

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS NATURAIS E EXATAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA**

Gustavo Donato Quatrin

**VALIDAÇÃO ANALÍTICA PARA DETERMINAÇÃO DE CLORPIRIFÓS
E AVALIAÇÃO DA EFICIÊNCIA DO SISTEMA BIOBED BRASIL**

Santa Maria, RS
2016

Gustavo Donato Quatrin

**VALIDAÇÃO ANALÍTICA PARA DETERMINAÇÃO DE CLORPIRIFÓS E
AVALIAÇÃO DA EFICIÊNCIA DO SISTEMA BIOBED BRASIL**

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Química, Área de Concentração em Química Analítica, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Química**.

Orientadora: Prof.^a Dr^a Carmem Dickow Cardoso

Santa Maria, RS
2016

Gustavo Donato Quatrin

**VALIDAÇÃO ANALÍTICA PARA DETERMINAÇÃO DE CLORPIRIFÓS E
AVALIAÇÃO DA EFICIÊNCIA DO SISTEMA BIOBED BRASIL**

Dissertação apresentada ao curso de Pós-Graduação em Química, área de concentração Química Analítica, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS) como requisito parcial para obtenção do título de **Mestre em Química**.

Aprovado em 13 de Maio de 2016

Carmem Dickow Cardoso, Dra. (UFSM)
(Presidente/Orientadora)

Marcelo Barcellos da Rosa, Dr. (UFSM)

Luciano Gebler, Dr. (EMBRAPA)

Santa Maria, RS
2016

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente Deus por ter me fortalecido nos momentos de dificuldades e também aos meus pais Claudio e Enedi e minha irmã Ana Cláudia pelo suporte e pelas palavras de incentivo, sem vocês eu jamais teria conseguido.

A minha orientadora Prof^a Dr^a Carmem Dickow Cardoso, pelos ensinamentos, puxões de orelha e principalmente pelas liberações em dias de expediente para assistir shows em Porto Alegre.

À prof^a Dr^a Ionara Pizzutti pela coorientação, ensinamentos, palavras de conforto e incentivo nos momentos difíceis.

Ao pesquisador da EMBRAPA Dr. Luciano Gebler pelo auxílio na parte técnica e pela parceria na execução deste trabalho.

Ao prof^o Dr. Marcelo Barcellos da Rosa pelas contribuições.

Ao prof^o Dr. Joselito Trevisan pelos ensinamentos.

Ao colega Jonatan Dias pelo auxílio na parte experimental.

Às colegas Darliana Souza e Jaqueline Reichert pela parceria nos estudos.

Aos colegas e amigos que levarei para toda a vida, Fabio Garske, Julia Antunes, Sabrina Muller, Thais Bourscheid, João Victor Schenkel, Matias Netto, Jorge Contreras, Ingrid Duarte, Marlos Fontana, Mateus Borges, Nelise Michelon, Vanessa Baierle e mais alguns que por ventura posso ter esquecido obrigado pela ajuda e pelos momentos de descontração que passamos.

Aos amigos cujos quais dividimos não apenas o apartamento, mas as contas os problemas e as cervejas, Paulo Henrique Zen (Paulinho) e Gustavo Dalla Nora (Zé) obrigado pela amizade de vocês.

Aos amigos músicos, Rodrigo Vieira (Cebola), Michel Silva, Douglas Barcellos, Gilberto Rocha, Mauricio Cadó e Eugenio Piovesan, obrigado pela compreensão em momentos que estive ausente em função deste.

E a todos vocês que não foram citados, mas que fizeram parte, direta ou indiretamente desta jornada, o meu mais sincero muito obrigado.

RESUMO

VALIDAÇÃO ANALÍTICA PARA DETERMINAÇÃO DE CLORPIRIFÓS E AVALIAÇÃO DA EFICIÊNCIA DO SISTEMA BIOBED BRASIL

AUTOR: Gustavo Donato Quatrin
ORIENTADORA: Prof.^a Dr.^a Carmem Dickow Cardoso

Os pontos de estocagem e manuseio de pulverizadores agrícolas em fazendas são uma fonte de contaminação pontual no caso de derrames acidentais do agrotóxico concentrado e/ou vazamentos. A fim de evitar possíveis contaminações ambientais, desde a década de 90 tem sido desenvolvidos sistemas de camas biológicas, onde o manejo de agrotóxicos bem como a lavagem de implementos agrícolas é feito sobre uma mistura de palha, solo e turfa. Esta biomistura tem a capacidade de reter e posteriormente biodegradar os agrotóxicos. Neste estudo foi validado um método para análises de rotina para determinação do agrotóxico organofosforado clorpirifós em camas biológicas. O método baseia-se na extração de 5 gramas de amostra com 30 mL de uma solução de acetona acidificada com ácido fosfórico 98:1:1 (v/v/v). Após homogeneização, centrifugação e filtração, 125 µL do extrato foi evaporado e reconstituído em 5 mL de metanol acidificado com 0,1% de ácido acético. A análise foi realizada em um sistema de cromatografia líquida acoplado a um espectrômetro de massas *tandem* (UPLC-MS/MS). Os parâmetros de validação avaliados foram linearidade da curva analítica (r^2), exatidão (fortificação e recuperação em %), limites de detecção (LOD) e quantificação (LOQ) do instrumento e do método, precisão (RSD %) e efeito matriz. Para o estudo de linearidade as soluções analíticas foram preparadas em solvente orgânico e em extrato de matriz, a 0,1; 0,5; 1; 5; 20; 100; 250 ng mL⁻¹. O estudo de recuperação foi realizado em amostras fortificadas em três

concentrações (2, 10 e 50 mg kg⁻¹) repetido sete vezes (n=7) para cada concentração. Os valores obtidos ficaram entre 96 e 115% com valores de RSD inferiores a 20% para os três níveis de concentração estudados. O LOQ real obtido foi 2 mg kg⁻¹. O efeito matriz observado foi inferior a $\pm 20\%$, o que demonstra que não há supressão ou aumento considerável no sinal do analito. O sistema de camas biológicas foi eficiente para a degradação de clorpirifós em ambos 1) simulação de derrame acidental e 2) aplicação de solução diluída do agrotóxico. Neste último caso, todos os valores obtidos ao final das etapas de amostragem (14 meses) ficaram abaixo do LOQm real.

Palavras chave: Clorpirifós. Camas biológicas. Biomistura. Validação. UPLC-MS/MS.

ABSTRACT

ANALYTICAL VALIDATION FOR CHLORPYRIFOS DETERMINATION AND EFFICIENCY ASSESSMENT OF BRAZIL BIOBED SISTEM

Author: Gustavo Donato Quatrin
Advisor: Prof.^a Dr^a Carmem Dickow Cardoso

The storage and handling points of agricultural sprayers on farms are a contamination point source of punctual contamination in case of accidental spills of concentrated pesticide and / or leaks, among others. In order to avoid possible environmental contaminations, since the decade of 90's have been developed biobed systems, where the handling of pesticides as well as agricultural implements washing are discharged on a mixture of straw, soil and peat (biomix). This mixture has the ability to retain and subsequently biodegrade pesticides. In this study was validated an analytical method applied for routine analysis to determine the organophosphate pesticide chlorpyrifos in biobeds. The method is based on 5 g sample extraction with 30 mL of acetone acidified with phosphoric acid 98:1:1 (v/v/v). After homogenization, centrifugation and filtration, 125 μ L of the extract was evaporated and reconstituted in 5 mL of methanol acidified with 0.1% acetic acid. The analysis was performed on a liquid chromatographic system coupled to a tandem mass spectrometer (UPLC-MS/MS). The validation parameters evaluated were calibration curve linearity (r^2), accuracy (spike and recovery %), limits of detection (LOD) and quantification (LOQ) of the instrument and the method, precision (RSD%) and matrix effect. To the linearity study analytical solutions were prepared in organic solvent and matrix extract at 0.1; 0.5; 1; 5; 20; 100; 250 ng mL^{-1} . The recovery study was conducted on samples spiked at three concentrations (2, 10 and 50 mg kg^{-1}) with seven replicates ($n = 7$) for each concentration and the values obtained were between 96 and 115% with RSD values lower than 20 % for all three concentration levels studied. The real LOQ obtained was 2 mg kg^{-1} and the matrix effect observed was lower than $\pm 20\%$, which demonstrates that there is not considerable suppression or enhancement in the analyte signal. The biobed system efficiently degraded chlorpyrifos in both 1) simulation of accidental spillage and 2)

application of diluted pesticide solution. In the latter case, all the values obtained at the final sampling time (14 months) were below the real LOQ_m.

Keywords: Chlorpyrifos. Biobed. Biomix. Validation. UPLC-MS/MS.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Diagrama de uma cama biológica.....	29
Figura 2 - Componentes de uma cama biológica.	30
Figura 3 - Fungo da podridão branca.	32
Figura 4 – Estrutura genérica do clorpirifós.....	37
Figura 5 - Montagem dos reatores	47
Figura 6 - Mapa dos reatores que sofreram contaminação pelo agrotóxico clorpirifós	47
Figura 7 – Organograma dos experimentos 1 e 2.....	51
Figura 9 - Organograma do procedimento de extração e determinação de clorpirifós em biomistura.....	53
Figura 10 - Comparação das curvas analíticas em solvente orgânico e extrato de matriz.	60
Figura 11 - Comparação entre os quatro primeiros níveis de concentração da curva analítica, em solvente orgânico e em extrato de matriz. (0,1 a 5 ng mL ⁻¹)	61
Figura 12- Degradação da solução diluída de clorpirifós	68
Figura 13 - - Mecanismo de degradação do clorpirifós	71

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Massa e volume do agrotóxico clorpirifós adicionado à matriz na etapa de fortificação, utilizando 5 g de amostra em 30 mL de solvente.	57
Tabela 2 – Recuperação média e desvio padrão relativo (RSD) para os experimentos 1, 2 e 3 (n=3) para amostras fortificadas com clorpirifós a 10 mg kg ⁻¹	58
Tabela 3 - Dados de linearidade para o clorpirifós, a partir de soluções preparadas em solvente orgânico e em extrato de matriz.	59
Tabela 4 - Efeito matriz para clorpirifós em cada nível de concentração estudado nas curvas analíticas.	61
Tabela 5 - Valores calculados e estimados de limites de detecção do instrumento (LODi), a partir das soluções analíticas em solvente orgânico e em extrato de matriz.	62
Tabela 6 - Valores estimados para limite de detecção do método (LODm), limite de quantificação do instrumento (LOQi), e limite de quantificação para o método (LOQm) para curva em solvente orgânico e extrato da matriz, a partir do limite de detecção estimado do instrumento (LODi).	63
Tabela 7 - Taxas de recuperação e desvio padrão relativo (RSD) para clorpirifós relativo aos três níveis de fortificação	64
Tabela 8 - Precisão intermediária estudada a partir de testes feitos por dois analistas, sob as mesmas condições de análise.	65
Tabela 9 - Concentração de clorpirifós na cama biológica, em cinco diferentes tempos de coleta, após simulação de derrame acidental com Lorsban®.	65
Tabela 10 - Concentrações de clorpirifós, utilizando soluções diluídas, em diferentes tempos de coleta, para biomistura (reatores 4 e 5), latossolo (reatores 6 e 7) e nitossolo (reatores 8 e 9).	67

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Classificação dos agrotóxicos de acordo com os efeitos à saúde humana.	23
Quadro 2 - Propriedades físico-químicas do clorpirifós.....	37
Quadro 3 - Doses de contaminação nos reatores	48
Quadro 4 - Tempos de coleta.....	48

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária

API – Ionização à Pressão Atmosférica, do idioma inglês *Atmospheric Pressure Ionization*

Ceparc - Centro de Pesquisa e Análise de Resíduos e Contaminantes

DDT - 1,1,1-tricloro-2,2-di(p-clorofenil)etano

DL 50 – Dosagem Letal para 50% dos animais testados

Embrapa - Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária

ESI – Ionização por Eletronebulização, do idioma inglês *Electrospray Ionization*

GC-ECD - Cromatografia Gasosa com Detector por Captura de Elétrons, do idioma inglês *Gas Chromatography- Electron Capture Detector*

HPLC-UV - Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com Detector Ultravioleta, do idioma inglês *High Performance Liquid Chromatography-Ultraviolet*

INMETRO - Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia

IBAMA - Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis

Kow – Coeficiente de partição octanol – água, do idioma inglês *Octanol-Water Partition Coefficient*

LMR – Limite máximo de resíduos

LOD – Limite de detecção, do idioma inglês *Limit of Detection*

LODi – Limite de detecção do instrumento, do idioma inglês *Instrument Limit of Detection*

LODm – Limite de detecção do método, do idioma inglês *Method Limit of Detection*

LOQ – Limite de quantificação, do idioma inglês *Limit of Quantification*

LOQi – Limite de quantificação do instrumento, do idioma inglês *Instrument Limit of Quantification*

LOQm – Limite de quantificação do método, do idioma inglês *Method Limit of Quantification*

MAPA – Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento

MRM – Monitoramento de Reações Múltiplas, do idioma inglês, *Multiple Reactions Monitoring*

MS – Espectrometria de massas, do idioma inglês *Mass Spectrometry*

NPD - Detector seletivo para nitrogênio e fósforo, do idioma inglês *Nitrogen Phosphorus Detector*

PCNB - pentacloronitrobenzeno

pH – Potencial hidrogeniônico

P.I. – Padrão interno

P.I.P. - Padrão interno do procedimento

P.I.I. - Padrão interno do instrumento

PTFE – Politetrafluoretileno

pKa – Logaritmo negativo da constante de acidez

pKb - Logaritmo negativo da constante de basicidade

r² – Coeficiente de determinação

rpm - Rotações por minuto

RSD - Desvio padrão relativo, do idioma inglês *Relative Standard Deviation*

t_{1/2} – Tempo de meia vida

UPLC - MS/MS - Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência acoplada a espectrometria de massas tandem, do idioma inglês *Ultra Performance Liquid Chromatography tandem Mass Spectrometry*

LISTA DE APÊNDICES

APÊNDICE 1 - Sequência de injeções para a avaliação da linearidade, onde BS: “branco” em solvente (metanol), BM: “branco” da matriz (extrato de biomistura), PS: padrão em solvente (metanol) - concentração em ng mL^{-1} e PM: padrão em extrato da matriz (biomistura) – concentração em ng mL^{-1}	80
Apêndice 2 – Gráfico relativo aos reatores 2A, 2B, 3A e 3B	81

LISTA DE ANEXOS

ANEXO 1 - Cromatogramas MRM para Clorpirifós.....	79
--	-----------

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	18
1.1.1 Objetivo geral:	19
1.1.2 Objetivos específicos:.....	19
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	20
2.1 História dos agrotóxicos	20
2.2 Toxicidade dos agrotóxicos	22
2.3 Agrotóxicos e seu destino no ambiente.....	24
2.4 Agrotóxicos organoclorados e organofosforados	26
2.5 Agrotóxicos e suas propriedades físicas e químicas.....	27
2.6 Camas biológicas.....	28
2.6.1 Elementos que compõem uma cama biológica	29
2.6.2 Biomistura	31
2.6.3 Fatores que afetam o desempenho das camas biológicas	32
2.6.4 Perspectivas futuras	34
2.6.4.1 Manuseio e descarte da biomistura	34
2.6.4.2 Camas biológicas como uma alternativa para o tratamento de efluentes agroindustriais	35
2.7 Clorpirifós	36
2.7.1 Determinação de clorpirifós em matrizes de biomistura	38
2.8 Validação de método	40
2.8.1 Seletividade	40
2.8.2 Linearidade.....	40
2.8.3 Limite de detecção e limite de quantificação	41
2.8.4 Exatidão	42
2.8.5 Precisão	42
3 MATERIAIS E MÉTODOS	44
3.1 Instrumentação	44
3.2 Solventes e reagentes	45
3.3 Materiais	45
3.4 Obtenção das amostras	46
3.5 Preparo das soluções analíticas	48
3.6 Condições cromatográficas.....	49

3.7 Procedimento de extração	50
3.8 Validação do método	54
3.8.1 Curva analítica e linearidade	54
3.8.2 Efeito matriz	54
3.8.3 Limite de detecção (LOD) e Limite de quantificação (LOQ)	55
3.8.4 Ensaio de fortificação e recuperação.....	56
3.8.5 Precisão intermediária.....	57
3.9 Análise das amostras reais	57
4 RESULTADOS E DISCUSSÕES	58
4.1 Otimização do procedimento de extração	58
4.2 Validação do método	59
4.2.1 Curva analítica e linearidade	59
4.2.2 Avaliação do efeito matriz	60
4.2.3 Limite de detecção (LOD) e limite de quantificação (LOQ)	62
4.2.4 Ensaio de fortificação e recuperação.....	63
4.2.5 Precisão intermediária.....	64
4.3 Análise das amostras reais	65
5 CONSIDERAÇÕES FINAIS	69
6 DESTINAÇÃO DOS RESÍDUOS GERADOS	70
7 TRABALHOS FUTUROS.....	71
8 REFERÊNCIAS.....	72
ANEXO 1.....	79
APÊNDICE 1	80
APÊNDICE 2 –	81

1 INTRODUÇÃO

O modelo de produção agropecuária adotado no Brasil, baseado no aumento da produtividade por meio de plantas melhoradas geneticamente e pelo uso de insumos como fertilizantes e agrotóxicos, exige a estruturação de toda a sociedade para avaliar e gerenciar os riscos oriundos da utilização desses produtos.

Para garantir a sustentabilidade dos sistemas de produção agropecuários que utilizam tais insumos, o monitoramento e a avaliação dos impactos do uso destas substâncias devem ser vistos como atividades essenciais. Como exemplo, destacam-se os avanços alcançados em química analítica, que possibilita a detecção e a quantificação de concentrações anteriormente difíceis de serem mensuradas.

Os pontos de abastecimento de agrotóxicos, no meio rural, têm sido tratados como parte das boas práticas agrícolas e nestes locais ocorre um processo antagônico ao planejado para o uso de agrotóxicos em áreas agrícolas. Os produtos são testados e autorizados para uso na forma de pequenas doses distribuídas em uma grande área de terreno ou em um grande volume de água, resultando em concentrações de g ha^{-1} ou mg L^{-1} de ingrediente ativo. Quando se trabalha com agrotóxicos concentrados (comerciais) em um curto período de tempo ocorre contaminação pontual, produzindo concentrações equivalentes a gramas ou decigramas por metro quadrado o que aumenta o risco de que o agrotóxico ultrapasse a concentração de segurança ambiental.

Tendo em vista os recentes estudos de biodegradação dos agrotóxicos, tem-se sugerido a utilização deste local como um reator biológico *in situ* denominado *biobed* (cama biológica). Este sistema, além de evitar que os contaminantes atinjam solo e água, tem por objetivo principal adsorver e degradar os agrotóxicos reduzindo o risco de contaminação ambiental. A adsorção e posterior degradação se dá pela ação de micro-organismos que se desenvolvem em uma mistura denominada *biomix* (biomistura), composta normalmente de solo, palha e turfa. Esta mistura resulta em uma matriz complexa do ponto de vista analítico, o que dificulta a detecção e a quantificação dos agrotóxicos presentes.

Nota: A Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA) adota a terminologia Sistema Biobed Brasil para o sistema de cama biológica desenvolvido na Estação Experimental de Fruticultura de Clima Temperado (Vacaria, RS), que é uma adaptação do sistema *biobed* sueco.

1.1 Objetivos

1.1.1 Objetivo geral:

Desenvolver e validar uma metodologia analítica para a determinação do agrotóxico clorpirifós em matrizes de camas biológicas.

1.1.2 Objetivos específicos:

1. Otimizar as condições do procedimento de extração, de forma a reduzir o tempo de análise.
2. Avaliar o desempenho das camas biológicas nas condições climáticas do sul do Brasil, para a degradação do agrotóxico clorpirifós, propondo o uso deste sistema como um processo de prevenção de desastres ambientais.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 História dos agrotóxicos

O primeiro registro do uso de inseticidas é de cerca de 4.500 anos atrás por sumérios que usavam compostos de enxofre para controlar insetos e ácaros, enquanto que cerca de 3.200 anos atrás, os chineses estavam usando compostos de mercúrio e arsênio para controlar piolhos do corpo. Escritos da Grécia e Roma antigas mostram que a religião, a magia popular e o uso do que pode ser chamado de métodos químicos, foram utilizados para o controle de doenças de plantas, ervas daninhas, insetos e pragas animais. Como não havia indústrias químicas, os produtos usados tinham de ser provenientes de plantas, derivados de animais, ou de natureza mineral de fácil obtenção (UNSWORTH, 2010).

Um dos primeiros e mais importantes registros do uso de agrotóxicos na era d.C (depois de Cristo) foi datado no ano de 900, quando os chineses usaram arsênio para controlar insetos em jardins (JARDIM; ANDRADE; QUEIROZ, 2009).

Em 1669, ocorreu o primeiro relato do uso de arsênio como inseticida pela sociedade ocidental, em que o mel contaminado com esse composto era utilizado como isca para formigas. Em 1690, extratos de tabaco eram utilizados como inseticidas de contato (JARDIM; ANDRADE; QUEIROZ, 2009).

O “Verde de Paris”, sal de cobre que contém o íon arsenito, AsO_3^{-3} , foi um inseticida de uso popular introduzido nos Estados Unidos em 1867. Outros sais contendo esse íon ou o íon arsenato, AsO_3^{-4} , como os arsenatos de chumbo e de cálcio, também foram utilizados para este fim, em 1892 e 1907, respectivamente (JARDIM; ANDRADE; QUEIROZ, 2009).

Entre 1940 e 1950, as indústrias químicas da América do Norte e da Europa Ocidental produziram grandes quantidades de agrotóxicos, especialmente inseticidas. Nessa época, os ingredientes ativos da maioria desses agrotóxicos eram organoclorados, muitos dos quais tinham em comum propriedades notáveis, como estabilidade com relação à decomposição ou à degradação ambiental; baixa solubilidade em água, para moléculas isentas de oxigênio ou nitrogênio; alta solubilidade em meios semelhantes aos hidrocarbonetos, como os tecidos

gordurosos de organismos vivos e, toxicidade relativamente alta para insetos e seres humanos (JARDIM; ANDRADE; QUEIROZ, 2009).

No final do século XIX e início do século XX, começaram a ser desenvolvidos inseticidas orgânicos sintéticos. O marco para o desenvolvimento destes compostos foi a transformação do composto inorgânico cianato de amônio em uréia, que é um composto nitrogenado presente na urina, e sua síntese foi efetuada pelo químico alemão Friedrich Wöhler em 1828 (BRAIBANTE; ZAPPE, 2012).

Até então acreditava-se que compostos orgânicos não poderiam ser sintetizados em laboratório, sendo produzidos apenas por organismos vivos (BARBOSA, 2004).

Os inseticidas orgânicos sintéticos começaram a ser utilizados em grande escala na década de 1940, durante a Segunda Guerra Mundial, a fim de proteger os soldados das regiões tropicais e subtropicais da África e da Ásia, das pragas transmissoras da doença-do-sono, malária, entre outras. Devido à necessidade de proteger o exército, as pesquisas de novos inseticidas foram impulsionadas, o que resultou no desenvolvimento de vários agrotóxicos que são usados ainda hoje.

Um marco importante para a Química foi a descoberta da atividade inseticida do 1,1,1-tricloro-2,2-di(p-clorofenil)etano em 1939, conhecido como DDT. Esse inseticida foi utilizado pela primeira vez em 1943, durante a Segunda Guerra Mundial, para combater piolhos que infestavam tropas norte-americanas na Europa e que transmitiam uma doença chamada tifo exantemático (BRANCO, 2003).

No Brasil, durante os anos de 1954 a 1960 houve um intenso processo de registro de novos produtos no Ministério da Agricultura, pois a utilização de agrotóxicos se tornou evidente em ações de combate a vetores agrícolas. O crescimento econômico no Brasil se dá em grande parte à produção agrícola e a forma como esse processo vem se desenvolvendo, podendo influenciar em várias características ambientais. Estas que vão desde a perda da biodiversidade pela expansão das fronteiras agrícolas até os danos causados à saúde, resultante da qualidade do alimento que é consumido (TEIXEIRA, 2005).

A análise do desenvolvimento do uso de agrotóxicos a partir da segunda metade do século XX baseia-se em três momentos com conceitos distintos. O conceito estético-comercial que era voltado para o interesse do desenvolvimento da indústria de agrotóxicos que visava à erradicação das pragas na agricultura, criando assim uma dependência do agricultor com os defensivos agrícolas, na busca de

maior produtividade; o conceito ecológico que surge com o crescente número de acidentes com agrotóxicos, mostrando cada vez mais o risco de seu uso indiscriminado para o homem e ao ambiente; o conceito eco-toxicológico que levou o homem a avaliar melhor a ação dessas substâncias químicas (SOARES, 2010; GUERRA; SAMPAIO, 1991).

As principais substâncias químicas utilizadas como agrotóxicos foram desenvolvidas durante a Primeira Guerra Mundial (1914-1918), tendo sido modificadas e amplamente empregadas também durante a Segunda Guerra (1939-1945). Após a guerra, existindo grandes estoques destas substâncias e alta capacidade de produção instalada nos parques industriais, o enfoque da utilização dos agrotóxicos deixou de ser de caráter militar, passando a ser amplamente utilizado na agricultura (LUTZENBERGER, 2004). Exemplo disso é o dicloro-difenil-tricloroetano (DDT), desenvolvido durante a Segunda Guerra, organoclorado de extraordinário poder inseticida, que se tornou até meados da década de 80 o mais amplamente utilizado dos novos agrotóxicos, ainda antes que seus efeitos ambientais tivessem sido estudados (BOZIKI; SILVA; PRINTES, 2011).

A partir da década de 50, a Revolução Verde resultou em um novo modelo de produção agrícola. Anos depois surgiram problemas relacionados com o sistema agrícola utilizado, como a degradação dos recursos naturais, através de constantes erosões no solo e processos de salinização, problemas econômicos advindos do declínio da produtividade e problemas sociais devido à exclusão dos pequenos produtores dos processos produtivos. Dessa forma, “inicia-se então, um debate acerca da necessidade de um novo modelo tecnológico, ecológico e economicamente sustentável, diferente daquele baseado no uso intensivo de insumos químicos” (LEITE; TORRES, 2008).

2.2 Toxicidade dos agrotóxicos

No Brasil, o registro dos agrotóxicos é realizado mediante avaliação e aprovação por parte dos órgãos federais ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária), IBAMA (Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis) e MAPA (Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento). Estes

órgãos tem por finalidade principal a verificação da segurança ambiental e para a saúde humana além da avaliação da eficiência do produto para as indicações de uso apresentadas pelo requerente do registro (BRASIL, 1989).

Um agrotóxico pode ser classificado quanto à periculosidade para a saúde, em classes que variam de I a IV: produtos altamente perigosos ao meio ambiente (Classe I), produtos muito perigosos ao meio ambiente (Classe II), produtos perigosos ao meio ambiente (Classe III) e produtos pouco perigosos ao meio ambiente (Classe IV). A classificação dos agrotóxicos em função dos efeitos à saúde, (Quadro 1), decorrentes da exposição humana a esses agentes, pode resultar em diferentes classes toxicológicas. Essa classificação obedece a testes ou estudos realizados em laboratório que estabelece a dosagem letal (DL) do agrotóxico como aquela capaz de matar 50% dos animais testados com a referida dose (RIBAS; MATSUMURA, 2009).

Classe Toxicológica	Toxicidade	DL 50	Faixa colorida
I	Extremamente tóxico	$\leq 5 \text{ mg kg}^{-1}$	Vermelha
II	Altamente tóxico	Entre 5 e 50 mg kg^{-1}	Amarela
III	Mediamente tóxico	Entre 50 e 500 mg kg^{-1}	Azul
IV	Pouco tóxico	Entre 500 e 5000 mg kg^{-1}	Verde
-	Muito pouco tóxico	Acima de 5000 mg kg^{-1}	-

Quadro 1 - Classificação dos agrotóxicos de acordo com os efeitos à saúde humana.
Fonte: (RIBAS; MATSUMURA, 2009)

A Avaliação do Potencial de Periculosidade Ambiental, conduzida pelo IBAMA, se baseia nas características do produto como as propriedades físicas e químicas e sua toxicidade para os variados organismos encontrados na natureza; o quanto o produto se acumula em tecidos vivos; se persiste por muito tempo no ambiente; e se consegue se deslocar (solo, ar ou água). Ainda são analisados os perigos de causar mutações, câncer, má-formação em fetos ou embriões, e se podem colocar em risco a reprodução de aves e de mamíferos (IBAMA, 2009).

Para efeito de classificação quanto ao potencial de periculosidade ambiental de um agrotóxico, seus componentes e afins, são atribuídas 19 características

individuais, entre as citadas, que resultarão na classificação final do produto, obedecendo à seguinte graduação: Classe I – Produto Altamente Perigoso Classe II – Produto Muito Perigoso Classe III – Produto Perigoso Classe IV – Produto Pouco Perigoso. De acordo com IBAMA o clorpirifós é altamente perigoso para o ambiente (classe II) (IBAMA, 2009).

2.3 Agrotóxicos e seu destino no ambiente

As propriedades físicas e químicas dos agrotóxicos, bem como a quantidade e a frequência de uso, métodos de aplicação, características bióticas e abióticas do ambiente e as condições meteorológicas determinarão qual será o destino dos agrotóxicos no ambiente. (KLINGMAN; ASHTON; NOORDHOFF, 1982)

Essas condições variam de acordo com o produto e com os fatores relacionados à sua aplicação, por isso não se pode prever um modelo único para o comportamento destes agrotóxicos nem sua interação com o ambiente. Entretanto, alguns processos são conhecidos e descritos para diferentes produtos, tais como retenção, transformação e transporte. Esses processos podem prever como o produto se comportará interagindo com as partículas do solo e com outros componentes, com sua velocidade de evaporação, solubilidade em água e bioacumulação (RIBAS; MATSUMURA, 2009).

A persistência de agrotóxicos no solo depende da eficiência dos processos físicos de transformação citados. Sabe-se que alguns fungicidas inorgânicos, como os cúpricos, podem persistir no ambiente por décadas. Já a maioria dos fungicidas orgânicos tem meia-vida curta, apesar de que os produtos de sua decomposição possam persistir por longo tempo. O tiofanato metílico, por exemplo, é convertido em carbendazim no solo, mas o último persiste por meses. Os hidrocarbonetos aromáticos como PCNB (penta-cloro-nitro-benzeno), podem persistir no solo por vários anos (MIZUBUTI; MAFFIA, 2006).

O aumento considerável no volume de agrotóxicos aplicados tem trazido uma série de transtornos e modificações para o ambiente, tanto pela contaminação das comunidades de seres vivos que o compõe, quanto pela sua acumulação nos

segmentos bióticos e abióticos do ecossistema (biota, água, ar, solo, entre outros) (RIBAS; MATSUMURA, 2009).

Os recursos hídricos agem como integradores de todos os processos biogeoquímicos em quaisquer regiões, superficiais ou subterrâneas, e são os principais destinos de agrotóxicos, principalmente quando aplicados na agricultura (RIBAS; MATSUMURA, 2009).

A preocupação com a contaminação de recursos hídricos com agrotóxicos aumentou a partir do ano de 1979, quando os primeiros traços de contaminação foram detectados nos EUA. Ribeiro et al. (2007) relatam que, mesmo em concentrações baixas, são encontrados resíduos de agrotóxicos em amostras de água subterrânea em países como Grã-Bretanha, Alemanha, Estados Unidos, Grécia, Bulgária, Espanha, Portugal e Brasil. De maneira geral, a contaminação dos ambientes aquáticos no Brasil por resíduos de agrotóxicos pode ser considerada como moderada, salvo exceções em áreas altamente poluídas, como por exemplo áreas alagadas de cultivo de arroz, e é comparativamente menor que a contaminação presente nos países do hemisfério norte (RIBEIRO et al., 2007).

No solo, a preocupação com a contaminação é referente à interferência desses princípios ativos em processos biológicos responsáveis pela oferta de nutrientes. As alterações ocorridas na degradação da matéria orgânica são consideráveis, através da inativação e morte de micro-organismos e invertebrados que se desenvolvem no solo. A ciclagem de nutrientes pode ser afetada quando, por exemplo, o princípio ativo persistente no solo interfere no desenvolvimento de bactérias fixadoras de nitrogênio, responsáveis pela disponibilização desse mineral às plantas (EDWARDS, 1989).

A respiração do solo é um parâmetro utilizado para se observar a atividade geral dos micro-organismos, e pode ser utilizada como ferramenta para verificar os efeitos dos agrotóxicos sobre diferentes populações de micro-organismos (FERREIRA et al. 2006).

De acordo com Ribas e Matsumura (2009), a fiscalização de todo o ciclo de vida destes produtos, desde as matérias-primas até o descarte, poderia reduzir os impactos ambientais e, se conduzida de forma segura, também os problemas relacionados à contaminação humana (trabalhadores da produção, trabalhadores rurais e consumidores).

Outro fator importante para um futuro menos agressivo é o incentivo à produção mais limpa, como a produção orgânica, o manejo integrado e a utilização de agentes de controle biológico para a redução de danos no campo (RIBAS; MATSUMURA, 2009).

Com a conscientização do produtor rural, sobre o risco da utilização de agrotóxicos sem controle e a existência de outras formas de controle de pragas mais limpas, pode-se pensar em uma agricultura mais sustentável, que mantenha os níveis de produtividade, garantindo alimentação para a população, sem elevar os níveis de contaminação ambiental nem prejudicar os seres vivos, especialmente a saúde humana (RIBAS; MATSUMURA, 2009).

2.4 Agrotóxicos organoclorados e organofosforados

Durante e após a Segunda Guerra Mundial foram desenvolvidos muitos inseticidas orgânicos que substituíram, em grande proporção, as substâncias inorgânicas e organometálicas. Em geral, a maioria dos agrotóxicos orgânicos e organometálicos é bastante tóxica para os seres humanos e outros mamíferos, especialmente, nos níveis de dosagens requeridos para torná-los efetivos nas aplicações em campo. Os agrotóxicos orgânicos foram inicialmente projetados para serem biodegradáveis, embora se saiba que isto não acontece em muitos casos. Além disso, metais e semimetais (metalóides) tóxicos, como o arsênio, usados comumente em alguns agrotóxicos, não são biodegradáveis. Uma vez lançados no ambiente tendem a permanecer indefinidamente em plantas, águas, solos ou sedimentos, podendo integrar-se à cadeia alimentar, caso eles sejam liberados nesses locais (JARDIM; ANDRADE; QUEIROZ, 2009).

Os maiores problemas ligados à persistência de agrotóxicos no meio ambiente estão relacionados à utilização dos agrotóxicos organoclorados. Nesses compostos, a ligação carbono-cloro, presente na estrutura molecular, é difícil de ser rompida e o cloro pode reduzir a reatividade de outras ligações das moléculas orgânicas. Em muitas aplicações a falta de reatividade química é considerada como sendo uma vantagem importante, porém, também significa que, uma vez que os

organoclorados tenham sido lançados no meio ambiente, eles se degradam muito lentamente, tendendo, portanto, a se acumularem (JARDIM; ANDRADE; QUEIROZ, 2009).

Até 1957, os organoclorados eram os compostos mais usados como agrotóxicos, entretanto, gradativamente eles foram sendo substituídos pelos agrotóxicos do grupo dos organofosforados, devido à sua menor persistência ambiental e seu reconhecido potencial inseticida (MORAES, 1999; FERRER, 2003).

Desde a década de 70 os organofosforados passaram a ser os agrotóxicos mais utilizados no mundo. O seu consumo tem aumentado drasticamente, assim como os relatos de casos de intoxicações em função de exposição aguda, crônica e até mesmo a baixas doses. Estes compostos são largamente utilizados no Brasil, seja na lavoura ou no combate a endemias, como o controle da dengue, febre amarela e doença de Chagas. Outro fato que também chama a atenção é que os organofosforados apresentam efeito tóxico mais agudo para os seres humanos e outros mamíferos do que os agrotóxicos organoclorados, utilizados para os mesmos fins (BARTH; BIAZON, 2010).

2.5 Agrotóxicos e suas propriedades físicas e químicas

A estrutura molecular definida de cada agrotóxico determina, pelo menos parcialmente, o grau com que ele irá interagir no ambiente. A presença de grupos funcionais contendo oxigênio, nitrogênio e enxofre tendem a tornar os compostos orgânicos mais reativos, tanto química quanto biologicamente. Além disso, os tornam mais solúveis em água e menos voláteis quando comparados aos hidrocarbonetos com o mesmo número de carbonos. A presença de halogênios torna o composto menos solúvel em água, mais volátil e normalmente menos reativo tornando-o ambientalmente mais estável (CABRERA, et al. 2008).

A solubilidade em água é uma propriedade importante para os processos ambientais, pois atua no comportamento, transporte e destino desses compostos, indicando a tendência do agrotóxico em ser carregado superficialmente no solo atingindo águas superficiais. No entanto, este não é o único parâmetro para prever a percolação, devendo ser analisado em conjunto com outras propriedades.

Os valores do produto da constante de dissociação ácida (pKa) têm efeito sobre a solubilidade do agrotóxico e, através do pKa do agrotóxico e do pH do solo, é possível prever a forma predominante (ionizável ou molecular) de um agrotóxico ácido. A mesma relação pode ser obtida usando pKb para agrotóxicos alcalinos (CABRERA, et al, 2008).

2.6 Camas biológicas

A tecnologia de camas biológicas foi desenvolvida na Suécia durante a década de 90. A partir de 1997 começou a ser implementada em vários países da Europa e atualmente está se difundindo pela América Latina. Esta tecnologia de biopurificação conhecida como *biobed* (cama biológica) foi desenvolvida para evitar ou reduzir a contaminação ambiental por agrotóxicos. (TORSTENSSON & CASTILLO, 1997; JEREZ, et al, 2013). Uma cama biológica é uma construção simples e econômica, projetada para coletar possíveis derrames de agrotóxicos (TORSTENSSON & CASTILLO, 1997; TORSTENSSON, 2000).

As camas biológicas, em seu projeto pioneiro, consistiram em um buraco de 60 cm de profundidade no solo, recoberto com uma camada de argila no fundo, uma biomistura de palha e turfa e um recobrimento de grama na superfície. Pode-se incluir uma rampa para estacionamento do equipamento de aspersão (JEREZ, et al, 2013).

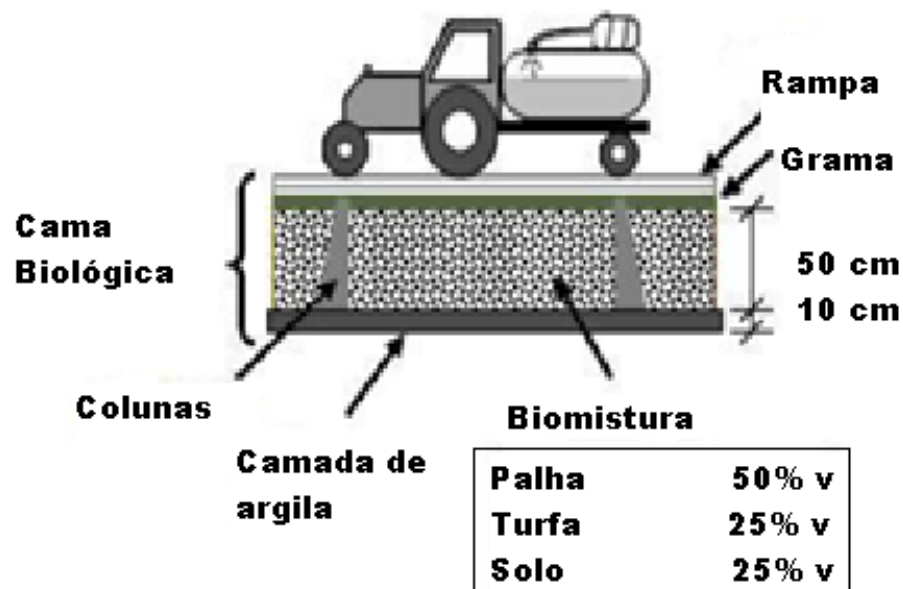


Figura 1 - Diagrama de uma cama biológica.

Fonte: Adaptado de (CASTILLO, TORSTENSSON, STENSTRÖM, 2008).

O objetivo do sistema é que o manejo de agrotóxicos durante o enchimento do pulverizador seja feito sobre a cama biológica e caso ocorra algum derrame acidental os agrotóxicos possam ser retidos e degradados na cama biológica.

2.6.1 Elementos que compõem uma cama biológica

Segundo Jerez et al, (2013), uma cama biológica apresenta a composição descrita a seguir.

Biomistura: É o componente mais importante da cama biológica, pois permite a retenção e posterior degradação dos agrotóxicos. É composta por 50% de palha, 25% de turfa e 25% de solo, como representado na Figura 1.

Cobertura vegetal: É uma camada de grama, cuja função é aumentar a eficiência da cama biológica, retendo os agrotóxicos e controlando a lixiviação daqueles que apresentam maior mobilidade.

Cascalho: É uma capa de pedras pequenas que se localiza no fundo da cama biológica, entre a biomistura e a cobertura impermeabilizante. Atua como um filtro

para evitar que resíduos orgânicos provenientes da biomistura possam vir a entupir o sistema de drenagem e recirculação.

Areia: Exerce a função de filtragem mais eficiente que o cascalho; sua utilização é opcional.

Sistema de impermeabilização: Consiste em um revestimento de concreto, ou outro material, para as paredes do buraco. Este revestimento tem a função de não deixar os agrotóxicos entrarem em contato com o solo.

Sistema de suporte: Consiste em um suporte metálico, onde o equipamento será apoiado.

Sistema de recirculação: Consiste em um poço com revestimento de concreto conectado a cama biológica e a uma bomba que recebe o líquido percolado e faz com que ele circule novamente pela cama biológica.

Teto de proteção: Consiste em uma cobertura que tem a função de proteger a cama biológica de chuvas, evitando a saturação com água.

Os componentes da cama biológica estão representados na Figura 2.

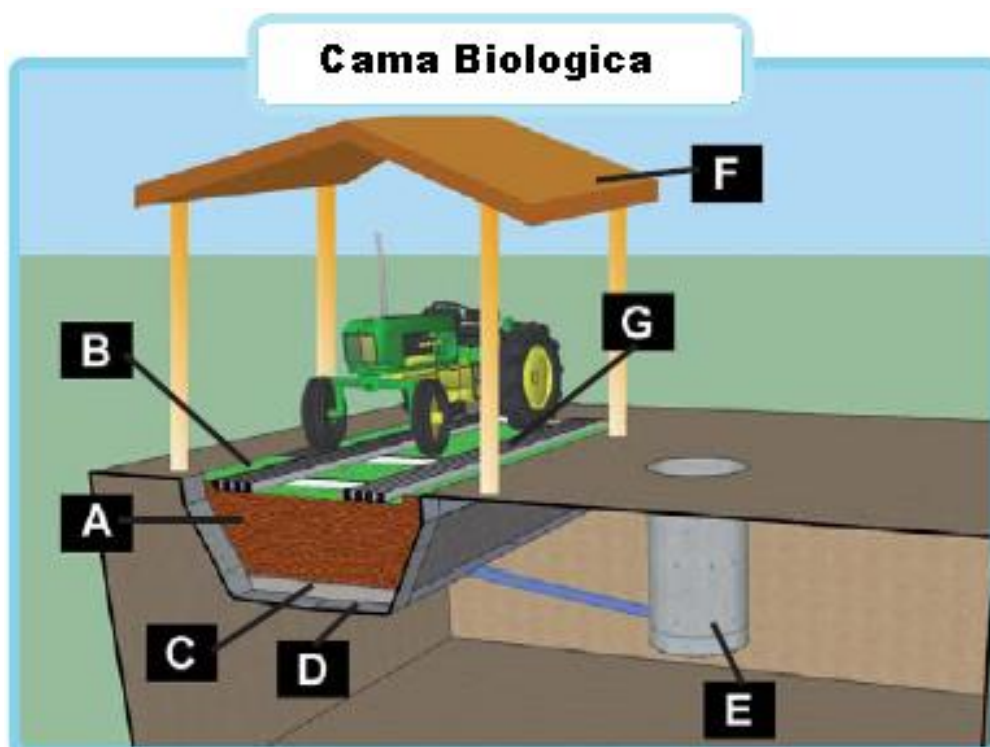


Figura 2 - Componentes de uma cama biológica.

Biomistura (A), cobertura vegetal (B), camada de cascalho (C), sistema de impermeabilização (D), sistema de recirculação (E), teto de proteção (F), sistema de suporte para a máquina ou implemento agrícola (G).

Fonte: (JEREZ, et al, 2013)

2.6.2 Biomistura

O solo, correspondente a 25% da composição da biomistura, é extraído até 20 cm da superfície da terra, sem a camada de vegetais, e fornece vários micro-organismos que participam ativamente da degradação dos agrotóxicos. Ademais, dependendo de seu pH e conteúdo de matéria orgânica, tem uma grande capacidade de retenção dos agrotóxicos.

Os solos mais adequados ao uso em camas biológicas são os solos com alto teor de matéria orgânica; também é possível usar solos arenosos.

Recomenda-se evitar o uso de solos com argila, pois estes dificultam a homogeneização na biomistura e tendem a interagir com a água, afetando o movimento dos líquidos no sistema (JEREZ, et al, 2013).

A turfa é um material orgânico esponjoso proveniente de um tipo de musgo extraído de sedimentos naturais. Geralmente contém aproximadamente 60% de carbono, 33% de oxigênio, 6% de hidrogênio e 2% de nitrogênio. A turfa tem uma grande capacidade de absorver água, contribuindo para manter a unidade do sistema. Também tem função de adsorver os agrotóxicos para facilitar sua degradação pelos micro-organismos (JEREZ, et al, 2013).

A aquisição da turfa representa um custo considerável na composição da biomistura, bem como existe uma preocupação no que diz respeito à sustentabilidade, já que este material é um recurso não renovável. Uma alternativa para substituir a turfa seria o uso de carvão vegetal, também chamado de biocarvão, obtido por combustão de material vegetal, o qual possui uma elevada capacidade de adsorção de contaminantes orgânicos, além do baixo custo e disponibilidade (JEREZ, et al, 2013).

De acordo com Castillo, Torstensson, Stenström (2008) a turfa contribui para a regulação do pH e controle da umidade do sistema. Turfas com maior conteúdo de matéria orgânica e maior acidez favorecem o crescimento de fungos que degradam agrotóxicos.

A palha é um material orgânico com alto teor de lignina e celulose, obtida no campo, principalmente como resíduo de colheita de leguminosas e gramíneas, como

trigo ou arroz. É um componente muito importante na biomistura, pois favorece o crescimento de vários micro-organismos, especialmente dos fungos da podridão branca (Figura 3) os quais apresentam alta capacidade de degradação de agrotóxicos. Para uma melhor incorporação da palha com os outros componentes da biomistura é recomendada que esta seja triturada em pequenos pedaços, menores do que 10 cm.

Apesar da facilidade de se obter palha em resíduos de colheita, nem sempre é possível obter palha em fazendas com atividade frutícola ou florestal. Então propõe-se a substituição da palha por serragem, casca de cevada ou casca de aveia. Entretanto, estas substituições totais ou parciais modificam as características da biomistura. Porém, o uso de palha deve ser mais estudado, pois pode alterar a cinética de degradação de alguns agrotóxicos quando comparada com a serragem. Deve-se ter certo cuidado com o uso de palha na biomistura devido a que a degradação de alguns agrotóxicos pode ser mais lenta (JEREZ, et al, 2013).

A principal função da palha é estimular a atividade de fungos da podridão branca, com capacidade de degradar a lignina, através da formação de enzimas como as peroxidases e as lacases. Estas enzimas têm demonstrado eficiência na degradação de agrotóxicos (CASTILLO, et al. 2001; COPPOLA, et al. 2007).



Figura 3 - Fungo da podridão branca.
Fonte: (CASTILLO, TORSTENSSON, STENSTRÖM, 2008).

2.6.3 Fatores que afetam o desempenho das camas biológicas

A eficiência de uma cama biológica é medida pela capacidade de reter e degradar os agrotóxicos. A composição da biomistura é crucial para a sorção dos agrotóxicos e atividade microbiana predominante. Além disso, algum componente rico em lignina deve estar presente. Dependendo da disponibilidade no determinado país/região, a palha pode ser substituída por outros materiais, por exemplo, cascas de cítricos, ramos de videira, entre outros (CASTILLO, TORSTENSSON, STENSTRÖM, 2008).

Em geral, o uso de materiais lignocelulósicos tem várias vantagens práticas: eles estão frequentemente disponíveis em fazendas, são persistentes e sua degradação lenta permite um contínuo fornecimento de carbono, energia e nutrientes, sem a necessidade de adições frequentes. No entanto, o nível do material lignocelulósico na biomistura tem um efeito sobre o tipo de microbiota que se desenvolve.

A degradação microbiana de agrotóxicos em camas biológicas pode ser vista como o resultado final de um complexo e interativo processo de funções metabólicas e co-metabólicas. A importância relativa de cada processo depende das características de cada agrotóxico, mas pode ser parcialmente regulada pela composição da biomistura (KARANASIOS, E.; TSIROPOULOS N. G.; KARPOUZAS G., 2012).

Agrotóxicos com estruturas aromáticas são suscetíveis à degradação por enzimas extracelulares como fenoloxidasas produzidas por fungos da podridão branca (CASTILLO et al. 2001).

O manejo da água, definida como a frequência e a intensidade da carga de águas residuais em processos de biopurificação (camas biológicas), tem sido identificado como um fator-chave na eficiência da cama biológica.

Estudos mostraram que o fluxo de água afetou fortemente a capacidade de retenção da biomistura com turfa e sugeriram que uma carga de água média de 12,5 L m⁻³ no sistema poderia ser suficiente para a retenção eficaz de agrotóxicos (DE WILDE et al. 2010).

Tentativas tem sido feitas para aumentar a capacidade de biodegradação pela inoculação de micro-organismos que degradam agrotóxicos. As tentativas iniciais focaram-se na inoculação de biomistura com fungos da podridão branca e substratos ricos em lignocelulose. Von Wire'n-Lehret et al. (2001) mostraram que a

inoculação de biomistura com *Phanerochaete chrysosporium* acelerou a degradação do herbicida isoproturon.

Apesar de seu alto potencial de degradação, os fungos da podridão branca são concorrentes fracos e podem ser oprimidos por fungos e bactérias do solo, limitando assim sua utilização prática para a otimização biotecnológica do processo de biopurificação. De modo a evitar estas limitações, Peters (2007) propôs a utilização de enzimas ligninolíticas como biocatalisadores em camas biológicas. Estas enzimas têm demonstrado uma notável capacidade de co-metabolizar uma ampla gama de agrotóxicos.

De Wilde et al. (2010) mostrou que a síntese de uma nova biomistura com material preparado a partir de uma cama biológica (5% em peso) muito exposta ao fungicida metalaxil acelerou a degradação deste fungicida e reduziu a aclimatação, fase necessária para o início da degradação.

2.6.4 Perspectivas futuras

2.6.4.1 Manuseio e descarte da biomistura

O substrato da biomistura pode, potencialmente, conter altos teores de resíduos de agrotóxicos e pode ser considerado como resíduo perigoso, dessa forma deve ser tratado com conformidade quanto ao manuseio e ao descarte.

Possíveis formas de lidar com este material incluem dispersão, deposição em aterro ou incineração. Algumas destas técnicas podem levar à depuração completa do substrato, mas são bastante caras, como é o caso da incineração, além disso, não podem ser considerados processos terminais, pois incluem transferência do contaminante para outro meio.

Em estudo pioneiro Torstensson (2000) mostrou que um período de armazenagem de oito meses, com o material colocado sobre a metade de uma lona e coberto com a outra metade (para evitar lixiviação em caso de chuva) e sendo monitorado periodicamente, pode ser suficiente para a redução de resíduos de agrotóxicos em níveis abaixo dos limites de detecção.

Após a desintoxicação, a biomistura é normalmente distribuída em campos agrícolas ou de pousio. No entanto, ainda não há relatos sobre o impacto desta prática sobre a diversidade e função dos micro-organismos de solo, considerando seu papel fundamental como condutores dos principais ciclos geoquímicos. Esta é uma área de pesquisa futura considerando a introdução de ferramentas moleculares avançadas que permitam um melhor conhecimento da ecologia e funções dos micro-organismos do solo (KARANASIOS, E.; TSIROPOULOS N. G.; KARPOUZAS G., 2012).

2.6.4.2 Camas biológicas como uma alternativa para o tratamento de efluentes agroindustriais

Até agora, o uso de sistemas de biopurificação é restrito aos efluentes contaminados por agrotóxicos, produzidos pelas atividades de manejo e lavagem de máquinas agrícolas. Contudo, as atividades agroindustriais alternativas produzem efluentes contaminados com altas cargas de agrotóxicos. Um exemplo disto é o tratamento pós-colheita de frutas (frutas cítricas, maçã, peras e bananas), que leva para a produção de grandes volumes de águas residuais. Estas águas residuais contêm elevadas concentrações de fungicidas e antioxidantes, usados para proteger as frutas da deterioração no armazenamento, e constituem uma fonte séria de contaminação dos recursos hídricos naturais (CASTILLO et al. 2000).

Apesar disso, o único sistema de depuração disponível atualmente é baseado em adsorção de agrotóxicos em carvão ativado granular (GARCIA PORTILLO et al. 2004). Este sistema reduz a concentração de contaminantes em até 7000 vezes. No entanto, o custo elevado para a sua construção e manutenção, além da avançada tecnologia de operação impede a implementação em instalações de embalagem de frutas.

Sistemas de biopurificação do tipo cama biológica podem oferecer uma solução integrada para o tratamento de águas residuais provenientes da exploração e pós-colheita na produção de frutos. No entanto, os elevados volumes de águas residuais (25-100 m³) produzidos pela indústria de embalagens de frutas, dentro de um curto período de tempo (3-4 meses), faz necessária a adaptação deste sistema

bem como rotinas de gestão da água e conteúdo da biomistura para depurar efetivamente estes efluentes (KARANASIOS, E.; TSIROPOULOS N. G.; KARPOUZAS G., 2012).

2.7 Clorpirifós

O clorpirifós é um dos principais agrotóxicos organofosforados comercializados. (SILVA, 2013). Este agrotóxico teve seu registro e lançamento originalmente nos Estados Unidos, em 1965, pela *The Dow Chemical Company*. Desde então, produto de nome comercial Lorsban® tem sido um dos produtos mais utilizados no mundo inteiro para controle de insetos. No Brasil o Lorsban® teve seu lançamento em 1972 e vem sendo importante ferramenta no controle de pragas, tendo registro de uso para um total de 36 pragas em 13 culturas diferentes (DOW AGROSCIENCE, 2008).

Nos EUA cerca de 10 mil toneladas deste composto foram comercializadas entre 1987 e 1998. Pode ser utilizado para o controle de pragas em diversas culturas alimentares, bem como em plantas ornamentais e culturas em estufas. Também pode ser aplicado para controle de pragas em ambientes fechados e até mesmo em coleiras de animais domésticos (SILVA, 2013).

O clorpirifós atua como inseticida e acaricida, sendo amplamente aplicado para o controle de moscas, lagartas, ácaros e pulgões, que atacam um grande número de culturas no Brasil, entre as quais milho, trigo, soja, sorgo, feijão, café, algodão, frutas cítricas, maçã, banana, batata, cenoura, repolho, tomate, couve e fumo. Este agrotóxico age sobre os insetos e ácaros por contato, fumigação e profundidade, ocasionando distúrbios no sistema nervoso central e posterior morte (SOUZA, 2013).

O risco para a saúde humana está no fato de atuar como inibidor de enzimas como a colinesterase, causando síndrome colinérgica e, portanto, sendo neurotóxico (PENA et al. 2003).

O clorpirifós, pertencente ao grupo dos inseticidas organofosforados (Figura 4), apresenta baixa solubilidade em água e alto coeficiente de sorção no solo. É altamente tóxico e muito perigoso para o meio ambiente (Classe II), sendo que o

limite máximo de resíduos (LMR) desse agrotóxico permitido em grãos, vegetais e pastagens varia de acordo com a cultura (ANVISA, 2004).

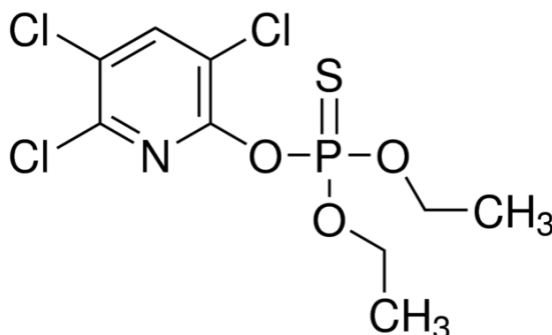


Figura 4 – Estrutura genérica do clorpirifós.
Fonte: (SIGMA ALDRICH, 2015).

O Quadro 2 apresenta algumas propriedades físicas e químicas do clorpirifós.

Propriedades	Características
Nome químico	O,O-dietil-O-(3,5,6-tricloro-piridil)-fósforo-tionato
Nome comum	Clorpirifós
Massa molar	350,6 g mol ⁻¹
Formula Molecular	C ₉ H ₁₁ Cl ₃ NO ₃ PS
Estado Físico	Sólido cristalino
Cor	Branca
Odor	Mercaptana
Ponto de Fusão (°C)	41,5 – 42,5
Ponto de Ebulição (°C)	300
Pressão de vapor a 25°C	2,51 x 10 ⁻⁵ mmHg
Densidade a 21 °C	1,51 g mL ⁻¹
Solubilidade	Acetona: 400g L ⁻¹ a 20 °C Diclorometano: 400g L ⁻¹ a 20 °C Hexano: 400g L ⁻¹ a 20 °C Tolueno: 400g L ⁻¹ a 20 °C Acetato de etila: 400g L ⁻¹ a 20 °C Água: 1,05 mg L ⁻¹ a 25 °C
Coeficiente de partição n-octanol/água	50000

Quadro 2 - Propriedades físico-químicas do clorpirifós.
Fonte: (MARCELO, 2011).

Os inseticidas organofosforados constituem um dos principais responsáveis por intoxicações ocupacionais no campo. Quimicamente podem ser definidos como ésteres do ácido fosfórico ou de ácidos derivados desse. Quando comparados com os inseticidas clorados, os organofosforados são considerados mais tóxicos, entretanto, não se acumulam em tecidos gordurosos. Como organofosforado, face à elevada lipossolubilidade que apresenta, o clorpirifós é absorvido pelo organismo, especialmente pela pele, além de membranas mucosas e pela via respiratória. O impacto na saúde do trabalhador rural está associado à exposição no momento de preparo da calda, aplicação na lavoura e durante a colheita. A absorção pelo trato gastrointestinal, normalmente, ocorre por ingestão em situações de intoxicação acidental, suicídio e/ou homicídio. A intoxicação também pode ocorrer pelo consumo de frutas e verduras *in natura* contaminadas e destinadas ao consumo sem que o período de carência do agrotóxico seja observado. (PENA et al. 2003)

No Brasil, o uso deste agrotóxico se restringe a produção agrícola, tendo seu uso vetado em formulações dos inseticidas de uso doméstico segundo a resolução da ANVISA RDC nº 226/2004 (ANVISA, 2004).

2.7.1 Determinação de clorpirifós em matrizes de biomistura

A eficácia de um processo de degradação de agrotóxicos em camas biológicas é respaldada pelos resultados de métodos analíticos validados, altamente sensíveis, que avaliam a eficiência do processo.

De um modo geral, as análises de resíduos de agrotóxicos em biomistura são baseadas em uma extração sólido-líquido envolvendo, posteriormente, algumas etapas de purificação do extrato, seguido de análise cromatográfica.

Um método para determinação de clorpirifós em biomistura proposto por Racke et al. (1996) também citado por Coppola et al. (2007) e Fernández -Alberti et al. (2012), utilizou 5 g de amostra, com 30 mL de solução extratora contendo acetona, água e ácido fosfórico concentrado na proporção de 98:1:1, respectivamente, e subsequente agitação em mesa. Posteriormente, as amostras

foram submetidas à ultrassom por 30 minutos, centrifugação a 10000 rpm e filtração com filtros PTFE (politetrafluoretileno) com porosidade de 0,2 µm. Por último 20 µL foram injetados em um sistema de cromatografia líquida com detecção por UV.

Outros métodos propostos na literatura para análise de clorpirifós em biomistura utilizaram grandes quantidades de amostras, bem como grandes quantidades de solventes, que, por conseguinte, geram quantidades relativamente grandes de resíduos passivos.

O método utilizado por Fogg et al. (2004) fez uso de 40 g de amostra acrescida de 40 g de Na₂SO₄. A mistura, extraída com 160 mL de uma solução de diclorometano e metanol (90:10, v/v) foi analisada por cromatografia gasosa com detector seletivo para nitrogênio e fósforo (NPD, do idioma inglês *Nitrogen and Phosphorus Detector*).

Na metodologia utilizada por Fait et al. (2007) uma mistura de 10 g de amostra e 12 g de terra diatomácea foi colocada em uma coluna e extraída com 100 mL de diclorometano. Posteriormente uma alíquota de 10 mL foi submetida à evaporação sob fluxo de nitrogênio e o extrato reconstituído em 1 mL de hexano e analisado por cromatografia gasosa com detecção por espectrometria de massas.

O método proposto por Vischetti et al. (2008) utilizou 40 g de amostra extraída em duplicata com porções de 80 mL de metanol/água (80:20, v/v) e sob agitação por 1h. O extrato, centrifugado a 15000 rpm por 15 min, foi filtrado, particionado com clorofórmio (3 vezes de 80 mL) e evaporado. O resíduo dissolvido em 1 mL de metanol foi analisado por HPLC com detecção UV.

Outra estratégia analítica, empregada por Omirou et al. (2012), utilizou 25 g de amostra extraída com 50 mL de uma mistura de acetato de etila/acetona (70:30, v/v) sob agitação por 90 min. O extrato foi filtrado e evaporado a vácuo. O resíduo redissolvido em 5 mL de acetona foi analisado por cromatografia gasosa com detector por captura de elétrons (GC-ECD, do idioma inglês *Gas Chromatography–Electron Capture Detector*).

2.8 Validação de método

2.8.1 Seletividade

A matriz da amostra pode conter componentes que interferem no desempenho da medição. Os interferentes podem aumentar ou reduzir o sinal, e a magnitude do efeito também pode depender da concentração (INMETRO, 2011).

A seletividade de um método instrumental de separação refere-se à capacidade de avaliar os analitos em estudo na presença de componentes que podem interferir com a sua determinação em uma amostra complexa. Esses interferentes podem ser outro ingrediente ativo, excipientes, impurezas e produtos de degradação, bem como outros compostos de propriedades similares ao analito. A seletividade garante que o pico de resposta seja exclusivamente do composto de interesse. Se a seletividade não for assegurada, a linearidade, a exatidão e a precisão do método estarão comprometidas (RIBANI et al. 2004).

Uma das formas de se avaliar a seletividade é comparando a matriz isenta do analito de interesse, e a matriz fortificada com esta substância (padrão). Nesse caso, nenhum interferente deve eluir no tempo de retenção do analito, que deve estar bem separado dos demais compostos presentes na amostra.

Uma segunda maneira faz uso de detectores modernos (arranjo de diodos, espectrômetro de massas), que comparam o espectro do pico obtido na separação com o de um padrão e utiliza-se isto como uma indicação da presença do composto puro. Estas duas maneiras são as mais utilizadas.

O método de adição de padrão também pode ser aplicado para os estudos de seletividade, porém este método é utilizado quando não é possível obter a matriz isenta do analito de interesse (RIBANI et al. 2004).

2.8.2 Linearidade

A linearidade refere-se à capacidade do método em fornecer resultados proporcionais à concentração do analito, dentro de uma determinada faixa de aplicação.

Na maior parte dos casos, a relação matemática entre o sinal fornecido pelo detector e a concentração ou massa do analito deve ser determinada a partir de sinais medidos para massas ou concentrações conhecidas dessa espécie. Essa relação matemática pode ser expressa como uma equação de reta do tipo $y = ax + b$. (RIBANI et al. 2004)

Em qualquer técnica instrumental, a relação linear simples, descrita pela equação $y = ax + b$, só é válida em um determinado intervalo de massa ou concentração da espécie medida. Este intervalo, no qual se pode construir uma curva analítica linear, é a faixa linear dinâmica. (RIBANI et al. 2004)

Constrói-se um gráfico com as respostas relativas no eixo y e as concentrações correspondentes em escala logarítmica no eixo x. A linha obtida deve ser horizontal sobre toda a faixa linear. São desenhadas outras linhas horizontais paralelas no gráfico, para 95 e 105% da linha da faixa linear. Pode-se dizer que o método é linear até o ponto onde a resposta relativa intercepta a linha de 95 ou 105% (RIBANI et al. 2004).

2.8.3 Limite de detecção e limite de quantificação

O limite de detecção (LOD, do idioma inglês *Limit of Detection*) expressa a menor concentração da substância em questão que pode ser detectada, mas não necessariamente quantificada.

O limite de quantificação (LOQ, do idioma inglês *Limit of Quantification*) é referente à menor concentração que pode ser medida com uma certeza entre a concentração e os parâmetros precisão e exatidão. O LOQ pode ser calculado pela relação sinal ruído ou pela razão entre estimativa do desvio padrão da resposta do branco e a inclinação da curva analítica (RIBANI et al. 2004).

2.8.4 Exatidão

Representa o grau de concordância entre os resultados obtidos e um valor de referência aceito como verdadeiro. Para avaliar a exatidão os processos mais utilizados são: materiais de referência, comparação de métodos, ensaios de recuperação e adição de padrão (RIBANI et al. 2004).

A recuperação é definida como a proporção da quantidade do analito, presente ou adicionado na porção do material teste, que é extraída e passível de ser quantificada (RIBANI et al. 2004).

Os intervalos aceitáveis de recuperação para a análise de resíduos devem estar entre 70 e 120%, com precisão de até $\pm 20\%$ (RIBANI et al. 2004).

2.8.5 Precisão

Representa a dispersão dos resultados entre ensaios independentes. A precisão pode ser avaliada pelo desvio padrão relativo (RSD, do idioma inglês *Relative Standard Deviation*).

Normalmente métodos que quantificam compostos em macro quantidades requerem RSD de 1 a 2%; em métodos de análises de traços ou impurezas (microescala) são aceitos RSD de até 20%.

A precisão em validação de métodos analíticos é considerada em três níveis diferentes: repetitividade, precisão intermediária e reprodutibilidade.

A repetitividade representa a concordância entre os resultados de sucessivas medições de um mesmo método, sob mesmas condições: mesmo procedimento de ensaio, mesmo analista, mesmo instrumento usado e sob as mesmas condições, mesmo local do ensaio e repetições no menor intervalo de tempo possível. (INMETRO, 2011). O INMETRO recomenda sete ou mais repetições para o cálculo da estimativa do desvio padrão (RIBANI et al. 2004).

A precisão intermediária indica variações dentro de um mesmo laboratório: dias ou analistas diferentes, ou uma combinação destes fatores, e tem por objetivo assegurar que no mesmo laboratório o método fornecerá os mesmos resultados (RIBANI et al. 2004).

A reprodutibilidade avalia o grau de concordância dos resultados em medições feitas sob condições variadas, como, equipamentos, analistas, reagentes, condições ambientais, entre outros (RIBANI et al. 2004). É considerada importante quando um laboratório busca a verificação do desempenho dos seus métodos em relação aos dados de validação obtidos por meio de comparação interlaboratorial. (INMETRO, 2011).

3 MATERIAIS E MÉTODOS

Este trabalho foi desenvolvido no Centro de Pesquisa e Análise de Resíduos e Contaminantes (CEPARC) junto a Universidade Federal de Santa Maria (UFSM) em parceria com a Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa) de Vacaria, RS.

As etapas de desenvolvimento e validação da metodologia, bem como a análise das amostras reais, foram realizadas no CEPARC. As amostras utilizadas foram provenientes da Embrapa, onde foi realizado o estudo do desempenho das camas biológicas, bem como avaliação eco toxicológica do sistema (CARNIEL, 2015)

3.1 Instrumentação

- Cromatógrafo a líquido calibrado, sistema Acquity UPLC-MS/MS (Waters, EUA) equipado com:
 - Amostrador automático, bomba quaternária, forno para coluna e sistema de degaseificação;
 - Coluna cromatográfica BECH C₁₈, 100 mm de comprimento, 2,1 mm de diâmetro interno e 1,7 µm de tamanho de partícula (Waters, EUA);
- Detector MS triplo quadrupolo calibrado, Xevo TQS (Waters, EUA) utilizando o modo de ionização por eletronebulização (ESI), operando no modo positivo;
- Sistema de aquisição de dados através do *software* MassLynx e Target Lynx versão 4.1, validado;
- Gerador de Nitrogênio (Peak Scientific, EUA);
- Sistema de purificação de água Milli-Q[®] (Millipore, EUA);
- Balança analítica de precisão com quatro casas decimais, calibrada (Sartorius, Alemanha);
- Balança analítica de precisão com duas casas decimais, calibrada (Mettler, Suíça);

- Centrífuga Hareaus Varifugue (Thermo Scientific, Alemanha);
- Pipetador automático HandyStep, calibrado (Brand, Alemanha);
- Homogeneizador *Ultraturrax* (Polytron, Suíça);
- Dispensador de volume (Fortuna[®] Opitifix[®]).

3.2 Solventes e reagentes

- Argônio 99,999% de pureza (Air Liquide, Brasil);
- Nitrogênio 99,999% de pureza (Peak Scientific, EUA);
- Acetona Grau Resíduo (Macron Chemicals, EUA);
- Ácido fosfórico 85% PA (Mallinckrodt, EUA);
- Formiato de Amônio ≥ 97% PA (Sigma-Aldrich, Alemanha);
- Metanol Grau HPLC (Mallinckrodt, EUA);
- Clorpirifós (Dr. Ehrenstorfer, 98,5%);
- Quinalfós. (Dr. Ehrenstorfer, 99%);
- Propoxur (Dr. Ehrenstorfer, 99,5%).

3.3 Materiais

- Tubos de Teflon[®] (PTFE), capacidade de 250 mL;
- Frascos de vidro para armazenamento de soluções nos volumes de 16 e 22 mL (National Scientific, EUA);
- Balões volumétricos calibrados de 5 e 10 mL (Blau Brand, Alemanha ou Restek, EUA);
- Vidrarias comuns de laboratório.

3.4 Obtenção das amostras

Os estudos de campo foram conduzidos na estação de fruticultura de clima temperado da Embrapa uva e vinho (Vacaria, Brasil), a partir de dezembro 2013 a março de 2014 (CARNIEL, 2015; GEBLER et al, 2015).

Tanto as amostras “branco” utilizadas na etapa de validação do método quanto as amostras contaminadas (para posterior estudo de monitoramento), foram provenientes dos reatores montados na estação da Embrapa, construídos de acordo com o modelo suíço, com biomistura composta por palha, solo e turfa na proporção de 50:25:25 (v/v/v) (CASTILLO, TORSTENSSON, STENSTRÖM, 2008).

A palha de trigo utilizada na biomistura foi triturada em pedaços de aproximadamente 2 cm. O solo, caracterizado como Latossolo Bruno Álico, com teor de argila na faixa de 30%, areia na faixa de 24% e silte na faixa de 46%, foi coletado a 10 cm da superfície, nos pomares da estação da Embrapa. A turfa utilizada foi adquirida da empresa Beifort de Garibaldi, RS.

Os reatores foram montados em caixas d’água de polietileno com capacidade de 360 L, representados na

Figura 5. O reator possui, no fundo, um cano (A) para a drenagem do lixiviado e sobre este cano uma camada de pedras (B) para auxiliar na filtração do lixiviado evitando o entupimento. A biomistura (C) é colocada acima da camada de pedra e por fim o reator recebe uma camada de grama (D).



Figura 5 - Montagem dos reatores
Foto: Luciano Gebler

Para avaliar a degradação do agrotóxico clorpirifós foram montados nove reatores e os estudos foram feitos em duplicata (A e B) como mostrado na Figura 6. Os reatores 1 a 5 foram compostos com biomistura; o reator 1 (que não aparece na figura) é o “branco”, ou seja, sem contaminação. Os reatores 6 e 7 foram compostos com latossolo e os reatores 8 e 9, com nitossolo.



Figura 6 - Mapa dos reatores que sofreram contaminação pelo agrotóxico clorpirifós

Os reatores 2 e 3 receberam uma aplicação única de 1,0 e 0,5 L, respectivamente, do produto formulado Lorsban® que tem como princípio ativo o agrotóxico clorpirifós, na concentração de 480g/L. Esta aplicação teve como objetivo simular um derrame acidental do produto. Os demais reatores receberam uma solução diluída de Lorsban® (250 mL/100 L) oriunda da lavagem de máquinas agrícolas, segundo o quadro 3.

Data de aplicação	Reatores/ Duplicata/ Volume de Lorsban® (L)											
	4		5		6		7		8		9	
	Biomistura		Biomistura		Latossolo		Latossolo		Nitossolo		Nitossolo	
	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B
16/12/2013	50	50	25	25	50	50	25	25	50	50	25	25
07/03/2014	20	20	10	10	20	20	10	10	20	20	10	10
10/03/2014	20	20	10	10	20	20	10	10	20	20	10	10
17/03/2014	20	20	10	10	20	20	10	10	20	20	10	10
Total (L)	110		55		110		55		110		55	

Quadro 3 - Reatores contaminados com Lorsban® (250 mL/100 L) incluindo data de aplicação e quantidade do agrotóxico aplicado.

O quadro 4 mostra como as coletas foram realizadas:

Tempos de Coleta	Mês e ano da coleta	Tempo de contaminação (mês)
T0	Dezembro/2013	Aplicação inicial
T1	Fevereiro/2014	Dois meses de contaminação
T2	Abril/2014	Quatro meses de contaminação
T3	Julho/2014	Sete meses de contaminação
T4	Agosto/2014	Oito meses de contaminação
T5	Fevereiro/2015	Quatorze meses de contaminação

Quadro 4 - Calendário de coleta utilizado após a contaminação dos reatores com Lorsban®.

3.5 Preparo das soluções analíticas

Para o preparo da solução analítica estoque, de concentração 1000 mg L⁻¹, o padrão analítico foi pesado em frasco de vidro de 22 mL com tampa com batoque de

teflon® (PTFE), e a partir de cálculo determinou-se o volume de solvente necessário para alcançar a concentração desejada. O solvente foi adicionado ao frasco com o auxílio de um pipetador automático previamente calibrado. O frasco foi agitado manualmente e submetido à ultrassom por cerca de 5 minutos a fim de solubilizar alguma partícula sólida remanescente.

Foi preparado 1 litro de metanol acidificado com 0,1 % de ácido acético para reconstituição do resíduo após evaporação. Para isso, 1 mL de ácido acético concentrado foi pipetado, com pipetador automático, e adicionado a 999 mL de metanol grau resíduo, juntamente com propoxur, que é o padrão interno do instrumento (P.I.I.), na concentração de 40 ng mL⁻¹.

As curvas analíticas de trabalho, para os estudos de linearidade e efeito matriz, foram confeccionadas nas concentrações de 0,1; 0,5; 1; 5; 20; 100; 250 ng mL⁻¹, a partir da solução estoque.

Para a curva analítica em solvente orgânico, volumes calculados da solução estoque foram adicionados em sete balões volumétricos de 10 mL, calibrados, seguido da adição do propoxur na concentração de 40 ng mL⁻¹ e o volume foi completado com metanol acidificado. Essas soluções foram utilizadas também para o preparo das curvas analíticas em extrato da matriz.

Para a confecção da curva analítica em extrato da matriz foi realizada uma extração da amostra “branco” de biomistura e procedeu-se de acordo como descrito no item 3.7.

3.6 Condições cromatográficas

Para o cromatógrafo a líquido

- Volume de injeção: 2 µL no modo *partial loop with needle overfill*.
- Temperatura do forno da coluna: 40 °C.
- Fase móvel A: solução de formiato de amônio 0,3 g L⁻¹.
- Fase móvel B: metanol.
- Gradiente da fase móvel: o programa foi iniciado com 90% do eluente A e levado diretamente a 10% em 7,75 minutos. Manteve-se essa proporção por 0,75 minutos e posteriormente a composição foi levada à composição

inicial (90% de A) em 0,01 minutos e manteve-se essa proporção até o final da corrida cromatográfica.

- Vazão da fase móvel: 0,45 mL min⁻¹.
- Tempo total de corrida: 10 minutos.

Para o espectrômetro de massas

- Ionização à pressão atmosférica com ESI no modo positivo.
- Voltagem do capilar: 3,00 kV.
- Temperatura do gás de dessolvatação (N₂): 400 °C.
- Vazão do gás de dessolvatação (N₂): 500 L h⁻¹.
- Vazão do gás no cone de amostragem (N₂): 150 L h⁻¹.
- Vazão do gás de nebulização (N₂): 7,0 L h⁻¹.
- Vazão do gás de colisão (Ar): 0,15 mL min⁻¹.

3.7 Procedimento de extração

Nesta etapa foram estudadas diferentes condições (experimentos 1, 2 e 3), de forma a diminuir o tempo de análise.

Para os experimentos abaixo, três amostras foram fortificadas com 10 mg kg⁻¹ de clorpirifós e, posteriormente, extraídas e analisadas em triplicata.

No experimento 1 foi avaliada agitação em mesa por duas horas como descrito na (RACKE et al. 1996).

Para o experimento 2, a agitação em mesa foi substituída por agitação mecânica em *ultraturrax* por 1 minuto, conforme descrito também na figura 7.

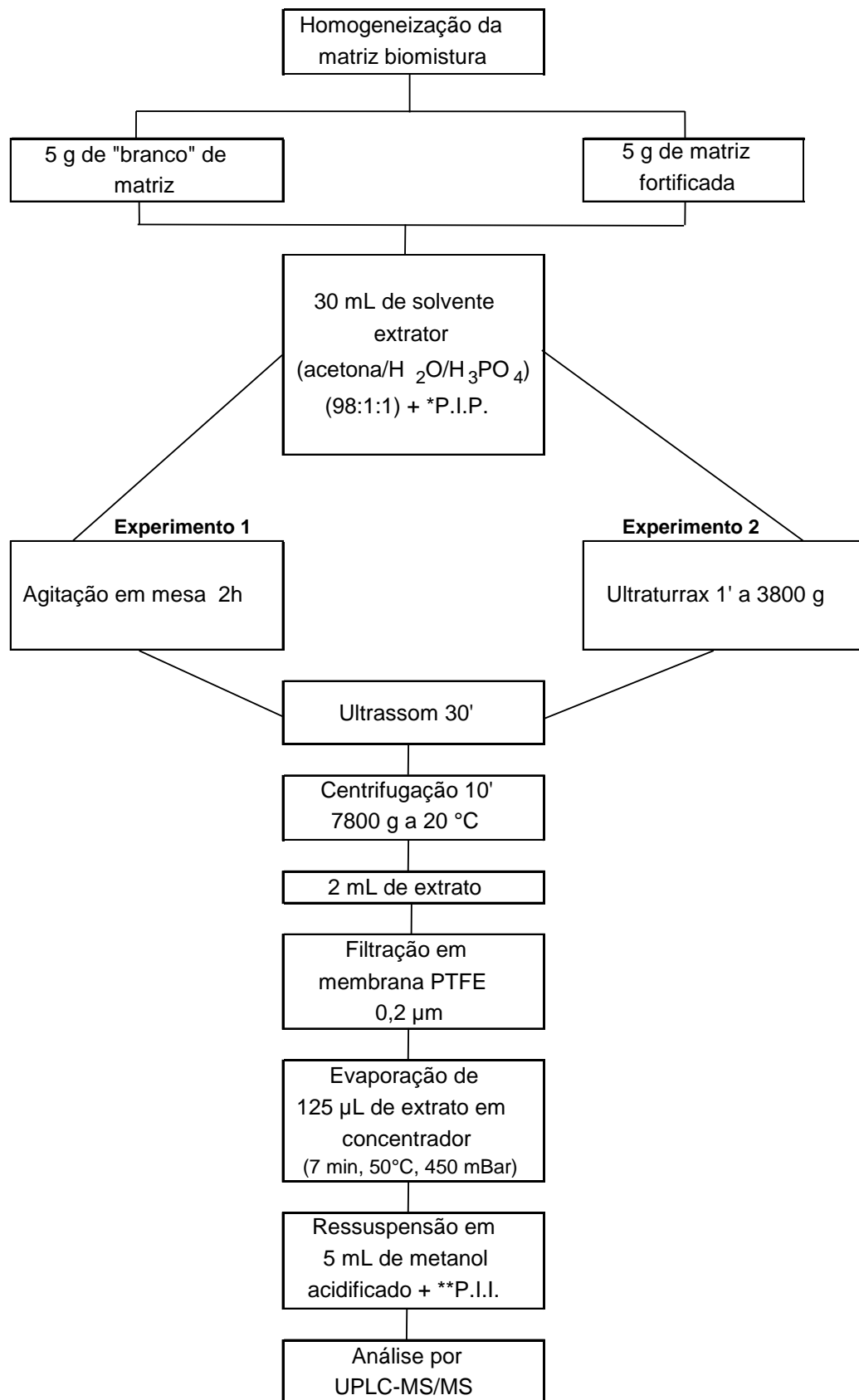


Figura 7 – Organograma dos experimentos 1 e 2.

No experimento 3 foi avaliada o uso de banho de ultrassom na frequência de 48 KHz e na potência de 55W, por 10 e 20 minutos e na ausência da radiação (COPPOLA et al., 2007).

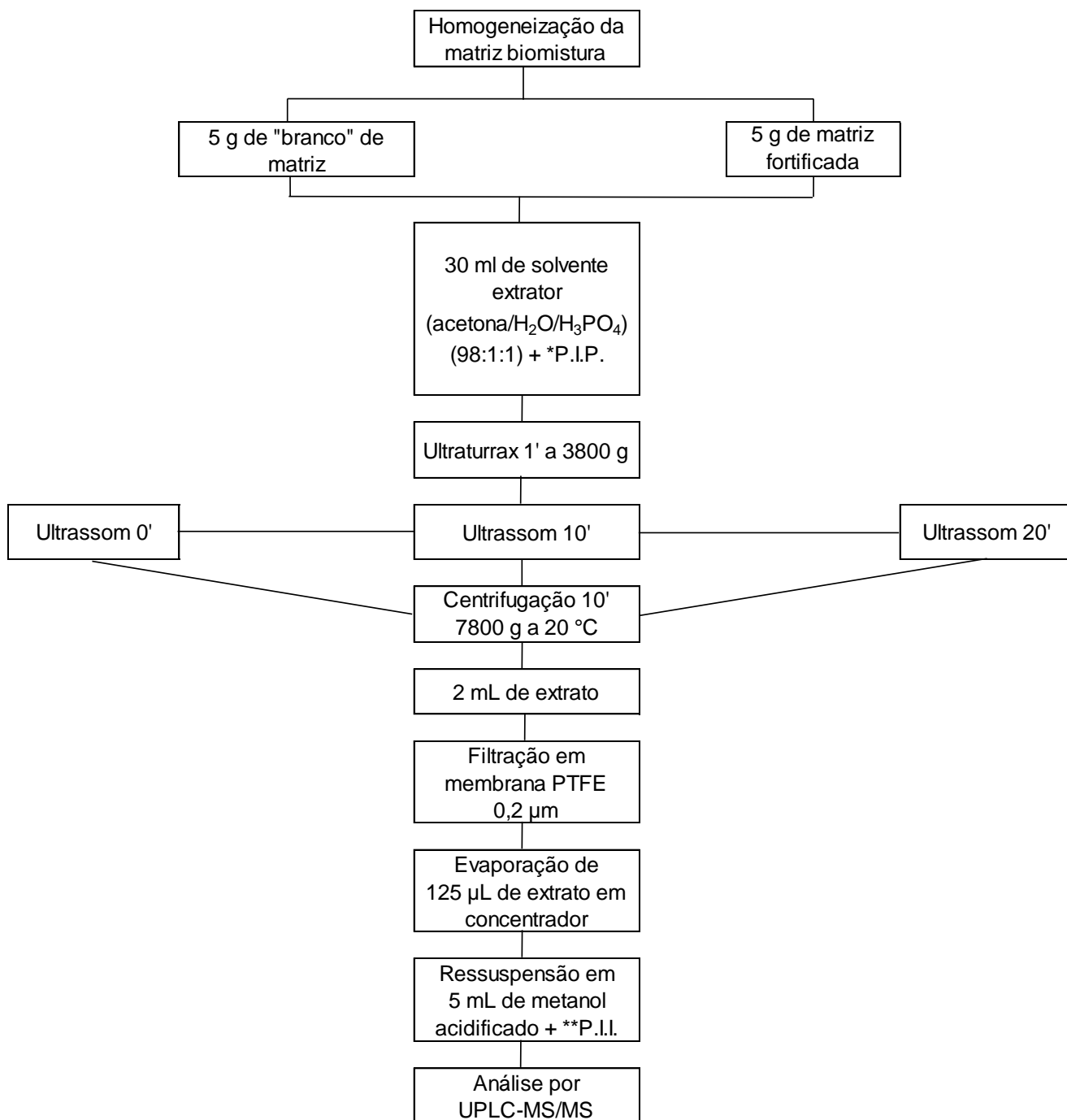


Figura 8: Organograma do experimento 3.

Após a realização dos experimentos e a avaliação das melhores condições foi elaborado o organograma que representa o procedimento estabelecido para extração e determinação de clorpirifós em biomistura (Figura 9). Este procedimento foi efetuado para as amostras de “branco” em matriz e soluções analíticas em matriz.

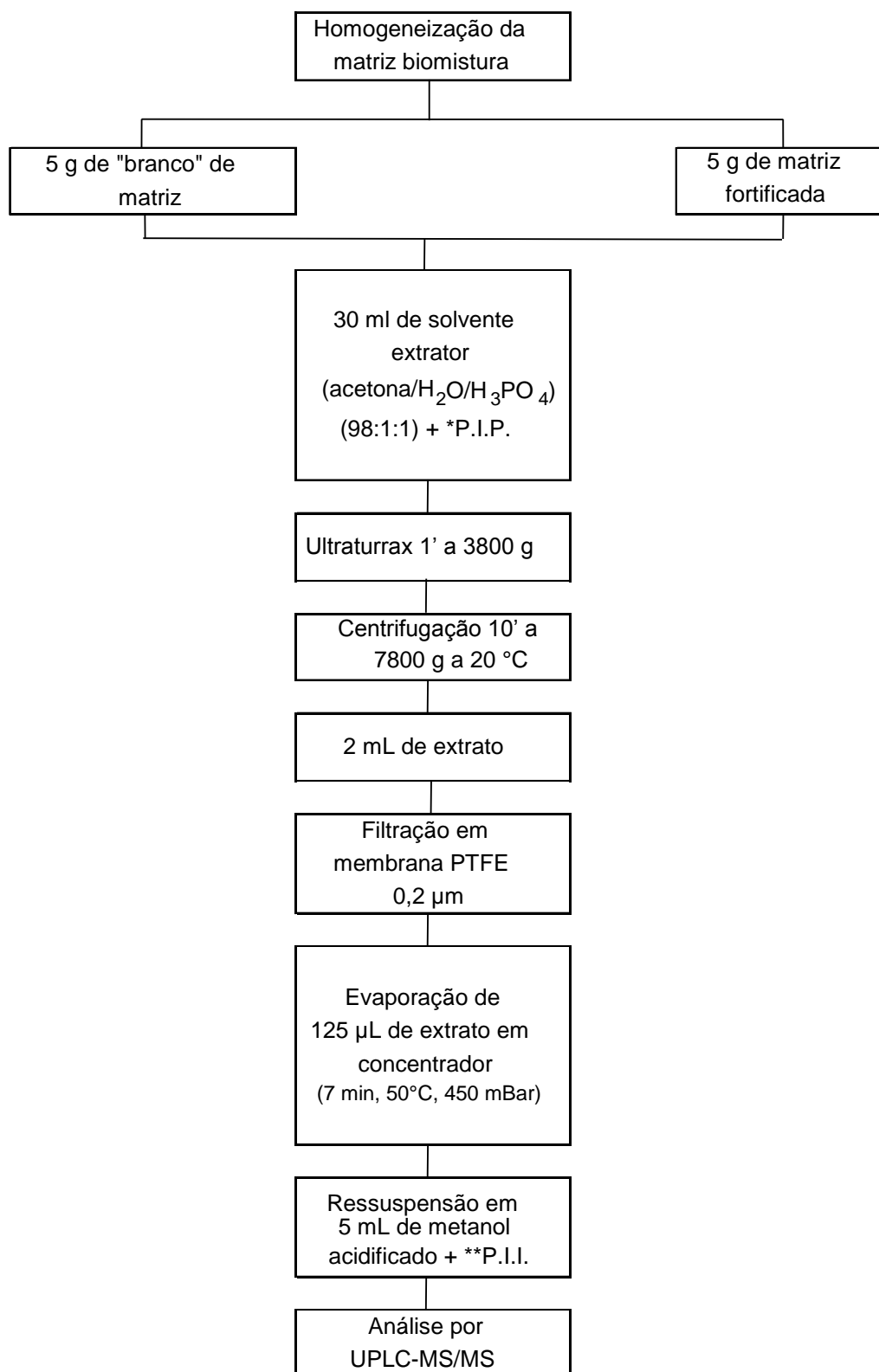


Figura 9 - Organograma do procedimento de extração e determinação de clorpirifós em biomistura.

3.8 Validação do método

Para a validação do método utilizou-se a amostra “branco” proveniente do reator 1.

3.8.1 Curva analítica e linearidade

A linearidade da curva analítica foi avaliada injetando as soluções analíticas descritas no item 3.5 no sistema cromatográfico.

Primeiramente injetou-se o “branco” dos reagentes (metanol acidificado com 0,1% de ácido acético + P.I.P. + P.I.I.) e o “branco” de matriz. Posteriormente as soluções analíticas foram injetadas alternadamente (primeiro em solvente depois em matriz) e em ordem crescente de concentração a fim de evitar *carryover* na coluna cromatográfica. Esta sequência de injeção foi repetida sete vezes conforme as recomendações do INMETRO. (APÊNDICE I)

A partir dos dados de área obtidos foi calculado o desvio padrão relativo (RSD%) das injeções. Os valores de área e concentração foram colocados em gráfico para se obter uma equação de reta do tipo $y = ax + b$ para a obtenção dos parâmetros da curva analítica. Com esses dados, foi possível obter o valor de r^2 (coeficiente de determinação), a (coeficiente angular) e b (coeficiente linear).

3.8.2 Efeito matriz

O efeito matriz foi avaliado de duas formas, uma, de acordo com Pizzutti et al. (2009) constituiu na comparação das áreas obtidas das soluções preparadas em solvente e em extrato “branco” de matriz. A equação 1 demonstra como esta figura de mérito foi calculada.

$$\text{Efeito matriz (\%)} = \frac{A1-A2}{A2} \times 100 \quad (1)$$

Sendo:

A1 = média das áreas da solução em matriz em uma determinada concentração;

A2 = média das áreas da solução em solvente orgânico em uma determinada concentração.

Outra maneira de avaliar o efeito que a matriz exerce na amostra é pela comparação das inclinações das curvas analíticas obtidas para as soluções preparadas em extrato “branco” de matriz e em solvente orgânico.

O cálculo para a avaliação do efeito matriz a partir das inclinações da curva foi realizado de acordo com a equação 2.

$$\text{Efeito matriz(\%)} = 100 \times \left(1 - \frac{S_m}{S_s}\right) \quad (2)$$

Sendo:

S_m = inclinação da curva preparada em extrato “branco” da matriz;

S_s = inclinação da curva preparada em solvente orgânico.

3.8.3 Limite de detecção (LOD) e Limite de quantificação (LOQ)

Para a determinação da estimativa do limite de detecção do instrumento (LOD_i) e do método (LOD_m), bem como do limite de quantificação do instrumento (LOQ_i) e do método (LOQ_m) foram utilizados os dados do estudo de linearidade e as equações descritas abaixo.

A partir das áreas das soluções analisadas e do RSD (sete réplicas), fez-se o uso da equação 3 para obtenção do LOD_i calculado.

$$\text{LOD}_i (\text{ng mL}^{-1}) = 3 \times \text{RSD} \times C \quad (3)$$

Sendo:

RSD = desvio padrão relativo das áreas das sete injeções em determinada concentração

C = concentração da solução analítica

A partir do LOD_i calculado chega-se ao LOD_i estimado. Ou seja, o menor nível de concentração da curva que apresentar o LOD_i calculado será assumido como LOD_i estimado.

Multiplicando-se o valor do LOD_i estimado pelo fator do método de extração (235,29), obteve-se o valor estimado do LOD_m ($\mu\text{g kg}^{-1}$).

A partir do LOD_i estimado aplicando-se a equação 4, obteve-se o valor do LOQ_i (ng mL^{-1}).

$$\text{LOQ}_i (\text{ng mL}^{-1}) = \text{LOD}_i \times 3,33 \quad (4)$$

Por último, multiplicando-se o LOQ_i pelo fator do método de extração, obteve-se o valor do LOQ_m ($\mu\text{g kg}^{-1}$).

3.8.4 Ensaio de fortificação e recuperação

A fim de avaliar a exatidão do método foram realizados ensaios de fortificação e recuperação.

Os níveis de fortificação avaliados foram de 2, 10 e 50 mg kg^{-1} .

A amostra “branco” da biomistura foi fortificada com clorpirifós a partir de uma solução 1000 mg L^{-1} , para as concentrações 10 e 50 mg kg^{-1} e 100 mg kg^{-1} para a concentração de 2 mg kg^{-1} (Tabela 1). Para cada nível de fortificação foram feitas sete replicatas incluindo a amostra “branco”, extraída sem a contaminação pelo agrotóxico.

Tabela 1 - Massa e volume do agrotóxico clorpirifós adicionado à matriz na etapa de fortificação, utilizando 5 g de amostra em 30 mL de solvente.

Concentração da solução (mg L ⁻¹)	Volume adicionado da solução (μL)	Nível de fortificação (mg Kg ⁻¹)	Massa absoluta do agrotóxico adicionado à amostra (mg)	Concentração do agrotóxico antes da injeção (ng mL ⁻¹)
100	100	2	0,01	8,5
1000	50	10	0,05	42,5
1000	250	50	0,025	212,5

3.8.5 Precisão intermediária

A precisão intermediária foi utilizada para avaliar a repetitividade do método analítico. Os ensaios de fortificação e extração foram feitos em dias distintos por analistas distintos e foram calculadas as médias dos percentuais de recuperação das sete replicatas para cada analista. Posteriormente, foram calculadas as médias para os resultados dos dois analistas, em cada nível de concentração (fortificação) e calculado o desvio padrão e RSD% em cada concentração.

3.9 Análise das amostras reais

As amostras contaminadas, provenientes dos reatores 2 ao 5 compostos por biomistura, bem como os reatores 6 e 7 compostos com latossolo e por fim os reatores 8 e 9 compostos por nitossolo, foram submetidas ao mesmo procedimento analítico da amostra “branco”, descrito no organograma da Figura 9.

4 RESULTADOS E DISCUSSÕES

4.1 Otimização do procedimento de extração

As amostras (em triplicata) foram fortificadas em níveis de 10 mg kg⁻¹ e submetidas a três experimentos diferentes, conforme descrito no item 3.7. Os resultados estão apresentados na tabela 2.

Tabela 2 – Recuperação média e desvio padrão relativo (RSD) para os experimentos 1, 2 e 3 (n=3) para amostras fortificadas com clorpirifós a 10 mg kg⁻¹.

	Experimento 1 (agitação mecânica)	Experimento 2 (<i>ultraturrax</i>)	Experimento 3 (ultrassom)		
			0 minutos	10 minutos	20 minutos
Recuperação (%)	42,9	99,2	97,9	103,1	107,6
RSD (%)	2,1	1,7	2,8	4,6	0,3

Para o experimento 1 não foram obtidas taxas de recuperação satisfatórias utilizando agitação em mesa (2 h).

No experimento 2 utilizando sistema de homogeneização *ultraturrax* por 1 min. foi observada uma melhora considerável nas taxas de recuperação. Além disso, essa opção reduziu consideravelmente o tempo total da análise, já que não foi necessária agitação por 2 h.

Com relação à aplicação de ultrassom (experimento 3), representado na figura 8, mostra os resultados das recuperações obtidas para as amostras submetidas a 10 e 20 minutos de ultrassom e para as amostras livres desta radiação. Ao avaliar o emprego do ultrassom, optou-se por retirar esta etapa do procedimento tendo em vista os que os resultados dos testes de recuperação não demonstraram diferença considerável. Cabe salientar que não foram estudados os efeitos de parâmetros do ultrassom que poderiam influenciar na eficiência dos resultados, tais como potência, frequência e tipos de ultrassom (sonda ou banho).

Todos os resultados demonstraram recuperação e RSD% dentro da faixa aceitável, desta forma, optou-se por não fazer o uso do ultrassom o que implica na redução do tempo de análise.

4.2 Validação do método

4.2.1 Curva analítica e linearidade

Como apresentado na tabela 3, os valores de coeficiente de determinação (r^2) foram satisfatórios tanto para soluções em solvente, quanto para soluções em extrato de matriz, demonstrando que o método é linear para a faixa estudada (0,1 a 250 ng mL⁻¹).

No momento em que os dados são gerados, passam para uma tabela do Excel com os seguintes métodos estatísticos, já inseridos: *Grubbs*, teste F e teste T. O primeiro, recomendado pelas normas ISO 5725- 3 e ISO 5725-2, faz a verificação da ausência de valores discrepantes. Os testes F e T, por sua vez avaliam a dispersão dos dados e verifica-se se há diferença entre uma amostra e uma média populacional, respectivamente.

Tabela 3 - Dados de linearidade para o clorpirifós, a partir de soluções preparadas em solvente orgânico e em extrato de matriz.

Soluções em extrato de matriz			Soluções em solvente orgânico		
Faixa Linear (ng mL ⁻¹)	r^2	Equação da curva	Faixa Linear (ng mL ⁻¹)	r^2	Equação da curva
0,1 – 250	0,995	$y=6767 x - 2255$	0,1 - 250	0,990	$y=6759 x - 969$

4.2.2 Avaliação do efeito matriz

Quando há um aumento ou um decréscimo na resposta do detector para um analito presente no extrato da matriz, em comparação com a resposta do detector para o analito em solvente orgânico, diz-se que há um efeito matriz (PIZZUTTI, 2006).

Para a avaliação do efeito matriz, bem como da seletividade, foram comparadas as curvas analíticas obtidas em solvente orgânico e em extrato de matriz. Quando comparadas as sete concentrações da curva (

Figura 10), em solvente orgânico e extrato de matriz, percebe-se um pequeno efeito matriz. Já quando comparados os quatro primeiros níveis de concentração (Figura 11) observa-se um efeito matriz um pouco mais pronunciado, em função da baixa concentração em que se trabalha.

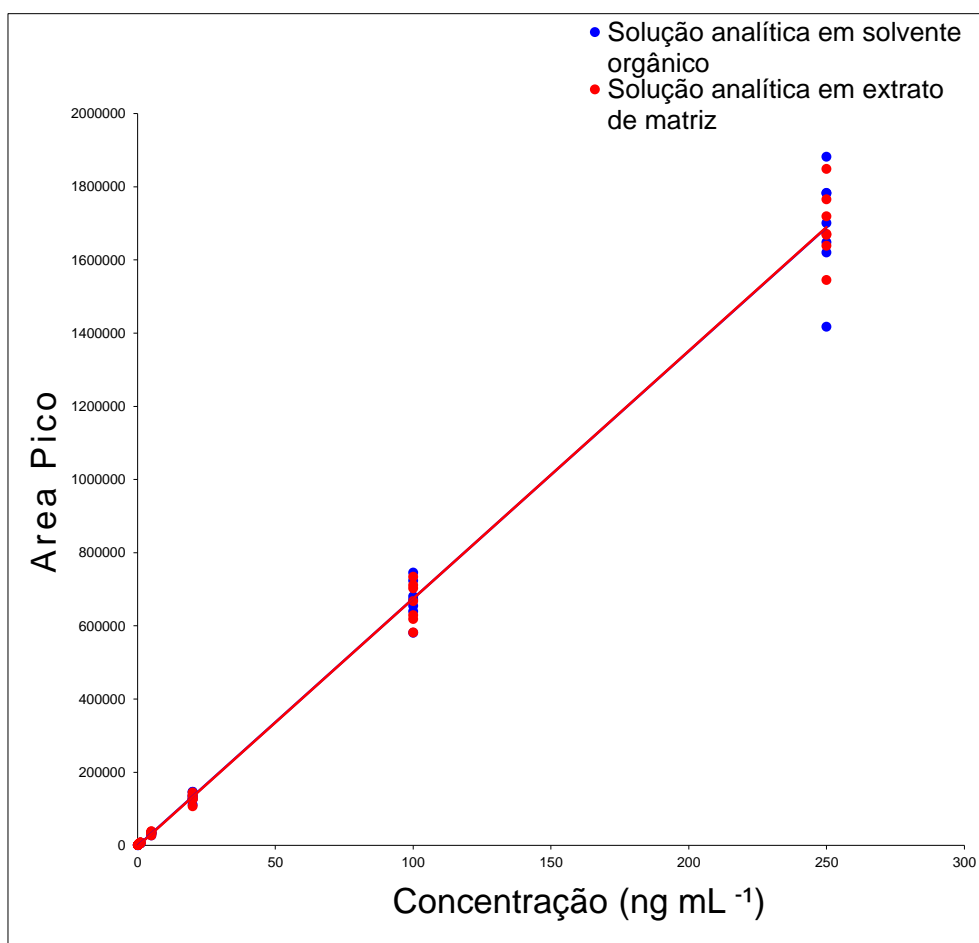


Figura 10 - Comparação das curvas analíticas em solvente orgânico e extrato de matriz.

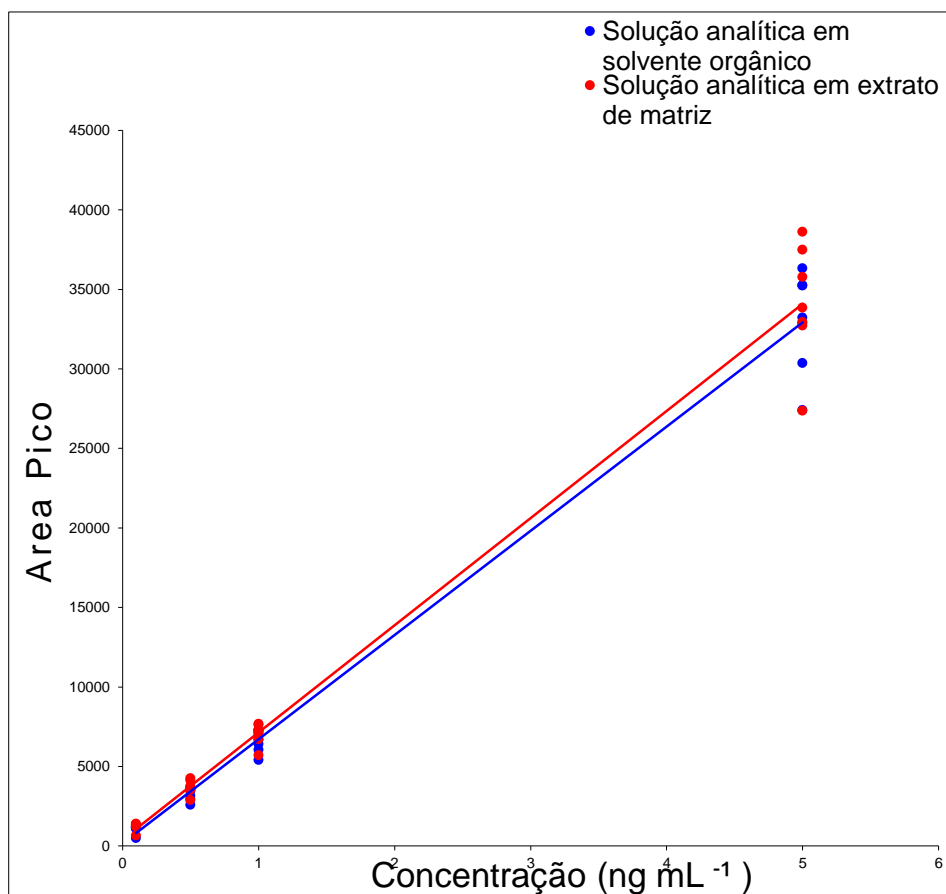


Figura 11 - Comparação entre os quatro primeiros níveis de concentração da curva analítica, em solvente orgânico e em extrato de matriz. (0,1 a 5 ng mL⁻¹)

A tabela 4 mostra a relação nível de fortificação e o respectivo efeito matriz.

Tabela 4 - Efeito matriz para clorpirifós em cada nível de concentração estudado nas curvas analíticas.

Concentração (ng mL ⁻¹)	Efeito Matriz (%)
0,1	15
0,5	14
1	7
5	4
20	-3
100	-1
250	0
Média	5

Ainda que seja observado um efeito matriz, a partir das figuras 10 e 11, de acordo com SANTE (2015) os resultados com efeito matriz entre +20% e -20% são considerados aceitáveis para análises de contaminantes em nível de traços.

O Anexo 1 apresenta os cromatogramas no modo de varredura MRM (*Multiple Reactions Monitoring*) obtidos nas transições de quantificação (350,1>97,0) e confirmação (350,1>197,9) para o agrotóxico clorpirifós (no modo ESI positivo), para solução padrão preparada em extrato branco da matriz (biomistura) e em solvente a 250 ng mL⁻¹ e também para amostra “branco” da biomistura a 2, 10 e 50 mg kg⁻¹. A semelhança na intensidade do sinal, nos cromatogramas obtidos a partir de uma solução padrão em extrato branco da matriz (A) e m solvente (B) mostra a pouca influência de efeito matriz. Também se observa a ausência de interferentes na análise cromatográfica.

4.2.3 Limite de detecção (LOD) e limite de quantificação (LOQ)

A Tabela 5 mostra os valores de LOD_i calculado e estimado para os quatro primeiros níveis de concentração da curva analítica. O LOD_i calculado é obtido a partir da equação 3 (item 3.8.3), levando em conta o RSD das sete replicatas para cada nível de concentração.

Tabela 5 - Valores calculados e estimados de limites de detecção do instrumento (LOD_i), a partir das soluções analíticas em solvente orgânico e em extrato de matriz.

Concentração	0,1 ng mL ⁻¹		0,5 ng mL ⁻¹		1 ng mL ⁻¹		5 ng mL ⁻¹	
	solvente	matriz	solvente	matriz	solvente	matriz	solvente	matriz
Curvas								
RSD %	24	21	13	13	10	10	10	11
LOD_i calculado	0,07	0,06	0,19	0,2	0,31	0,29	1,13	1,64
LOD_i estimado	0,1	0,1	0,5	0,5	1	1	5	5

Se o valor do LOD_i calculado for menor que o valor da concentração naquele nível estudado, assume-se essa concentração como sendo o LOD_i estimado. Neste caso o LOD_i estimado é de 0,1 ng mL⁻¹ para a curva em solvente e o mesmo valor para curva em extrato da matriz visto o baixo efeito da matriz sobre o analito.

A tabela 6 mostra os valores estimados para LOD_m, LOQ_i e LOQ_m a partir do LOD_i estimado para as curvas em solvente orgânico e em extrato da matriz.

Tabela 6 - Valores estimados para limite de detecção do método (LOD_m), limite de quantificação do instrumento (LOQ_i), e limite de quantificação para o método (LOQ_m) para curva em solvente orgânico e extrato da matriz, a partir do limite de detecção estimado do instrumento (LOD_i).

Solvente	LOD_i (ng mL⁻¹)	LOD_m (mg kg⁻¹)	LOQ_i (ng mL⁻¹)	LOQ_m (mg kg⁻¹)
Solvente orgânico	0,1	0,02	0,3	0,07
Extrato da matriz	0,1	0,02	0,3	0,07

Poucos são os estudos para clorpirifós em biomisturas, na literatura. VISCHETTI et al. (2008) obteve LOD de 30 µg kg⁻¹ (0,03 mg kg⁻¹) para clorpirifós. No entanto o uso de grandes volumes de solventes extratores e o relativo longo tempo de agitação torna este procedimento demorado para ser usado em análises de rotina, bem como, gera grande volume de resíduos por análise.

Os demais estudos citados neste trabalho não abordam valores desta figura de mérito na matriz biomistura.

4.2.4 Ensaio de fortificação e recuperação

O critério de aceitação para os ensaios de fortificação é que os valores de recuperação estejam compreendidos na faixa de 70 a 120% com um RSD abaixo de 20%. (SANTE, 2015). Os resultados obtidos no ensaio de fortificação obedecem estes requisitos.

O LOQ real é aquele que apresenta valor de recuperação e RSD% dentro dos parâmetros aceitáveis. Neste caso a concentração de 2 mg kg⁻¹ foi o nível de

concentração mais baixo estudado que apresentou resultados satisfatórios (tabela 7).

Tabela 7 - Taxas de recuperação e desvio padrão relativo (RSD) para clorpirifós relativo aos três níveis de fortificação

Nível de fortificação (mg kg ⁻¹)					
2		10		50	
Rec. (%)	RSD (%)	Rec. (%)	RSD (%)	Rec. (%)	RSD (%)
115,0	8,5	100,0	3,2	96,0	5,1

Os estudos na literatura, que apresentam valores de LOQm em relação à determinação clorpirifós em camas biológicas, são limitados. Embora Fait et al. (2007) e Vischetti et al. (2008) tenham reportado resultados satisfatórios de LOQm, ambos os procedimentos utilizam elevado volume de solvente (100 mL e 80 mL, respectivamente), o que eleva o custo da análise e gera grandes volumes de resíduos a serem descartados.

Outros métodos para determinação de clorpirifos tem sido propostos, com valores satisfatórios de recuperação (%) e RSD (Fogg et al, 2004;. Omirou et al, 2012;. Coppola et al, 2007; Fernández-Alberti et al, 2012). No entanto, estes métodos utilizam métodos de extração demorados, tornando os processos inadequados para análises de rotina. Fogg et al. (2004) propôs um método para a determinação de clorpirifos utilizando 1 hora de agitação e o método desenvolvido por Omirou et al. (2012) utilizou um tempo de agitação de mais 90 min. Coppola et al. (2007) e Fernandez-Alberti et al. (2012) utilizaram um volume de solvente de extração semelhante ao utilizado no método proposto neste trabalho (30 mL de acetona), no entanto, Coppola et al. (2007) aplicou agitação mecânica durante toda a noite, no procedimento de extração, enquanto Fernández-Alberti et al. (2012) utilizou 2 horas de agitação mecânica mais um adicional de 30 minutos de ultrassom. De um modo geral, em todos os métodos descritos na literatura, os tempos de agitação tornam o processo relativamente demorado quando comparado à metodologia proposta.

4.2.5 Precisão intermediária

Ao avaliar a precisão intermediária (tabela 8) observou-se um RSD% que variou de 1,8 a 4,1 entre os resultados, indicando que não há diferença considerável de resultados entre os ensaios realizados sob mesmas condições, variando-se o analista.

Tabela 8 - Precisão intermediária estudada a partir de testes feitos por dois analistas, sob as mesmas condições de análise.

Concentração (mg kg ⁻¹)	Média das recuperações % (n=7)		RSD (%)
	Analista 1	Analista 2	
2	115	118	1,8
10	100	106	4,1
50	96	101	3,6

4.3 Análise das amostras reais

A simulação de derrame acidental foi feita nos reatores 2 e 3 (contendo biomistura) em uma única aplicação de 1 L (reatores 2A e 2B) e 0,5 L (reatores 3A e 3B) de Lorsban®, em dezembro de 2013, com o ativo clorpirifós na concentração de 480g/L. Os resultados das análises (n=3 para cada amostra) são apresentados na tabela 9.

Tabela 9 - Concentração de clorpirifós na cama biológica, em cinco diferentes tempos de coleta, após simulação de derrame acidental com Lorsban®.

Reator	Concentração de clorpirifós (mg kg ⁻¹)/RSD%				
	T1	T2	T3	T4	T5
2 A	370,0/6,5	572,5/2,0	234,6/6,8	143,4/7,8	47,6/19,7
2 B	552,7/4,3	446,2/5,3	425,2/14,3	498,7/3,9	15,9/20,2
3 A	403,3/2,8	163,6/5,7	274,4/8,0	<LOQm/16,2	347,7/9,0
3 B	468,2/11,7	468,4/2,8	446,1/6,4	215,7/25,6	43,5/6,9

LOQm real: Limite de quantificação do método (2 mg kg⁻¹)

Para os reatores 2A, 2B e 3B, nos tempos de coleta T1 e T5, as concentrações de clorpirifós diminuíram, demonstrando que a degradação do

agrotóxico ocorreu em algum estágio entre a aplicação e a coleta final (Fevereiro de 2014).

O gráfico apresentado no apêndice 2 mostra a variação da concentração ao longo do tempo. Observa-se certa estabilidade na concentração do agrotóxico até mais ou menos 100 dias e a partir daí observa-se um decaimento exponencial na concentração do produto. O intervalo de confiança mostra que os dados apresentam uma boa confiabilidade estatística, uma vez que apenas 4 pontos de toda a quantidade de dados se localizam fora do intervalo de confiança de 95%, demonstrado pelas linhas azuis.

Considerando todos os momentos de coleta, foram detectados valores discrepantes (em itálico) de concentração de clorpirifós: T2 para o reator 2A e T4 para o reator 2B. As amostras analisadas são amostras de campo, desta forma o procedimento de coleta adotado pode ter influenciado na quantidade de agrotóxico encontrada. Os reatores utilizados são reatores de leito seco, para os quais não se pode garantir uma mistura homogênea. Isto significa que torrões podem estar presentes na biomistura que compõe a cama biológica. Desta forma, em um determinado momento do procedimento de coleta, podem ter sido coletadas amostras com torrões sem (ou com pouco) resíduo do agrotóxico, enquanto que em outro momento, amostras contendo alta concentração de produto.

Curiosamente, as concentrações de clorpirifós para amostras do reator 3A não diminuíram ao longo do tempo de coleta. Acredita-se que amostras a partir deste reator poderiam conter um torrão de turfa (ou solo), com uma grande quantidade de agrotóxico adsorvido durante a simulação do derrame acidental. Na verdade, falhas no procedimento de homogeneização da turfa ou do solo poderiam produzir torrões com, grande uma grande quantidade do agrotóxico adsorvido durante o procedimento de simulação do derrame. Isso poderia explicar os resultados inconsistentes encontrados entre os tempos de coleta e entre as duplicatas. Em relação aos valores de RSD ($n = 7$ para cada amostra analisada), 90% estão de acordo com o limite recomendado. O uso de camas biológicas no Brasil é relativamente novo, assim, é importante considerar que os processos de construção da cama biológica e de amostragem podem requerer ajustes.

Os reatores 4 e 5 (contendo biomistura), os reatores 6 e 7 (contendo latossolo) e os reatores 8 e 9 (contendo nitossolo) foram submetidos à aplicação de

solução diluída de Lorsban® (250 mL/100 L). Os resultados são apresentados na Tabela 10.

Tabela 10 - Concentrações de clorpirifós, utilizando soluções diluídas, em diferentes tempos de coleta, para biomistura (reatores 4 e 5), latossolo (reatores 6 e 7) e nitossolo (reatores 8 e 9).

Reator	Concentração de clorpirifós (mg kg ⁻¹)/RSD%				
	T1	T2	T3	T4	T5
4 A	4,9/16,0	2,4/16,7	<LOQm /48,6	<LOQm /8,0	<LOQm /9,4
4 B	3,4/19,0	<LOQm /41,3	2,3/19,4	3,5/8,8	<LOQm /17,3
5 A	2,8/6,0	<LOQm /5,8	<LOQm /46,7	<LOQm /12,1	<LOQm /52,3
5 B	<LOQm/42,6	<LOQm /17,4	<LOQm /21,1	<LOQm /36,3	<LOQm /32,0
6 A	2,5/12,4	<LOQm /8,3	<LOQm /16,6	<LOQm /7,9	<LOQm /7,5
6 B	2,0/8,9	<LOQm /9,6	<LOQm /20,3	<LOQm 10,4	<LOQm /27,1
7 A	4,7/9,6	2,8/5,3	2,4/17,0	<LOQm /0,8	<LOQm /19,9
7 B	3,9/18,7	2,9/2,6	<LOQm/15,1	2,2/12,2	<LOQm/9,9
8 A	<LOQm/13,7	2,1/9,6	<LOQm/48,3	44,2/1,0	<LOQm/0,0
8 B	5,9/17,9	<LOQm/36,2	<LOQm/33,7	<LOQm/8,4	<LOQm/13,9
9 A	2,3/13,6	3,5/24,8	<LOQm/17,1	<LOQm/17,3	<LOQm/31,5
9 B	<LOQm/6,3	<LOQm/5,0	<LOQm/19,9	<LOQm/5,3	<LOQm/34,6

Observam-se valores discrepantes de concentração de Lorsban® nas três composições da cama biológica, além de inconsistência entre os valores das duplicatas. Mesmo assim, a degradação do agrotóxico foi bem sucedida, uma vez que em T5 (tempo de coleta final) todos os valores obtidos estão abaixo do LOQm (2 mg kg⁻¹). A Figura 12 exhibe graficamente os dados exibidos na tabela 10, demonstrando a degradação de uma solução diluída de clorpirifós.

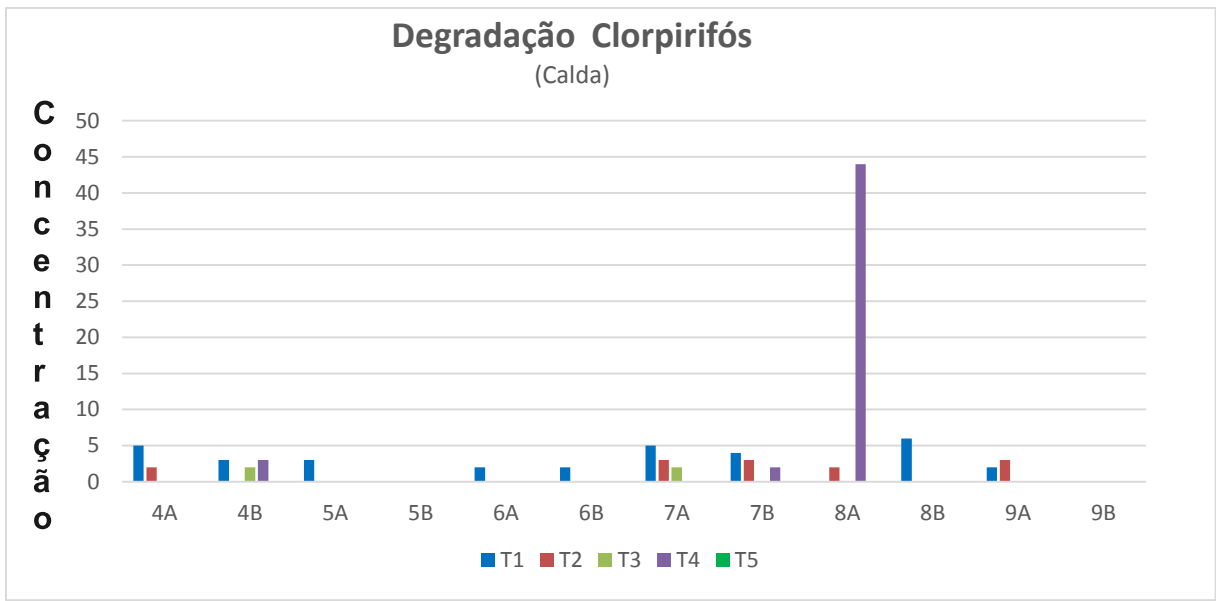


Figura 12- Degradação da solução diluída de clorpirifós

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A ausência de estudos publicados sobre a determinação de resíduos de agrotóxicos em camas biológicas desenvolvidas no Brasil outorga a este trabalho um mérito importante e evidente, não somente pela complexidade da matriz quanto pela necessidade de desenvolver e validar métodos analíticos para tais matrizes.

O método analítico proposto neste estudo foi validado para a determinação de clorpirifós em biobeds por UPLC-MS/MS. O LOQm real foi de 2 mg kg⁻¹ e o efeito matriz observado foi inferior a $\pm 20\%$, o que demonstra não haver supressão ou aumento considerável no sinal do analito na matriz estudada. Além disso, o método usa um baixo volume de solvente de extração em comparação com a maioria dos métodos existentes para camas biológicas ou matrizes semelhantes. Esta é uma vantagem que não pode ser subestimada, visto que quanto maior o consumo de solventes orgânicos, maior o custo da análise e do procedimento para o tratamento e descarte corretos dos resíduos gerados ao final da análise. A homogeneização das amostras antes da análise produziu excelentes resultados nos ensaios de recuperação, bem como diminuiu consideravelmente o tempo de análise, o que torna este método atrativo para análises de rotina. Valores de recuperação entre 96 e 115% com um RSD inferior a 20% foram obtidos para as amostras fortificadas com cada uma das três concentrações de clorpirifós estudadas.

O sistema de cama biológica foi eficiente na degradação do agrotóxico clorpirifós em ambas as condições experimentais: na simulação de um derrame acidental do agrotóxico e na aplicação de solução diluída proveniente da lavagem de máquinas agrícolas.

Não há Limite Máximo de Resíduos (LMR) estabelecido no Brasil para resíduos de clorpirifós em camas biológicas, bem como não há dados de monitoramento disponíveis. Essa realidade mostra a importância do estudo para o desenvolvimento de métodos analíticos qualificados para determinação de agrotóxicos e como contribuição para a implementação da tecnologia de camas biológicas no Brasil.

6 DESTINAÇÃO DOS RESÍDUOS GERADOS

Durante este trabalho foram gerados resíduos líquidos e resíduos sólidos. Os líquidos foram armazenados em frascos identificados como halogenados, não-halogenados e resíduos de acetona, enquanto que os resíduos sólidos foram colocados em sacos plásticos, devidamente identificados.

Todos resíduos recolhidos foram encaminhados ao setor de coleta de resíduos do Departamento de Química e a destinação final ficou sob responsabilidade de empresa terceirizada.

7 TRABALHOS FUTUROS

A introdução da tecnologia de biocama em um novo país exige a adaptação da composição e estrutura do sistema às necessidades específicas do país. Assim, acredita-se que a otimização da metodologia de coleta a campo, onde se estabelecerá um número mínimo de pontos e volume de coleta, de forma a minimizar a influência da falta de homogeneidade na biomistura, possa ser uma indicação para estudos futuros.

A possível contaminação ambiental por lixiviação da biomistura, em caso de excesso de água da chuva no reator, é outra questão que pode promover estudos subsequentes.

A figura 13, ilustra o mecanismo de degradação do clorpirifós em seus subprodutos, o 3,5,6-tricloro-2-piridinol (TCP) e o desetil clorpirifós. (SILVEIRA, 2012). O TCP apresenta alta solubilidade em água, quando comparado ao clorpirifós, provocando a contaminação generalizada nos solos e no ambiente aquático, sendo tóxico a muitas espécies de peixes. Na degradação do clorpirifós por microorganismos o TCP prejudica o rendimento, pois possui alta atividade microbiana. Desta forma, o desenvolvimento de um método de análise que inclua a determinação dos subprodutos do clorpirifós pode ser uma opção para estudos futuros.

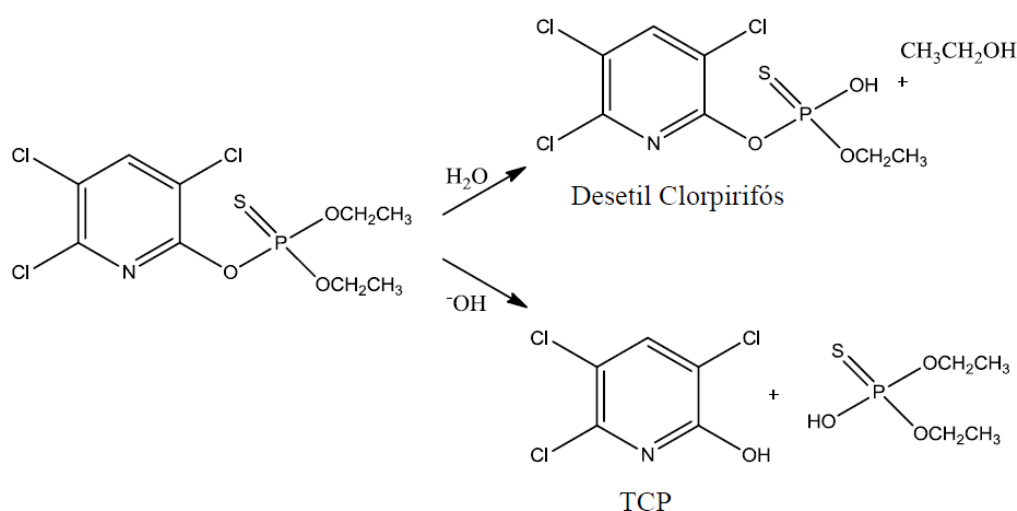


Figura 13 - - Mecanismo de degradação do clorpirifós
Fonte: (SILVEIRA, 2012)

8 REFERÊNCIAS

AGENCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA). Resolução RDC nº 206, Ago. 2004. **Monografia de produtos agrotóxicos**. Disponível em: <<http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/b822400047458d519692d63fbc4c6735/C20++Clorpirif%C3%B3s.pdf?MOD=AJPERES>> , Acesso em: 10 set. 2014.

BARBOSA, L. C. A. **Os agrotóxicos, o homem e o meio ambiente**. Minas Gerais: Ed. UFV, 2004.

BARTH, V. G.; BIAZON, A. C. B. **Complicações decorrentes da intoxicação por organofosforados**. SaBios: Rev. Saúde e Biol., v.5, n.2, p.27-33, jul./dez, 2010.

BOZIKI, D. ; SILVA, L. B.; PRINTES, R. C. **Situação atual da utilização de agrotóxicos e destinação de embalagens na área de proteção ambiental estadual rota sol, Rio Grande De Sul Brasil**. Revista Vitas: Visões Transdisciplinares sobre Ambiente e Sociedade, Niterói- RJ, v. 1, n. 1, p.1-14, set. 2011.

BRAIBANTE, M. E. F.; ZAPPE, J.A. **A química dos agrotóxicos**, Química Nova na Escola, 2012.

BRANCO, S. M. **Natureza e agroquímicos**. 2. ed. São Paulo: Moderna, 2003.

BRASIL. Lei nº 7802, de 11 de julho de 1989. **Dispõe sobre a pesquisa, a experimentação, a produção, a embalagem e rotulagem, o transporte, o armazenamento, a comercialização, a propaganda comercial, a utilização, a importação, a exportação, o destino final dos resíduos e embalagens, o registro, a classificação, o controle, a inspeção e a fiscalização de agrotóxicos, seus componentes e afins, e dá outras providências**. Disponível em: <<http://www.mma.gov.br/port/conama/legiabre.cfm?codlegi=515>> . Acesso em: 25 maio 2016.

CABRERA, L.; COSTA F. P.; PRIMEL, E.G. **Estimativa de risco de contaminação das águas por agrotóxicos na região sul do Estado do RS**. Química Nova, v. 31, p. 1982 – 1986, 2008.

CARNIEL, L. S. C., **Avaliação do risco ecológico de Mancozebe e Clorpirifós para representantes da macro e mesofauna do solo e eficiência de leitões**

biológicos de descarte. Dissertação (Mestrado em ciência do solo) 140 p. UDESC, Lages, 2015.

CASTILLO, M. D. P. **Degradation of pesticides by *Phanerochaete chrysosporium* in Solid Substrate Fermentation.** Tese (Doutorado em ciências agrícolas), Swedish University of Agricultural Sciences, Acta Universitatis Agricultura, Suécia. 1997.

CASTILLO, M. D. P., ANDER, P. STENSTRÖM, J. **Lignin and manganese peroxidase activity in extracts from straw solid substrate fermentations.** Biotechnology Techniques. v.11, p. 701-706,1997.

CASTILLO, M. D. P., ANDER, P., STENSTRÖM, J. ,TORSTENSSON, L. **Degradation of the herbicide bentazon as related to enzyme production by *Phanerochaete chrysosporium* in a solid substrate fermentation system.** World Journal of Microbiology & Biotechnology. v.16, p. 289-295, 2000.

CASTILLO, M. D. P., TORSTENSSON, L., STENSTRÖM, J. **Biobeds for environmental protection from pesticide use: A review.** Journal of Agricultural and Food Chemistry v. 56, n.15, 2008.

CASTILLO, M. D. P., VON WIRÉN-LEHR, S., SCHEUNERT, I. &TORSTENSSON, L. **Degradation of isoproturon by the white rot fungus *Phanerochaete chrysosporium*.** Biology and Fertility of Soils. v. 33, p. 521-528. 2001.

COPPOLA, L., CASTILLO, M. D. P., MONACI, E. & VISCHETTI, C. **Adaptation of the biobed composition for chlorpyrifos degradation to southern Europe conditions.** Journal of Agricultural and Food Chemistry. v. 55, p. 396-401, 2007.

DE WILDE T., SPANOGHE P., RYCKEBOER J., JAEKEN P., SPRINGAEL D, **Transport and degradation of pesticides in a biopurification system undervariable flux, part II: a macrocosm study.** Environ Pollut v.158, p. 3317–3322, 2010.

Dow Agrosiences. **Lorsban 480 BR.** 2008. Disponível em <<http://www.dowagro.com/pt-br/brasil/product-finder/inseticidas/lorsban-480-br>> Acesso em: 25 mar. 2015.

EDWARDS, C. A. **Impact of herbicides on soil ecosystems.** Critical Reviews in Plant Science, London, v. 8, p. 221-257, 1989.

FAIT, G.; NICELLI, M.; FRAGOULIS, G.; TREVISAN, M.; CAPRI, E. **Reduction of point contamination sources of pesticide from a vineyard farm.** Environmental Science & Technology. v.41, p. 3302-3308, 2007.

FERNÁNDEZ-ALBERTI, S.; RUBILAR, O.; TORTELLA, G.R.; DIEZ M.C. **Chlorpyrifos degradation in a Biomix: Effect of pre-incubation and water holding capacity.** Journal of Soil Science and Plant Nutrition v. 12 (4), p. 785-799, 2012.

FERREIRA, A.P.; CUNHA, C.L.N.; WERMELINGER, E.D.; SOUZA, M.B.; LENZI, M.F.; MESQUITA, C.M.; JORGE, L.C. **Impactos de agrotóxicos na atividade microbiana do solo e sobre a saúde dos agricultores.** Revista Baiana de Saúde Pública, Salvador, v. 32, n. 2, p. 309-321, 2006.

FERRER, A. **Intoxicación por plaguicidas.** Analesis San Navarra, Pamplona, supl1, v. 26, p.155-171, 2003.

FOGG, P. ; BOXALL, A. B. A. ; WALKER, A. ; JUKES, A. **Leaching pesticides from biobeds: effect of biobed depth and water loading.** Journal of Agricultural and Food Chemistry.v. 52, p. 6217-6227, 2004.

GARCIA P. M. ; AVINO E. S. ; VICENTE J.O. **Purification system for waste water coming from fruit and vegetable processing plants and phytosanitary treatments in the field.** United States Patent, US 6,709,585 B1, 2004 Disponível em<<http://www.patentbuddy.com/Patent/6709585>>Acesso em: 30 jun. 2014.

GEBLER, L.; PIZZUTTI, I. R.; CARDOSO, C. D.; FILHO, O. K.; MIQUELLUTI, D. J.; REGIS, S. S.; SANTOS, R. S. S. **Bioreactors to organize the disposal of phytosanitary effluents of Brazilian apple production.** Chemical Engineering Transactions. v. 43, 343-348. 2015.

GUERRA, M. S.; SAMPAIO, D. P. A. **Receituário Agrônomo.** Guia prático para a nova lei dos agrotóxicos. 2. ed. São Paulo: Ed. Globo, 1991.

IBAMA. **Produtos agrotóxicos e afins comercializados em 2009 no Brasil: Uma abordagem ambiental 2009.** Brasília: DIQUA/ CGASQ. Brasília: Ibama, 2009. Disponível em:<http://www.ibama.gov.br/phocadownload/Qualidade_Ambiental/produtos_agrotoxicos_comercializados_brasil_2009.pdf> . Acesso em: 27 mai. 2016.

INMETRO. **Orientação sobre validação de métodos analíticos, DOQ-CGCRE-008, 2011** <http://www.inmetro.gov.br/Sidoq/Arquivos/Cgcre/DOQ/DOQ-Cgcre-8_04.pdf>, Acesso em: 10 set. 2014.

JARDIM, I C. S. F.; ANDRADE, J. de A.; QUEIROZ, S. C. do N. de. **Resíduos de agrotóxicos em alimentos: uma preocupação ambiental global – um enfoque às maçãs**. Química Nova, Campinas, v. 32, n. 4, p. 997-1000, 2009.

JEREZ, M. C. D.; CIFUENTES, G. P.; QUIJADA, C. A.; MUÑOZ, G. B.; RAMÍREZ, C. C.; SÁNCHEZ, J. D.; ARANEDA, O. R.; FUENTES, G. T. **Manual de construcción y operación de lechos biológicos: manejo adecuado de residuos de plaguicidas em la producción frutícola de la Región de la Araucanía a través de la implementación y difusión de lechos biológicos**. Proyecto D09R1006. Universidad de La Frontera, Instituto de Agroindustria, Temuco, 2013. 124 p.

KARANASIOS, E.; TSIROPOULOS N. G.; KARPOUZAS G. **On-farm biopurification systems for the depuration of pesticide waste waters: recent biotechnological advances and future perspectives**. Biodegradation, v. 23, n. 6, Nov, 2012.

KLINGMAN, G. C.; ASHTON, F. M.; NOORDHOFF, L. J. **Weed Science: principle sandractices**. 2. ed. New York: John Wiley, 449 p. 1982.

LEITE, K. D. C.; TORRES, M. B. R. O uso de agrotóxicos pelos trabalhadores rurais dos assentamentos Catingueira Baraúna – RN. **Revista Verde de Agroecologia e Desenvolvimento Sustentável**. v. 03, n. 04, p. 06-28, 2008.

LUTZENBERGER, J. **Manual de Ecologia, do Jardim ao Poder: Vol I**, Porto Alegre: L&PM, 2004.

MARCELO, L. R., **Cinética e termodinâmica de sorção do inseticida clorpirifós em latossolo Vermelho- Amarelo**. 62 f. Dissertação (Mestrado em Agro Química) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2011.

MIZUBUTI, E. S. G.; MAFFIA, L.A. (Ed.). **Introdução a Fitopatologia**. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, p. 146-147. 2006.

MORAES, A. C. L. de. **Contribuição para o estudo das intoxicações por carbamatos: o caso do chumbinho no Rio de Janeiro**. 111 f. Dissertação (Mestrado em Saúde Pública) - Fundação Oswaldo Cruz, Escola Nacional de Saúde

Pública, Rio de Janeiro, 1999.

OMIROU, M., DALIAS, P., COSTA C., PAPASTEFANOU C., DADOS A., EHALIOTIS C., D.G. KARPOUZAS. **Exploring the potential of biobeds for the depuration of pesticide-contaminated wastewaters from the citrus production chain: Laboratory, column and field studies.** Environmental Pollution v.166 p.31 -39, 2012.

PENA, M. F.; AMARAL, E. H.; SPERLING, E. V.; CRUZ I. **Método para determinação de resíduos de clorpiripós em alface por cromatografia líquida de alta eficiência.** Pesticidas: R. Ecotoxicol. E Meio Ambiente, v. 13, 2003.

PETERS K. C. The Jena Bios Fungal Biobed: successful **elimination of pesticides supported by fungal activity.** 2nd European Biobed Workshop, Dez 11–12, Belgica, p 4, 2007.

PIZZUTTI, I. R. **Validação de métodos multirresíduo de extração e desenvolvimento de método de purificação por GPC para análise de resíduos de pesticidas em soja utilizando GC-MS, GC-MS/MS e LC-MS/MS.** Tese (Doutorado em Química) 297 p. UFSM, Santa Maria, 2006.

PIZZUTTI, I. R.; KOK, A.; HIEMSTRA, M. , WICKERT, C. ; PRESTES, O. D.; **Method validation and comparison of acetonitrile and acetone extraction for** RACKE, K. D.; STEELE, K. P.; YODER, R. N.; DICK, W. A.; AVIDOV, E. **Factors affecting the hydrolytic degradation of chlorpyrifos in soil.** J. Agric. Food. Chem. 44, 1582-1592, 1996.

RIBANI, Marcelo et al. **Validação de Métodos Cromatográficos e Eletroforéticos.** Química Nova, Campinas, SP, v. 27, n. 5, p. 771-780, jun. 2004.
RIBAS, P. P.; MATSUMURA, A. T. S. **A química dos agrotóxicos: impacto sobre a saúde e meio ambiente.** Revista Liberato, Novo Hamburgo, v. 10, n. 14, p.149-158, dez. 2009.

RIBEIRO, M.L.; LOURENCETTI, C.; PEREIRA, S.Y.; MARCHI, M.R.R. **Contaminação de águas subterrâneas por agrotóxicos: avaliação preliminar.** Química Nova, São Paulo, SP, v. 30, n. 3, p. 688-694, 2007.

SANTE, **Guidance document on analytical quality control and validation procedures for pesticide residues analysis in food and feed.** Document No. SANTE/11945/2015.

SIGMA-ALDRICH CORPORATION, 2015. Disponível em <<http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/fluka/45395?lang=pt®ion=BR>> Acesso em: 02 ago. 2015.

SILVA, N. A. **Biodegradação dos pesticidas clorpirifós, metil paration e profenofós por fungos de origem marinha.** 159 f. Dissertação (Mestrado em Química) - Universidade de São Paulo, São Carlos, 2013.

SILVERIRA, T. M. **Estudo comparativo de métodos de análise para determinação de clorpirifós em águas da zona rural de Ouro Branco/MG, empregando planejamentos experimentais multivariados.** 89f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Ambiental) Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto, 2012.

SOARES, W. L. **Uso de agrotóxicos e seus impactos à saúde e ao meio ambiente: uma avaliação integrada entre a economia, a saúde, a ecologia e a agricultura.** Tese (Doutorado em Saúde Pública e Meio Ambiente) – Escola Nacional de Saúde Pública Sérgio Arouca. Rio de Janeiro, 2010.

SOUZA, T. D. **Remoção do Inseticida Clorpirifós em Sistemas Alagados Construídos Cultivados com Diferentes Espécies Vegetais.** 72 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Agrícola) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2013.

TEIXEIRA, J. C. A modernização da agricultura no Brasil: Impactos Econômicos, Sociais e Ambientais. **Revista Eletrônica da Associação dos Geógrafos do Brasil.** v. 02, n. 02, ano 2, p. 21-42, 2005.

the analysis of 169 pesticides in soya grain by liquid chromatography–tandem mass spectrometry. Journal of Chromatography A, v. 1216, 2009

TORSTENSSON, L. & CASTILLO, M.D.P. **Use of biobeds in Sweden to minimize environmental spill ages from agricultural spray equipment.** Pesticide Outlook. 8, 24-27. 1997.

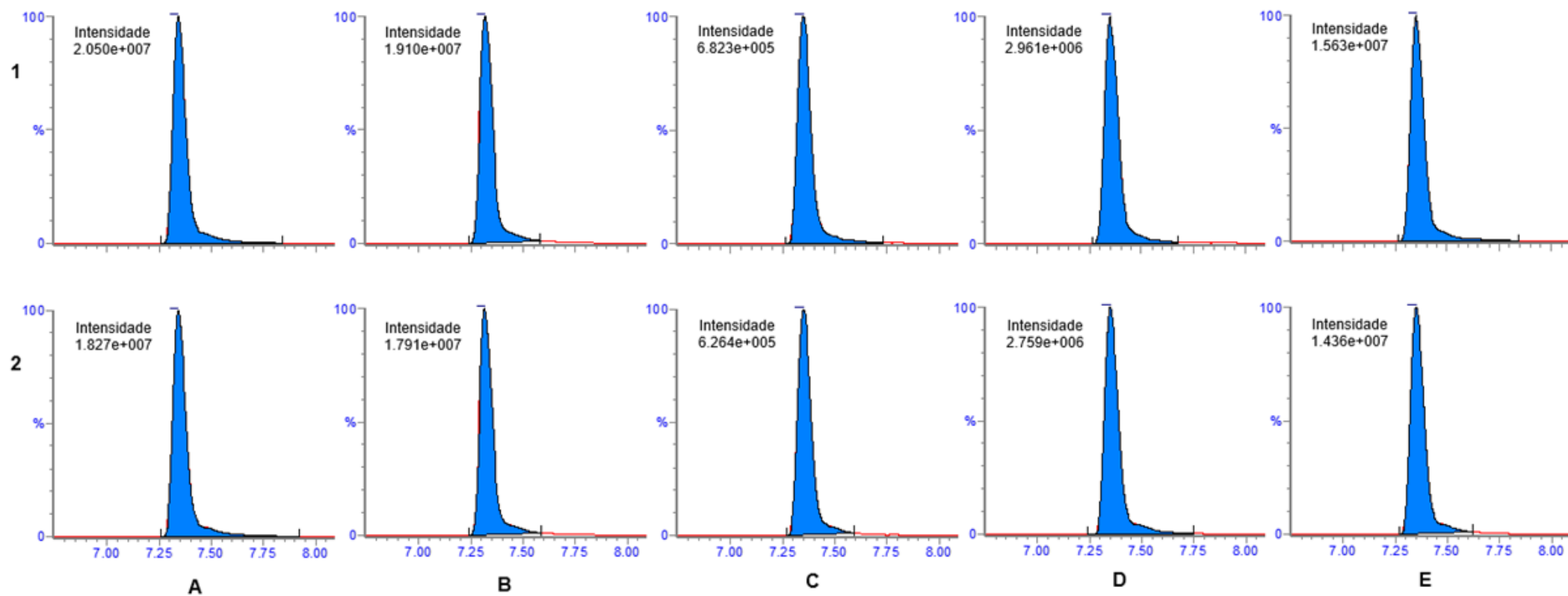
TORSTENSSON, L., **Experiences of biobeds in practical use in Sweden.** Pesticide Outlook. 11, 206-212, 2000.

UNSWORTH, J., History Of Pesticide Use. IUPAC-International Union Of Pure And Applied Chemistry, Mai 2010 Disponível em <http://agrochemicals.iupac.org/index.php?option=com_sobi2&sobi2task=sobi2details&catid=3&sobi2id=31> Acesso em: 29 mai. 2014.

VISCHETTI, C.; MONACI, E.; CARDINALI, A.; PERUCCI, P. **The effect of initial concentration, co-application and repeated applications on pesticide degradation in a biobed mixture.** Chemosphere. v. 72, p. 1739-1743, 2008.

VON WIRÉN-LEHR, S., CASTILLO, M. D. P., TORSTENSSON, L. SCHEUNERT, I. **Degradation of isoproturon in biobeds.** Biology and Fertility of Soils. 33, 535-540, 200.

ANEXO 1: Cromatogramas MRM para clorpirifós (Tempo de retenção: 7,34): (1) Transição de quantificação (350,1>97,0) e (2) transição de confirmação (350,1>197,9) obtido por UPLC-MS/MS ESI operando em modo positivo. (A) Solução padrão preparada em extrato branco de matriz e (B) em solvente a 250 ng mL⁻¹. Amostra branco biobed fortificada a (C) 2 mg kg⁻¹, (D) 10 mg kg⁻¹ e (E) 50 mg kg⁻¹.



APÊNDICE 1 - Sequência de injeções para a avaliação da linearidade, onde BS: “branco” em solvente (metanol), BM: “branco” da matriz (extrato de biomistura), PS: padrão em solvente (metanol) - concentração em ng mL⁻¹ e PM: padrão em extrato da matriz (biomistura) – concentração em ng mL⁻¹.

1	BS
2	BM
3	PS - 0,1
4	PM - 0,1
5	PS - 0,5
6	PM - 0,5
7	PS - 1
8	PM - 1
9	PS - 5
10	PM - 5
11	PS - 20
12	PM - 20
13	PS - 100
14	PM - 100
15	PS - 250
16	PM - 250

17	BS
18	BM
19	PS - 0,1
20	PM - 0,1
21	PS - 0,5
22	PM - 0,5
23	PS - 1
24	PM - 1
25	PS - 5
26	PM - 5
27	PS - 20
28	PM - 20
29	PS - 100
30	PM - 100
31	PS - 250
32	PM - 250

33	BS
34	BM
35	PS - 0,1
36	PM - 0,1
37	PS - 0,5
38	PM - 0,5
39	PS - 1
40	PM - 1
41	PS - 5
42	PM - 5
43	PS - 20
44	PM - 20
45	PS - 100
46	PM - 100
47	PS - 250
48	PM - 250

49	BS
50	BM
51	PS - 0,1
52	PM - 0,1
53	PS - 0,5
54	PM - 0,5
55	PS - 1
56	PM - 1
57	PS - 5
58	PM - 5
59	PS - 20
60	PM - 20
61	PS - 100
62	PM - 100
63	PS - 250
64	PM - 250

65	BS
66	BM
67	PS - 0,1
68	PM - 0,1
69	PS - 0,5
70	PM - 0,5
71	PS - 1
72	PM - 1
73	PS - 5
74	PM - 5
75	PS - 20
76	PM - 20
77	PS - 100
78	PM - 100
79	PS - 250
80	PM - 250

81	BS
82	BM
83	PS - 0,1
84	PM - 0,1
85	PS - 0,5
86	PM - 0,5
87	PS - 1
88	PM - 1
89	PS - 5
90	PM - 5
91	PS - 20
92	PM - 20
93	PS - 100
94	PM - 100
95	PS - 250
96	PM - 250

97	BS
98	BM
99	PS - 0,1
100	PM - 0,1
101	PS - 0,5
102	PM - 0,5
103	PS - 1
104	PM - 1
105	PS - 5
106	PM - 5
107	PS - 20
108	PM - 20
109	PS - 100
110	PM - 100
111	PS - 250
112	PM - 250

Apêndice 2 – Gráfico em escala logarítmica relativo aos reatores 2A, 2B, 3A e 3B (tabela 9).

