Desta maneira, é importante estudar modos de extracção de pesticidas (para posterior determinação), não só para verificar os níveis presentes em cada compartimento ambiental (atmosfera, solo, águas), mas também em alimentos, animais, etc., de modo a avaliar o nível de contaminação e o potencial efeito adverso.

Os estudos relativos a esta área têm vindo a ser referenciados ao longo das décadas, verificando-se gradualmente uma melhoria nas técnicas utilizadas. Os solventes orgânicos, muito utilizados neste campo, também representam um problema para o ambiente e para quem os manuseia. Neste sentido, houve um desenvolvimento das técnicas de maneira a diminuir (ou anular) o uso de solventes orgânicos, como foi possível verificar com o aparecimento da extracção em fase sólida (*solid phase extraction* – SPE), extracção com fluido supercrítico (*supercritical fluid extraction* – SFE), microextracção em fase sólida (*solid phase microextraction* - SPME) ou extracção assistida por microondas (*microwave-assisted extraction* – MAE). O custo dos equipamentos também é um dos pontos importantes a analisar para o processo de extracção. Temos como exemplo, a SFE, que apesar de ser a técnica mais “amiga” do ambiente, não é das mais utilizadas devido ao seu elevado custo. A substituição dos solventes orgânicos por tensioactivos é uma alternativa barata, segura e viável, que pode levar ao abandono gradual do uso de solventes. O uso de tensioactivos associado a equipamentos como o microondas e os ultra-sons, ou através do ponto de turvação (*cloud point* – CP), tem sido bastante estudado dada as suas grandes potencialidades [2, 3].

1.1. Pesticidas

Pesticida é qualquer substância, ou mistura de substâncias, com intenção de prevenir, destruir, repelir ou atenuar, qualquer tipo de pestes ou infestantes [4]. Os pesticidas podem ser classificados de acordo com o seu alvo (insecticidas, fungicidas, herbicidas, etc.), modo de acção (ingestão, microbiano, etc.) ou a sua composição química (organoclorados, carbamatos, etc.).

Foi estimado que apenas cerca de 0,1% da quantidade total de pesticida aplicada é realmente utilizada no controlo de pragas. Os outros 99,9% entram directamente no meio ambiente, contaminando os solos, a água e o ar, onde ficam à “disposição” de outros organismos [3, 5]. Além disso, muitos pesticidas podem persistir por longos períodos de tempo nos ecossistemas, como por exemplo os pesticidas organoclorados que, 20 anos após ter sido proibida a sua utilização, continuam a ser detectados no meio ambiente [6, 7].

Uma vez na cadeia alimentar, um pesticida deste tipo pode sofrer biomagnificação, ou seja, o aumento da sua quantidade nos tecidos dos organismos, a cada nível da cadeia alimentar.

1.1.1. Pesticidas no Meio Ambiente

A utilização de pesticidas nas actividades agrícolas é a principal causa da sua introdução no meio ambiente. Após a libertação no ambiente, os pesticidas podem ter destinos diferentes: a) quando pulverizados podem mover-se através do ar, e podem eventualmente, terminar no solo ou na água; b) quando aplicados directamente no solo podem ser lixiviados e arrastados pelas águas superficiais ou podem deslocar-se para camadas inferiores do solo e posteriormente para os lençóis de água subterrâneos; c) quando injectados no solo também podem estar sujeitos a estes dois últimos destinos.

A aplicação de pesticidas directamente na água, ou indirectamente (proveniente dos solos) pode implicar não só a acumulação destes na água, como também pode contribuir para o aumento dos níveis presentes no ar, através da evaporação. Isto para exemplificar que o movimento de pesticidas no meio ambiente é bastante complexo, não só pelas várias possibilidades de entrada do mesmo no meio ambiente, mas também como resultado das transferências que ocorrem continuamente entre os diferentes compartimentos ambientais. Em alguns casos, essas transferências ocorrem entre as áreas que são próximas umas das outras mas também pode envolver transporte de pesticidas a longas distâncias [8-10].

Quando o pesticida é libertado no ambiente pode ocorrer a sua degradação, pela acção da luz solar, da água, de outros produtos químicos ou de bactérias, que leva à obtenção de metabolitos, geralmente, menos nocivos. A Figura 1 resume alguns dos possíveis destinos de um pesticida após a sua aplicação; Se o tempo de permanência no ambiente for reduzido, implica uma diminuição das possibilidades de movimentação do pesticida e conseqüentemente a uma menor probabilidade deste constituir efeitos adversos para o Homem ou para o biota. O mesmo não se passa com os pesticidas persistentes, que podem mover-se por longas distâncias e acumular-se no ambiente conduzindo, a uma maior probabilidade de causar efeitos nocivos [11].

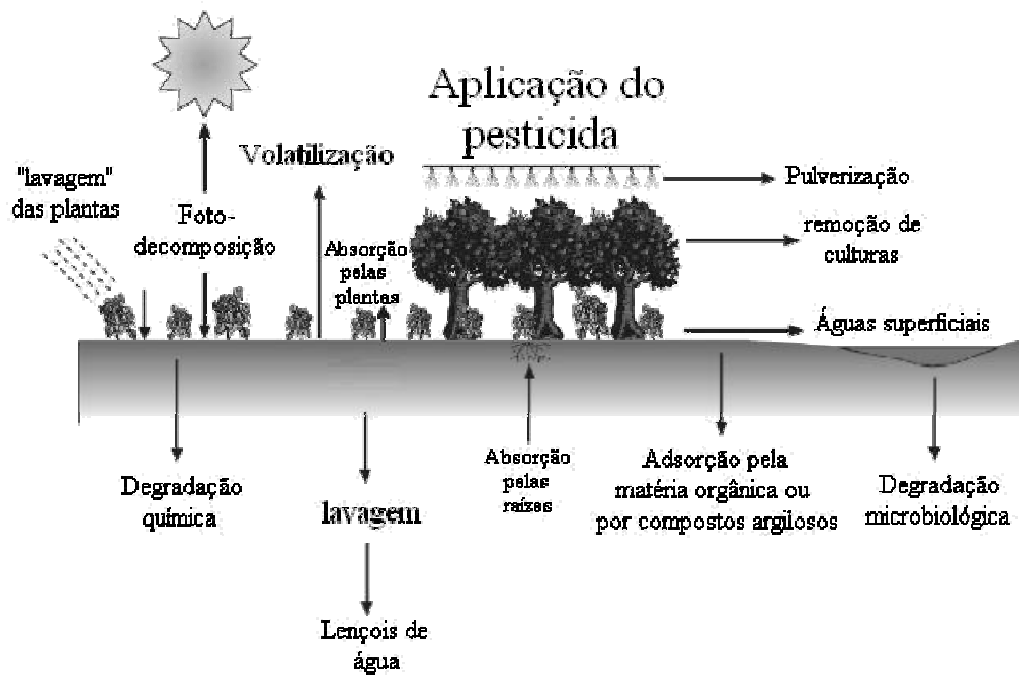


Figura 1 – Possíveis destinos dos pesticidas após a sua entrada no meio ambiente. (adaptado de Ref. [12])

1.1.2. Propriedades dos Pesticidas [13-15]

As propriedades dos pesticidas têm uma grande influência no seu comportamento e destino, após a sua libertação no meio ambiente. Estas propriedades englobam a volatilidade, degradação, adsorção e solubilidade.

A evaporação dos pesticidas está directamente dependente da sua volatilidade. Os pesticidas mais voláteis tendem a ser evaporados com mais facilidade, o que leva à diminuição destes nos solos ou nas águas e consequentemente diminui a contaminação das águas subterrâneas.

A persistência está inversamente relacionada com a degradação, ou seja, quanto mais persistente for um pesticida, menor é a sua taxa de degradação, e mais tempo permanecerá no ambiente. Pode ocorrer degradação dos pesticidas devido à foto-degradação ou à acção de microrganismos e a processos físico-químicos. A persistência dos pesticidas no meio ambiente resulta na circulação dos mesmos pelos diferentes

compartimentos ambientais. Este fenómeno pode decorrer durante longos períodos de tempo.

A capacidade de adsorção de um pesticida a um solo resulta num maior tempo de permanência deste no ambiente. Esta propriedade não depende só das características do pesticida, mas também da composição do solo. Uma forte adsorção diminui o risco de contaminação de águas, quer superficiais quer subterrâneas.

A solubilidade encontra-se, em parte, relacionada com a adsorção. Muitos dos pesticidas organoclorados são altamente persistentes no solo, mas a sua presença em águas subterrâneas é nula, devido à sua baixa solubilidade e adsorção extremamente forte às partículas do solo. Pesticidas solúveis presentes nos solos podem ser escoados para as águas superficiais ou podem ser difundidos pelo solo até às águas subterrâneas.

1.1.3 Pesticidas Organoclorados

Os pesticidas organoclorados são eficazes contra uma grande variedade de insectos. Como exemplo, temos o diclorodifeniltricloroetano (DDT), que foi de uso muito generalizado pela população em geral e, por exemplo, pelos militares contra os mosquitos portadores de doenças [16].

Estes compostos químicos começaram a ser usados em 1940, embora hoje em dia sejam muito pouco utilizados em todo o mundo [17]. Os países desenvolvidos já substituíram os pesticidas organoclorados por formulações modernas que possuam características biodegradáveis e menos nocivas. No entanto, os países em desenvolvimento, continuam a preferir a utilização de pesticidas organoclorados, dado o baixo custo de produção e a elevada eficiência no controlo de pragas, que estes pesticidas continuam a apresentar. Por esta razão, o dilema da relação custo/eficácia versus impacto ecológico e as novas formulações de pesticidas são questões que geram muita controvérsia a nível mundial [16, 18, 19].

A agência de protecção ambiental dos Estados Unidos (EPA) proibiu o uso de muitos destes pesticidas no período 1970-1980, mas mesmo assim, ainda é possível encontrar estes pesticidas com concentrações elevadas, em diferentes regiões, devido à sua elevada persistência no meio ambiente [16].

Os pesticidas organoclorados pertencem ao grupo de poluentes orgânicos persistentes (POPs) são caracterizados pela elevada estabilidade, persistência, hidrofobicidade e afinidade para determinadas substâncias [20]. A maioria destes pesticidas são muito persistentes no meio ambiente, mas são insolúveis em água não havendo por isso tendência para se moverem para os lençóis freáticos. Podem, no entanto, ser um grave problema, uma vez que permanecem na superfície por um longo período de tempo, em que ficam sujeitos a processos de evaporação, podendo ser transportados pela atmosfera e acumulados em áreas remotas [18, 21].

Os pesticidas organoclorados apresentam um especial interesse pelo facto do seu uso generalizado ter sido seguido por variados estudos, os quais relataram além da sua persistência, em diferentes meios ambientais, a sua capacidade de bioacumulação e biomagnificação em cadeias alimentares. Isto porque, estes compostos apresentam elevada resistência à degradação química e microbiológica e alta solubilidade em lípidos. Os resíduos de pesticidas organoclorados já foram detectados em tecidos humanos, um pouco por todo o mundo [17, 22, 23].

Os pesticidas organoclorados constituem um grupo único de pesticidas, devido à sua estrutura cíclica, ao número de átomos de cloro e à sua baixa volatilidade. Podem subdividir-se em quatro grupos [16]:

- diclorodifeniletanos (ex. DDT)
- ciclodienos (ex. Aldrin, Dieldrin)
- clorobenzenos (ex. Hexaclorobenzeno, HCB)
- ciclohexanos (ex. Hexaclorociclohexano, HCH)

O pesticida alvo de estudo neste trabalho será o aldrin, que foi um dos pesticidas mais utilizados no combate a pragas. Este pesticida pertence à “*dirty dozen*” da EPA, na qual listam as 12 substâncias prioritárias desta agência [24].

1.1.3.1. Aldrin

O Aldrin, $C_{12}H_8Cl_6$ (Figura 2), pertence à classe dos pesticidas organoclorados, apresenta-se como um sólido incolor cristalino, no seu estado puro. Quando sob a forma comercial (90% de pureza), este pesticida apresenta uma coloração acastanhada. A sua solubilidade é $27\mu\text{g/L}$, a 27°C , o que significa que é praticamente insolúvel [25]. A pressão de vapor a 20°C é $10,0 \times 10^{-3}\text{Pa}$ e o coeficiente de partição octanol-água, é de 7,4, o que demonstra o seu elevado potencial de bioacumulação. No solo, o aldrin é convertido por epoxidação em dieldrin. Este último é mais estável e altamente persistente no ambiente, apesar de ambos serem fortemente sorvidos no solo, em especial pela matéria orgânica. Contudo, são resistentes à lixiviação, o que leva a um baixo potencial na contaminação de lençóis freáticos [26].

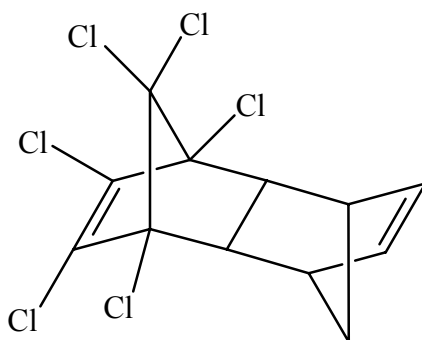


Figura 2 – Estrutura Química do Aldrin.

É classificado como insecticida, sendo utilizado no controlo de pragas nomeadamente, térmitas, gafanhotos, baratas, entre outros e foi bastante utilizado na agricultura intensiva, em dosagens entre $2,0-10,0\text{kg/ha}$ [25]. Dada a sua persistência no ambiente, a susceptível biomagnificação e toxicidade em animais e humanos, este pesticida organoclorado foi banido dos países tecnologicamente desenvolvidos [18, 27]. No entanto, continua a ser detectado no ar e nas precipitações pluviométricas [21]. Os seres humanos como, parte da cadeia alimentar, estão constantemente expostos a este tipo de contaminações, através do consumo de carne peixe e vegetais. Estima-se que cerca de 90% da exposição seja feita através da ingestão de alimentos [28].

O aldrin e o dieldrin destacam-se, como agentes de intoxicações, devido à elevada toxicidade, aguda e a longo prazo, que possuem. Após a ingestão, estes insecticidas são rápida e quase completamente absorvidos pelo tracto gastrointestinal e transportados para o fígado e daí para a corrente sistémica e diversos tecidos. A pele também constitui uma excelente porta de entrada dos ciclodienos para o organismo humano [29]. Uma vez no organismo, estes pesticidas podem causar danos em vários sistemas, entre os quais no sistema imunitário, no sistema hepático, no sistema reprodutivo ou no sistema nervoso, para além de que estes pesticidas são disruptores endócrinos [30].

1.2. Tensioactivos

1.2.1. Características Gerais

Os tensioactivos são moléculas anfífilas, ou seja, apresentam uma zona apolar (hidrofóbica) constituída por uma cadeia hidrocarbonada, com um número de átomos de carbono compreendidos, geralmente, entre oito e dezoito e uma zona polar (hidrofílica) que pode ser iónica ou não iónica, o que permite a classificação dos tensioactivos em quatro grupos: aniónicos, catiónicos, *zwitteriónicos* ou não iónicos. A natureza anfífilica dos tensioactivos confere-lhes propriedades únicas de onde se destaca a formação de micelas. O termo micela designa uma entidade de dimensões coloidais, em equilíbrio dinâmico com o monómero que dá origem à sua formação (Figura 3)

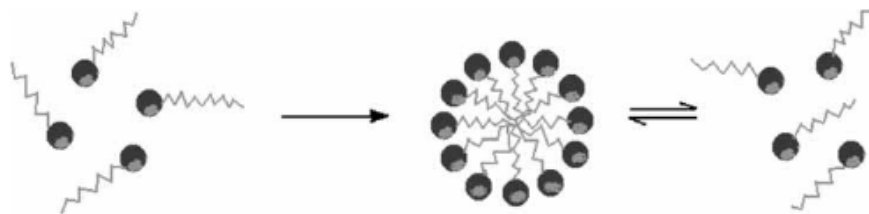


Figura 3 – Formação de agregado micelar [31].

Os tensoactivos, quando presentes em solução, a baixas concentrações existem sob a forma de monómeros. O aumento da concentração acima de um determinado valor, denominado concentração micelar crítica (CMC), provoca a associação espontânea dos monómeros e, desta forma, ocorre a formação de agregados (micelas). Esta associação das moléculas de tensoactivo ajuda a diminuir a área de contacto entre a parte hidrofóbica do tensoactivo e a água. A água tem uma estrutura densa devido às ligações de hidrogénio tridimensionais, que permite a existência de “*clusters*” de tamanho específico que permitem a acomodação das cadeias hidrocarbonadas do tensoactivo.

Cada micela é composta por um determinado número de moléculas de tensoactivo, denominado número de agregação (N), que rege, normalmente, o tamanho e a geometria do sistema micelar [32].

A CMC dos tensoactivos varia com a estrutura do tensoactivo, a temperatura da solução, a presença de um electrólito e de compostos orgânicos. O tamanho da parte hidrofóbica do tensoactivo, também influencia a CMC, em geral, esta diminui com o aumento da cadeia hidrofóbica [33].

As micelas formadas por tensoactivos não iónicos geralmente apresentam concentrações micelares críticas menores e números de agregação mais altos que aquelas formadas a partir de tensoactivos iónicos, devido à ausência de repulsões electrostáticas entre as cabeças dos monómeros não iónicos.

Uma propriedade importante das micelas é a capacidade de solubilizar diferentes compostos, o que permite a extracção de analitos e/ou complexos pouco solúveis em água. Existe uma variedade de metodologias possíveis para a extracção com tensoactivos, dependendo da natureza dos analitos e do tensoactivo utilizado, sendo que, a utilização dos tensoactivos pode ser feita, geralmente, de dois modos:

- quando presentes em solventes orgânicos, os tensoactivos formam micelas inversas, e são utilizado na extracção de enzimas extracelulares, proteínas, metais, etc.; [34]

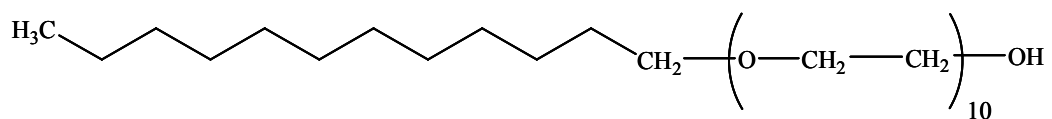
- em solução aquosa, os tensoactivos são utilizados no isolamento e purificação de compostos bioquímicos [35-37] e componentes de membranas [38] e em processos de extracção [36, 39].

1.2.2. Tensioactivos não iónicos

Os tensioactivos não iónicos do tipo éteres alquil poli(óxido de etileno), também denominados de álcoois etoxilados (AE), foram sintetizados pela primeira vez, no início da década de 30 e, desde então, devido à sua detergentência, às suas propriedades humectantes e esponjosas, têm sido utilizados amplamente na indústria e em produtos domésticos, nomeadamente em produtos de lavandaria [40, 41].

Na Figura 4 estão representadas as estruturas dos tensioactivos não iónicos utilizados no presente trabalho. A sua fórmula geral é $C_nH_{2n+1}(OCH_2CH_2)_mOH$. Geralmente são denominados de C_nE_m , onde n indica o número de carbonos na cadeia alquila e m representa o número de unidades de óxido de etileno na parte hidrofílica. Comercialmente, estão disponíveis sob a forma de mistura de vários C_nE_m , com diferentes valores de m , mas também existem na forma pura. O elevado grau de pureza que estes compostos começam a apresentar, possibilita a determinação de parâmetros físico-químicos tais como: CMC, densidade, temperatura de ponto de turvação, balanço hidrofílico-lipofílico HLB, entre outros.

a)



b)

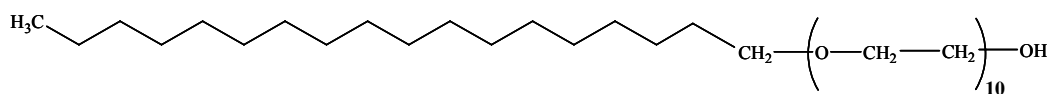


Figura 4 – Estrutura dos tensioactivos: a) POLE e b) Brij76.

Os tensioactivos não iónicos do tipo polietóxido, constituídos por uma cadeia de poli(óxido de etileno) como porção hidrofílica, formam uma grande família de tensioactivos. De acordo com a constituição química da porção hidrofóbica, dão origem a

séries de compostos com diferentes nomes comerciais, sendo as mais conhecidas as séries Brij (álcool), Triton X (p-t-octilfenol), Triton N (nonilfenol), Span (ésteres de ácidos gordos) e Tween (ésteres de sorbitol) [42].

O tensioactivo éter estiril poli(óxido de etileno) (Brij76), de massa molecular 711,02g/mol, é constituído por uma cadeia alquílica de 18 carbonos, responsável pelo seu carácter hidrofóbico, e uma cadeia de polioxietileno com um número médio de 10 unidades de óxido de etileno, de natureza hidrofílica. Este tensioactivo tem um HLB de 12,4 e a densidade é 0,964g/mL a 25°C [43].

O tensioactivo éter lauril poli(óxido de etileno) (POLE), M= 626,86g/mol, é constituído na parte hidrofóbica por uma cadeia hidrocarbonada de 12 carbonos e na parte hidrofílica por uma cadeia de polioxietileno com um número médio de 10 unidades de óxido de etileno. Como principais características apresenta: temperatura de ponto de turvação de 77°C, o HLB é 14,1 e a CMC é de 0,00009M [40, 44].

1.2.3. Áreas de Aplicação dos Tensioactivos

Existem numerosas aplicações dos meios micelares, destacando-se a sua utilização conjunta com métodos electroquímicos, espectroscópicos e de separação. Nestes últimos, os tensioactivos têm maior aplicabilidade nos processos de extracção, sendo também utilizados em processos cromatográficos e electroforéticos.

Nas separações cromatográficas a presença de tensioactivos, em concentrações superiores à CMC, na fase móvel, gerou um novo tipo de cromatografia, denominada cromatografia líquida micelar. A capacidade que os sistemas micelares possuem de interagir com uma grande quantidade de substâncias, tanto hidrofóbicas como iónicas, oferece grandes possibilidades na separação dos analitos por cromatografia líquida de alta eficiência (*high performance liquid chromatography* – HPLC). As separações são conseguidas por distribuição dos analitos entre a fase estacionária a micelar e a aquosa.

É frequente a utilização de meios micelares na electroforese capilar (EC). O primeiro uso de tensioactivos neste campo deve-se a Terabe, em 1984, que denominou esta técnica por cromatografia micelar electrocinética (*micellar electrokinetic chromatography* - MEKC). A MEKC combina a electroforese capilar com a cromatografia de partição e é

bastante utilizada na separação de espécies neutras [45]. A MEKC combina a alta eficiência, a rapidez, a sensibilidade e uma boa selectividade.

Os tensioactivos também podem ser aplicados em metodologias de separação por ultra-filtração e em membranas líquidas de tensioactivo. A utilização de tensioactivos na separação por ultra-filtração baseia-se na associação de solutos com as micelas e posterior separação das mesmas, através da passagem da solução por uma membrana de ultra-filtração. A membrana deve possuir um poro com tamanho suficientemente pequeno, para reter os agregados micelares, mas grande o suficiente para que o fluxo seja aceitável. Normalmente esta técnica é aplicada na determinação de iões metálicos, mediante a utilização de ligandos hidrofóbicos, previamente incorporados nas micelas, o que pode conferir aplicações industriais a esta técnica [46].

Uma área importante de utilização dos tensioactivos é a da extracção de compostos de matrizes complexas, como por exemplo as ambientais. O presente trabalho está integrado neste âmbito.

1.2.4. Tensioactivos e Meio Ambiente

A vasta utilização dos tensioactivos em produtos domésticos e/ou industriais conduz á sua presença no meio ambiente [33]. Apesar da legislação determinar a sua biodegradabilidade, muitas vezes os tensioactivos são apenas parcialmente degradados, o que se traduz na sua presença, bem como dos seus produtos, no meio ambiente, e que pode resultar em:

- problemas ambientais provocados pelos tensioactivos;
- problemas ambientais provocados pela mobilização de poluentes orgânicos e inorgânicos ligados ao solo, pelos tensioactivos [47].

Mas, se por um lado os tensioactivos podem ser prejudiciais ao ambiente por outro, podem ajudar na remoção de pesticidas dos solos, por lavagem. Este processo é um dos pertencentes à remediação de solos contaminados e tem sido estudado por diversos autores, devido aos baixos preços e toxicidade em relação a outros sistemas de descontaminação. A capacidade que os tensioactivos têm de solubilizar compostos relativamente insolúveis é um facto conhecido e que tem vindo a ser explorado por muitas indústrias [33].

O uso de tensoactivos não iónicos nos processos de extracção oferece vantagens em relação à toxicidade. Os tensoactivos não iónicos utilizados nos processos de extracção, são em grande maioria, classificados como não tóxicos e inofensivos para o Homem. Os tensoactivos não iónicos da classe dos polioxietilenados são parcialmente biodegradáveis, pois as bactérias do género *Pseudomonas* de origem marinha conseguem degradar 4 ou 5 grupos etoxilo da cadeia polioxietilenada [48].

1.2.5. Tensoactivos vs Solventes Orgânicos

A utilização de tensoactivos apresenta algumas vantagens face aos solventes orgânicos comumente utilizados na extracção de pesticidas e outros poluentes ambientais. São elas:

- o aumento de selectividade, para a qual contribuem os tensoactivos, já que os meios micelares podem ser mais selectivos relativamente aos analitos, uma vez que os retém no seu interior.
- maior segurança e menor custo. O volume de tensoactivo necessário é muito menor face à quantidade de solventes orgânicos. Por outro lado, a toxicidade dos tensoactivos é menor. Pode incluir-se a utilização dos tensoactivos nos processos de extracção como fazendo parte de uma área da Química Verde.
- compatibilidade com fases móveis micelares, orgânicas ou aquosas.
- evaporação do solvente pode levar a perdas do analito, no caso da extracção líquido-líquido.
- o tensoactivo elimina ou reduz a quantidade de analito sorvido num tubo, quando armazenado. É importante, pois a adsorção dos analitos aos recipientes contribui, por vezes, para as baixas recuperações dos mesmos.

1.3. Extracção de Pesticidas

Nos últimos anos desenvolveram-se muitos métodos de análise de poluentes orgânicos, nomeadamente pesticidas, em amostra de interesse ambiental. Mas, a

complexidade das amostras, a necessidade de recuperações eficazes e quantitativas, assim como a presença de interferentes, obriga à realização de um pré-tratamento, que reflecte uma importante contribuição no tempo de análise, assim como a introdução de solventes orgânicos com considerável toxicidade e que podem provocar impactos importantes no meio ambiente. Neste sentido, desenvolveram-se técnicas de maneira a reduzir, ou até mesmo anular, o uso de solventes orgânicos, como foi possível verificar com o aparecimento da SFE, SPE, SPME ou MAE.

A SFE é, de todas as técnicas, a mais “amiga” do ambiente, pois os extractores utilizados neste processo, normalmente são gases inertes, aplicados a baixas temperaturas e a baixas pressões. O fluido supercrítico mais utilizado é o dióxido de carbono devido aos seus baixos parâmetros críticos, não é tóxico, inflamável ou reactivo, e é possível obtê-lo com elevado grau de pureza a baixos custos. A SFE pode ser aplicada a uma grande quantidade de matrizes, na determinação de diversos analitos, mas as condições que devem ser usadas para tornar a extracção possível, ou eficiente, não compensam face às vantagens apresentadas [49-51]. É também importante ter em atenção o custo dos equipamentos. Lombas-García *et al.* [52] realizaram um estudo comparativo da SFE com os ultra-sons (U.S.) na extracção de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (PAHs) de um material de referência e concluíram que a SFE não apresenta vantagens em relação aos U.S., dada a complexidade e trabalho necessário face aos resultados obtidos.

Dadas as vantagens, já referidas, dos tensioactivos em relação aos solventes orgânicos, estes agentes apresentam-se como uma boa alternativa face a estes métodos. A extracção de pesticidas e outros poluentes ambientais, utilizando meios micelares, em substituição dos solventes, já foi explorada por Santana Rodriguez e seus colaboradores, com recurso às microondas [53]. Os meios micelares também foram utilizados por V Pino, na extracção de PAHs de sedimentos marinhos, com a utilização das microondas e dos ultra-sons [54].

1.3.1. Extracção por Ultra-Sons

A extracção por ultra-sons está inserida nos métodos de extracção convencionais, mas existem vários estudos que demonstram que esta técnica é bastante eficiente na extracção de analitos orgânicos de matrizes sólidas (Tabela 1).

Os ultra-sons apresentam vantagens ao nível do custo do equipamento, tempo de extracção e ao nível de automação [55], promovem um maior contacto entre a amostra sólida e o solvente, o que se traduz num aumento da recuperação obtida [56, 57].

Na Tabela 1 estão resumidos alguns estudos de extracção de poluentes orgânicos, realizados com recurso aos ultra-sons, nos quais se obtiveram taxas de recuperação superiores a 80%.

Tor *et al.* [58] optimizaram o procedimento de extracção por ultra-sons de pesticidas organoclorados e os seus metabolitos de amostras de solo. A optimização teve em vista o estudo do tipo e quantidade de solvente, e a duração do tempo de extracção. Concluíram que os ultra-sons são uma técnica eficiente na extracção de pesticidas organoclorados de solos. Babić *et al.* [57] estudaram a extracção de pesticidas de solos utilizando também os ultra-sons. Para além de concluírem acerca da eficiência na extracção de pesticidas de amostras sólidas, verificaram que de entre as técnicas tradicionais de extracção, esta é a mais vantajosa, em termos de custos, solventes e tempo.

O uso de tensioactivos, como solução extractante, na metodologia por ultra-sons já foi estudado por V. Pino *et al.* na extracção de PAHs de sedimentos marinhos. Dada a boa recuperação obtida concluíram que a utilização de ultra-sons aliada aos tensioactivos é uma boa opção na extracção destes poluentes orgânicos de amostras sólidas. Isto porque, é uma técnica rápida e a utilização de tensioactivos é mais “limpa” e menos perigosa [59].

A extracção por ultra-sons, não tem só aplicação ao nível da extracção de analitos orgânicos de matrizes sólidas. Ashley *et al.* [60] aplicaram os U.S. na extracção de metais de amostras de interesse ambiental e para a saúde. I. Rezić [61] estudou a extracção de 23 metais do algodão. Sulman *et al.* [62] extraíram compostos biologicamente activos de matéria-prima vegetal.

Tabela 1 – Tabela resumo da pesquisa realizada sobre a extração de analitos orgânicos de matrizes sólidas, com recurso ao Ultra-Sons

Analito	Amostra	Solvente	V (solvente) (mL)	M (matriz) (g)	Tempo (min)	Passos de extração	Recuperação	Método de detecção	Referência
Pesticidas	Solos	Acetona	20	10	15	1	>80%	TLC	[57]
Pesticidas Organoclorados	Sedimentos marinhos	Diclorometano	5	1	20	2	>90%	GC/ECD	[63]
Pesticidas	Mel	Benzeno:água 1:1 (v/v)	20	5	20	3	>90%	TLC	[64]
Resíduos de Pesticidas	Vegetais	Acetato de Etilo	40	5	35	1	>80%	LC-MS-MS	[56]
Pesticidas Organoclorados	Solos	Éter de petróleo:acetona 1:1 (v/v)	25	10	20	2	>88%	GC/ECD	[58]
PAHs	Sedimentos marinhos	Tensioactivo (POLE) 0,1M	10	0,8	30	1	>85%	HPLC-UV	[59]

1.3.1.1. Ultra-Sons - Teoria

Ultra-som é o nome dado a qualquer onda de som, cuja frequência seja superior à frequência mais alta que o ouvido humano é capaz de captar, ou seja, superior a 16KHz, que corresponde a 16000 ciclos por segundo. É possível distinguir duas áreas de ultra-sons, a de alta frequência (de 1 a 10MHz) e baixa intensidade, usualmente utilizada para fins de diagnóstico em medicina e em engenharia; e a de baixa frequência (entre 20 e 100KHz) e alta intensidade, aplicada em limpezas e reactividade química [39, 65, 66].

O facto do ultra-som ser uma onda de som, permite a sua transmissão através de qualquer sólido, líquido ou gás, uma vez que possuem propriedades elásticas. O movimento de um corpo vibrante (a fonte sonora) é comunicado às moléculas do meio, sendo que cada uma delas transmite o seu movimento às partículas adjacentes antes de voltar à sua posição inicial. Por outras palavras, a onda de ultra-som, como todas as ondas de som, consiste em ciclos de compressão e expansão. Nos ciclos de compressão exerce-se uma pressão positiva no líquido, resultando numa aproximação entre as moléculas; por outro lado, nos ciclos de expansão (também denominados, ciclos de rarefacção), a pressão exercida é negativa, o que leva ao afastamento das moléculas. Nestes últimos ciclos, se a onda tiver intensidade suficiente, pode ocorrer a formação de cavidades [39, 66].

1.3.1.1.1. Cavitação

A extracção por ultra-sons é afectada pela cavitação acústica, função mecânica e pela função térmica. A cavitação é o factor mais importante. Sob a radiação dos ultra-sons são criadas micro-bolhas quando a pressão negativa é suficientemente elevada [56]. A cavitação é o fenómeno de formação, crescimento e subsequente colapso de microbolhas ou cavidades que ocorrem em intervalos de tempo muito reduzidos (milissegundos), sendo libertadas elevadas quantidades de energia. Da alternância dos dois ciclos (de compressão e de expansão), resultam várias fases da cavitação, como a formação da bolha/cavidade, a fase de crescimento e a fase de colapso, com a consequente libertação de energia [67].

A formação da bolha ocorre na fase de expansão, como consequência da pressão negativa. Durante o ciclo de compressão o tamanho da bolha vai diminuindo. O seu tamanho diminui e aumenta alternadamente de forma cíclica até atingir um tamanho crítico instável, verificando-se o colapso das bolhas no seguimento do ciclo de compressão. O

crescimento da bolha e a posterior implosão num líquido irradiado com ultra-sons é o fenómeno físico responsável pela maioria dos fenómenos sonoquímicos.

Os fenómenos de cavitação ocorrem simultaneamente em pequenas regiões do reactor. Deste modo, é difícil quantificar o número de cavidades que ocorrem num determinado intervalo de tempo.

Como exemplo de fenómenos de cavitação pode indicar-se a geração de “hot spots”, a libertação de radicais livres muito reactivos, o aumento de transferência de massa ou a limpeza de superfícies sólidas. [68-70]

A sonificação aumenta os movimentos moleculares, que promovem a eficiência da transferência de massa e a agitação. Estes fenómenos podem proporcionar o aumento do rendimento das reacções químicas, acelerando as mesmas e reduzindo o número de passos intermédios.

A implosão das cavidades concebe um ambiente pouco usual para as reacções químicas. O vapor e os gases dentro da bolha são extremamente comprimidos durante o colapso cavitacional, o que leva ao aumento da temperatura e pressão. Ainda se pressupõe, que o colapso cavitacional origina condições locais drásticas: dentro da bolha a temperatura é cerca de 5000K, com uma pressão de aproximadamente 1000atm; no líquido circundante as temperaturas são da ordem dos 1900K.

Algumas condições são limitadas a regiões muito pequenas e o calor produzido durante a cavitação é dissipado muito rapidamente [68].

A ruptura das bolhas de cavitação pode gerar elevadas pressões e temperaturas em micropontos do meio, dando lugar a ondas de choque que se dispersam no meio de reacção. As equações seguintes permitem-nos calcular as temperaturas e pressões máximas nos micropontos, quando ocorre a ruptura das bolhas:

$$T_{\max} = T_0 \left[\frac{P_M (k-1)}{P} \right] \qquad P_{\max} = P \left[\frac{P_M (k-1)}{P} \right]$$

onde T_0 corresponde à temperatura ambiente, P à pressão da bolha no tamanho máximo, P_M à pressão em equilíbrio no momento da ruptura e k ao índice politrópico (relação entre os calores específicos da mistura gás/vapor).

1.3.1.2. Equipamento

Os equipamentos de ultra-sons mais comuns nos laboratórios de química são o banho de limpeza e a sonda de ultra-sons. O banho apresenta vantagem por ser uma fonte de irradiação economicamente mais acessível, ao mesmo tempo que assegura uma simples distribuição da energia no reactor. A sonda destaca-se pela sua maior potência, para além que esta pode ser variável [39].

1.3.2. Extracção por Ponto de Turvação

Quando uma solução de tensioactivos não iónicos é aquecida acima de uma determinada temperatura, há formação de duas fases. A temperatura à qual se observa a formação dessas fases denomina-se temperatura de CP e depende essencialmente da concentração de tensioactivo presente em solução. Deste modo é possível representar graficamente a temperatura a que ocorre a separação de fases em função da concentração de tensioactivos - diagrama de fases. Neste diagrama observa-se uma zona onde predomina apenas uma fase, L, e outra onde predominam duas fases, 2L (Figura 5). O ponto mínimo ao qual ocorre separação das fases designa-se por ponto crítico, sendo a temperatura crítica (T_C) e a concentração (C_C) crítica as designações atribuídas à temperatura e concentração, neste ponto. O fenómeno é reversível, podendo-se obter novamente uma fase com arrefecimento [36, 71, 72].

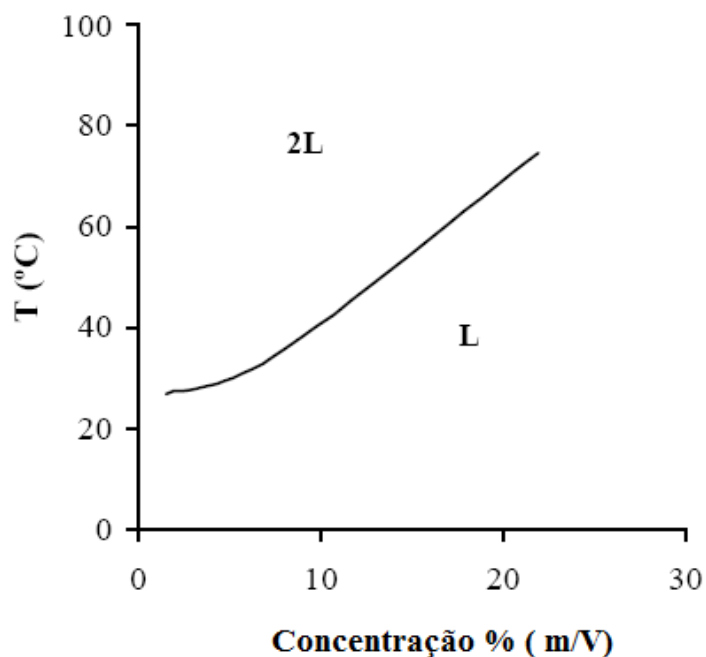


Figura 5 – Representação esquemática de um diagrama de fases de um tensoactivo em solução. L – uma fase e 2L – duas fases [36].

A temperatura de ponto de turvação de um tensoactivo pode ser modificada na presença de sais, bases, ácidos, polímeros, ureia ou outros tensoactivos. Assim, é possível obter uma determinada temperatura de CP, para uma aplicação analítica concreta, fazendo uso desta metodologia de extracção/pré-concentração, mediante uma adequada selecção do tensoactivo não iónico ou *zwitteriónico* e dos aditivos apropriados.

O ponto de turvação não é exclusivo dos tensoactivos não iónicos. Alguns tensoactivos duplamente iónicos (*zwitteriónicos*) também sofrem este fenómeno. A principal diferença entre os diagramas de fase dos tensoactivos não iónicos e *zwitteriónicos* prende-se com o facto de nos segundos a separação ocorrer quando a temperatura diminui.

As primeiras aplicações da separação de fases aplicando este fenómeno referem-se à extracção de iões metálicos, formando complexos moderadamente solúveis em água. A eficiência do processo depende da hidrofobicidade do ligando e do complexo formado, nas constantes de equilíbrio aparentes no meio micelar e na cinética de formação do complexo e na transferência entre as fases. Mais tarde foi utilizada no isolamento e purificação de

compostos com interesse biológico, nomeadamente proteínas. A aplicação da extracção por ponto do turvação (*cloud point extraction – CPE*) a outros compostos orgânicos, que não biomoléculas, é relativamente recente.

Experimentalmente, a CPE é bastante simples. Em primeiro lugar os tensoactivos não iónicos ou *zwitteriónicos* são adicionados à solução aquosa contendo o analito. A concentração final do tensoactivo deve ser superior à CMC para que haja micelas presentes em solução. Uma vez que os valores da CMC dos tensoactivos neutros são muito baixos, é necessário, apenas, a adição de uma pequena quantidade de tensoactivo puro ou solução concentrada à amostra. Estabelece-se o equilíbrio de partição e as moléculas de analito são incorporadas nos agregados micelares presentes na solução. Para que ocorra a separação de fases altera-se a temperatura. A separação total das fases é conseguida utilizando centrifugação, ou simplesmente, por decantação e os analitos ficam concentrados na fase rica em tensoactivo (Figura 6). Dependendo da densidade do tensoactivo, este pode situar-se acima ou abaixo da fase aquosa. A adição de sais pode ajustar a densidade da fase aquosa. Em alguns casos é mais fácil e conveniente trabalhar com a fase rica em tensoactivo na camada superior para evitar que haja contaminação cruzada com a fase aquosa.

Caso seja necessário, pode-se diluir ou fazer um “clean-up” à fase resultante, previamente à análise [36].

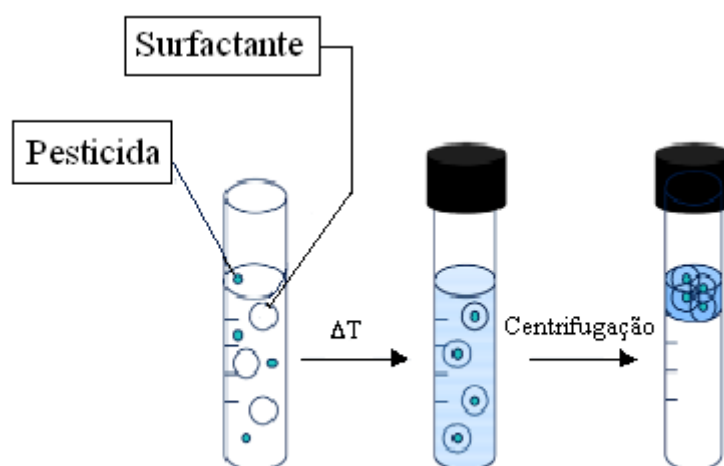


Figura 6 – Etapas da extração por ponto de turvação [73].

1.4. High Performance Liquid Chromatography (HPLC)

A volatilidade dos compostos condiciona a sua separação por cromatografia de gás. Neste contexto, a cromatografia líquida tem um papel importante na separação e quantificação de inúmeros compostos. O HPLC utiliza pressões elevadas para forçar a passagem do solvente através de colunas compactas, constituídas por partículas muito finas, com o intuito de proporcionar separações muito eficientes [74].

Uma coluna de HPLC apresenta tamanho reduzido, devido ao empacotamento, constituído por partículas muito pequenas, o que aumenta a área de interacção entre a fase estacionária e a amostra, permitindo separações mais eficientes. Existem numerosas fases estacionárias nas quais se baseiam vários tipos de cromatografia, dependendo do analito em questão: adsorção, permuta iónica, exclusão molecular e partição. Dentro desta última podem considerar-se dois casos: HPLC de fase normal e HPLC de fase reversa, dependendo da sua polaridade. Na coluna de fase reversa, a fase estacionária é apolar, sendo mais utilizada, pois apresenta afinidade para uma maior gama de analitos de polaridade variável.

O detector UV/Vis é o detector mais comum em HPLC. Isto deve-se ao facto deste detector se apresentar como um dos mais baratos e disponíveis e também, pelo facto de quase todos os compostos orgânicos são cromóforos [75]. A utilização detector UV/Vis apresenta algumas desvantagens na análise de tensioactivos não iónicos pela elevada absorção destes compostos na gama do UV, o que torna impossível a detecção de analitos em concentrações vestigiais [76]. Uma alternativa possível é a utilização do detector de fluorescência, mas este detector está limitado a analitos com fluoróforos, tal como os PAHs.

Por outro lado, existe alguma dificuldade em associar a utilização de tensioactivos à cromatografia de gás ou à electroforese capilar com alguns tipos de tensioactivos, dada a necessidade de remoção do tensioactivo da amostra previamente à injeção da mesma. Na cromatografia de gás, a injeção directa da amostra, contendo o tensioactivo, pode deteriorar a coluna e provocar o entupimento da mesma. Na electroforese capilar a injeção directa do material extraído pode provocar a adsorção do tensioactivo às paredes do capilar, o que se traduz numa perda de reprodutibilidade e eficiência [36, 71, 77].

1.5. Enquadramento do Trabalho Experimental

O aumento da quantidade de pesticidas utilizados fez crescer a preocupação acerca dos efeitos nocivos que estes poderiam causar no meio ambiente e, em particular, no Homem. O crescimento dos estudos nesta área provocou o desenvolvimento e aperfeiçoamento das técnicas analíticas, sendo uma preocupação a diminuição ou eliminação do uso de solventes orgânicos na preparação da amostra.

A utilização de tensioactivos, associada a técnicas de extracção é ainda pouco estudada. Deste modo no presente trabalho investigou-se a utilização de tensioactivos na extracção de um pesticida organoclorado de solos, o aldrin, associada aos ultra-sons. Os solos estudados sofreram diferentes processos de fertilização, o que levou a investigar se estas teriam influência no processo de extracção. A utilização de outros métodos de extracção aplicando tensioactivos foi também alvo de estudo.

PARTE EXPERIMENTAL

A parte experimental deste trabalho consistiu na optimização da extracção, assistida por ultra-sons, do aldrin adsorvido a um solo, aplicando diferentes extractantes, para seguidamente se estudar a influência das diferentes fertilizações orgânicas, a que o solo foi sujeito, na extracção do referido pesticida. Numa abordagem posterior, foram estudadas outras técnicas de extracção, com recurso aos tensioactivos.

2.1. Reagentes

O pesticida utilizado, aldrin, de grau analítico, foi fornecido pela Pestanal (Sigma-Aldrich).

Os tensioactivos utilizados foram: o éter lauril poli(óxido de etileno) (POLE) fornecido pela Sigma (St. Louis, MO, USA) e o éter estiril poli(óxido de etileno) (Brij76) fornecido pela Fluka (Buch, Suíça).

No enriquecimento dos solos utilizou-se éter etílico, de grau analítico, fornecido pela LabScan.

O sulfato de sódio anidro (Na_2SO_4) foi obtido da Merck (Darmstad, Alemanha), o cloreto de magnésio hexahidratado ($\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$), da Riefel-de Haën e o sulfato de cobre pentahidratado ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) da Panreac (Barcelona, Espanha).

Para a extracção com solventes orgânicos foram utilizados o acetato de etilo de qualidade gradiente para HPLC, da LabScan, o éter de petróleo 40-60°C PA-ISO, da Panreac, a acetona e o acetonitrilo (ACN) de gradiente para HPLC, da Chromanorm.

Para a análise por cromatografia líquida foram empregues como eluentes o acetonitrilo de qualidade gradiente para HPLC, da Chromanorm e água ultra-pura.

2.2. Material

As amostras de solo foram cedidas pelo “Institute of Plant Nutrition” da universidade de Bona (Alemanha), e resultaram de talhões de um terreno sujeitos a fertilizações controladas desde 1959.

O campo experimental situa-se em Meckenheim, a cerca de 15Km a sudoeste de Bona, entre Meckenheim e Rheinbach, a 170m acima do nível do mar. O solo é constituído por 6,9% de areia, 77,1% de silte e 16,0% de argila. A fracção mineral argilosa consiste em 5% de esmectite, 16% de vermiculite, 69% de ilite e 10% de caulinite.

O objectivo do estudo destes solos foi testar a utilização de diferentes tipos de fertilização orgânica na agricultura. Os campos foram sujeitos a uma sequência de cultivo típica para a região em causa. Os ensaios com estes solos iniciaram-se em 1959. As quantidades de fertilizante aplicadas não foram sempre as mesmas, mas mantêm-se desde 1999, com aplicações de 3 em 3 anos.

O terreno de cultivo, com 980m^2 , foi dividido em 40 talhões numerados, seguido da distribuição aleatória de cada fertilização pelos mesmos. O campo foi tratado com diferentes fertilizantes orgânicos, vulgarmente utilizados na agricultura, sendo eles: o composto (COM), referente a produtos de compostagem de lixos domésticos, as lamas do tratamento biológico de efluentes domésticos (SLU) e estrumes animais (FYM). Incluiu-se também um controlo, correspondente aos talhões sem adição de fertilizantes orgânicos, apenas com fertilização mineral (MIN). Cada uma das fertilizações orgânicas foi aplicada

em três doses diferentes, 4 réplicas de cada, e a fertilização mineral numa única dose, igualmente com 4 réplicas, resultando num total de 40 parcelas, de 24,5m² cada.

Dos 40 talhões, apenas 21 foram seleccionados: o controlo e os que possuíam a menor e a maior dosagem de cada um dos fertilizantes orgânicos, resultando em 7 tratamentos. Das 4 réplicas apenas foram amostradas 3, originando um total de 7×3 amostras de solo.

As amostras foram recolhidas da superfície do solo (0-30cm). Foram secas ao ar e peneiradas por crivos de 2mm. Cada amostra continha aproximadamente 1000g de solo.

Neste trabalho foram apenas estudado os solos 6 (SLU III), 19 (COM III), 27 (FYM III) e 37 (MIN). Estes solos são referentes às fertilizações mais elevadas (solos 6, 19, 27) e ao controlo (solo 37).

D. Lima [78] determinou a matéria orgânica presente no solo, referente às diferentes fertilizações utilizadas, para os talhões em estudo, as quais se encontram na Tabela 2.

Tabela 2 – Percentagem de matéria orgânica presente nos solos com diferentes fertilizações

Solo	Fertilização	Matéria Orgânica (%)
6	SLU	6,09
19	COM	9,40
27	FYM	5,89
37	MIN	5,34

2.3. Enriquecimento dos Solos com Aldrin

Com o intuito de enriquecer os solos com pesticida, foi pesada uma determinada massa de solo (~2g), à qual se adicionaram 2mL de solução de pesticida em éter etílico, dentro de um tubo de centrifuga. Os tubos foram agitados, para promover o contacto do solo com o pesticida e posteriormente deixados ao ar, a fim de evaporar o solvente.

2.4. Método de Análise (HPLC)

O pesticida foi analisado por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC). O cromatógrafo utilizado, da Merck-Hitachi, é composto por: uma bomba inteligente L-6200, um detector L-4250 UV/Vis e um integrador D-2500 Chromato-Integrator. A coluna utilizada foi LiChroCART[®] 250-4 LiChrospher[®] 100 RP-18 (5 µm). O comprimento de onda utilizado foi 214nm.

O volume injectado foi sempre de 20µL. Para a determinação do aldrin foi utilizada como fase móvel uma mistura de acetonitrilo:água na proporção 85:15, com um fluxo de 0,5ml/min. Estas condições operacionais resultaram de uma série de experiências com o intuito de obter o pico do aldrin bem separado dos constituintes da matriz, da solução injectada.



Figura 7 – Aparelho de HPLC utilizado.

2.5. Preparação da Solução Stock e dos Padrões

A solução stock de aldrin foi preparada em acetonitrilo, e armazenada no frio, a 4°C. Os padrões utilizados nas curvas de calibração foram preparados, a partir da solução anterior, numa mistura de tensioactivos, POLE:Brij76, na proporção de 7:3, com a concentração de 5%, ou num solvente orgânico, e posteriormente injectados no HPLC.

2.6. Métodos de Extracção de Aldrin Adsorvido a Solos

2.6.1. Extracção Assistida por Ultra-Sons

Ao solo, previamente enriquecido com pesticida, adicionou-se um determinado volume de solução extractora. A extracção foi levada a cabo em tubos de polipropileno, introduzidos num banho de ultra-sons, JP-Selecta (Barcelona, Espanha), com potência fixa de 50W, durante um determinado tempo. Seguidamente as amostras foram centrifugadas a 5600rpm durante 10 minutos (20 minutos para os tensioactivos). Decantou-se a solução para um novo tubo, filtrou-se por filtros 0,22µm e injectou-se no cromatógrafo.



Figura 8 – Banho de ultra-sons utilizado para a extracção.

2.6.2. Extracção com Agitação

Ao solo, previamente enriquecido com pesticida, adicionou-se um determinado volume de solução extractora. A extracção foi levada a cabo em tubos de polipropileno, colocados num agitador *end-over-end*, da Heiolph, durante um determinado tempo a 106 rpm. Terminado o tempo, as amostras foram centrifugadas a 5600 rpm, durante 10 minutos (20 minutos para tensioactivos). Decantou-se a solução extractora para um novo tubo e filtrou-se por filtros 0,22 μm . Injectou-se no HPLC.



Figura 9 – Agitador end-over-end

2.6.3. Extracção por Ponto de Turvação

2.6.3.1. Estudos Relacionados com a Formação do Ponto de Turvação

- Determinação da Temperatura de Ponto de Turvação do Tensioactivo

Num tubo de ensaio foram introduzidos 3mL de solução de tensioactivos. O tubo foi colocado em banho-maria com controlo de temperatura. A temperatura de ponto de turvação verifica-se quando aparece turbidez persistente, ou seja, que não desaparece quando se abana o tubo.

- Diagrama de fase do tensioactivo

O diagrama de fases do tensioactivo construiu-se com base na medição de temperaturas de ponto de turvação com diferentes concentrações de tensioactivo. Os resultados apresentados referem-se à média de três medições.

- Determinação da Razão dos Volumes das Fases

Pretendeu-se determinar a relação dos volumes das duas fases colocando 3mL de solução de tensioactivos num tubo de ensaio e após ter atingido o ponto de turvação esperou-se para garantir a total separação das fases. Depois da separação tentou medir-se o volume de cada uma das fases, contudo, dado o reduzido volume da fase rica em tensioactivo e facto de solidificar logo que se tentava separar, não foi possível medi-lo com o rigor necessário para uma análise quantitativa.

2.6.3.2. Efeito dos Sais na Temperatura por Ponto de Turvação

A adição de um sal inerte pode facilitar o processo de separação de fases, uma vez que aumenta a densidade da fase aquosa. Com aumento da concentração do sal, o tamanho das micelas e o número de agregação (número médio de moléculas anfifílicas por micela) aumentam, e a concentração micelar permanece constante. Consequentemente, diminui a solubilidade dos analitos apolares na fase aquosa, levando à obtenção de recuperações mais elevadas [73, 79].

Foram estudados três sais, o Na_2SO_4 , o $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ e o $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$. As soluções de sal foram preparadas a diferentes concentrações, numa solução de tensioactivo, a 1%. Posteriormente procedeu-se à determinação da temperatura de ponto de turvação da solução.

2.7 Tratamento Estatístico dos Resultados

O tratamento estatístico dos resultados foi realizado com recurso às ferramentas do Microsoft Excel 2003.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Caracterização do Aldrin

O aldrin, o pesticida em estudo neste trabalho, apresenta como característica relevante, o facto de ser praticamente insolúvel em água (0,027mg/L). Assim, para fase móvel 85:15 de acetonitrilo e água, respectivamente, o tempo de retenção do aldrin é próximo de 21 minutos, nas condições cromatográficas utilizadas, como é possível observar na Figura 10.

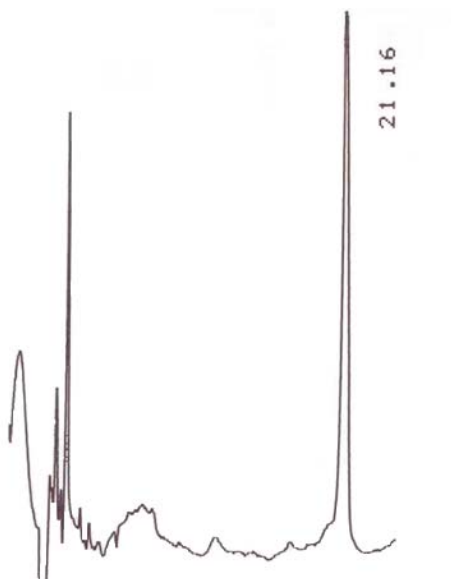


Figura 10 – Cromatograma típico do aldrin, em solução aquosa de tensoactivos.

Para a determinação quantitativa do aldrin foram efectuadas duas curvas de calibração, uma para os estudos do pesticida realizados com tensoactivos, outra para as experiências feitas com solventes orgânicos. Para a primeira as concentrações variaram entre 1,00 e 15,54mg/L, e para a segunda entre 1,55 e 6,21mg/L. Cada ponto das curvas de calibração corresponde à média de três medições.

A Tabela 3 apresenta as equações das curvas de calibração e os respectivos coeficientes de correlação (R^2), limites de detecção (LD) e limites de quantificação (LQ). Numa operação analítica o LD é a menor quantidade de analito que pode ser detectada e o LQ a menor quantidade que pode ser determinada.

Tabela 3 – Parâmetros referentes às duas curvas de calibração.

Padrões em:	Curva de calibração	R^2	LD (mg/L)	LQ (mg/L)
Tensoactivo	$y = 7307,3x - 980,86$	0,9977	0,799	2,662
Solvente orgânico	$y = 8090,9x - 678,75$	0,9991	0,185	0,616

Como se pode verificar na tabela, os valores dos limites de detecção e quantificação referentes à curva com os padrões em acetato de etilo (solvente orgânico utilizado) apresentam valores mais baixos e um coeficiente de correlação mais elevado.

3.2. Extracção Assistida por Ultra-Sons – Optimização de Processos

Numa primeira etapa fez-se um estudo de alguns factores que poderiam influenciar a extracção do aldrin de solos, de modo a seleccionar as melhores condições de extracção do pesticida. Foram estudadas diferentes composições de tensoactivos, bem como o tempo de exposição aos ultra-sons. Factores como temperatura e potência não foram estudados uma vez que o equipamento utilizado era de potência fixa e não era termostatizado.

3.2.1. Seleção do Tensoactivo

Foram realizados ensaios com as seguintes misturas de tensoactivos: POLE:Brij76 1:1 e POLE:Brij76 7:3 e ainda o tensoactivo POLE. A mistura POLE:Brij76 7:3 foi utilizada por Santana Rodríguez e seus colaboradores [53], na extracção de pesticidas, entre os quais o aldrin, de solos, recorrendo à extracção por microondas (*micellar-assisted microwave extraction* - MAME). Também V. Pino *et al.* [59] utilizaram o tensoactivo POLE, na extracção de PAH's de sedimentos marinhos, utilizando os ultra-sons como técnica de extracção.

Todas as soluções de tensoactivos foram preparadas com a concentração final de 5% (m/v). A 2g de solo, previamente enriquecido com aldrin, foram adicionados 8 mL de solução extractante e levado aos ultra-sons durante 15 minutos.

As percentagens de recuperação obtidas para o aldrin, após a extracção com os diferentes tensoactivos, apresentam-se na Tabela 4, com respectivo desvio-padrão relativo e intervalo de confiança.

Tabela 4 – Resultados obtidos para a extracção assistida por ultra-sons (t=15min), com diferentes tensioactivos e concentração de 5% (Vtensioactivo=8mL, m(solo)=2g). DPR – desvio padrão relativo; I.C. – intervalo de confiança; n – número de extracções

Tensioactivo	POLE	POLE:Brij76 7:3	POLE:Brij76 1:1
%Recuperação	40,35	58,80	31,25
DPR (%)	8,633	4,737	5,062
I.C.	8,648	4,429	7,484
n	3	4	4

Pode observar-se que as percentagens de recuperação obtidas para os diferentes tensioactivos variam entre 31,25 e 58,80%, sendo os intervalos de confiança inferiores a 10%. Comparando as percentagens de recuperação obtidas com as misturas POLE: Brij76 verifica-se que o incremento da quantidade de Brij76 na mistura produz um decréscimo da taxa de recuperação do aldrin adsorvido ao solo em estudo. Mas, por outro lado, a ausência de Brij76 também faz diminuir a percentagem de recuperação obtida. Contudo, não foi possível chegar a uma justificação plausível para este facto, pois na literatura disponível não foi encontrada informação útil para fundamentar os resultados obtidos.

Na extracção de pesticidas organoclorados de solos, com tensioactivos, Santana Rodríguez e seus colaboradores obtiveram, com a mistura de tensioactivos POLE:Brij76 7:3, uma taxa de recuperação de aldrin a variar entre 57,5 e 80% para diferentes solos. V. Pino na aplicação de meios micelares (POLE) associados aos ultra-sons, para a extracção de PAHs de sedimentos marinhos, obteve recuperações superiores a 90%.

O tamanho das partículas influencia fortemente a adsorção dos analitos à amostra [73, 80]. Deste modo não é possível comparar, na totalidade, os resultados obtidos com os da literatura, uma vez que os solos apresentam diferentes constituições, tanto a nível da granulometria, como ao nível da composição. Mas, o facto de o solo ser essencialmente constituído por argilas e silte (partículas <50µm) pode justificar as baixas taxas de recuperação obtidas, para o pesticida em estudo, com os tensioactivos, uma vez que a

percentagem de partículas de grão fino é considerável, aumentando a área superficial disponível para adsorção.

Na Figura 11 estão representadas, graficamente, as taxas de recuperação e respectivos intervalos de confiança, para um nível de confiança de 95%, obtidas utilizando como extractante os tensoactivos estudados.

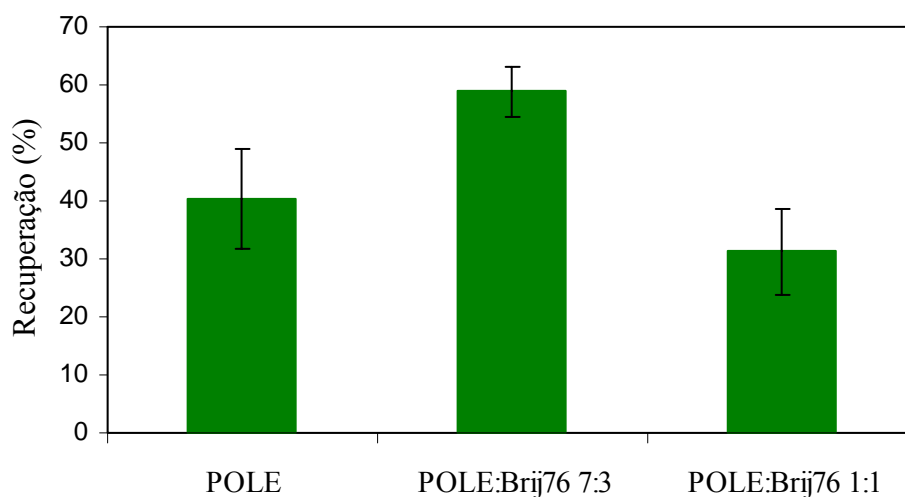


Figura 11 – Gráfico referente às extracções de aldrin utilizando diferentes tensoactivos/mistura de tensoactivos e respectivo intervalo de confiança.

Pela observação do gráfico verifica-se que a mistura de tensoactivos com a proporção 7:3 apresenta o valor mais elevado de percentagem de recuperação e um reduzido intervalo de confiança.

3.2.1.1. Tratamento Estatístico dos Resultados

Uma vez que as incertezas associadas aos resultados (intervalos de confiança) têm valores de grandeza considerável e de modo a justificar a escolha do tensoactivo POLE:Brij76 7:3 para a extracção do aldrin recorreu-se a um teste de significância, a ANOVA.

A ANOVA (análise da variância) é uma ferramenta estatística utilizada para separar e estimar diferentes causas de variação, tais como as que são causadas pela mudança de um factor controlado ou a variação devido a erros aleatórios. Permite também testar, se a

alteração de factores controlados produz diferenças significativas entre os valores médios obtidos.

Num teste de significância, como é o caso da ANOVA, testa-se a veracidade de uma hipótese denominada hipótese do nulo (H_0). A utilização do termo “nulo” implica que não há diferenças entre os valores observados e os conhecidos. Assumindo que a hipótese do nulo é verdadeira, a estatística pode ser utilizada para mostrar que a probabilidade das diferenças observadas entre a média de uma amostra \bar{x} e do valor verdadeiro μ resulta unicamente de erros aleatórios. Em termos práticos a ANOVA divide a variabilidade em variabilidade entre grupos e variabilidade dentro de grupos e compara-as por meio de um teste F [81].

Assim, neste caso, se H_0 é verdadeira: “As recuperações não são significativamente diferentes”. Na Tabela 5 está representada a ANOVA, na qual são comparadas as percentagens de recuperação do aldrin, adsorvido no solo, pelas diferentes soluções de tensioactivos, quando sujeitas à exposição de ultra-sons.

Tabela 5 – Tabela ANOVA referente à comparação das variâncias da extracção por ultra-sons, das diferentes soluções tensioactivos. (SQ – soma dos quadrados; gl – graus de liberdade; MQ – Média dos quadrados; valor P – probabilidade ($p < 0.05$))

ANOVA						
Fonte de variação	SQ	gl	MQ	F	valor P	F crítico
Entre grupos	1566,097	2	783,049			
Dentro de grupos	114,023	8	14,253	54,939	2,12E-05	4,459
Total	1680,120	10				

Na Tabela 5 verifica-se que o F crítico é menor que o F calculado, o que significa que as recuperações obtidas para as diferentes soluções de tensioactivos estudados diferem significativamente e, deste modo, rejeita-se a hipótese do nulo. Uma maneira simples para identificar estas diferenças é através do teste das mínimas diferenças significativas [81].

Neste teste colocam-se os valores das médias por ordem crescente e comparam-se as diferenças entre uma média e a que lhe está adjacente, com um valor denominado Mínima Diferença Significativa (M.D.S.). Este valor é dado por:

$$M.D.S. = s \sqrt{\frac{2}{n}} \times t_{h(n-1)},$$

onde o s é a estimativa do desvio padrão “dentro de grupos”, o n é o número de réplicas e $h(n-1)$ corresponde aos graus de liberdade da estimativa. A estimativa do desvio padrão é dada por:

$$s = \sqrt{\sigma^2} = \sqrt{\sum_i \sum_j \frac{(x_{ij} - \bar{x}_i)^2}{h(n-1)}}$$

Colocando as taxas de recuperação obtidas por ordem crescente temos:

POLE:Brij76 1:1	POLE	POLE:Brij76 7:3
31,25%	40,35%	58,80%

Para $s=4,95$, $t=3,306$, a $M.D.S$ é 8,06 logo,

$$\text{POLE:Brij76 1:1} < \text{POLE} < \text{POLE:Brij76 7:3}$$

ou seja, os resultados diferem todos entre eles sendo que o POLE:Brij76 1:1 é o tensioactivo com o qual se obtém a menor taxa de recuperação do aldrin e o POLE:Brij76 7:3 a maior. Assim, pode comprovar-se que o tensioactivo mais eficiente na extracção do aldrin é a mistura POLE:Brij76 na proporção de 7:3, utilizada nos ensaios posteriores.

3.2.2. Estudo da Influência do Tempo de Extração na Recuperação

Analisando a Tabela 1, referente à extração de poluentes orgânicos de matrizes sólidas, verifica-se que alguns autores na extração de pesticidas, por ultra-sons, utilizaram tempos que variam entre 15 e 35 minutos. Assim, para estudar a influência do tempo de extração na recuperação do aldrin foram seleccionados os tempos 15 e 30 minutos. Foram comparadas as taxas de recuperação obtidas ao fim dos tempos referidos, utilizando a solução de tensoactivos POLE:Brij76 com a concentração de 5% na proporção 7:3. Na Tabela 6 estão representadas as recuperações, em percentagem, obtidas para cada um dos tempos, bem como, o respectivo desvio padrão relativo e o intervalo de confiança, com nível de confiança de 95%.

Tabela 6 – Resultados obtidos para a extração assistida por ultra-sons com diferentes tempos, com a mistura POLE:Brij76, na proporção de 7:3, com concentração de 5% (Vtensoactivo=8mL, m(solo)=2g). DPR – desvio padrão relativo; I.C. – intervalo de confiança; n – número de extracções

Tempo	15minutos	30minutos
%Recuperação	58,80	52,70
DPR (%)	4,737	9,608
I.C.	4,429	8,051
N	4	4

A taxa de recuperação ao fim de 15 minutos parece ser superior à recuperação obtida ao fim de 30 minutos. No entanto, verifica-se que a variabilidade existente entre os resultados obtidos para o tempo mais longo é maior, o que pode levar a concluir que não existem diferenças significativas entre os dois resultados.

3.2.2.1. Tratamento Estatístico dos Resultados

A fim de verificar a existência de diferenças significativas entre os dois tempos estudados, aplicou-se um teste t para a comparação das duas percentagens de recuperação obtidas. Para identificar o teste t a aplicar, é necessário verificar se as variâncias são significativamente diferentes. Para isso faz-se um teste F , que consiste na comparação das variâncias das duas recuperações obtidas para os tempos de 15 e 30 minutos.

$$F = \frac{s_1^2}{s_2^2}, \quad s_1^2 > s_2^2$$

Testa-se a veracidade da hipótese do nulo: “As variâncias são iguais”. O valor de F calculado é de 3,30 e o valor de F crítico é 15,44 logo, o F crítico é maior que o F calculado. Deste modo não se rejeita a hipótese do nulo, o que significa que as variâncias são iguais. Assim sendo a comparação das médias é feita por meio de um teste t para amostras com variâncias iguais:

$$t = \frac{(\bar{x}_1 - \bar{x}_2)}{s} \sqrt{\frac{1}{n_1} + \frac{1}{n_2}}, \text{ em que } s = \frac{(n_1 - 1)s_1^2 + (n_2 - 1)s_2^2}{n_1 + n_2 - 2}$$

onde n corresponde ao número de determinações, \bar{x} à média e s^2 à variância das médias em estudo.

Mais uma vez é necessário estabelecer a H_0 : “As taxas de recuperação não são significativamente diferentes”. Na tabela seguinte estão representados os resultados referentes ao teste t , para comparação das percentagens de recuperação para os tempos em estudo.

Tabela 7 – Teste *t* referente à comparação das médias dos dois tempos em estudo.

	15minutos	30minutos
Média	58,80	52,70
Variância	7,76	25,64
nº de extracções	4	4
Variância agrupada	16,70	
<i>gl</i>	6	
<i>t</i> calculado	2,110	
<i>t</i> crítico	2,446	

Pelos resultados apresentados na tabela verifica-se que o *t* crítico é maior que o *t* tabelado, logo não se rejeita a hipótese do nulo. Daqui, pode concluir-se que os resultados obtidos na extracção do aldrin ao fim de 15 e 30 minutos não diferem entre si significativamente. Deste modo, uma vez que ao fim de 15 minutos a quantidade de aldrin extraída é a mesma do que utilizando 30 minutos na extracção, foi seleccionado o tempo mais baixo com o intuito de rentabilizar o trabalho.

3.2.3. Estudo da Concentração do Tensioactivo na Extracção do Aldrin Adsorvido

A concentração de tensioactivo deverá sempre ser superior à sua concentração micelar crítica (CMC), de maneira a garantir a formação de micelas. Uma vez que a CMC dos tensioactivos não iónicos é bastante baixa (10^{-5} - 10^{-4} M) [82], a formação de micelas foi garantida para todas as concentrações testadas.

No seu trabalho Santana Rodríguez [53] optimizou as condições experimentais para a extracção de pesticidas organoclorados de solos, com recurso às microondas, utilizando como solução extractora a mistura de tensioactivos POLE:Brij76, na proporção 7:3. Constataram que a concentração de tensioactivo é o factor que mais afecta as recuperações, quando se opera com as microondas, para além de estar correlacionado com a potência.

Como concentração óptima de tensioactivo obtiveram 5%. Daí que, nos ensaios anteriores tenha sido utilizada esta concentração nas soluções de tensioactivos preparadas. No entanto também se pretende testar o efeito da variação da concentração da solução de tensioactivos na desorção do pesticida em estudo. Para escolher a concentração mais adequada a utilizar neste trabalho experimental, optou-se por estudar uma concentração inferior e uma concentração superior aos 5%. As concentrações escolhidas foram 2 e 10%. Na Tabela 8 apresentam-se as taxas de recuperação obtidas para o aldrin com a mistura POLE:Brij76, na proporção de 7:3, a diferentes concentrações, e os respectivos desvios padrão relativo e intervalos de confiança, com nível de confiança de 95%.

Tabela 8 – Resultados obtidos para a extracção por ultra-sons (t=15min), com a mistura POLE:Brij76, na proporção de 7:3, com diferentes concentrações (Vtensioactivo=8mL, m(solo)=2g). DPR – desvio padrão relativo; I.C. – intervalo de confiança; n – número de extracções

[tensioactivo] (%)	2	5	10
%Recuperação	41,89	58,80	50,72
DPR (%)	10,25	4,737	19,07
I.C.	6,828	4,429	15,37
n	4	4	4

A Figura 12 mostra a representação gráfica das percentagens de recuperação da Tabela 8 e respectivo intervalo de confiança das determinações analíticas.

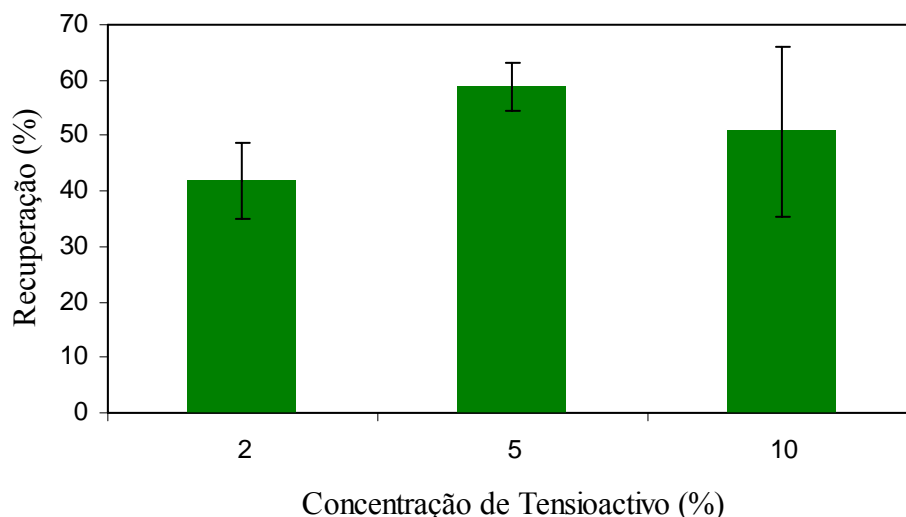


Figura 12 – Gráfico referente às extracções de aldrin de um solo utilizando diferentes concentrações de tensoactivo e respectivo intervalo de confiança das determinações analíticas.

Analisando a Tabela 8 e a Figura 12 verifica-se que a concentração de 5% é aquela com a qual a taxa de recuperação parece ser mais elevada. No entanto, uma vez que os intervalos de confiança se sobrepõem não se pode concluir definitivamente no que respeita à concentração mais adequada para realizar estas extracções.

3.2.3.1. Tratamento Estatístico dos Resultados

Com o objectivo de verificar se as recuperações obtidas são ou não significativamente diferentes utilizaram-se testes t (Tabela 9). A hipótese do nulo é definida como: “As recuperações não são significativamente diferentes”.

Tabela 9 – Testes t referentes às comparações das médias das percentagens de recuperação do aldrin, obtidas com as diferentes concentrações da mistura de tensioactivos estudada.

	2%	5%	10%
Média	41,887	58,803	50,71
Variância	18,441	7,760	93,52
nº de extracções	4	4	4

Comparação das médias:	2 e 5%	5 e 10%	2 e 10%
Variância agrupada	13,101	50,640	55,9811
gl	6	6	6
t calculado	6,609	1,6067	1,66
t crítico	2,4469	2,446	2,442

Comparando o t calculado com o t crítico para cada conjunto de concentrações, verifica-se que apenas as concentrações de 2 e 5% diferem entre si. A variabilidade apresentada pela concentração de 10% pode justificar o facto de esta concentração não apresentar diferenças significativas em relação às outras concentrações em estudo. Pelos resultados apresentados, a concentração de 5% foi a escolhida para os ensaios posteriores.

3.2.4 Extracção Sequencial

Por vezes, com o intuito de obter melhores taxas de recuperação, utiliza-se mais que um passo de extracção, como se pode observar na Tabela 1. O método da EPA 3550C [83] descreve a extracção por ultra-sons para a concentração de compostos orgânicos, de matrizes sólidas. O método apresenta dois procedimentos baseados na concentração esperada para o composto orgânico em estudo. Se a concentração esperada for inferior a 20mg/kg, deve ser empregue uma serie de 3 extracções, numa grande quantidade de amostra; se for superior a 20mg/kg, a quantidade de amostra é menor e o composto

orgânico é extraído numa única vez. Neste estudo, o enriquecimento foi de 20mg de pesticida por kg de solo. Por conseguinte, optou-se por verificar se a utilização de mais que um passo de extracção traria melhorias significativas nos resultados obtidos para o aldrin. Na Figura 13, estão representados os resultados obtidos para os dois passos, efectuados em 4 amostras, sendo o resultado apresentado, a média de 3 extracções com POLE:Brij76 7:3, a 5%.

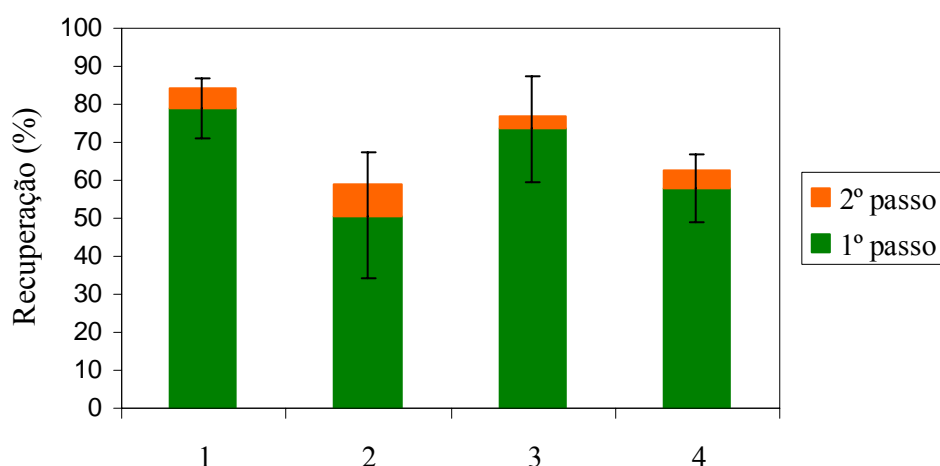


Figura 13 – Gráfico referente à extracção do aldrin por ultra-sons (t=15min), com a mistura POLE:Brij76 7:3, a 5%. (Vtensioactivo=8mL, m(solo)=2g, passos de extracção=2).

Pela análise do gráfico verifica-se que a quantidade de pesticida extraída no segundo passo é relativamente baixa. Por outro lado os intervalos de confiança do primeiro passo de extracção abrangem as recuperações referentes ao segundo passo de extracção daí que, se optou por realizar apenas um passo de extracção.

3.3. Extracção por Ultra-Sons com Solventes Orgânicos

A utilização de solventes orgânicos na extracção de pesticidas, por ultra-sons, já foi alvo de estudo como se pode observar na Tabela 1. Dos estudos apresentados na referida tabela, apenas em dois foi investigada a extracção do aldrin. Ali Tor *et al.* [58] estudaram a

extração de aldrin, entre outros pesticidas organoclorados, de solos, utilizando solventes e ultra-sons no processo. Estudaram vários solventes e obtiveram melhores resultados com a mistura éter de petróleo:acetona 1:1. M.C. Vagi *et al.* [63] também extraíram pesticidas organoclorados de sedimentos marinhos utilizando a extração assistida por ultra-sons. De entre os solventes estudados, obtiveram melhores percentagens de recuperação com o diclorometano. Em ambos os casos, utilizaram também a acetona e o acetato de etilo.

Partindo destes dados, foram escolhidos 4 solventes: a acetona, o acetato de etilo, o acetonitrilo e a mistura acetona:éter de petróleo, na proporção de 1:1. Na Tabela 10 estão apresentados os resultados obtidos após a extração do aldrin com solventes.

Tabela 10 – Resultados obtidos para a extração por ultra-sons ($t=15\text{min}$), com diferentes solventes ($V_{\text{solvente}}=8\text{mL}$, $m(\text{solo})=2\text{g}$). DPR – desvio padrão relativo; I.C. – intervalo de confiança; n – número de extrações.

Solventes	Acetona	Acetato de etilo	Acetonitrilo	Acetona/éter de petróleo (1:1)
%Recuperação	66,23	80,10	71,42	100,82
DPR (%)	10,13	6,23	8,95	5,43
I.C.	16,66	7,94	10,16	13,59
n	3	4	4	3

As recuperações obtidas com os solventes utilizados variam entre 66,23 e 100,82%, com um intervalo de confiança inferior a 17%. A representação gráfica das taxas de recuperação, e respectivos intervalos de confiança com nível de confiança 95%, presentes na Tabela 10 encontra-se na Figura 14.

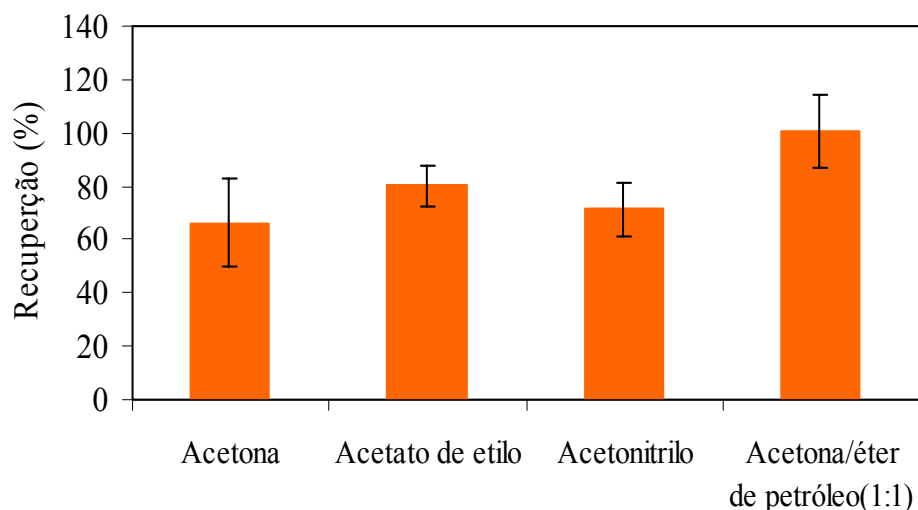


Figura 14 – Gráfico referente às recuperações de aldrin obtidas, após extração por ultra-sons, com recurso a solventes orgânicos e respectivo intervalo de confiança.

Dos resultados obtidos na Tabela 10 e na Figura 14, retira-se que a acetona é o solvente menos eficiente na extração de aldrin, recuperando-se apenas cerca 66% de pesticida e o éter de petróleo é o solvente mais eficaz no processo de extração devido à elevada taxa de recuperação obtida para o aldrin, cerca de 100%.

Um dos parâmetros que podem influenciar a eficiência da extração é a natureza do solvente. Na extração por ultra-sons foram utilizados solventes com diferentes polaridades, as quais se encontram na Tabela 11.

Tabela 11 – Índice de Polaridade dos solventes utilizados na extracção do aldrin.

Solvente	Polaridade
Éter de Petróleo	<0,1
Éter de petróleo e acetona (1:1)	0,1<Polaridade <2,75
Acetato etilo	4,4
Acetona	5,4
Acetonitrilo	5,8

Comparando os resultados obtidos com as polaridades dos solventes verifica-se uma relação directa entre a polaridade e as percentagens de recuperação. Contudo as percentagens obtidas com acetona e acetonitrilo não revelaram diferenças significativas, o que não surpreende, dada a proximidade das suas polaridades.

Devido à baixa polaridade do aldrin seria de esperar uma maior afinidade para o solvente mais apolar, o que foi verificado, uma vez que foi com a mistura acetona: éter de petróleo que se obteve a recuperação mais elevada.

3.3.1. Tratamento Estatístico dos Resultados

A fim de averiguar a existência de diferenças significativas nos resultados obtidos para a extracção do aldrin com diferentes solventes, foi feito um teste ANOVA (Tabela 12). Definiu-se a hipótese do nulo, H_0 : “ As recuperações não são significativamente diferentes.”

Tabela 12 – Tabela ANOVA referente às variâncias obtidas, utilizando a extração por Ultra-Sons, com diferentes solventes. (SQ – soma dos quadrados; *gl* – graus de liberdade; MQ – Média dos quadrados; valor P – probabilidade ($p < 0.05$))

ANOVA						
<i>Fonte de variação</i>	<i>SQ</i>	<i>gl</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>valor P</i>	<i>F crítico</i>
Entre grupos	2151,99	3	717,33	20,647	0,000132	3,708
Dentro de grupos	347,419	10	34,7419			
Total	2499,41	13				

Através da comparação dos valores de *F* presentes na tabela, verifica-se que o valor de *F* é superior ao *F* crítico, o que prova a existência de diferenças significativas entre os resultados obtidos para os diferentes solventes. Assim sendo, rejeita-se a H_0 . Para identificar as diferenças, aplica-se o teste da M.D.S. Colocando as taxas de recuperação por ordem crescente obtém-se:

Acetona	Acetonitrilo	Acetato de etilo	Éter de petróleo: Acetona (1:1)
66,23	71,42	80,10	100,82

Para $s = 5,93$, $t_{10} = 2,23$, a M.D.S é 9,99 logo,

Acetona \approx Acetonitrilo \approx Acetato de etilo $<$ Éter de petróleo:acetona(1:1)

Através do teste das mínimas diferenças significativas, a acetona, o acetonitrilo e o acetato de etilo, não apresentam diferenças nos resultados e diferem significativamente da

mistura éter de petróleo:acetona (1:1), que é o solvente que apresenta maior percentagem de recuperação. Deste modo, a mistura éter de petróleo:acetona (1:1) foi o solvente escolhido para ensaios posteriores.

3.3.2. Comparação dos Solventes Orgânicos com os Tensioactivos como Extractantes

Comparando os resultados obtidos com os tensioactivos e com os solventes verifica-se que na extracção utilizando os solventes como extractante é possível obter taxas de recuperação mais elevadas. Isto, pela maior afinidade que o pesticida tem em relação aos solventes, devido à elevada hidrofobicidade do pesticida. No entanto, a utilização de solventes orgânicos provocou alguns problemas, nomeadamente na determinação por HPLC:

- no comprimento de onda utilizado (214nm) a absorção dos solventes orgânicos é muito elevada, face aos tensioactivos.
- os solventes orgânicos extraem muito mais matéria orgânica dos solos em relação aos tensioactivos, o que dificultou por vezes, a separação do pico do aldrin.
- dificuldade em obter uma boa linha de base, muitos picos sobrepostos correspondentes a diferentes compostos extraídos pelos solventes;
- a variabilidade dos resultados é muito maior.

3.4. Extracção com Agitação

A realização desta experiência teve como objectivo a comparação dos ultra-sons com um outro método que permitisse o movimento das partículas, o qual promove a possível interacção entre as mesmas e o extractante. Para tal, utilizando as condições optimizadas nos estudos de extracção realizados com ultra-sons, submeteu-se o solo a um procedimento de extracção com agitação mecânica. O tensioactivo utilizado foi a mistura POLE:Brij76, na proporção de 7:3, com concentração de 5% (m/v).

Na tabela seguinte estão expressos os resultados referentes à extracção do aldrin, com agitação, durante 15 minutos e após 18 horas.

Tabela 13 – Resultados obtidos para a extracção com agitação a diferentes tempos, com a mistura de tensioactivos POLE:Brij76 7:3, com concentração de 5% ($V_{\text{solvente}}=8\text{mL}$, $m(\text{solo})=2\text{g}$). DPR – desvio padrão relativo; I.C. – intervalo de confiança; n – número de extracções

Tempo	15minutos	18horas
%Recuperação	66,83	66,35
DPR (%)	12,51	11,72
I.C.	13,28	12,36
n	4	4

Como é possível observar na Tabela 13, as taxas de recuperação são ambas da ordem dos 66% com intervalos de confiança semelhantes. Daqui retira-se que não seriam necessários mais de 15 minutos para garantir a máxima eficiência no processo de extracção. Através das percentagens de recuperação verifica-se que a extracção com agitação apresenta melhores resultados face aos ultra-sons, apresentando, em contrapartida intervalos de confiança mais elevados.

Ao contrário dos ultra-sons, que provocam um aumento de temperatura após funcionarem muito tempo seguido, na agitação foi possível utilizar tempos de extracção mais elevados pois não havia risco de aquecimento, o qual se podia traduzir em alterações dos resultados.

3.4.1. Comparação da Extracção por Ultra-Sons e com Agitação

A fim de verificar a existência de diferenças significativas, entre a extracção do aldrin com a mistura POLE:Brij76, 7:3, com concentração de 5%, com os ultra-sons e com a agitação fez-se um teste *t*.

Uma vez que as variâncias não diferem significativamente (verificado através de um teste F) foi aplicado um teste t para variâncias iguais, cujo resultado está apresentado na Tabela 14.

Tabela 14 – Comparação das médias das percentagens de recuperação do aldrin obtidas com os ultra-sons e com a agitação.

	Ultra-sons	Agitação
Média	58,803	66,828
Variância	7,760	69,846
nº de determinações	4	4
Variância agrupada		38,803
gl		6
t calculado		1,8219
t crítico		2,44691

Uma vez que o t calculado é menor que o t crítico as recuperações não diferem significativamente, o que significa que não se rejeita a H_0 . Deste modo, pode concluir-se que não existem diferenças significativas entre a extracção do aldrin, com tensioactivos, por ultra-sons e com agitação.

3.5. Influência das fertilizações na extracção do aldrin

Uma vez optimizados os factores que poderiam influenciar a extracção do pesticida do solo, aplicou-se a mistura de tensioactivos POLE:Brij76 7:3 e a mistura de solventes éter de petróleo:acetona 1:1, na extracção do aldrin de solos com diferentes fertilizações: o solo fertilizado com composto (COM), o solo fertilizado com estrumes (FYM), o solo fertilizado com lamas de estações de tratamentos (SLU) e o solo com fertilização mineral (MIN).

3.5.1. Extracção com POLE:Brij76 7:3

A extracção do aldrin com o tensoactivo POLE:Brij76, 7:3, com concentração de 5% (m/v) foi aplicada nos diferentes solos. Os resultados obtidos (Tabela 15) encontram-se entre 53,65 e 60,00%, não tendo sido obtidos intervalos de confiança, com nível de confiança 95%, superiores a 5%. A recuperação mais elevada refere-se ao solo com a fertilização mineral e, a mais baixa, ao solo fertilizado com composto.

Tabela 15 – Resultados obtidos para a extracção do aldrin, com a mistura de tensoactivos, 7:3, com concentração de 5%, das fertilizações mais elevadas dos diferentes solos e do controlo (Vsolvente=8mL, m(solo)=2g). DPR – desvio padrão relativo; I.C. – intervalo de confiança; n – número de extracções

Solos	Solo 27 (FYM III)	Solo 37 (MIN I)	Solo 19 (COM III)	Solo 6 (SLU III)
%Recuperação	60,00	61,98	53,65	55,80
DPR (%)	2,126	4,247	2,865	4,679
I.C.	2,0280	4,186	2,618	4,237
n	4	4	4	4

3.5.1.1. Tratamento Estatístico dos Resultados

Apesar da diferença entre as taxas de recuperação obtidas para os diferentes solos, com a mistura de tensoactivos, ser inferior a 10%, foi feito o teste ANOVA para verificar a existência de diferenças significativas nos resultados, sendo a H_0 : “As recuperações não são significativamente diferentes”. A Tabela 16 seguinte refere-se à análise das variâncias dos resultados obtidos.

Tabela 16 – Tabela ANOVA referente às variâncias dos diferentes solos estudados, utilizando a extracção por Ultra-Sons, com a mistura de tensoactivos. (SQ – soma dos quadrados; *gl* – graus de liberdade; MQ – Média dos quadrados; valor P – probabilidade ($p < 0.05$))

ANOVA						
Fonte de variação	SQ	<i>gl</i>	MQ	<i>F</i>	valor P	<i>F</i> crítico
Entre grupos	61,2919	3	20,4306	3,34	0,0562	3,49
Dentro de grupos	73,5121	12	6,12601			
Total	134,804	15				

Analisando os resultados verifica-se que o valor de *F* obtido é menor que o *F* crítico, ou seja, os resultados não são significativamente diferentes. Deste modo, não se rejeita a hipótese do nulo. Pode admitir-se que as taxas de recuperação do aldrin são sensivelmente as mesmas, ou seja, as diferentes fertilizações aplicadas no solo não têm influência na recuperação do pesticida com os tensoactivos, no processo de extracção com ultra-sons.

3.5.2. Extracção com Solventes Orgânicos

Apesar da mistura éter de petróleo:acetona 1:1 apresentar melhores resultados, ocorreram algumas dificuldades em trabalhar com esta mistura no HPLC, devido à complexa composição deste solvente e à maior quantidade de matéria orgânica que extrai, pelo que se optou por utilizar o acetato de etilo como solvente extractor, dado que este foi o segundo solvente a apresentar melhores recuperações.

Os resultados referentes à extracção do aldrin, por ultra-sons, utilizando como extractante o acetato de etilo apresentam-se na Tabela 17.

Tabela 17 – Resultados obtidos para a extracção do aldrin, com solvente, acetato de etilo, das fertilizações mais elevadas dos diferentes solos e do controlo ([aldrin]=5 mg/L, Vsolvente=8mL). DPR – desvio padrão relativo; I.C. – intervalo de confiança; n – número de extracções

Solos	Solo 27 (FYM III)	Solo 37 (MIN I)	Solo 19 (COM III)	Solo 6 (SLU III)
%Recuperação	79,09	68,43	93,24	82,46
DPR (%)	4,553	8,672	10,32	9,499
I.C.	4,477	7,377	11,95	9,74
n	5	5	5	5

Analisando os resultados da tabela verifica-se que os valores das percentagens de recuperação variam entre 68,43%, referente ao solo mineral e 93,24% no caso do solo fertilizados com composto. Ao contrário dos resultados obtidos na extracção do pesticida com tensioactivos, a recuperação mais elevada foi obtida a partir do solo fertilizado com composto, e a mais baixa do solo com fertilização mineral.

3.5.2.1 Tratamento Estatístico dos Resultados

Para verificar se existem diferenças entre os resultados das extracções com o acetato de etilo obtidos para os solos com diferentes fertilizantes, foi feito o teste ANOVA, apresentado na Tabela 18. Definiu-se como H_0 “As recuperações obtidas não são significativamente diferentes”.

Tabela 18 – Tabela ANOVA referente às variâncias dos diferentes solos estudados, utilizando a extração por Ultra-Sons, com solvente orgânico. (SQ – soma dos quadrados; *gl* – graus de liberdade; MQ – Média dos quadrados; valor P – probabilidade ($p < 0.05$))

ANOVA						
<i>Fonte de variação</i>	<i>SQ</i>	<i>gl</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>valor P</i>	<i>F crítico</i>
Entre grupos	1566,97	3	522,325	10,339	0,000501	3,239
Dentro de grupos	808,327	16	50,5204			
Total	2375,302	19				

Na Tabela 18 pode observar-se que o valor de *F* é superior ao *F* crítico e, deste modo, rejeita-se a hipótese do nulo, ou seja, há diferenças significativas nos resultados obtidos para os diferentes solos. Através do teste das mínimas diferenças significativas é possível distinguir quais os solos que diferem entre si. Colocando as taxas de recuperação obtidas com o acetato de etilo por ordem crescente, obtemos:

Solo 37 (MIN I)	Solo 27 (FYM III)	Solo 6 (SLU III)	Solo 19 (COM III)
68,43	79,09	82,46	93,24

$$M.D.S. = s \sqrt{\frac{2}{n}} \times t_{h(n-1)}, \text{ com } s=7,11 \text{ e } t_{16}=2,1199$$

$$M.D.S = 9,53.$$

Após o cálculo das mínimas diferenças significativas conclui-se que:

$$\text{MIN} < \text{FYM} \approx \text{SLU} < \text{COM}$$

Ou seja, no solo com fertilização mineral a quantidade de pesticida extraída é menor, seguido das fertilizações com estrume e lamas, que não diferem uma da outra significativamente, sendo o solo com a fertilização composta, aquele do qual se extraiu maior quantidade de pesticida.

3.5.3. Comparação dos Extractantes nas Diferentes Fertilizações

Na Figura 15 estão representadas as percentagens de recuperação do aldrin, extraído dos solos com diferentes fertilizações, com acetato de etilo e com a mistura de tensioactivos e respectivo intervalo de confiança, com nível de confiança 95%. Mesmo com erros relativamente elevados, as extracções com acetato de etilo apresentam melhores recuperações, em geral, como é possível visualizar. Apenas no solo mineral é possível verificar uma aproximação dos resultados obtidos com a mistura de tensioactivos e com o solvente.

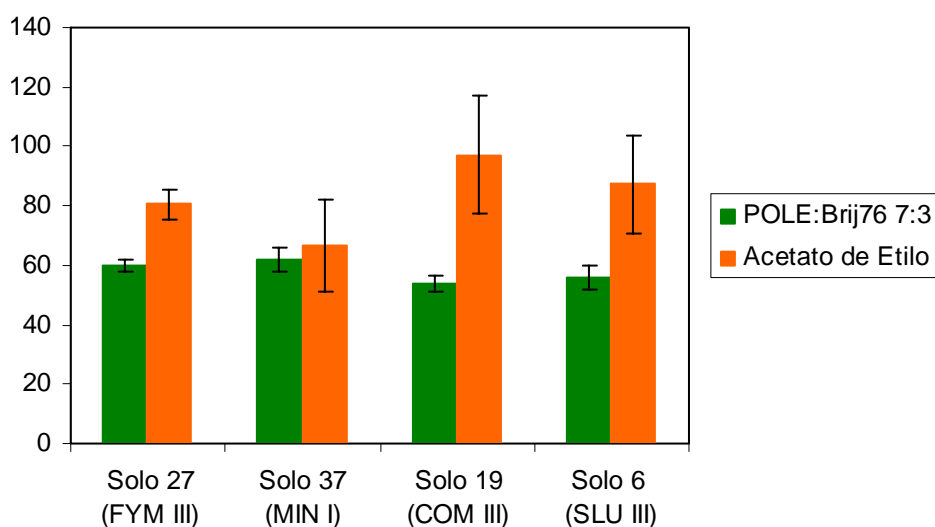


Figura 15 – Gráfico comparativo da extração por U.S. com tensioactivos e com acetato de etilo, e respectivos intervalos de confiança.

A textura do solo é extremamente importante nos processos de sorção. As partículas mais pequenas, apresentam maior área superficial, o que faz aumentar a adsorção de compostos às mesmas, a qual também é influenciada pela natureza do analito [53].

Dos três principais constituintes do solo (areia, silte e argila), a argila é o constituinte com partículas de menores dimensões (maior área superficial) e elevada carga superficial pelo que se espera que apresente um grande poder adsorvente. Assim, em solos com elevadas quantidades de argila as recuperações vão ser menores [53]. Uma possível justificação para os resultados obtidos na extracção do aldrin com a mistura de tensioactivos de diferentes solos, mesmo sendo as diferenças pequenas, poderia envolver a quantidade de matéria orgânica de cada solo. Os solos com elevada quantidade de matéria orgânica têm boas recuperações pois o tensioactivo também consegue extrair substâncias húmicas nas quais se encontra ligado o pesticida [27]. Este pressuposto não coincide com os resultados obtidos para a extracção com tensioactivos, uma vez que as percentagens de recuperação obtidas para os diferentes solos não diferem significativamente, pelo que é possível concluir que, no caso dos solos estudados, o conteúdo de matéria orgânica do solo não influencia as taxas de recuperação, para os tensioactivos. O mesmo não se verifica, na extracção com solventes dado que, em solos com maior percentagem de matéria orgânica a percentagem de recuperação do pesticida foi maior, como se pode observar na Tabela 19.

Tabela 19 – Dados referentes à quantidade de matéria orgânica, em %, presente nos quatro solos com a recuperação do aldrin, em %, para o POLEBrij76 7:3 e para o acetato de etilo.

Solo	Matéria Orgânica (%)	Recuperação do Aldrin (%)	
		Tensioactivo	Solvente Orgânico
Solo 6 (SLU)	6,09	55,80	82,46
Solo 19 (COM)	9,40	53,65	93,24
Solo 27 (FYM)	5,89	60,00	79,09
Solo 37 (MIN)	5,34	61,98	68,43

Com o intuito de perceber qual a influência do conteúdo de matéria orgânica do solo procedeu-se à calcinação, numa mufla a 550°C, durante 6h, com o objectivo de eliminar a matéria orgânica presente. Este estudo apenas foi realizado para o solo com maior percentagem de matéria orgânica, ou seja, para o solo fertilizado com composto. A

Tabela 20 apresenta os resultados da extracção do aldrin por ultra-sons, para o solo 19 calcinado e não calcinado.

Tabela 20 – Resultados obtidos para a extracção do aldrin, com acetato de etilo, e com a mistura de tensioactivos, para o solo com a fertilização COM III (não calcinado e calcinado). DPR – desvio padrão relativo; I.C. – intervalo de confiança; n – número de extracções

	Acetato de etilo		Tensioactivo	
	Solo não calcinado	Solo calcinado	Solo não calcinado	Solo calcinado
Recuperação (%)	93,24	81,36	53,65	48,16
DPR (%)	10,32	5,686	2,865	4,670
I.C.	11,96	7,356	2,618	3,577
n	4	4	4	4

Através da realização de um teste *t*, para variâncias iguais, foi possível verificar a existência de diferenças significativas entre o solo não calcinado e o solo calcinado, tanto para o acetato de etilo como para a mistura dos tensioactivos, como se pode observar na Tabela 21.

Tabela 21 – Valores de testes t referentes às comparações das médias das percentagens de recuperação do aldrin, dos solos calcinados e não calcinados, obtidas para o acetato de etilo e para a mistura de tensioactivos.

	Para o acetato de etilo	Para a mistura de tensioactivos
gl	7	6
t calculado	2,246	6,679
t crítico	2,364	2,447

As percentagens de recuperação obtidas para os solos calcinados são menores do que para os solos não calcinados, o que vem provar que as substâncias húmicas também são extraídas, incrementando a recuperação do aldrin. Por outro lado, pode supor-se que o acetato de etilo extrai mais matéria orgânica que o tensioactivo, dada a maior diferença entre os solos calcinados e não calcinados. Mais ainda, a matéria orgânica provoca uma maior variabilidade dos resultados, no que diz respeito aos solventes orgânicos. O mesmo não é verificado para a mistura dos tensioactivos, que apesar do I.C. ser maior no solo não calcinado, a diferença é mínima.

3.6. Extracção por Ponto de Turvação

3.6.1. Diagrama de Fases

A formação de ponto de turvação em função da concentração do tensioactivo na solução pode realizar-se mediante a construção de um diagrama de fases, o qual remete para a influência que a temperatura pode exercer numa solução micelar. A obtenção do diagrama de fases foi feita com base na variação da concentração da mistura de tensioactivos utilizada, entre 0,05 e 10% (m/v), que foram posteriormente sujeitas a um aumento de temperatura, a fim de se registar a temperatura de ponto de turvação, na qual se formam duas fases distintas.

A figura seguinte corresponde ao diagrama de fases efectuado para a mistura POLE:Brij76, na proporção de 7:3. Cada ponto da curva corresponde a uma média de 3 medições.

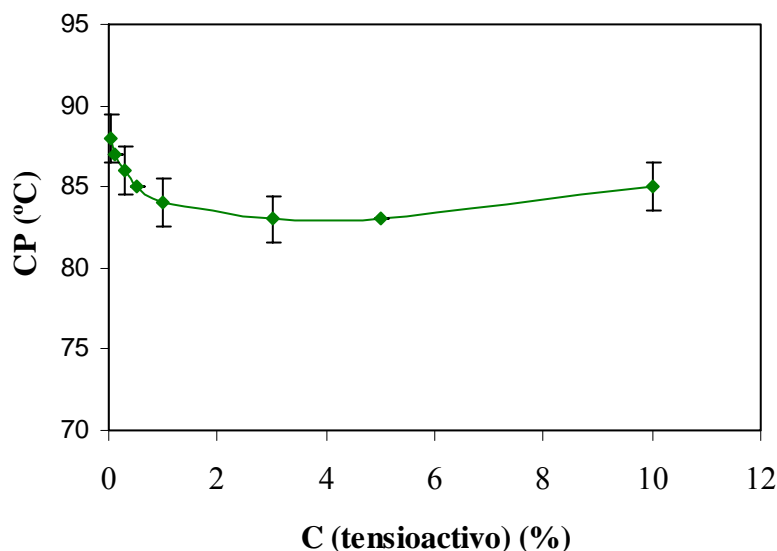


Figura 16 – Diagrama de fases referente à mistura de tensoactivos, POLE:Brij76, 7:3.

Como é possível observar, a curva mostra um aumento da temperatura de turvação para concentrações de tensoactivo, inferiores a 1% (m/v). As concentrações de 3 e 5 % correspondem aquelas que têm menor temperatura de CP, 83°C, sendo esta a temperatura mínima à qual ocorre a formação de fases. Deste modo, e em concordância com o trabalho já realizado, optou-se pela utilização de concentração de 5%. Por outro lado, uma concentração mais elevada permite obter quantidade suficiente de fase rica em tensoactivo, para a posterior quantificação de aldrin por HPLC.

3.6.2. Influência da Força Iónica do Meio no Ponto de Turvação

A concentrações inferiores a 0,01M, a maioria dos electrólitos não apresenta efeitos significativos no processo de extracção por CP. Para concentrações superiores podem produzir-se efeitos de aumento ou diminuição da temperatura crítica [84]. Foram propostos mecanismos para explicar os efeitos dos electrólitos na T_C das soluções de tensoactivo. Alguns electrólitos podem fazer com que diminua a temperatura crítica por um processo de

desidratação ao passo que outros têm o mesmo efeito por favorecerem a associação das moléculas de água [71].

Para determinar o efeito da adição de sais na temperatura de CP da mistura de tensoactivos, com concentração 1%, utilizaram-se três electrólitos: o Na_2SO_4 , o $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ e o $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, a diferentes concentrações. Na presença dos electrólitos a temperatura crítica diminui e verifica-se uma razão quase linear da temperatura com o aumento da concentração dos sais. A Figura 17 mostra o comportamento da adição de concentrações crescentes de diferentes electrólitos no CP. Pode observar-se a seguinte ordem de grau de influência $\text{MgCl}_2 < \text{CuSO}_4 < \text{Na}_2\text{SO}_4$.

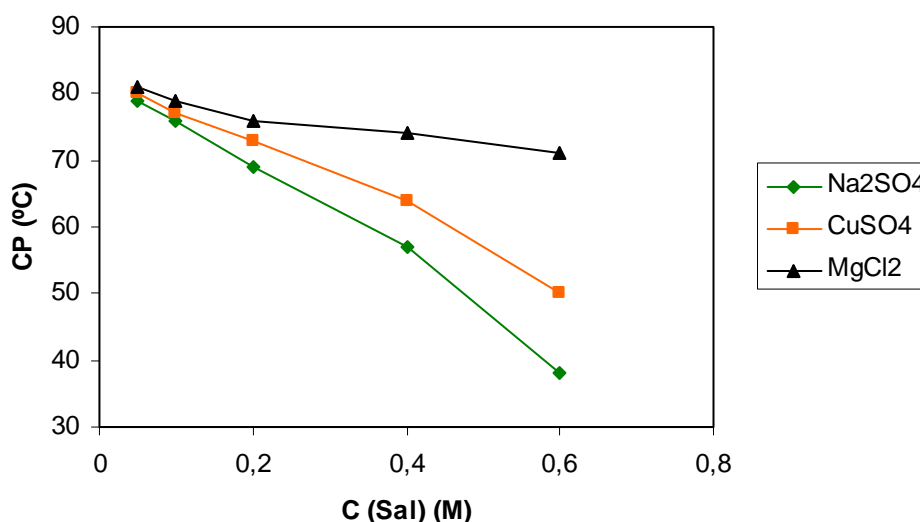


Figura 17 – Influência da variação da concentração de diferentes sais na temperatura de CP, para a concentração 1% de POLE:Brij76 7:3.

Pela visualização do gráfico, verifica-se que o sulfato de sódio é o sal que produz efeitos mais significativos na diminuição da temperatura de CP. Assim, foi nos ensaios seguintes o sal utilizado foi o Na_2SO_4 , com concentração de sal 0,4M. Não foram utilizadas concentrações de sais superiores dada a dificuldade em dissolver as quantidades de sais necessárias.

3.6.3. Optimização do processo de separação de fases na Extracção por Ponto de Turvação

O grau de distribuição do analito entre a fase aquosa e a fase rica em tensioactivo, no processo de extracção por ponto de turvação pode ser descrito por um coeficiente de distribuição K_D :

$$K_D = \frac{C_S}{C_{aq}}$$

onde C_S é a concentração final de soluto na fase rica em tensioactivo e C_{aq} corresponde à sua concentração na fase aquosa.

Quando se utiliza a metodologia de ponto de turvação para extrair de forma quantitativa os analitos presentes na solução inicial, o factor a otimizar é o factor de extracção (E), definido por:

$$E = \frac{n_S}{n_{aq}}$$

sendo n_S o número de moles do analito na fase rica em tensioactivo e n_{aq} o número de moles presente na fase aquosa.

Tendo em conta as equações anteriores, obtém-se a seguinte expressão:

$$E = K_D \frac{V_S}{V_{aq}}$$

onde V_S/V_{aq} corresponde à razão de volumes das fases.

Por outro lado, a fracção de analito extraído, p , é dada por:

$$p = \frac{K_D}{K_D + \frac{V_{aq}}{V_S}}$$

Finalmente, o factor de pré-concentração (C_F) define-se como a relação entre a concentração do analito na fase rica em tensioactivo em relação à amostra original, dado por:

$$C_F = \frac{C_S}{C_{in}} = p \frac{V_{in}}{V_S}$$

onde C_{in} é a concentração de analito na amostra inicialmente e V_{in} o volume da mesma [39].

Como se pode verificar, o factor de pré-concentração depende, entre outros factores, da relação do volume das fases, da constante de distribuição do analito e da concentração de tensioactivo utilizada.

A relação entre as fases V_{in}/V_S é a razão entre o volume da solução aquosa a ser concentrada e o volume da fase rica em tensioactivo. Esta razão aumenta com a diminuição da concentração do tensioactivo.

Para analitos extremamente hidrofóbicos, como no caso do Aldrin, que possuem constantes de distribuição extremamente favoráveis entre a fase aquosa e micelar, o factor de pré-concentração máximo, possível de obter, coincide numericamente com a relação entre as fases [71].

Em geral, o volume da fase rica em tensioactivo, que se extrai após a separação de fases, é muito pequeno. Isto justifica os elevados factores de pré-concentração obtidos a partir desta técnica. O volume da fase rica em tensioactivo depende essencialmente da quantidade de tensioactivo presente em solução, ou seja da sua concentração. Dado o reduzido volume desta fase, é necessária a utilização de um volume de solução inicial suficientemente elevado para que a sua manipulação não leve à introdução de erros na reprodutibilidade dos resultados. Daí que, seja necessário a optimização do volume da solução inicial, mantendo um factor de pré-concentração aceitável. Por outro lado, quando se estabelece o factor de pré-concentração condiciona-se a quantidade de analito presente na amostra inicial. Ou seja, o factor de pré-concentração depende da concentração do analito na amostra inicial.

Neste trabalho ocorreram inúmeras dificuldades na extracção do pesticida, de entre as quais, a remoção da fase rica em tensioactivo, a injeção da mesma no HPLC, dado o diâmetro da seringa e o arrefecimento rápido do mesmo, que provocou a sua solidificação no interior da seringa, provocando o entupimento da agulha.

Deste modo, não foi possível quantificar o pesticida após a CPE, verificando-se apenas a separação das fases, a influência dos sais no abaixamento da temperatura e o elevado factor de pré-concentração que é possível obter, pois a fase rica em tensioactivo apresenta um volume muito baixo, face à fase aquosa.

3.7. Extracção com Sais – Formação de Fases Líquidas

Na tentativa de conseguir utilizar a metodologia do ponto de turvação na extracção do aldrin de solos, adicionou-se um pouco de acetonitrilo à fase rica em tensioactivo, de modo a ser possível a injeção da fase rica em tensioactivo no HPLC. Após a adição deste solvente observou-se a formação de uns flocos. Após alguns testes, verificou-se que na presença de uma solução salina (Na_2SO_4) e de acetonitrilo ocorria a formação de duas fases nítidas: uma fase aquosa, constituída pela solução salina e uma fase orgânica, constituída pelo acetonitrilo, tensioactivo e possivelmente o pesticida.

A separação de fases permitiu a obtenção de analito num menor volume de solução, ou seja, permitiu a concentração do analito na fase orgânica. A presença de sais saturou a fase aquosa e provocou o aparecimento de duas fases, uma orgânica, contendo o aldrin, e outra aquosa rica em sais. A fase orgânica foi posteriormente filtrada e injectada no HPLC. Contudo, o ACN é solúvel em água, o que provocou uma diminuição da fase orgânica face ao volume adicionado.

A fim de quantificar o pesticida foi necessário estabelecer uma medida rigorosa do volume da fase orgânica, o qual é variável, de acordo com a relação entre o volume de ACN e o volume de solução aquosa de tensioactivos e sais. Foi necessário estabelecer a relação entre o volume de fase orgânica adicionada e o volume final da mesma. Numa primeira etapa preparou-se um conjunto de soluções de tensioactivos, a 5% com sulfato de sódio 0,4M, às quais foram adicionados volumes variáveis de acetonitrilo de modo a obter sempre 20mL de volume final. Após agitação, durante 5 minutos, num agitador end-over-end, a 23 rpm, transferiram-se as soluções para buretas de modo a permitir medir os volumes das diferentes fases após um repouso de 10 minutos.

A Figura 18 representa o volume da fase orgânica obtida em função do volume de acetonitrilo adicionado. Na Figura 18 (a) está representada a relação dos volumes obtidos a partir de ensaios sem solos. Como se pode observar há diferenças significativas entre os volumes de acetonitrilo adicionados e os volumes de fase orgânica obtidos. Contudo obtém-se uma boa correlação entre esses volumes. No sentido de fazer o mesmo tratamento a extractos aquosos de tensioactivos de amostras de solos utilizou-se o mesmo procedimento e obteve-se a recta (b) da Figura 18. As diferenças observadas entre as duas

experiências podem ser explicadas pelo facto de o solo ter contribuído para a modificação da concentração de electrólito na fase aquosa.

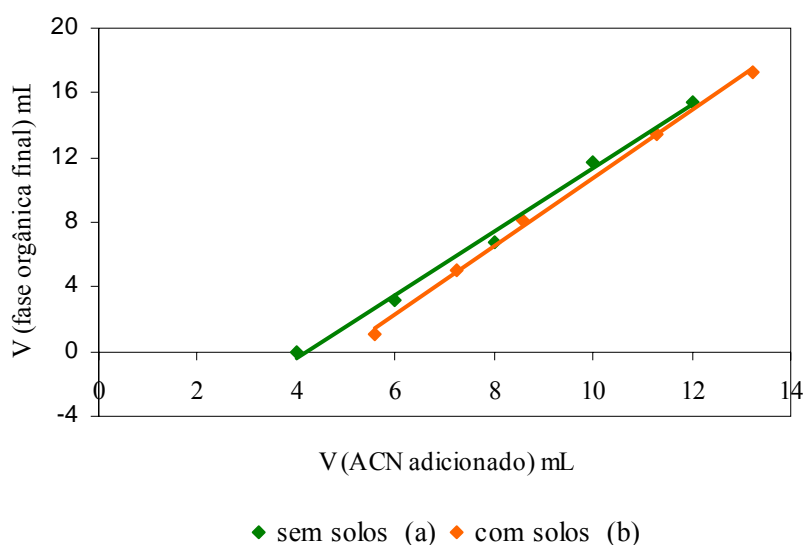


Figura 18 – Volume de fase orgânica obtido em função do volume de acetonitrilo adicionado. (a) – na ausência de solos; (b) – na presença de solos.

A Tabela 22 apresenta as equações das rectas presentes no gráfico anterior, bem como os respectivos coeficientes de correlação.

Tabela 22 – Equações das rectas acima obtidas e respectivo coeficiente de correlação.

	Equação da recta	Coefficiente de correlação
Com solos	$y = 2,0999x - 10,276$	$R^2 = 0,9978$
Sem solos	$y = 1,9663x - 8,315$	$R^2 = 0,9948$

Previamente à utilização desta metodologia, foi realizado um ensaio nas mesmas condições do ensaio da Figura 18 (a) tendo sido adicionado aldrin (5mg/L) à solução salina de tensioactivos, a fim de verificar a recuperação do aldrin, tendo-se obtido uma taxa de recuperação de $\approx 80\%$, o que sugere que nem todo o pesticida passa para a fase orgânica, ficando uma parte retida na fase aquosa. Este resultado refere-se à média de quatro ensaios.

Este sistema de separação de fases foi aplicado após a realização de ensaios de extração do aldrin de um solo, recorrendo à extração nos ultra-sons, com uma solução de POLE:Brij76 7:3, a 5% + Na₂SO₄ 0,4M. Os resultados apresentam-se na Tabela 23.

Tabela 23 – Percentagem de recuperação do aldrin e respectivos desvio padrão relativo, e intervalo de confiança. DPR – desvio padrão relativo; I.C. – intervalo de confiança; n – número de extracções

Ensaio	1	2	3
%Recuperação	52,42	74,94	59,63
DPR (%)	20,08	11,67	9,612
I.C.	16,73	13,90	14,23
n	4	4	3

As taxas de recuperação, do pesticida, obtidas variam entre 52,42 e 74,94, com intervalos de confiança entre 13,90 e 16,73. Uma vez que os três ensaios representam a mesma metodologia utilizada, pode verificar-se uma enorme variabilidade entre ensaios e dentro dos próprios ensaios. Podemos inferir que o método não é viável uma vez que não conduz há obtenção de resultados precisos. Mas, por outro lado, não foram feitos outros estudos com condições diferentes. Por, exemplo, a utilização de um solvente mais apolar, poderia garantir a passagem de todo o aldrin para a fase orgânica.

CAPÍTULO 4

CONCLUSÕES

Com este trabalho pretendeu-se estudar a extracção do aldrin de solos, sujeitos a diferentes fertilizações, utilizando a extracção assistida por ultra-sons. Foi também alvo de estudo, a eficiência de tensioactivos não iónicos como extractantes, dadas as vantagens ambientais e económicas que apresentam face aos solventes orgânicos.

Numa primeira abordagem, e partindo de alguma bibliografia consultada, foi feita a optimização do método, utilizando os tensioactivos para a extracção do aldrin de um solo. Concluiu-se que, dos tensioactivos estudados, a mistura POLE:Brij76 na proporção 7:3, com concentração de 5% foi aquele com a qual se obtiveram melhores recuperações. O tempo de extracção de 15 minutos foi o escolhido para a extracção assistida por ultra-sons.

Também foram realizados estudos de extracção com solventes orgânicos. Dos quatro solventes estudados: a acetona, o acetonitrilo, o acetato de etilo e a mistura éter de petróleo:acetona (1:1), este último, apresentou taxas de recuperação mais elevadas, tendo sido seleccionado, para ensaios subsequentes. No entanto, devido à sua composição complexa, os resultados tornaram-se pouco reprodutíveis, tendo sido substituído pelo acetato de etilo.

A influência das fertilizações nos processos de extracção foi estudada, tanto para a mistura POLE:Brij76 7:3, como para o acetato de etilo. No caso da mistura de tensioactivos foi verificado que, com o aumento da percentagem de matéria orgânica presente nos solos, devido às diferentes fertilizações, a taxa de recuperação do aldrin diminuiu, ainda que, após tratamento estatístico, as diferenças não se tenham revelado significativas. As taxas de recuperação obtidas com o acetato de etilo apresentaram resultados inversos: o aumento da percentagem de matéria orgânica provocou o aumento da taxa de recuperação obtida, observando-se diferenças significativas nos resultados obtidos. Deste modo inferiu-se que o acetato de etilo extraiu matéria orgânica, à qual se encontrava adsorvido o aldrin, sendo separados na coluna cromatográfica.

Também foi investigada a aplicação de tensioactivos, na extracção por ponto de turvação com o objectivo de utilizar esta propriedade para fins de reconcentração e limpeza da amostra. Através do diagrama de fases construído seleccionou-se a concentração de 5% de tensioactivo como sendo a melhor concentração a utilizar. Verificou-se ainda que, a presença de electrólitos na solução de tensioactivos fez diminuir a temperatura de ponto de turvação. O Na_2SO_4 provocou diminuições acentuadas na temperatura de ponto de turvação, tendo sido, por isso, utilizado, nos ensaios posteriores. No desenrolar deste trabalho surgiram alguns problemas entre os quais, o entupimento da agulha da micro-seringa, que impossibilitou a continuação desta metodologia. Por outro lado, os problemas que ocorreram levaram ao desenvolvimento de uma metodologia baseada na formação de duas fases, com a adição de solventes orgânicos à solução salina de tensioactivos. Com esta técnica seria possível a concentração do analito num menor volume de solução. Os resultados obtidos apresentam-se dentro do esperado, mas com uma elevada incerteza o que limita a utilização deste método.

A utilização de tensioactivos como solvente extractante tem-se demonstrado uma eficaz alternativa aos solventes orgânicos. Estes apresentam diversas vantagens, o que despertou o interesse em estudar a sua aplicação. Quer associados aos ultra-sons ou por ponto de turvação os resultados obtidos foram bastante interessantes, mas ainda assim seria uma mais-valia a realização de mais estudos, visando alternativas que conduzam a resultados ainda mais satisfatórios.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Marco, J.A.M. and Kishimba, M.A., *Concentrations of pesticide residues in grasses and sedges due to point source contamination and the indications for public health risks, Vikuge, Tanzania*. Chemosphere, **2005**. 61(9): p. 1293-1298.
2. Arias-Estévez, M., López Periago, E., Martínez-Carballo, E., Simal-Gándara, J., Mejuto, J.C. and García-Río, L., *The mobility and degradation of pesticides in soils and the pollution of groundwaters resources*. Agriculture, Ecosystems and Environment, **2008**. 123: p. 247-260.
3. Pimentel, D. and Levitan, L., *Pesticides - Amounts Applied and Amounts Reaching Pests*. Bioscience, **1986**. 36(2): p. 86-91.
4. <http://www.epa.gov/pesticides/about/index.htm>

Referências Bibliográficas

5. Bandala, E.R., Gelover, S., Leal, M.T., Arancibia-Bulnes, C., Jimenez, A. and Estrada, C.A., *Solar photocatalytic degradation of Aldrin*. *Catalysis Today*, **2002**. 76(2-4): p. 189-199.
6. Arias-Estévez, M., López Periago, E., Martínez-Carballo, E., Simal-Gándara, J., Mejuto, J.C. and García-Río, L., *The mobility and degradation and degradation of pesticides in soils and the pollution of groundwaters resources*. *Agriculture, Ecosystems and Environment*, **2008**. 123: p. 247-260.
7. Hung, C.C., Gong, G.C., Chen, H.Y., Hsieh, H.L., Santschi, P.H., Wade, T.L. and Sericano, J.L., *Relationships between pesticides and organic carbon fractions in sediments of the Danshui River estuary and adjacent coastal areas of Taiwan*. *Environmental Pollution*, **2007**. 148(2): p. 546-554.
8. http://www.agf.gov.bc.ca/pesticides/c_2.htm
9. Schnoor, J.L., *Fate of Pesticides and Chemicals in the Environment*. **1992**: Wiley - IEEE
10. Gavrilesco, M., *Fate of pesticides in the environment and its bioremediation*. *Engineering in Life Sciences*, **2005**. 5(6): p. 497-526.
11. <http://extoxnet.orst.edu/tibs/movement.htm>.
12. <http://www.ermanz.govt.nz/news-events/archives/presentations/Brent%20Clothier.pdf>.
13. Jenkins, J.J. and Thomson, P.A., *OSU Extension Pesticide Properties Database*. **1999**.
14. <http://www.prn2.usm.my/mainsite/bulletin/sun/1997/sun7.html>

15. Carpenter, Z.L., *Pesticide Properties That Affect Water Quality*, in *Texas Agricultural Extension Service*, The Texas A&M University System.
16. Moreno, D.V., *Combinación de Medios Moleculares Organizados con Sistemas de Extracción y Microextracción en Fase Sólida. Implementación en muestras sólidas de origen marino y terrestre para la determinación de pesticidas organoclorados*, in *Departamento de Química*. **2007**, Universidad de Las Palmas de Gran Canaria: Las Palmas de Gran Canaria.
17. Carreno, J., Rivas, A., Granada, A., Lopez-Espinosa, M.J., Mariscal, M., Olea, N. and Olea-Serrano, F., *Exposure of young men to organochlorine pesticides in Southern Spain*. *Environmental Research*, **2007**. 103(1): p. 55-61.
18. Sankararamkrishnan, N., Sharma, A.K. and Sanghi, R., *Organochlorine and organophosphorous pesticide residues in ground water and surface waters of Kanpur, Uttar Pradesh, India*. *Environment International*, **2005**. 31(1): p. 113-120.
19. Fatoki, O.S. and Awofolu, R.O., *Methods for selective determination of persistent organochlorine pesticide residues in water and sediments by capillary gas chromatography and electron-capture detection*. *Journal of Chromatography A*, **2003**. 983(1-2): p. 225-236.
20. Peris, E., Requena, S., de la Guardia, M., Pastor, A. and Carrasco, J.M., *Organochlorinated pesticides in sediments from the Lake Albufera of Valencia (Spain)*. *Chemosphere*, **2005**. 60(11): p. 1542-1549.
21. Scheyer, A., Graeff, C., Morville, S., Mirabel, P. and Millet, M., *Analysis of some organochlorine pesticides in an urban atmosphere (Strasbourg, east of France)*. *Chemosphere*, **2005**. 58(11): p. 1517-1524.

Referências Bibliográficas

22. Corbi, J.J., Strixino, S.T., do Santos, A. and Del Grande, M., *Environmental diagnostic of metals and organochlorinated compounds in streams near sugar cane plantations activity (Sao Paulo State, Brazil)*. Química Nova, **2006**. 29(1): p. 61-65.
23. Flores, A.V., Ribeiro, J.N., Neves, A.A. and Queiroz, E.L.R.d., *Organoclorados: um problema de saúde pública*. Ambiente e Sociedade, **2004**. VII(2): p. 111-125.
24. http://www.swrcb.ca.gov/stormwtr/docs/pbt_tbl.doc
25. *Aldrin e Dieldrin 1989*, Geneva: World Health Organization.
26. *Aldrin e Dieldrin. 1995*, Environmental and Workplace Health: Canadá.
27. Lopez, L., Pozo, C., Gomez, M.A., Calvo, C. and Lopez, J.G., *Studies on the effects of the insecticide aldrin on aquatic microbial populations*. International Biodeterioration & Biodegradation, **2002**. 50(2): p. 83-87.
28. Campoy, C., Jimenez, M., Olea-Serrano, M.F., Moreno-Frias, M., Canabate, F., Olea, N., Bayes, R. and Molina-Font, J.A., *Analysis of organochlorine pesticides in human milk: preliminary results*. Early Human Development, **2001**. 65: p. S183-S190.
29. Carvalho, W.A., Matos, G.B., Cruz, S.L.B. and Rodrigues, D.S., *Acute Intoxication by Aldrin - Relationship between Clinical Signs and Serum Levels in Man*. Revista De Saude Publica, **1990**. 24(1): p. 39-46.
30. Schafer, K.S., Kegley, S.E. and Patton, S., *Nowhere to Hide: Persistent Toxic Chemicals in the U.S. Food Supply*. **2001**, Pesticide Action Network North America/Commonweal: San Francisco.

31. Bezerra, M.D., Arruda, M.A.Z. and Ferreira, S.L.C., *Cloud point extraction as a procedure of separation and pre-concentration for metal determination using spectroanalytical techniques: A review*. Applied Spectroscopy Reviews, **2005**. 40(4): p. 269-299.
32. Maniasso, N., *Micellar media in analytical chemistry*. Química Nova, **2001**. 24(1): p. 87-93.
33. Haigh, S.D., *A review of the interaction of surfactants with organic contaminants in soil*. Science of the Total Environment, **1996**. 185(1-3): p. 161-170.
34. Scamehorn, J.F. and Harwell, J.H., *Surfactant-Based Separation Processes*. Surfactant Science Series. Vol. 33. **1989**: Dekker.
35. Tani, H., Kamidate, T. and Watanabe, H., *Micelle-mediated extraction*. Journal of Chromatography A, **1997**. 780(1-2): p. 229-241.
36. Quina, F.H. and Hinze, W.L., *Surfactant-mediated cloud point extractions: An environmentally benign alternative separation approach*. Industrial & Engineering Chemistry Research, **1999**. 38(11): p. 4150-4168.
37. Sanchez-Ferrer, A., Bru, R. and Garcia-Carmona, F., *Phase-Separation of Biomolecules in Polyoxyethylene Glycol Nonionic Detergents*. Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology, **1994**. 29(4): p. 275-313.
38. Jones, M.N., *Surfactants in membrane solubilisation*. International Journal of Pharmaceutics, **1999**. 177(2): p. 137-159.
39. Estévez, V.P., *Extracción y preconcentración micelar. Aplicación a la determinación de hidrocarburos aromáticos policíclicos en muestras de interés medioambiental*, in *Departamento de Química Analítica, Nutrición y Bromatología*. **2002**, Universidad de La Laguna: La Laguna.

Referências Bibliográficas

40. Berthod, A., Tomer, S. and Dorsey, J.G., *Polyoxyethylene alkyl ether nonionic surfactants: physicochemical properties and use for cholesterol determination in food*. *Talanta*, **2001**. 55: p. 69-83.
41. Eadsforth, C.V., Sherren, A.J., Selby, M.A., Toy, R., Eckhoff, W.S., McAvoy, D.C. and Matthijs, E., *Monitoring of environmental fingerprints of alcohol ethoxylates in Europe and Canada*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, **2006**. 64(1): p. 14-29.
42. Rocha, J.M.S., *Aplicações de agentes tensioactivos em biotecnologia*. *Boletim de Biotecnologia*, **1999**. 64: p. 5-11.
43. <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/search/ProductDetail/FLUKA/16007>
44. <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/search/ProductDetail/SIGMA/P9769>
45. Santos, S.M., Duarte, A.C. and Esteves, V.I., *Development and application of a capillary electrophoresis based method for the assessment of monosaccharide in soil using acid hydrolysis*. *Talanta*, **2007**. 72(1): p. 165-171.
46. Doulia, D. and Xiarchos, I., *Ultrafiltration of micellar solutions of nonionic surfactants with or without alachlor pesticide*. *Journal of Membrane Science*, **2007**. 296(1-2): p. 58-64.
47. Niessen, W.M.A., *Liquid Chromatography-mass spectrometry*. 2nd ed. **1999**, New York: Marcel Dekker 634.
48. Scott, M.J. and Jones, M.N., *The biodegradation of surfactants in the environment*. *Biochimica Et Biophysica Acta-Biomembranes*, **2000**. 1508(1-2): p. 235-251.

49. Castro, M.D.L.d., Valcárcel, M. and Tena, M.T., *Analytical Supercritical Fluid Extraction*. **1994**, Berlin: Springer.
50. Camel, V., *Supercritical fluid extraction as a useful method for pesticides determination*. *Analisis*, **1998**. 26(6): p. M99-M111.
51. Dean, J.R., *Extraction of polycyclic aromatic hydrocarbons from environmental matrices: Practical considerations for supercritical fluid extraction*. *Analyst*, **1996**. 121(9): p. R85-R89.
52. Lombas-Garcia, E., Gans, O., Krska, R. and Grasserbauer, M., *Supercritical fluid extraction versus ultrasonic extraction for the analysis of polycyclic aromatic hydrocarbons from reference sediments*. *International Journal of Environmental Analytical Chemistry*, **1998**. 72(4): p. 289-300.
53. Moreno, D.V., Ferrera, Z.S. and Rodriguez, J.J.S., *Use of polyoxyethylene surfactants for the extraction of organochlorine pesticides from agricultural soils*. *Journal of Chromatography A*, **2006**. 1104(1-2): p. 11-17.
54. Pino, V., Ayala, J.H., Afonso, A.M. and González, V., *Determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in marine sediments by high-performance liquid chromatography after microwave-assisted extraction with micellar media*. *Journal of Chromatography A*, **2000**. 869(1): p. 515-522.
55. Dean, J.R. and Xiong, G.H., *Extraction of organic pollutants from environmental matrices: selection of extraction technique*. *Trac-Trends in Analytical Chemistry*, **2000**. 19(9): p. 553-564.
56. Pan, J., Xia, X.X. and Liang, J., *Analysis of pesticide multi-residues in leafy vegetables by ultrasonic solvent extraction and liquid chromatography-tandem mass spectrometry*. *Ultrasonics Sonochemistry*, **2008**. 15(1): p. 25-32.

Referências Bibliográficas

57. Babic, S., Petrovic, M. and Kastelan-Macan, M., *Ultrasonic solvent extraction of pesticides from soil*. Journal of Chromatography A, **1998**. 823(1-2): p. 3-9.
58. Tor, A., Aydin, M.E. and Ozcan, S., *Ultrasonic solvent extraction of organochlorine pesticides from soil*. Analytica Chimica Acta, **2006**. 559(2): p. 173-180.
59. Pino, V., Ayala, J.H., Afonso, A.M. and Gonzalez, V., *Ultrasonic micellar extraction of polycyclic aromatic hydrocarbons from marine sediments*. Talanta, **2001**. 54(1): p. 15-23.
60. Ashley, K., Andrews, R.N., Cavazos, L. and Demange, M., *Ultrasonic extraction as a sample preparation technique for elemental analysis by atomic spectrometry*. Journal of Analytical Atomic Spectrometry, **2001**. 16(10): p. 1147-1153.
61. Rezic, I., *Optimization of ultrasonic extraction of 23 elements from cotton*. Ultrasonics Sonochemistry, **2009**. 16(1): p. 63-69.
62. M.G.Sulman, Semagina, N.V. and Ankudinova, T.V., *Ultrasonic Extraction of Biologically Active Compounds from the Vegetable Raw Material*, Tver Technical University: Tver.
63. Vagi, M.C., Petsas, A.S., Kostopoulou, M.N., Karamanoli, M.K. and Lekkas, T.D., *Determination of organochlorine pesticides in marine sediments samples using ultrasonic solvent extraction followed by GC/ECD*. Desalination, **2007**. 210(1-3): p. 146-156.
64. Rezic, I., Horvat, A.J.M., Babic, S. and Kastelan-Macan, M., *Determination of pesticides in honey by ultrasonic solvent extraction and thin-layer chromatography*. Ultrasonics Sonochemistry, **2005**. 12(6): p. 477-481.

65. Silva, R., Little, C., Ferreira, H. and Cavaco-Paulo, A., *Incorporation of peptides in phospholipid aggregates using ultrasound*. Ultrasonics Sonochemistry, **2008**. 15(6): p. 1026-1032.
66. Lorimer, J.P. and Mason, T.J., *Sonochemistry .1. the Physical Aspects*. Chemical Society Reviews, **1987**. 16(2): p. 239-274.
67. Lecoffre, Y., *Cavitation : bubble trackers*. **1999**, Rotterdam: A. A. Balkema.
68. Silva, R.J.M., *Tratamento de Fibras Têxteis com Ultra-Sons e Enzimas*, in *Departamento de Engenharia Textil*. **2006**, Universidade do Minho: Guimarães.
69. Suslick, K.S., III, W.B.M. and Didenko, Y., *Hot Spot Conditions During Multi-Bubble Cavitation*. Sonochemistry and Sonoluminescence, **1999**: p. 191-204.
70. Suslick, K.S., Hammerton, D.A. and Cline, R.E., *The Sonochemical Hot-Spot*. Journal of the American Chemical Society, **1986**. 108(18): p. 5641-5642.
71. Carabias-Martinez, R., Rodriguez-Gonzalo, E., Moreno-Cordero, B., Perez-Pavon, J.L., Garcia-Pinto, C. and Laespada, E.F., *Surfactant cloud point extraction and preconcentration of organic compounds prior to chromatography and capillary electrophoresis*. Journal of Chromatography A, **2000**. 902(1): p. 251-265.
72. Pramauro, E. and Prevot, A.B., *Solubilization in Micellar Systems - Analytical and Environmental Applications*. Pure and Applied Chemistry, **1995**. 67(4): p. 551-559.
73. Ferrera, Z.S., Sanz, C.P., Santana, C.M. and Rodriguez, J.J.S., *The use of micellar systems in the extraction and pre-concentration of organic pollutants in environmental samples*. Trac-Trends in Analytical Chemistry, **2004**. 23(7): p. 469-479.

Referências Bibliográficas

74. Harris, D.C., *Quantitative chemical analysis*. 3rd ed. **1991**, New York: W. H. Freeman.
75. Skoog, D.A., Holler, F.J. and Nieman, T.A., *Principles of instrumental analysis*. 5th ed. **1998**, Philadelphia: Saunders College Publishing.
76. Jin, X.H., Zhu, M. and Conte, E.D., *Surfactant-mediated extraction technique using alkyltrimethylammonium surfactants: Extraction of selected chlorophenols from river water*. *Analytical Chemistry*, **1999**. 71(2): p. 514-517.
77. Faria, A.M., Queiroz, M.E.L.R. and Neves, A.A., *Extração por ponto nuvem: Técnica Alternativa para a Extração de Resíduos de Agrotóxicos*. *Pesticidas: R.Ecotoxicol. e Meio Ambiente*, **2005**. 15: p. 29-42.
78. Lima, D.L.D., *Caracterização da Matéria Orgânica de Solos Sujeitos a Diferentes Fertilizações.*, in *Departamento de Química*. **2007**, Universidade de Aveiro: Aveiro.
79. Ohashi, A., Ogiwara, M., Ikeda, R., Okada, H. and Ohashi, K., *Cloud point extraction and preconcentration for the gas chromatography of phenothiazine tranquilizers in spiked human serum*. *Analytical Sciences*, **2004**. 20(9): p. 1353-1357.
80. Gonçalves, C. and Alpendurada, M.F., *Assessment of pesticide contamination in soil samples from an intensive horticulture area, using ultrasonic extraction and gas chromatography–mass spectrometry*. *Talanta*, **2005**. 65(5): p. 1179–1189.
81. Miller, J.C. and Miller, J.N., *Statistics for analytical chemistry*. 3rd ed. **1993**, Chichester: Ellis Horwood. 233.
82. Schramm, L.L., *Surfactants - Fundamentals and Applications in the Petroleum Industry*. **2000**: Cambridge. 621.

83. *SW-846 EPA Method 3550C: Ultrasonic Extraction*. 3rd ed. **2007**, Washington, DC: U.S. Environmental Protection Agency.

84. Gu, T.R. and Galera-Gomez, P.A., *The effect of different alcohols and other polar organic additives on the cloud point of Triton X-100 in water*. *Colloids and Surfaces a-Physicochemical and Engineering Aspects*, **1999**. 147(3): p. 365-370.

