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

ESTUDO DE MÉTODOS EMPREGANDO HPLC-DAD E LC-MS/MS PARA DETERMINAÇÃO DE RESÍDUOS DE HERBICIDAS EM ÁGUA E SOLO DO CULTIVO DE ARROZ IRRIGADO

TESE DE DOUTORADO

Fábio Ferreira Gonçalves

Santa Maria - RS, Brasil
2007

ESTUDO DE MÉTODOS EMPREGANDO HPLC-DAD E LC-MS/MS PARA A DETERMINAÇÃO DE RESÍDUOS DE HERBICIDAS EM ÁGUA E SOLO DO CULTIVO DE ARROZ IRRIGADO

por

Fábio Ferreira Gonçalves

Tese apresentada ao 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 **DOUTOR EM QUÍMICA**

Orientador: Renato Zanella

Santa Maria – RS, Brasil

2007

Universidade Federal de Santa Maria
Centro de Ciências Naturais e Exatas
Programa de Pós-Graduação em Química

A Comissão Examinadora, abaixo assinada,
aprova a Tese de Doutorado

ESTUDO DE MÉTODOS EMPREGANDO HPLC-DAD E LC-MS/MS PARA A DETERMINAÇÃO DE RESÍDUOS DE HERBICIDAS EM ÁGUA E SOLO DO CULTIVO DE ARROZ IRRIGADO

elaborada por
Fábio Ferreira Gonçalves

como requisito parcial para a obtenção do grau de **Doutor em Química**

Comissão Examinadora

_____
Prof. Dr. Renato Zanella
(Orientador – Presidente)

_____
Prof^{a}. Dr^{a}. Martha Bohrer Adaime (co-orientadora) (UFSM)

_____
Prof. Dr. Eduardo Carasek da Rocha (UFSC)

_____
Prof. Dr. Sérgio Luis de Oliveira Machado (UFSM)

_____
Prof. Dr. Ednei Gilberto Primel (FURG)

Santa Maria, 20 de dezembro de 2007

À Márcia minha esposa, amiga, companheira de todas as horas. Obrigada por todo apoio, amor, compreensão, paciência. Amor, Te Amo.

À minha filha Helena, fonte de inspiração, tu és minha paixão, que enche minha vida de alegria, de satisfação, de paz, de serenidade, de orgulho e de amor.
Também Te Amo Muito, Muito.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Renato Zanella pela orientação profissional, pelo seu apoio, incentivo e compreensão em todos os momentos; que, mesmo muito atarefado sempre tem um tempinho para sanar as dúvida. E pela amizade cultivada no decorrer desses anos.

À Profª. Drª. Martha Bohrer Adaime pela participação e sugestões no exame de qualificação e na defesa da tese. Pelos ensinamentos no universo da Química Analítica e da Cromatografia, e pela disponibilidade e boa vontade de nos atender.

Ao Prof. Dr. Ednei Gilberto Primel pela sua valiosa participação no exame de qualificação e na defesa da tese. Pelos seus ensinamentos desde quando ingressei no LARP; pelas suas muitas idéias e críticas, sempre construtivas e também muito debatidas. E também pela amizade, apoio, companheirismo e os vários momentos de descontração.

À Prof. Dr. Sérgio Luis de Oliveira Machado pela sua participação na banca de qualificação e defesa da tese, suas sugestões e questionamentos. Nosso colaborador nas pesquisas, responsável pelas muitas coletas de água dos experimentos e sempre pronto a auxiliar e sanar as nossas dúvidas.

Aos Prof. Dr. Eduardo Carasek pela disposição em participar e pelas valiosa contribuição na defesa da tese, com suas sugestões pertinentes que muito vão contribuir no resultado final do trabalho. Obrigado pelas sugestões que muito contribuíram para o trabalho final.

Aos meus colegas do LARP com os quais convivi durantes esses anos, tenho um carinho muito grande por todos, agradeço principalmente aqueles tiveram uma participação especial no desenvolvimento deste trabalho, os amigos Samile, Caroline, Osmar e Márcia B. O tempo de convívio com vocês nunca é demais. Sentirei saudades dos momentos que passamos, mas outros melhores estão por vir. Obrigado pelo carinho, amizade e apoio e, pela oportunidade de aprender e conviver com vocês.

Aos meus pais e irmãos que se preocupam e torcem por mim sempre.

À UFSM pela oportunidade, principalmente pelo ensino gratuito e de qualidade.

Aos professores do Programa de Pós Graduação em Química da UFSM pela contribuição na minha formação.

Aos funcionários do PPGQ, Ademir e Valéria, pela atenção dispensada.

À CNPq pelo auxílio financeiro.

Agradeço à Deus por guiar meus passos e por me conceder mais esta bênção.

“Muitas vezes as pessoas são egocêntricas, ilógicas e insensíveis.
Perdoe-as assim mesmo.
Se você é gentil as pessoas podem acusá-lo de egoísta, interesseiro.
Seja gentil assim mesmo.
Se você é um vencedor, terá alguns falsos amigos e alguns inimigos verdadeiros.
Vença assim mesmo.
Se você é honesto e franco, as pessoas podem enganá-lo.
Seja honesto assim mesmo.
O que você levou anos para construir, alguém pode destruir de uma hora para outra.
Construa assim mesmo.
Se você tem paz e é feliz, as pessoas podem sentir inveja.
Seja feliz assim mesmo.
O bem que você faz hoje pode ser esquecido amanhã.
Faça o bem assim mesmo.
Dê ao mundo o melhor de você, mas isso pode não ser bastante.
Dê o melhor assim mesmo.
Veja que no final das contas, é entre você e Deus.
Nunca foi entre você e as outras pessoas.”

Madre Teresa de Calcutá

RESUMO

Tese de Doutorado
Programa de Pós-Graduação em Química
Universidade Federal de Santa Maria

ESTUDO DE MÉTODOS EMPREGANDO HPLC-DAD E LC-MS/MS PARA A DETERMINAÇÃO DE RESÍDUOS DE HERBICIDAS EM ÁGUA E SOLO DO CULTIVO DE ARROZ IRRIGADO

AUTOR: FÁBIO FERREIRA GONÇALVES
ORIENTADOR: PROF. DR. RENATO ZANELLA
Data e Local da Defesa: Santa Maria, dezembro de 2007

A lavoura arrozeira do Rio Grande do Sul (RS) é responsável por cerca de 50% da produção brasileira de arroz, e o sucesso da produção depende, geralmente, da aplicação de substâncias químicas. Muitas áreas cultivadas são infestadas com arroz vermelho que causa prejuízo na produção e na comercialização dos grãos. Neste sentido, foi desenvolvida uma cultivar adaptada ao cultivo de arroz irrigado tolerante à herbicidas imidazolinonas usados para o controle do arroz vermelho. O cultivo de arroz irrigado gera um grande impacto ao meio ambiente, tanto em quantidade como na qualidade das águas. Neste trabalho, foi desenvolvido e validado um método para determinação, em águas e solos, de resíduos dos herbicidas clomazona, imazapique e imazetapir. Foram determinados por HPLC-DAD, utilizando-se fase móvel de acetonitrila:água e fase estacionária C18, para as amostras de solo foi feita a confirmação por LC-MS/MS, com fonte de ionização e*lectrospray* no modo ESI+. Para pré-concentração das amostras utilizou-se SPE com cartuchos C18. Os herbicidas foram eluídos com diclorometano:metanol, e para extração nos solos foi utilizada extração com solvente e ultra-som. Os parâmetros de validação do método incluem curva analítica e linearidade, limite de detecção (LOD) e de quantificação (LOQ), precisão e exatidão (recuperação). Todas as curvas analíticas apresentaram valores de r^2 maiores que 0,99. Os LOQs para o método, considerando a etapa de pré-concentração de 200 vezes, foram de 0,12 µg L^{-1} para os herbicidas imazetapir e imazapique e 0,25 µg L^{-1} para o clomazona em amostras de água. Para as amostras de solo os valores de LOQ foram de 2,5 µg kg^{-1} para imazetapir e imazapique e de 5,0 µg kg^{-1} para clomazona, por HPLC-DAD. Os valores de LOQ para as amostras de solo para o sistema LC-MS/MS foram de 25,0 ng kg^{-1}. As recuperações ficaram entre 80,9 e 106,7%, com RSDs menores que 9,0% para as amostras de água e recuperações entre 89,3 e 105,7% com RSDs menores que 8,7% para amostras de solo. O método foi aplicado em estudos de dissipação na lavoura de arroz irrigado e na determinação da concentração residual em amostras de solo, onde foram aplicados os herbicidas, nas safras de 2004/05, 2005/06 e 2006/07. Foram encontrados resíduos de imazetapir até no máximo em 28 dias e do imazapique em 21 dias após aplicação e o clomazona até 42 dias após aplicação dos produtos em amostras de água. Nas amostras de solo, foram encontrados resíduos de imazetapir e imazapique em diferentes profundidades coletadas.

Palavras-chave: HPLC-DAD; LC-MS/MS; pesticidas; águas; solos; arroz irrigado

ABSTRACT

Doctoral Thesis
Programa de Pós-Graduação em Química
Universidade Federal de Santa Maria

STUDY OF METHODS USING HPLC-DAD AND LC-MS/MS FOR THE DETERMINATION OF RESIDUES OF HERBICIDES IN WATER AND SOIL OF THE IRRIGATED RICE CULTIVATION

AUTHOR: FÁBIO FERREIRA GONÇALVES
ADVISOR: PROF. DR. RENATO ZANELLA
Date and Place: December, 2007, Santa Maria

The irrigated agriculture of Rio Grande do Sul (RS) it is responsible for about 50% of the Brazilian production of rice, and the success of the production depends, generally, of the application of chemical substances. Many of the cultivated areas are infested with red rice, which cause damages in the production and commercialization of the grains. In this sense, it was developed to cultivate that was adapted to the cultivation of tolerant irrigated rice to the imidazolinones herbicides used for the control of the red rice. The cultivation of irrigated rice generates a great impact to the environment, so much in amount as in the quality of the waters. In this work it was developed and validated a method for determination, in waters and soils, of clomazone, imazapic and imazethapyr herbicides residues. They were analysed for HPLC-DAD, being used mobile phase of acetonitrile:water and stationary phase C18 and for the soil samples it was made the confirmation by LC-MS/MS, with ionization *electrospray* in the way ESI+ mode. For pre-concentration of the samples SPE was used with cartridges C18. The herbicides were eluated with dichlorometane:methanol, and for extraction in the soils was used solvent and ultrasonic bath. The parameters of validation of the method include analytical curve, linearity, limit of detection (LOD), limit of quantification (LOQ), precision and accuracy (recovery). Whole the analytical curves presented larger values of r^2 more than 0.99. The LOQs for the method, considering the stage of pre-concentration of 200 times, were 0.12 µg L^{-1} for the imazethapyr and imazapic herbicides and 0.25 µg L^{-1} for the clomazone in samples of water. For the soil samples the values of LOQ were of 2.5 µg kg^{-1} for imazethapyr and imazapic and 5.0 µg kg^{-1} for clomazone by HPLC-DAD. The values of LOQ for the soil samples for the system LC-MS/MS was 25.0 ng kg^{-1}. The recoveries were between 80.9 and 106.7%, with RSDs smaller than 9.0% for the samples of water and recoveries between 89.3 and 105.7% with smaller RSDs than 8.7% for soil samples. The method was applied in dissipation studies in the irrigated rice and in the determination of the residual concentration in soil samples, where were applied the herbicides, in the crops of 2004/05, 2005/06 and 2006/07. They were found imazethapyr residues at the most 28 days and of the imazapic 21 days after application and the clomazone until 42 days after application of the products in samples of water. In the soil samples were found imazethapyr residues and imazapic in different collected depths.

Keywords: HPLC-DAD; LC-MS/MS, pesticides, water, soil; irrigated rice

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - Produção de arroz por estado brasileiro, nos anos 2001-2003 (Fonte: IBGE, 2005) 5

FIGURA 2 - Figura 2 - Perfil do solo mostrando os horizontes característicos (Fonte: CETESB, 2007) 7

FIGURA 3 - Classificação toxicológica das formulações de pesticidas (Fonte: CIT) 20

FIGURA 4 - Diagrama esquemático das vias de poluição ambiental por pesticidas (Adaptado de SPADOTTO, 2002) 25

FIGURA 5 - Pesticidas analisados em amostras de água por LC-MS/MS (N=16 ≈200 pesticidas) (Adaptado de KUSTER *et al.*, 2006) 41

FIGURA 6 - Fluxograma do estudo realizado 58

FIGURA 7 - Sistema SPE utilizado para a pré-concentração dos herbicidas em amostras de água 65

FIGURA 8 - Diagrama demonstrando a forma de estabelecimento dos valores de LOD e LOQ 72

FIGURA 9 - Espectros de absorção, de 200 a 400 nm, obtidos por HPLC-DAD para os herbicidas: (A) Imazetapir, (B) Imazapique e (C) Clomazona 78

FIGURA 10 - Cromatograma típico de uma solução analítica contendo 1,0 mg L^{-1} dos herbicidas imazapique (t_R 6,5 min), imazetapir (t_R 7,6 min), e clomazona (t_R 13,6 min); (A) λ = 220 nm; (B) λ = 254 nm. 80

FIGURA 11 - Cromatograma total obtido no modo ESI+ para uma solução analítica contendo os herbicidas. 81

FIGURA 12- Cromatograma MRM obtido para uma solução analítica contendo 0,25 mg L^{-1} dos herbicidas : (A) imazapique (t_R 4,5 min), imazetapir (t_R 5,1 min), e clomazona (t_R 7,9 min) 82

FIGURA 13 - Gráfico que relaciona o volume de *breakthrough* para os três herbicidas 86

FIGURA 14 - Cromatograma típico obtidos por HPLC-DAD para extrações de amostra “branco” com ajuste de pH (A) e sem ajuste de pH (B). 89

FIGURA 15 - Cromatogramas de amostras de água de lavoura contendo os herbicidas, coletadas aos 3 dias após aplicação de (A) imazapique (t_R 6,68) e imazetapir (t_R 6,61) e (B) clomazona (t_R 13,61) 95

FIGURA 16 - Perfil da dissipação dos herbicidas na safra 2004-2005 96

FIGURA 17 - Perfil da dissipação dos herbicidas na safra 2005-2006 96

FIGURA 18 - Perfil da dissipação dos herbicidas na safra 2006-2007 97

FIGURA 19 - Cromatograma obtido por HPLC-DAD para uma amostra de solo (A), e uma sol uma solução analítica contendo 0,5 mg L^{-1} dos herbicidas imazapique (t_R 6,5 min), imazetapir (t_R 7,6 min). 103

FIGURA 20 - Gráfico representando o número de amostras positivas obtidas na análise do solo 104

LISTA DE TABELAS

TABELA 1- Escala de tamanho de partículas 8

TABELA 2- Estimativa do consumo total de água para irrigação do arroz no Rio Grande do Sul 14

TABELA 3- Limites máximos de resíduos (LMR) de pesticidas permitidos em arroz (FAO, 2002; DIRECTIVE 86/363/EEC, 2008; AGROFIT, 2008) e águas (BRASIL, 2004; BRASIL, 2005). 18

TABELA 4- Algumas propriedades físico-químicas dos pesticidas que indicam seu potencial de risco para ambientes aquáticos (BARCELÓ & HENNION, 1997; TOMLIM, 2000; DORES & DE-LAMONICA-FREIRE, 2001). 21

TABELA 5- Variação geral na dose dos pesticidas aplicados, ocorrida no século XX 24

TABELA 6- Herbicidas recomendados para cultura do arroz irrigado no Brasil. 29

TABELA 7- Herbicidas freqüentemente empregados na cultura do arroz no estado do RS. 31

TABELA 8- Informações dos padrões analíticos sólidos utilizados 61

TABELA 9- Volume de amostra e concentração dos analitos utilizados para obtenção do volume de *breakthrough.* 67

TABELA 10- Propriedades físico-químicas do solo onde foi realizado o experimento em Santa Maria, RS, 2007. 69

TABELA 11- Condições cromatográficas utilizadas para a quantificação dos herbicidas por HPLC-DAD 79

TABELA 12- Herbicidas quantificados por LC-MS/MS, modo de ionização ESI positivo e modo de aquisição MRM, íons precursores e íons produtos, e energia de colisão, para as duas transições. 81

TABELA 13- Recuperações obtidas, utilizando-se diferentes cartuchos de fase estacionária (C18 e Strata-X) e diferentes solventes de eluição. 83

TABELA 14- Recuperações obtidas para os herbicidas utilizando-se diferentes volumes do solvente de eluição. 84

TABELA 15- Recuperações obtidas para os herbicidas utilizando-se diferentes valores de pH. 84
TABELA 16- Recuperações obtidas para os herbicidas utilizando-se diferentes volumes de amostra. 85
TABELA 17- Recuperações obtidas para os herbicidas utilizando-se diferentes ajustes de pH dos solventes de extração. 88
TABELA 18- Recuperações obtidas para os herbicidas utilizando-se diferentes ajustes de pH dos solventes de extração. 89
TABELA 19- Resultados obtidos para calibração dos herbicidas no sistema HPLC-DAD. 90
TABELA 20- Resultados obtidos para calibração dos herbicidas no sistema LC-MS/MS 91
TABELA 21- Valores de LOD e LOQ para os herbicidas determinados por HPLC-DAD em amostras de água. 91
TABELA 22- Valores de LOD e LOQ para os herbicidas determinados por HPLC-DAD em amostras de solo. 92
TABELA 23- Valores de LOD e LOQ para os herbicidas determinados por LC-MS/MS em amostras de solo. 92
TABELA 24- Recuperação, RSD_r e RSD_{pi} do método para os herbicidas em amostras de água determinados por HPLC-DAD. 94
TABELA 25- Recuperação, RSD_r e RSD_{pi} do método para os herbicidas em amostras de solo determinados por HPLC-DAD. 94
TABELA 26- Cinética de degradação para os herbicidas, na safra 2004-2005. 100
TABELA 27- Cinética de degradação para os herbicidas, na safra 2005-2006. 100
TABELA 28- Cinética de degradação para os herbicidas, na safra 2006-2007. 100
TABELA 29- Resultados obtidos para quantificação de imazetapir e imazapique em amostras de solo coletadas a diferentes profundidades. 104

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

λ – comprimento de onda

ACN - acetonitrila

AHAS – Ácido acetohidróxido

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária

APCI – Ionização Química a Pressão Atmosférica, do inglês *Atmospheric Pressure Chemical Ionization*

C_0 – concentração inicial

C18 – sílica modificada com hidrocarboneto linear C18, octadecilsilano

C8 – sílica modificada com hidrocarboneto linear C8, octilsilano

CAS – *Chemical Abstracts Service*

CL_{50} – dose letal (via respiratória)

CONAMA – Conselho Nacional do Meio Ambiente

CTC – Capacidade de Troca de Cátions

DAD – Detecção por Arranjo de Diodos, do inglês *Diode Array Detection*

DB-5 – 5% fenil metil silicone

DCM - diclorometano

DDT –2,2 bis(p-clorofenil)-1,1,1-tricloroetano

d.i. – diâmetro interno

ECD – Detector por Captura de Elétrons, do inglês *Electron-Capture Detector*

EPA – Agência de Proteção Ambiental, do inglês *Environmental Protection Agency*

eqa – equivalente ácido

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

EU – União Européia

FE – fase estacionária

FM – fase móvel

FPD – Detector Fotométrico de Chama, do inglês *Flame Photometric Detector*

GABA – ácido gama aminobutírico, do inglês *γ-aminobutyric acid*

GC – Cromatografia Gasosa, do inglês *Gas Chromatography*

h – horas

ha – hectare

HPLC – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência, do inglês *High Performance Liquid Chromatography*

ICH – International Conference on Harmonisation

IMI – imidazolinonas

INMETRO – Instituto Nacional de Metrologia

ISO – International Standard Organisation

IUPAC – *International Union of Pure and Applied Chemistry*

k – Constante de reação

K_{ow} – Coeficiente de partição octanol-água

K_{oc} – Coeficiente de adsorção à matéria orgânica do solo

LC – Cromatografia Líquida, do inglês *Liquid Chromatography*

LLE – Extração Líquido-Líquido, do inglês *Liquid-Liquid Extraction*

LMR – Limite Máximo de Resíduos

LOD – Limite de Detecção, do inglês *Limit of Detection*

LOQ – Limite de Quantificação, do inglês *Limit of Quantification*

MCPA – 4-Cloro-2-methyl-phenoxyacetic acid

MeOH – metanol

MOS – Matéria Orgânica do Solo

MRM – Monitoramento de múltiplas reações, do inglês *Multiple Reaction Monitoring*

MS – Espectrometria de Massas, do inglês *Mass Spectrometry*

n – Número de medidas

NCI – Ionização química no modo negativo, do inglês *Negative Chemical Ionization*

NPD – Detector Nitrogênio-Fósforo, do inglês *Nitrogen-Phosphorus Detector*

ODS – Octadecilsilano

PC – produto comercial

PD – plantio direto

pK_a – potencial de dissociação ácida

PG – pré-germinado

PS2 – polímero de poliestireno

PS-DVB – copolímero de estireno divinilbenzeno

PTFE – politetrafluoretileno

R – Recuperação

r^2 – Coeficiente de determinação

RP – fase reversa, do inglês, *Reversed Phase*

RSD – Desvio Padrão Relativo, do inglês *Relative Standard Deviation*

RSD_r – Desvio Padrão Relativo para Repetitividade

RSD_{pi} – Desvio Padrão Relativo para Precisão Intermediária

s – estimativa do desvio padrão absoluto

SA – sulfonamida

SDVB – Estireno divinilbenzeno

SIM – Monitoramento do Íon Selecionado, do inglês *Selected Ion Monitoring*

SPE – Extração em Fase Sólida, do inglês *Solid Phase Extraction*

SU – sulfoniluréias

s_r – desvio padrão dos resíduos

t – tempo

$t_{1/2}$ – tempo de meia-vida

t_R – tempo de retenção

TLC – Cromatografia em Camada delgada, do inglês *Thin Layer Chromatography*

UV – ultravioleta

USDA – Departamento de Agricultura dos Estados Unidos, do inglês *United States Department of Agricultural*

USGS – *United States Geological Survey*

WRI – Instituto de Recursos Naturais da Grã-Bretanha, do inglês *World Resources Institute*

v/v – volume por volume

x_i – valores individuais

x_m – média de medidas em réplicas

LISTA DE ANEXOS

ANEXO A – Herbicidas aplicados nos experimentos realizados para o estudo
ANEXO B – Dados climáticos referentes ao período de cultivo de arroz irrigado, nos dois anos de estudo

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO 1
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA 3
2.1 O arroz 3
2.1.1 Características botânicas e morfológicas 3
2.1.2 Importância econômica do arroz 3
2.2 O Solo 5
2.2.1 Conceito e definição de solo 5
2.2.2 Propriedades Físicas e Químicas do solo 7
2.2.3 Solos de várzea 10
2.3 Agricultura irrigada 11
2.3.1 O uso da água na cultura do arroz irrigado 11
2.3.2 A necessidade de água para o arroz irrigado 12
2.4 Os Pesticidas 14
2.4.1 Conceitos e denominações dos pesticidas 14
2.4.2 O uso de pesticidas 16
2.4.3 A Legislação para pesticidas 17
2.4.4 Toxicidade dos pesticidas 19
2.4.5 Características físico-químicas dos pesticidas 20
2.4.6 Os pesticidas como contaminantes das águas e solos 22
2.4.7 Características do solo que afetam a persistência dos pesticidas 26
2.4.8 A degradação e a dissipação de pesticidas no solo 27
2.4.9 Herbicidas usados na cultura do arroz 29
2.4.10 Herbicidas escolhidos para o estudo 32
2.4.10.1 Clomazona 32
2.4.10.2 Imazapique 33
2.4.10.3 Imazetapir 34

2.5 Técnicas de extração e pré-concentração em amostras ambientais 35
2.5.1 Extração de compostos orgânicos em amostras de solo 36
2.5.2 Extração de compostos orgânicos em amostras de água.....38
2.6 Métodos cromatográficos para análise de pesticidas 39
2.6.1 Cromatografia Líquida acoplada à Espectrometria de Massas (LC-MS).....40
2.6.1.1 Ionização por Electrospray (ESI).....43
2.6.1.2 Ionização Química sob Pressão Atmosférica (APCI) 43
2.6.1.3 Analisadores.....44
2.7 Aplicações de métodos cromatográficos para determinação de pesticidas 46
2.7.1 Revisão bibliográfica sobre análise de pesticidas utilizando HPLC-DAD e LC-MS.....47
2.8 Validação de métodos cromatográficos para a determinação de pesticidas 53
2.8.1 Curva analítica e linearidade.....54
2.8.2 Limite de Detecção e Limite de Quantificação 55
2.8.3 Precisão (repetitividade e precisão intermediária).....55
2.8.4 Exatidão (Recuperação).....56
3 MATERIAIS E MÉTODOS 58
3.1 Instrumentação.....59
3.2 Reagentes solventes e materiais. 60
3.3 Padrões analíticos dos herbicidas estudados.....61
3.4 Otimização do sistema cromatográfico para determinação dos herbicidas61
3.4.1 Escolha da fase móvel e da vazão.....61
3.4.2 Escolha do comprimento de onda de máxima absorção de cada herbicida no HPLC-DAD.....62
3.4.3 Ajuste do pH da fase móvel.....63
3.5 Condições de Análise por LC-MS/MS.....63
3.5.1 Condições do sistema de detecção.....63
3.6 Otimização dos parâmetros para quantificação das amostras.....64
3.6.1 Amostras de água 64
3.6.1.1 Sistema SPE para a pré-concentração dos herbicidas 65
3.6.1.1.1 Sorventes avaliados 65

3.6.1.1.2 Volume da amostra 66
3.6.1.1.3 Ajuste do pH da amostra de água 67
3.6.1.1.4 Escolha do solvente de eluição 67
3.6.2 Amostras de solo.....68
3.6.2.1 Quantidade de amostra de solo 70
3.6.2.2 Solventes de extração e ajuste do pH.....70
3.6.2.3 Volumes de solvente testados na extração 70
3.7 Validação do método para amostras aquosas 71
3.7.1 Curva analítica e linearidade.....71
3.7.2 Limite de Detecção e limite de Quantificação.....71
3.7.3 Precisão (repetitividade e precisão intermediária).....72
3.7.4 Exatidão (recuperação) 73
3.8 Aplicação do método 73
3.8.1 Estudo da dissipação dos herbicidas em lavouras de arroz irrigado.....73
3.8.2 Cinética de degradação e tempos de meia-vida 74
3.8.3 Determinação da concentração residual no solo na entre-safra do arroz irrigado 75
3.8.4 Coletas e amostragens.....76
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO 77
4.1 Condições cromatográficas otimizadas para análise dos herbicidas por HPLC-DAD.....77
4.1.1 Escolha da fase móvel e da vazão.....77
4.1.2 Determinação do comprimento de onda de máxima absorção de cada herbicida.....78
4.2 Condições cromatográficas otimizadas para análise dos herbicidas por LC-MS 80
4.2.1 Condições do sistema de injeção e de detecção 80
4.3 Estudo da extração em fase sólida dos herbicidas 82
4.4 Procedimento experimental otimizado.....86
4.4.1 Procedimento experimental otimizado para análise dos herbicidas em amostras de água 87
4.5 Estudo da extração dos herbicidas nas amostras de solo.....87
4.5.1 Procedimento experimental otimizado para análise das amostras de solo 90

4.6 Validação dos métodos em amostras aquosas 90
4.6.1 Curva analítica e linearidade 90
4.6.2 Limite de detecção e limite de quantificação 91
4.6.3 Precisão (repetitividade e precisão intermediária) 93
4.6.4 Exatidão (Recuperação) 93
4.7 Aplicação do método 95
4.7.1 Estudo de dissipação em lavouras de arroz irrigado 95
4.7.2 Cinética de degradação e tempos de meia-vida 99
4.7.3 Determinação da concentração residual no solo na entre-safra do arroz irrigado 102
5 CONCLUSÕES 105
SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS 107
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 108
ANEXOS 120
PRODUÇÃO CIENTÍFICA REFERENTE AO PRESENTE TRABALHO 127

1 INTRODUÇÃO

O homem tem usado recursos da natureza sem a preocupação de reposição ou preservação. Devido a esta mentalidade, várias regiões do globo terrestre estão ameaçadas por causa da poluição. O homem, de modo geral, ainda não se conscientizou da importância em preservar as fontes de água. Uma preocupação tão antiga quanto o Império Romano. Naquela época, havia uma lei que obrigava o povo a cuidar bem das nascentes e dos canais, condenando severamente os que colocassem em risco as reservas de água ou desviassem seus cursos. De lá para cá, a população mundial cresceu muito bem como as fontes poluidoras. Há 2000 anos a população era apenas 3% do que é hoje; a partir de 1950 o consumo mundial triplicou e o consumo médio por habitante foi ampliado em 50%, mas a quantidade de água disponível é a mesma. Apesar disso, o homem continua praticando atos que contribuem para reduzir o volume e a qualidade da água no planeta.

Os pesticidas são compostos indispensáveis para a agricultura por possibilitarem a produção de grande quantidade de alimentos, necessários para atender a demanda que é cada vez maior. Desde o início de seu desenvolvimento, a produção agrícola está diretamente relacionada com a aplicação de substâncias químicas para controlar as pestes que atacam os produtos agrícolas, prejudicando as colheitas, fazendo com que aumente a produção e o desenvolvimento de novos pesticidas. O solo foi considerado, durante muito tempo, um sistema fechado, isolado e inerte, no qual era possível fazer depósito de resíduos sem que houvesse maiores problemas para os organismos que nele viviam. Isso não é verdade, pois o solo faz parte de um sistema e está em constante renovação, embora esta renovação algumas vezes seja lenta.

A aplicação indiscriminada de pesticidas conduz, geralmente à graves problemas ambientais. Os pesticidas muitas vezes são tóxicos, podendo ser classificados como cancerígenos, mutagênicos, teratogênicos e mimetizadores de hormônios; são aplicados em grande quantidade, em áreas bastante extensas e

também no emprego domissanitário, e geralmente possuem uma grande persistência no meio ambiente.

Desta forma, pode-se compreender o papel importante desempenhado pela Química Analítica, ciência que estuda e desenvolve novos métodos capazes de identificar e quantificar constituintes de uma amostra. Alguns desses constituintes podem ser os herbicidas clomazona, imazapique e imazetapir, que são utilizados na cultura de arroz irrigado.

Estes compostos são bastante usados no cultivo de arroz irrigado, uma importante atividade agrícola do Sul do Brasil, podendo vir a contaminar os mananciais hídricos e/ou persistirem no solo. Por isso, o desenvolvimento de novos métodos que possam ser utilizados para o monitoramento destes compostos no meio ambiente é de suma importância, pois a qualidade da água influencia também na saúde da população. Considerando o caráter imprescindível da água para a vida na terra, a importância do uso de pesticidas para atender a demanda mundial crescente de alimentos e a conseqüente possibilidade destes contaminarem o meio ambiente e o homem, os objetivos deste trabalho foram: (i) desenvolver e validar um método simples, rápido, sensível e eficiente para determinar os herbicidas clomazona, imazapique e imazetapir em águas de superfície por SPE e HPLC-DAD; (ii) desenvolver e validar um método para determinar os herbicidas clomazona, imazapique e imazetapir em solos com extração por ultra-som e determinação por HPLC-DAD e LC-MS/MS; (iii) realizar um estudo de acompanhamento da dissipação destes herbicidas em lavoura de arroz irrigado para avaliar o seu comportamento nesse tipo de amostra; iv) avaliar a persistência residual dos herbicidas imazapique e imazetapir em amostras de solo e v) determinar o tempo de meia-vida em água de lavoura dos herbicidas estudados.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 O arroz

2.1.1 Características botânicas e morfológicas

O arroz (*Oryza sativa, L.*) pertence à família *Gramineae* e subfamília *Pooideae* originário do sudoeste da Ásia que compreende a região leste da Índia, Indochina e sul da China e dentre os cereais cultivados, é o que mais se destaca, por ser alimento básico da maioria da população. Segundo a FAO (2004) já foram identificadas 140.000 variedades de arroz, sendo que as principais diferenças observadas entre elas são: origem genética (japônica ou índica), dimensões (curto, médio e longo) e composição do amido quanto ao teor de amilose (baixo, médio ou alto), o que está relacionado com suas características de cozimento: arroz solto ou arroz grudento.

Segundo Vieira e Carvalho (VIEIRA *et al.*, 1999) o arroz é um cereal consumido principalmente como grão inteiro, constituído por diversos tecidos, que apresentam estrutura, composição química e funções diferenciadas.

2.1.2 Importância econômica do arroz

Cultivado e consumido em todos os continentes, o arroz destaca-se pela produção e área de cultivo, desempenhando papel estratégico tanto no aspecto econômico quanto social.

O arroz é um dos mais importantes grãos em termos de valor econômico. É considerado o cultivo alimentar de maior importância em muitos países em

desenvolvimento, principalmente na Ásia e Oceania, onde vivem 70% da população total dos países em desenvolvimento e cerca de dois terços da população subnutrida mundial. É alimento básico para cerca de 2,4 bilhões de pessoas e, segundo estimativas, até 2050, haverá uma demanda para atender ao dobro desta população (FAO, 2004b).

Cerca de 150 milhões de hectares de arroz são cultivados anualmente no mundo, produzindo 590 milhões de toneladas, sendo que mais de 75% desta produção é oriunda do sistema de cultivo irrigado (EMBRAPA, 2007). A China é o maior produtor mundial, contribuindo com 30,7% do total produzido, seguida pela Índia com 20,4% (FAO, 2004b). Aproximadamente 90% de todo o arroz do mundo é cultivado e consumido na Ásia. A América Latina ocupa o segundo lugar em produção e o terceiro em consumo (EMBRAPA, 2003).

O Brasil está na 10ª posição entre os maiores produtores, contribui com 1,8% de todo o arroz produzido no mundo e é responsável por 50% da produção da América Latina e é o maior exportador da América Latina e Caribe (FAO, 2004a; FAO 2004b). Na safra 2005/06, foram cultivados 2,97 milhões de ha de arroz (9,7% da área total cultivada no Brasil) com uma produção total de 11,5 milhões de toneladas (CONAB, 2006).

O arroz ocupa o terceiro lugar em área, terceiro em produção e quarto em valor de produção (IBGE, 2005). Sempre presente na mesa do brasileiro, o arroz tem um consumo anual entre 45 a 50 kg, o terceiro mais elevado na América Latina. O Brasil tem uma cultura arrozeira que visa o abastecimento do mercado interno. O Rio Grande do Sul (RS) é o maior produtor brasileiro, dos 1,3 milhões de ha com arroz irrigado cultivados anualmente no Brasil, 1 milhão estão localizados no RS e é o responsável por pequenas exportações. No RS a produção de arroz é praticada sob clima subtropical na sua minoria em grandes fazendas (média de 200 ha) completamente mecanizadas (OLIVEIRA, 2006; FAO, 2004b).

A produção do RS representa mais de 58% da produção brasileira de arroz. Os patamares de produtividade de arroz irrigado são elevados, tendo atingido na safra 2004/05, um valor médio de 6,0 t ha^{-1} (CONAB, 2006; OLIVEIRA, 2006), produtividade semelhante às obtidas em países tradicionais no cultivo de arroz irrigado como Estados Unidos da América, Austrália e Japão. Esta alta produtividade está associada ao intenso uso de agroquímicos, tanto de adubos e fertilizantes, quanto de pesticidas.

Outros grandes produtores são os estados de Mato Grosso, Santa Catarina, Maranhão, Pará, Tocantins e Goiás (IBGE, 2005). A produção de arroz por estado brasileiro está demonstrada na Figura 1.

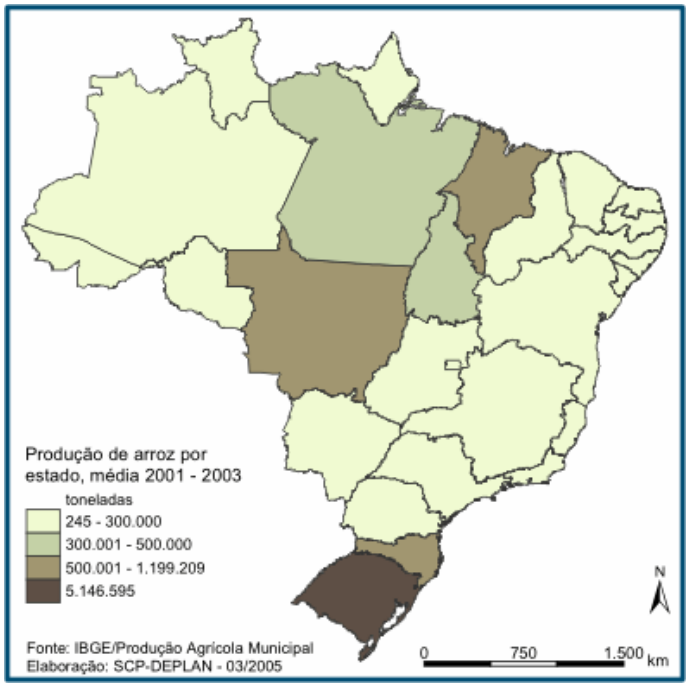


Figura 1 - Produção de arroz por estado brasileiro, nos anos 2001-2003 (Fonte: IBGE, 2005)

2.2 O Solo

2.2.1 Conceito e definição de solo

Tecnicamente, o Sistema Brasileiro de Classificação de Solos (SiBCS – EMBRAPA) define solo como “uma coleção de corpos naturais, constituídos por partes sólidas, líquidas e gasosas, tridimensionais, dinâmicos, formados por materiais minerais e orgânicos, que ocupam a maior parte do manto superficial das extensões continentais do nosso planeta, contém matéria viva e podem ser

vegetados na natureza, onde ocorrem. Ocasionalmente podem ter sido modificados por atividades humanas" (EMBRAPA, 2007; BARCELÓ, 2004).

O solo é um sistema, sendo que pode ser decomposto em partes menores, e que para existir e funcionar dependem do funcionamento harmônico destas partes (RESENDE *et al.*, 2002).

O solo é um sistema composto por matéria no estado sólido, líquido e gasoso, chamadas fases. A fase gasosa do solo, ou atmosfera do solo, é diferente da atmosfera terrestre. A atmosfera do solo possui maior concentração de gás carbônico (até 40% mais), devido à respiração dos microrganismos e das raízes, além de possuir menos oxigênio. A fase líquida do solo representa um reservatório de água e nutrientes nela dissolvidos que podem ser utilizados pelas plantas e pelos organismos que ali vivem, sendo também em meio para reações químicas (AZEVEDO & DALMOLIN, 2006; BARCELÓ, 2004).

A fase sólida do solo pode ser classificada quanto à sua natureza (mineral ou orgânica) e quanto ao tamanho das partículas. Na maioria dos solos, as partículas minerais (vindas diretamente das rochas) predominam sobre as partículas orgânicas (resultado da transformação de restos vegetais e animais).

É importante entender estes aspectos do solo, porque suas funções ambientais estão baseadas nas relações de troca de energia e matéria com os sistemas que estão no seu mesmo nível hierárquico (hidrosfera, litosfera, atmosfera, biosfera), no nível superior (planeta Terra) e no inferior (fase sólida, líquida e gasosa).

A ciência que estuda o solo é chamada pedologia, e a ciência que estuda especificamente o solo arável, chamada de edafologia (RESENDE *et al.*, 2002; AZEVEDO & DALMOLIN, 2006). Um solo, após atingir sua maturidade, apresenta a partir da superfície, o perfil ilustrado na Figura 2. Observa-se que o perfil do solo é caracterizado por várias zonas designadas como horizontes O, A, E, B, e C. As espessuras de cada horizonte são bastante variadas, apresentando desde centímetros até metros (RESENDE *et al.*, 2002; AZEVEDO & DALMOLIN, 2006).

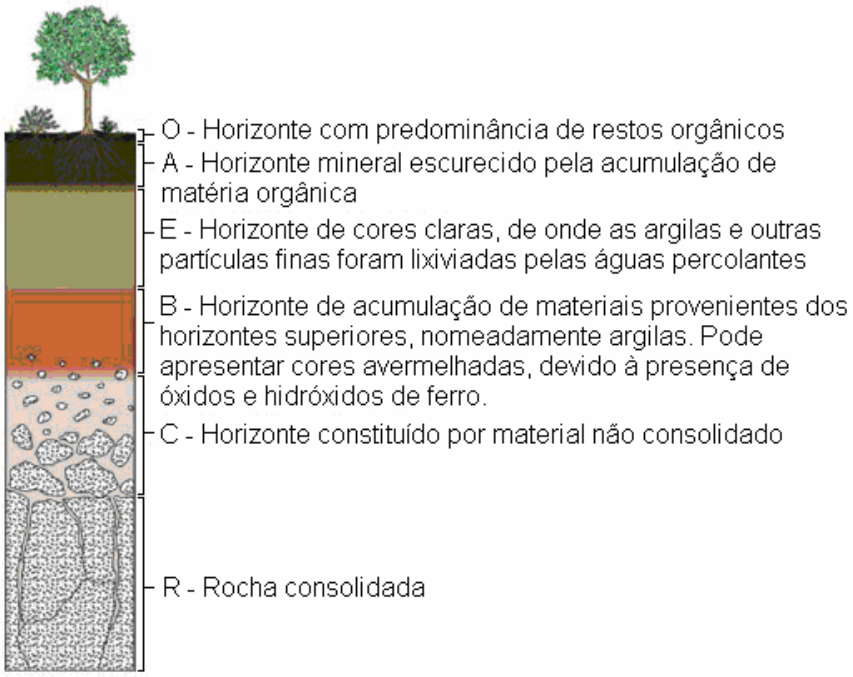


Figura 2 - Perfil do solo mostrando os horizontes característicos (Fonte: CETESB, 2007)

2.2.2 Propriedades Físicas e Químicas do solo

O solo é variável nas três dimensões. Quando observamos uma variação num corte vertical, tem-se um perfil (Figura 2), isto é, a face de um conjunto de seções, zonas ou faixas paralelas à superfície. Quando estas camadas evidenciam as diferenças, são chamadas de horizontes (por efeito dos processos formadores do solo) (RESENDE *et al.*, 2002; AZEVEDO & DALMOLIN, 2006).

Entre os solos, e dentro de cada solo, os horizontes podem diferir entre si nas propriedades: constituição, cor, textura, estrutura, porosidade, consistência, pedoclima, pedoforma (RESENDE *et al.*, 2002). Dependendo da espécie mineralógica que deu origem e dos mecanismos de intemperismo e transporte, o solo apresenta diferentes conteúdos das frações: areias, siltes ou argilas.

A fase sólida do solo é constituída por partículas minerais e orgânicas. Estas partículas possuem vários tamanhos (Tabela 1) e a distribuição do tamanho de

partículas do solo se encontra em cada intervalo de tamanho (AZEVEDO & DALMOLIN, 2006).

Tabela 1 - Escala de tamanho de partículas (Adaptada de RESENDE, 2002).

Fração	Diâmetro (mm)
Areia grossa	2 – 0,2
Areia fina	0,2 – 0,05
Silte	0,05 – 0,002
Argila	<0,002

A textura refere-se justamente à proporção das frações de areia, silte e argila encontrada no solo, sendo agrupada em 13 classes. Estas 13 classes texturais podem ser generalizadas originando 5 classes gerais, muito utilizadas para classificação de solos (RESENDE *et al.*, 2002; AZEVEDO & DALMOLIN, 2006):

Textura arenosa – compreende solos que apresentam teor de argila menor que 15%.

Textura média – solos que apresentam menos que 35% de argila e mais de 15% de areia, com exceção das classes areia.

Textura argilosa – quando o teor de argila estiver entre 35 e 60%.

Textura muito argilosa – quando o teor de argila for superior a 60%.

Textura siltosa – quando o solo apresentar predominantemente a fração silte, com menos de 15% de argila e menos de 35% de areia.

A textura também influencia no comportamento físico do solo, estando diretamente ligada ao arranjo das partículas (estrutura), oferecendo maior ou menor resistência à degradação por erosão. A textura também está relacionada ao desenvolvimento das plantas, pois influencia na disponibilidade de nutrientes, da água e na penetração das raízes (BARIZON *et al.*, 2005). A argila é considerada a mais importante fração granulométrica do solo, pois além das propriedades físicas, condiciona também as propriedades químicas do solo.

-Teor de Matéria Orgânica (RESENDE *et al.*, 2002; AZEVEDO & DALMOLIN, 2006): Um solo ideal é constituído por minerais (45%), poros ocupados pelo ar (25%) e pela água (25%), pela matéria orgânica (5%) e microrganismos, podendo a proporção de cada uma destas partes variar bastante de solo para solo, embora nos solos tropicais, os teores de matéria orgânica dificilmente ultrapassam

em 2%. A matéria orgânica do solo (MOS) é resultante da deposição natural de resíduos vegetais (exudados e/ou morte de raízes, queda de folhas, galhos, frutos, etc) e animais (excrementos e/ou morte da biota) que chegam ao solo, podendo ter a sua origem também no próprio homem, por meio da adubação orgânica feita com estercos (bovinos, de aves e de suínos), compostos orgânicos preparados na fazenda, adição de resíduos vegetais, tais como restos de alimentos ou adubos verdes plantados com a finalidade de incorporação ao solo. A MOS tem efeito direto sobre as características físicas, químicas e biológicas dos solos, sendo considerada uma peça fundamental para a manutenção da capacidade produtiva dos solos em qualquer ecossistema terrestre. Do ponto de vista físico, a MOS melhora a estrutura do solo, reduz a plasticidade e a coesão, aumenta a capacidade de retenção de água e a aeração, permitindo maior penetração e distribuição das raízes. A MOS atua diretamente sobre a fertilidade do solo por constituir a principal fonte de macro e micronutrientes essenciais às plantas, como também indiretamente, através da disponibilidade dos nutrientes, devido à elevação do pH, além de aumentar a capacidade de retenção dos nutrientes, evitando suas perdas (BARIZON *et al.*, 2005).

As propriedades químicas dos solos (pH, teor de nutrientes, capacidade de troca iônica, condutividade elétrica e matéria orgânica) são, ao lado da atividade biológica, responsáveis pelos principais mecanismos de atenuação de poluentes nesse meio (KAH *et al.*, 2007). Entre estes, podem ser destacadas a adsorção, a fixação química, precipitação, oxidação e a neutralização que, invariavelmente ocorrem no solo e através do manejo de suas propriedades, podem ser incrementados.

Muitas das funções que o solo desempenha no ambiente não seriam possíveis sem suas propriedades químicas. A principal propriedade química do solo é a Capacidade de Troca de Cátions (CTC), que é a medida da quantidade de cargas elétricas no solo e que determina a capacidade que o solo tem de trocar cátions. Esta é uma propriedade importante do solo, pois funciona como um reservatório de nutrientes, evitando que os mesmos sejam lixiviados durante e após uma chuva. De modo grosseiro, podemos assumir que quanto mais argiloso o solo, quanto maior o conteúdo de matéria orgânica e quanto maior o pH, maior será a CTC. No solo, há uma grande presença de cargas elétricas positivas e negativas, originadas dos componentes do solo, tanto dos minerais quanto da matéria orgânica.

A fração argila e outras frações como silte, por exemplo, em menor quantidade, podem apresentar essas duas cargas (BARIZON *et al.*, 2005, RESENDE *et al.*, 2002; AZEVEDO & DALMOLIN, 2006).

Alguns dos solos apresentam o número de cargas negativas maiores que o número de cargas positivas e são conhecidos como solos eletronegativos. Essas cargas negativas, que encontram-se na superfície dos minerais de argila e da matéria orgânica, são capazes de adsorver íons com cargas opostas: Ca^{2+}, Mg^{2+}, K^{+}, H^{+}, etc. Desta maneira se estabelece uma interação entre a fase sólida do solo e os cátions provenientes da solução do solo, que ficam aderidos às superfícies sólidas do solo.

2.2.3 Solos de várzea

Os solos cultivados com arroz irrigado na Região Subtropical do Brasil, especificamente nos Estados do Rio Grande do Sul (RS) e Santa Catarina (SC) são encontrados, principalmente, nos ecossistemas de várzeas (solos de várzea) formados por planícies de rios, lagoas e lagunas, apresentando uma característica comum: a formação em condições variadas de deficiência de drenagem (hidromorfismo).

Os solos cultivados com arroz irrigado no RS e SC apresentam drenagem naturalmente deficiente, decorrente de densidade elevada, baixa porosidade total, alta relação micro/macroporos, presença de camada subsuperficial com baixa permeabilidade e do relevo plano a suave ondulado. Parte destas condições são acentuadas pelo preparo do solo realizado em condições de umidade excessiva. Solos situados em patamares mais elevados ou em terras adjacentes às várzeas, de relevo suave ondulado a plano, eventualmente também são usados com cultura de arroz irrigado (EMBRAPA, 2007).

Até um determinado ponto, as condições apresentadas pelos solos de várzea podem ser consideradas favoráveis para o cultivo do arroz irrigado por reduzir as perdas de água e de nutrientes, porém são restritivas ao desenvolvimento do sistema radicular das culturas de sequeiro, podendo, em casos extremos de compactação, serem prejudiciais mesmo para o arroz irrigado. Em função da

heterogeneidade do material de origem e dos diferentes graus de hidromorfismo, apresentam grande variação nas características morfológicas, físicas, químicas e mineralógicas, o que determina seu agrupamento em diferentes classes, com diferentes limitações.

As principais classes em que estão incluídos os solos cultivados com arroz na Região subtropical, de acordo com o novo Sistema Brasileiro de Classificação de Solos (EMBRAPA, 2007; RESENDE *et al.*, 2002; AZEVEDO & DALMOLIN, 2006) são: Planossolos (antigos Planossolos e Solonetz Solodizado), Gleissolos (antigos Glei Húmico e Pouco Húmico, Hidromórficos Cinzentos e Solonchaks), Chernossolos (antigos Brunizém), Plintossolos, Vertissolos, Neossolos Flúvicos e Neossolos Quartzarênicos Hidromórficos (antigos Solos Aluviais e Areias Quartzosas Hidromórficas, respectivamente), Organossolos (antigos Solos Orgânicos) e Espodossolos (antigos Podzóis). Nos patamares mais elevados das áreas de várzea, podem ocorrer solos não-hidromórficos de drenagem imperfeita/moderada até boa, incluídos nas classes Argissolos, Alissolos e Luvissolos, desmembradas dos antigos Podzólicos, além de Chernossolos, Cambissolos e Neossolos Quartzarênicos Órticos (Areias Quartzosas).

2.3 Agricultura irrigada

2.3.1 O uso da água na cultura do arroz irrigado

A agricultura irrigada visando à prática da produção de alimentos é a que mais contribui para o redirecionamento das águas de seus cursos naturais. Isso é verdade, principalmente em países da Ásia e do Saara Africano, onde entre 80 e 90% da água doce é destinada para esse fim (FAO, 2004a). Atualmente, a irrigação é utilizada em 17% das áreas aráveis do planeta, sendo responsável por 40% da produção mundial de alimentos. A irrigação usa aproximadamente 70% total das águas retiradas do sistema global de rios, lagos e mananciais subterrâneos e os 30% restantes são utilizados para outros fins (industrial, geração de energia, recreação) (ANA, 2007).

Apesar do Brasil ser detentor de aproximadamente 10% das águas doces do planeta, a maior parte dessa água, aproximadamente 70%, está localizada na bacia Amazônica, região de menor índice demográfico do país, onde vivem apenas 7% da população. Sendo assim, a maior parte da população brasileira tem que dividir os 30% restantes. Em relação à água consumida no Brasil, metade ocorre na agricultura irrigada, a qual está vinculada a aproximadamente 5% da área cultivada, o restante é utilizado para outros fins (industrial, geração de energia, recreação) (ANA, 2007; REBOUÇAS *et al.*, 2002; KRAUSE, 1997).

A prática da irrigação se constitui no maior usuário de águas no país. A região Sul, demanda cerca de 41% (34% do total usado no Brasil) da água usada na irrigação (REBOUÇAS *et al.*, 2002). A água é um dos mais importantes fatores na produção do arroz, pois influencia nas características da planta, nas condições nutricionais do solo, regula a temperatura e controla as plantas daninhas (SOSBAI, 2003).

No RS, predomina o cultivo do arroz irrigado com as sementes distribuídas em solos secos com a semeadura feita em linhas ou a lanço. O início da irrigação ocorre em torno da terceira semana após a germinação e, na maioria das vezes, é intermitente até a pré-colheita (EMBRAPA, 1999). Tradicionalmente, é utilizada a irrigação contínua com água corrente, que se caracteriza por um elevado consumo (15.000 m^3 ha^{-1}) e baixa eficiência (IRGA, 2007).

Com o decorrer do tempo, as vantagens do sistema são suplantadas pelas desvantagens ambientais. Apesar da grande contribuição do Estado do RS na produção de arroz, muito pouco, até o momento, se fez em relação a estudos de comportamento e destino dos herbicidas no sistema, visando à manutenção da eficiência com menor risco e dano ambiental.

2.3.2 A necessidade de água para o arroz irrigado

O cultivo de arroz pode ser realizado no sistema irrigado, cujas lavouras concentram-se em sua grande maioria no Sul do País, ou no sistema de terras altas (ou de sequeiro), que é mais utilizado no cerrado brasileiro. Pode ser realizado em 4 diferentes sistemas, os quais diferenciam-se, basicamente, quanto à forma de

preparo do solo, métodos de semeadura e manejo inicial da água e dividem-se em: sistema convencional, cultivo mínimo, plantio direto, pré-germinado, mix e transplante de mudas.

Atualmente, no RS predomina o sistema de cultivo convencional (70,0%) seguido dos sistemas mínimo e plantio direto (19,0% da área) e pré-germinado + mix (11,0%) (ZAFFARONI & TAVARES, 2007). Em Santa Catarina (SC), o sistema pré-germinado é a única forma de cultivo de arroz irrigado utilizado (SOSBAI, 2003).

O cultivo mínimo é o sistema no qual se utiliza menor mobilização do solo, comparado ao convencional. O preparo do solo pode ser realizado tanto no verão como no final do inverno e a semeadura é realizada diretamente sobre a cobertura vegetal previamente dessecada com herbicida, sem revolvimento do solo, o que diminui a incidência de plantas daninhas, principalmente arroz vermelho (SOSBAI, 2003).

O sistema pré-germinado caracteriza-se pelo uso de sementes pré-germinadas em solo previamente inundado. Esse sistema tem-se mostrado mais eficaz no manejo da água, tendo em vista a boa distribuição da água e um maior planejamento no sistema de irrigação e drenagem. A manutenção da lâmina de água, após a semeadura pode provocar a morte das sementes pré-germinadas por falta de oxigênio, reduzindo a população das plântulas de arroz (SOSBAI, 2003). Para evitar esse problema, recomenda-se a drenagem dos quadros até o estabelecimento das plântulas. Entretanto, com esta prática, os nutrientes, colóides em suspensão e os pesticidas aplicados são liberados junto com a água para o meio ambiente. Portanto, no sistema pré-germinado, a drenagem da área após a semeadura pode desencadear grave problema ambiental, ao mesmo tempo que pode causar perdas dos nutrientes e/ou de pesticidas que estão presentes na água de irrigação que é liberada (MACHADO, 2003).

A irrigação da lavoura de arroz está intimamente relacionada ao sistema de cultivo adotado. A adoção de um ou de outro sistema irá determinar diferenças na época de início e fim da irrigação, manejo e consumo da água e no preparo do solo.

Para suprir a necessidade de água durante o ciclo para os cultivos convencional, mínimo e plantio direto, recomenda-se a utilização de vazões contínuas de 1,5 a 2,0 L s^{-1} ha^{-1}, num período médio de irrigação de 80-100 dias. No sistema pré-germinado, apesar do período de irrigação ser proporcionalmente maior, normalmente ocorre um menor consumo de água. Para a manutenção da lâmina,

vazões em torno de 1,0 L s^{-1} ha^{-1} são suficientes, devido a menor percolação da água no solo. A Tabela 2 compara o consumo total de água entre os diferentes sistemas de cultivo de arroz irrigado no RS.

Tabela 2 - Estimativa do consumo total de água para irrigação do arroz no Rio Grande do Sul (ZAFFARONI & TAVARES, 2007; OLIVEIRA, 2007)

Sistema de cultivo	Área (ha)	Área (%)	Consumo (1000 m^3 ha^{-1})	Consumo (1000 m^3)	Consumo (%)
Convencional, cultivo mínimo e plantio direto	845500	89,0	17,28	14610240	94
Pré-germinado	104500	11,0	8,90	929967	6
Total	950000	100	-	15540207	100

No entanto, o manejo da água é de fundamental importância para o sucesso na produção de arroz irrigado. A água, além de influenciar no aspecto físico das plantas, interfere também na disponibilidade dos nutrientes, na população e espécies de plantas daninhas presentes bem como na incidência de algumas pragas e doenças. A quantidade de água exigida para o cultivo de arroz é o somatório da água necessária para saturar o solo, formar uma lâmina, compensar a evapotranspiração e repor as perdas por percolação vertical, as perdas laterais e dos canais de irrigação.

2.4 Os Pesticidas

2.4.1 Conceitos e denominações dos pesticidas

A designação do termo pesticida já inaugura a polêmica: ecologistas e defensores do meio ambiente falam agrotóxicos, enquanto as indústrias produtoras usam a expressão “defensivos agrícolas”. Agrotóxicos, defensivos agrícolas, praguicidas, pesticidas e até biocidas são denominações dadas às substâncias

químicas, naturais ou sintéticas, destinadas a matar, controlar ou combater de algum modo as pragas, no sentido mais amplo: tudo aquilo que ataca, lesa ou transmite enfermidade às plantas, aos animais e ao homem. Adotando-se essa definição, arrolam-se entre as pragas: insetos, carrapatos, aracnídeos, roedores, fungos, bactérias, ervas daninhas ou qualquer outra forma de vida animal ou vegetal danosa à saúde e ao bem-estar do homem, à lavoura, à pecuária e seus produtos e a outras matérias-primas alimentares. Por extensão, incluem-se nesta categoria os agentes desfolhantes, os dessecantes e as substâncias reguladoras do crescimento vegetal. Excluem-se as vacinas, os medicamentos, os antibióticos de uso humano e veterinário e os agentes usados para o controle biológico das pragas (BARBOSA, 2004).

Segundo BAIRD (2002), os pesticidas são substâncias que podem matar diretamente um organismo indesejável ou controlá-lo de alguma maneira, por exemplo, interferindo em seu processo reprodutivo. Segundo o Instituto de Recursos Naturais da Grã-Bretanha (WRI, do inglês *World Resources Institute*) (1998), a maior parte dos pesticidas utilizados pelos países em desenvolvimento são os inseticidas, o que leva as pragas a criarem resistência e causarem grande parte dos danos à saúde. Os inseticidas organofosforados e carbamatos são menos persistentes que os organoclorados, mas são potencialmente mais tóxicos para os agricultores, especialmente quando não utilizados de maneira correta.

No Brasil, o Decreto nº 4.074, de 4 de janeiro de 2002, que regulamenta a Lei nº 7802/1989, os defensivos agrícolas, ou agrotóxicos, são produtos e agentes de processos físicos, químicos ou biológicos, destinados ao uso nos setores de produção, no armazenamento e beneficiamento de produtos agrícolas, nas pastagens, na proteção de florestas, nativas ou plantadas, e de outros ecossistemas e de ambientes urbanos, hídricos e industriais, cuja finalidade seja alterar a composição da flora ou da fauna, a fim de preservá-las da ação danosa de seres vivos considerados nocivos, bem como as substâncias de produtos empregados como desfolhantes, dessecantes, estimuladores e inibidores de crescimento (BRASIL, 2002).

Para efeitos deste estudo, adotou-se a denominação “pesticida”, seguindo a tendência internacional empregada em publicações da área.

Atualmente, no Brasil, mais de 300 princípios ativos e mais de 4.000 produtos comerciais e formulações de pesticidas estão no mercado e seu uso continua em

crescimento, em função do aumento da área cultivada, apesar da diminuição do número de usuários. O maior emprego de pesticidas ocorre nas culturas de soja, seguido do das culturas de cana-de-açúcar e algodão (SINDAG, 2007).

2.4.2 O uso de pesticidas

Os pesticidas começaram a ser utilizados em escala mundial após a segunda grande Guerra Mundial, sendo que vários deles já serviram de arma química nas guerras da Coréia e do Vietnã, como o Agente Laranja (mistura de 2,4-D e 2,4,5 T), desfolhante que dizimou milhares de soldados e civis (BARBOSA, 2004).

A partir daí, os países que tinham a agricultura como principal base de sustentação econômica, como aqueles na África, na Ásia e na América Latina, sofreram fortes pressões de organismos financiadores internacionais para adquirir essas substâncias químicas. A alegação era de que os agrotóxicos garantiriam a produção de alimentos para combater a fome. Com o inofensivo nome de "defensivos agrícolas", eles eram incluídos compulsoriamente, junto com adubos e fertilizantes químicos, nos financiamentos agrícolas. Sua utilização na agricultura nacional em larga escala ocorreu a partir da década de 70, do século passado (BARBOSA, 2004).

Atualmente, o Brasil é um dos países que mais utilizam pesticidas no mundo. No ano de 2006 foram gastos cerca de 3,9 bilhões de dólares nessas negociações (SINDAG, 2007). Infelizmente, pouco se faz para controlar os impactos sobre a saúde dos que produzem e dos que consomem os alimentos impregnados por essas substâncias. Pesticidas como o DDT (inseticida organoclorado) foi banido em vários países, a partir da década de 1970, quando estudos revelaram que os resíduos desses clorados persistiam ao longo de toda a cadeia alimentar, contaminando inclusive o leite materno (BAIRD, 2002).

No Brasil, somente em 1992, foram banidas as fórmulas à base de cloro (como BHC, aldrin, lindano), assim como várias outras substâncias, como o amitraz. A lei de pesticidas nº 7802, aprovada em 1989, proíbe o registro de produtos que possam provocar câncer, defeitos na criança em gestação (teratogênese) e nas células (mutagênese). Ainda assim produtos que já haviam sido proibidos continuam

sendo comercializados ilegalmente. Já os fungicidas manebe, zinebe e mancozebe perigosos devido a toxicidade, embora proibidos em vários países, são ainda muito usados no Brasil. O gramoxone (também conhecido como mata-mato), cujo princípio ativo é o paraquat que é proibido em diversos países, no Brasil é largamente usado no combate à ervas daninhas (PIZZUTTI, 2006).

2.4.3 A Legislação para pesticidas

O mercado, consumidor de produtos *in natura* ou processados, tem exigido requerimentos fitossanitários rigorosos, o que requer uma visão diferenciada de produção de arroz, priorizando a segurança do alimento e do meio ambiente. Nesse enfoque, a qualidade do grão é de vital importância para a conquista de novos nichos de mercado, principalmente quando considerada em relação ao Limite Máximo de Resíduos - LMR aceito pelos países importadores e recomendado pelo *Codex Alimentarius* (FAO, 2004). Na Tabela 3 estão listados os agrotóxicos mundialmente utilizados para a cultura do arroz, com seus respectivos LMRs permitidos pelo *Codex Alimentarius,* União Européia (EU) (DIRECTIVE 86/363/EEC, 2008) e Ministério da Agricultura (AGROFIT, 2008) para o grão de arroz e os limites estabelecidos para águas seguindo a legislação brasileira e a Agência de Proteção Ambiental (EPA do Inglês *Environmental Protection Agency*)) dos Estados Unidos. Alimentos com resíduos acima dos limites estabelecidos podem causar enormes prejuízos aos produtores, visto a proibição imposta por mercados externos. Além disto, não oferecem segurança alimentar e ambiental para os consumidores internos, que estão exigindo uma produção mais limpa. Assim, níveis de resíduos de agrotóxicos devem ser monitorados para evitar barreiras econômicas.

Devido ao fato dos mananciais de água serem fonte de água potável, muitas agências ambientais têm imposto legislações rigorosas a respeito da qualidade dessas águas. No Brasil, o Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA) na Resolução n° 357, de março de 2005 estabelece níveis de qualidade para águas ambientais, avaliados por parâmetros e indicadores específicos, de modo a assegurar o uso das águas doce, salgada e salobra (BRASIL, 2005). Já a Portaria n° 518 de março de 2004, do Ministério da Saúde, estabelece procedimentos e

responsabilidades relativos ao controle e vigilância da qualidade da água para consumo humano e seu padrão de potabilidade (BRASIL, 2004). De maneira geral, os limites estabelecidos pela Resolução do CONAMA são menores que os estabelecidos pela Portaria do Ministério da Saúde, os quais são em geral bastante altos. Nenhum dos compostos estudados neste trabalho possui limites na legislação brasileira.

TABELA 3 – Limites máximos de resíduos (LMR) de pesticidas permitidos em arroz (FAO, 2002; DIRECTIVE 86/363/EEC, 2008; AGROFIT, 2008) e águas (BRASIL, 2004; BRASIL, 2005).

Pesticidas	Arroz (mg kg^{-1})			Águas (µg L^{-1})		
	AGROFIT	União Européia	Codex Alimentarius	Portaria 518	Resolução 357	EPA/EUA
Alacloro	-	-	-	20	20	2
Aldrin e dieldrin	-	0,01	-	0,03	0,005	-
Atrazina	-	0,1	-	2	2	3
Bentazona	0,02	0,1	0,1	300	-	-
Bispiribaque Sódico	0,01	-	-	-	-	-
Carbaril	-	1,0	5,0	-	0,02	-
Carbofurano	0,2	0,02	-	-	-	-
Clomazona	0,1	-	-	-	-	-
Clordano (isômeros)	-	-	-	0,2	0,04	2
Clorpirifós	-	0,05	0,1	-	-	-
Clorpirifós metilico	-	3,00	0,1	-	-	-
2,4-D	0,2	0,05	0,05	30	4	70
DDT (isômeros)	-	0,05	-	2	0,002	-
Diquat	-	0,05	10	-	-	-
Disulfotam	-	0,02	0,5	-	-	-
Endolsulfam	-	0,05	0,1	20	0,056	-
Endrim	-	0,01	-	0,6	0,004	2
Fentim	-	0,05	0,1	-	-	-
Fipronil	0,01	-	-	-	-	-
Glifosato	0,2	0,1	0,1	500	65	700
Heptacloro e Heptacloro epóxido	-	0,01	-	0,03	0,01	0,6
Hexaclorobenzeno	-	0,01	-	1	0,0065	1
Imazapique	0,05		-	-	-	-
Imazetapir	0,05		-	-	-	-
Lindano	-	0,01	-	2	0,02	0,2
Malation	8,0	8,0	-	-	0,1	-
Metolacloro	-	0,05	-	10	10	-
Metoxicloro	-	0,01	-	20	0,03	40
Molinato	0,1	0,05	-	6	-	-
Paraquat	-	0,02	10	-	-	-

Parationa	0,2	0,05	-	-	0,04	-
Pendimentalina	0,05	0,05	-	20	-	-
Pentaclorofenol	-	-	-	9	0,009	1
Permetrina	0,1	-	-	20	-	-
Propanil	2,0	-	-	20	-	-
Simazina	-	-	-	2	2	4
Tebuconazole	0,1	-	-	-	-	-
Trifluralina	0,05	-	-	20	0,2	-

A EPA estabeleceu, em 2001, os padrões aceitáveis para água potável, com indicação do nível abaixo do qual não há risco para a saúde do consumidor e também do mais alto nível que é permitido (EUA, 2001). A União Européia estabelece limites mais rígidos. Para água potável, onde é permitida uma concentração máxima de 0,1 $\mu g\ L^{-1}$ para pesticidas individuais e 0,5 $\mu g\ L^{-1}$ para a soma de pesticidas, incluindo metabólitos ou produtos da degradação tóxicos (SCHUETTE *et al.*, 1990; KUSTER et al, 2006). Para águas superficiais, que serão destinadas a tratamento para posterior consumo humano, este limite máximo permitido é de 1 a 5 $\mu g\ L^{-1}$ (KUSTER et al, 2006).

2.4.4 Toxicidade dos pesticidas

O uso descontrolado, o medo de perda da produtividade da safra, a não utilização de equipamentos de proteção e o pouco conhecimento dos riscos, são alguns dos responsáveis pela intoxicação dos trabalhadores rurais.

Várias constatações foram feitas com trabalhadores rurais, que demonstraram relação entre a exposição crônica à pesticidas e doenças, principalmente do sistema nervoso (central e periférico). Além disso, também ocorrem episódios de intoxicação aguda, colocando em risco a vida dos trabalhadores rurais.

Os riscos não se limitam ao homem do campo, pois os resíduos das aplicações atingem os mananciais de água, o solo e o ar. Além disso, os alimentos comercializados nas cidades podem apresentar resíduos tóxicos. No Rio Grande do Sul, vários casos de intoxicação humana e animal com pesticidas por uso agrícola, doméstico, raticidas, e domissanitários já foram noticiados e tem aumentado ao longo dos anos (CIT, 2007).

A legislação brasileira obriga às formulações de pesticidas a apresentarem no rótulo, a cor correspondente à classe de sua toxicidade, conforme demonstrado na Figura 3 para alertar sobre o perigo desta formulação (BRASIL, 2002).

Classe I	**Faixa Vermelha – extremamente tóxico**
Classe II	**Faixa Amarela – altamente tóxico**
Classe III	**Faixa Azul – mediamente tóxico**
Classe IV	**Faixa Verde – pouco tóxico**

Figura 3 - Classificação toxicológica das formulações de pesticidas (Fonte: CIT, 2007).

2.4.5 Características físico-químicas dos pesticidas

Cada pesticida, em virtude dos átomos que o compõem, seu número e da maneira como eles são arranjados na estrutura química, possui uma série específica de propriedades físico-químicas.

As principais propriedades físico-químicas dos pesticidas relacionadas com o seu comportamento são as seguintes: solubilidade em água (S), pressão de vapor (PV), coeficiente de partição octanol-água (K_{ow}), constante de equilíbrio de ionização ácido (pK_a), ou base (pK_b), constante da lei de Henry (H), reatividade ou meia-vida ($t_{1/2}$).

A solubilidade em água, pressão de vapor, coeficiente de partição octanol-água e constante de ionização ácido ou base são propriedades químicas fundamentais obtidas no laboratório sob condições controladas e por métodos muito bem conhecidos (BARCELÓ & HENNION, 1997). Elas podem variar apenas com a temperatura e muito raramente com a pressão atmosférica. A meia-vida do pesticida por ser medida em condições de campo é um pouco diferente, seus resultados são dependentes das condições experimentais (local e tipo de solo, modo de aplicação, teor de água no solo, temperatura, etc.). Estudos realizados com o inseticida fenitrotiona indicaram uma redução no $t_{1/2}$ de 49,5 para 4,7 dias quando a

temperatura foi elevada de 23 para 49,7 ºC comprovando que os tempos de meia-vida dependem fortemente da temperatura (BARCELÓ & HENNION, 1997).

As propriedades físico-químicas dos pesticidas são importantes parâmetros que podem ser avaliados para estabelecer um conhecimento prévio sobre o seu potencial de risco como contaminante (PRIMEL *et al.*, 2005). Parâmetros como: constante da lei de Henry (K_H), solubilidade em água, coeficiente de partição octanol-água (K_{ow}), coeficiente de adsorção à matéria orgânica do solo (K_{oc}), constante de ionização ácida (pK_a), tempo de meia-vida ($t_{1/2}$) na água (DORES & DE LAMONICA-FREIRE, 2001) podem ser avaliados. Segundo BARCELÓ & HENNION (1997) pesticidas ácidos apresentam pK_a < 3-4, básicos pK_a > 10; polares tem log K_{ow} < 1-1,5, não polar log K_{ow} > 4-5; entre os dois valores são considerados moderadamente polares. Os pesticidas com log K_{ow} >3,0 sofrem bioacumulação.

A Tabela 4 relaciona algumas propriedades físico-químicas de pesticidas que são frequentemente usados na cultura de arroz irrigado, considerados importantes para avaliar os riscos de contaminação para águas (BARCELÓ & HENNION, 1997; TOMLIM, 2000, DORES & DE LAMONICA-FREIRE, 2001, PRIMEL *et al.*, 2005; NPIC, 2007.).

Tabela 4 - Algumas propriedades físico-químicas dos pesticidas que indicam seu potencial de risco para ambientes aquáticos (BARCELÓ & HENNION, 1997; TOMLIM, 2000; DORES & DE LAMONICA-FREIRE, 2001; NPIC, 2007).

Herbicidas	Solubilidade em água (mg L^{-1})	K_{oc} (cm^3g^{-1})	log K_{ow}	pK_a	PV (mPa) (20 ºC)	K_H (Pa m^3mol^{-1})	$t_{1/2}$ água (dias)
Clomazone	1100	150-562	2,54	-	19,2	$4,19x10^{-3}$	> 30
Imazapique	2200	-	-2	3,9	<0,013	-	-
Imazetapir	1400	10	1,49	3,9	<0,013	-	-
Metsulfuron metílico	2790	35	-1,74	3,3	$3,3 \times 10^{-7}$	$2,3 \times 10^{-10}$	22
Propanil	130	239-800	3,3	-	0,026	$3,6x10^{-3}$	1 - 2
Quincloraque	0,065	-	-1,15	4,3	< 0,01	$< 3,72x10^{-2}$	-

onde: K_H = constante da lei de Henry, K_{ow} = coeficiente de partição octanol-água, K_{oc} = coeficiente de adsorção à matéria orgânica do solo, $t_{1/2}$ = tempo de meia-vida; PV= pressão de vapor; pK_a= constante de ionização ácida.

O comportamento dos pesticidas no ambiente deve ser em princípio, diferente entre condições temperadas e tropicais. Segundo BARCELÓ & HENNION (1997), alguns dados sugerem que as taxas de degradação devem ser mais altas em países tropicais devido às temperaturas mais elevadas e à radiação mais intensa. Por outro lado, alguns estudos mostram que a toxicidade deve aumentar com o aumento da temperatura.

Uma vez que existem poucos estudos sobre pesticidas em ambientes tropicais, optou-se por usar os dados publicados na literatura para ambientes temperados, de modo que fosse possível uma comparação entre eles. É importante notar na Tabela 4 que as propriedades físico-químicas dos herbicidas diferem grandemente entre os diversos compostos, tornando extremamente difícil a tarefa de fazer generalizações sobre os destinos e impactos desses pesticidas no ambiente.

2.4.6 Os pesticidas como contaminantes das águas e solos

Desde o início de seu desenvolvimento, a produção agrícola está diretamente relacionada com a aplicação de substâncias químicas para controlar as pestes, que atacam os produtos agrícolas, prejudicando as colheitas, fazendo com que aumente a produção e o desenvolvimento de novos pesticidas (BARBOSA, 2004). O solo foi considerado durante muito tempo um sistema fechado, isolado e inerte, no qual era possível fazer depósito de resíduos sem que houvesse maiores problemas para os organismos que nele viviam. Isso não é verdade, pois o solo faz parte de um sistema e está em constante renovação, embora esta renovação possa ser lenta (AZEVEDO & DALMOLIN, 2006).

A aplicação indiscriminada de pesticidas conduz, geralmente à graves problemas ambientais. Dependendo de sua composição e toxicidade, os pesticidas podem ser classificados como cancerígenos, mutagênicos, teratogênicos e mimetizadores de hormônios (BAIRD, 2002); são aplicados em grande quantidade, em áreas bastante extensas e também no emprego domissanitário, e geralmente possuem uma grande persistência no meio ambiente (BIZUIK *et al.*, 1996).

A aplicação de pesticidas sintéticos tem sido uma prática rotineira na agricultura nos últimos cinqüenta anos. O uso indiscriminado desses compostos tem feito com que sejam detectados resíduos desses no ambiente e associados com um risco potencial a saúde pública. Resíduos de pesticidas têm sido identificados em todos os compartimentos ambientais (ar, água e solo) e em todas as regiões geográficas incluindo aquelas mais distantes de sua liberação original, como oceanos, desertos e zonas polares (BAIRD, 2002; SPADOTTO *et al.*, 2004).

Os efeitos para o meio ambiente ocasionados por um pesticida dependem intrinsicamente da sua ecotoxicidade a organismos terrestres e aquáticos. Além disso, dependem diretamente das concentrações atingidas nos diferentes compartimentos ambientais (solo, água, planta e atmosfera) que, por sua vez, dependem do modo e das condições de aplicação, das propriedades físico-químicas, da quantidade ou dose usada, das condições ambientais e do comportamento e destino do pesticida no meio ambiente (SPADOTTO *et al.*, 2004; ROCHA *et al.*, 2004).

Os pesticidas podem alcançar os corpos de água diretamente em aplicações para controle de plantas aquáticas e mosquitos, ou indiretamente pela drenagem de terras agrícolas, permeação através do solo, em resíduos de produção de pesticidas e resíduos municipais (fungicidas e bactericidas) (BIZIUK *et al.*, 1996). Como estes compostos são aplicados no campo mediante pulverizadores, bombas e/ou aviões, na forma de *spray*, a influência dos ventos não pode ser evitada, e eles são então dispersos no ambiente, podendo também atingir águas superficiais.

Os avanços ocorridos no século XX tiveram reflexo direto na indústria de pesticidas, que vem desenvolvendo produtos cada vez mais eficazes, mais seletivos e, em geral, menos agressivos ao meio ambiente (BARBOSA, 2004). Essa evolução pode ser percebida nos dados apresentados na Tabela 5.

Tabela 5 - Variação geral na dose dos pesticidas aplicados, ocorrida no século XX (BARBOSA, 2004)

Década	Produto	Dose (g ha^{-1})
1900	Metaborato de sódio	1900000 – 5000000
1910	Clorato de sódio	22000 – 600000
1930	2-metil-4,6-dinitrofenol	11000
1940	Ácido (4-cloro-2-metilfenóxi) acético	1000 – 2000
1960	Trifluralina	500 – 1000
1980	Fluazifope de butila	250
1980	Sulfoniluréias	2 - 25

Esse aumento de eficácia dos compostos é de grande importância, pois a quantidade de produtos químicos lançados no meio ambiente pode ser reduzida. O que não significa, necessariamente, que o impacto ambiental seja menor, pois deve-se levar em conta também a ecotoxicidade destes compostos e o seu impacto em organismos não-alvo. Estima-se que aproximadamente 700 mil toneladas de pesticidas sejam lançadas, anualmente, no meio ambiente (BARBOSA, 2004).

Depois da aplicação de um pesticida, vários processos físicos, químicos, físico-químicos e biológicos determinam seu comportamento. O destino de um pesticida no ambiente é governado por processos de retenção (sorção), de transformação (degradação) e de transporte (deriva, volatilização, lixiviação, escoamento superficial), e por interações desses processos. A Figura 4 apresenta um diagrama esquemático das vias de poluição ambiental por pesticidas. Além da variedade de processos envolvidos na determinação do destino ambiental de pesticidas, diferenças nas estruturas e propriedades das substâncias químicas, e nas características e condições ambientais, podem afetar esses processos (SPADOTTO, 2002).

As maiores rotas de transferência de pesticidas para sistemas aquáticos são o escoamento superficial e a drenagem. O tipo de planta e a topografia do terreno têm decisiva importância na maioria desses processos. Assim, a dinâmica dos pesticidas no solo está relacionada com a precipitação pluvial e a irrigação (TRAUBEBERHARD *et al.*, 1995).

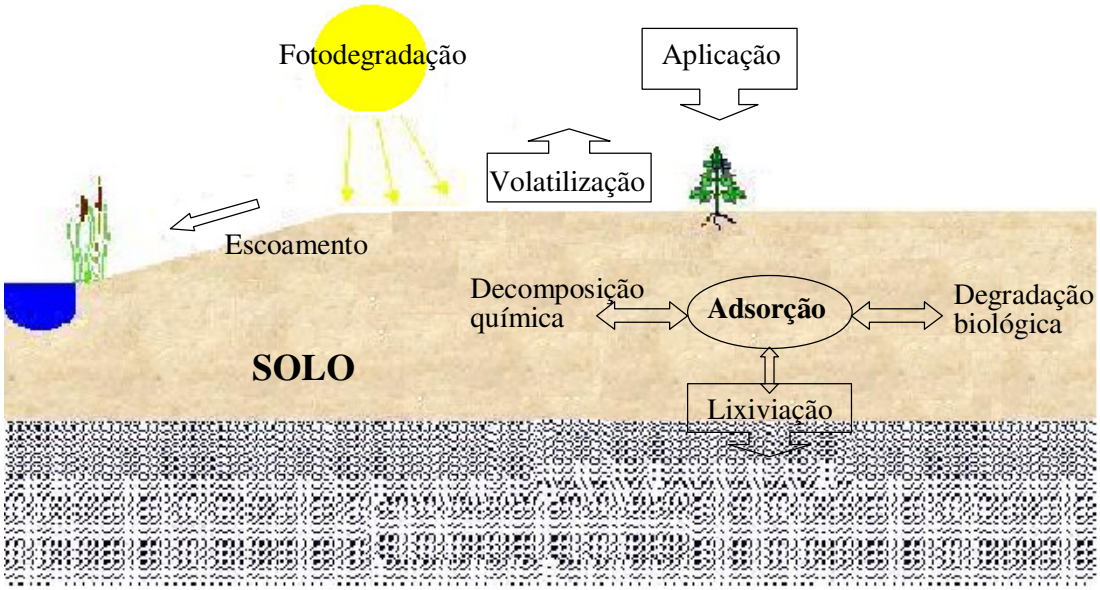


Figura 4 - Diagrama esquemático das vias de poluição ambiental por pesticidas [Adaptado de SPADOTTO, 2002].

Alguns compostos se bioacumulam em numerosas espécies e podem ser biomagnificados (ampliação biológica) através das cadeias tróficas. A cadeia alimentar aquática é um bom exemplo de como ocorre esse processo. Como exemplo, considere que a concentração de 2,2-bis(p-clorofenil)-1,1,1-tricloroetano (DDT) na água é de 0,000003 mg L^{-1}, mas que atinge 0,04 mg L^{-1} no plâncton, 0,5 mg L^{-1} na gordura de vairões, 2 mg L^{-1} nos peixes-agulha que nadam nessas águas e 25 mg L^{-1} na gordura das águias pescadoras que alimentam-se de peixe, perfazendo um fator de biomagnificação total de dez milhões (BAIRD, 2002). Essencialmente, a biomagnificação resulta de uma seqüência de etapas de bioacumulação que ocorrem ao longo da cadeia.

Os seres humanos não estão isentos desta contaminação e os pesticidas acumulam-se no organismo em tecidos lipídicos, fígado, rins, cérebro e coração. Como um agravante, muitos dos alimentos que fazem parte da dieta humana sofrem enriquecimento em relação à concentração inicial de pesticidas, como o leite, peixes de água doce ou salgada, crustáceos e vegetais.

Pesticidas são poluentes particularmente importantes dentre os compostos orgânicos devido ao seu uso freqüente e descontrolado. De acordo com um relatório publicado pela EPA, mais de 500000 toneladas de pesticidas foram usados nos Estados Unidos em 1985. Na Europa, o uso é difícil de estimar, porém o Reino

Unido reportou o uso de 14000 toneladas por ano durante o período de 1980 a 1983. O valor do mercado mundial para pesticidas foi estimado em US$ 32 bilhões em 2000, correspondendo a comercialização de mais de 3000 ingredientes ativos. As vendas totais de pesticidas variam muito com a categoria, sendo que os herbicidas representam 48%, os inseticidas 28%, os fungicidas 19% e os outros produtos 5% (BARBOSA, 2004). Desde o final dos anos 60, os herbicidas têm sido mais amplamente usados na América do Norte (BAIRD, 2002).

2.4.7 Características do solo que afetam a persistência dos pesticidas

Segundo o Departamento de Agricultura dos Estados Unidos (USDA do inglês *United States Department of Agricultural*) (2000), as características do solo e suas interações com as propriedades das moléculas dos pesticidas afetam a mobilidade destes. Algumas características mais importantes do solo, como a textura, permeabilidade assim como o teor de matéria orgânica, tem responsabilidade direta na sorção/dessorção de substâncias transportadas através do solo (KAH *et al.*, 2007).

A seguir serão apresentadas as principais características dos solos que afetam a persistência dos herbicidas (PASQUALETTO *et al.*, 1999; MULLER *et al.*, 2007; KAH *et al.*, 2007):

Tipo de solo: influencia não somente a persistência e a atividade dos pesticidas no solo, mas também a taxa com que são convertidos em outros compostos.

Conteúdo de matéria orgânica: este é o fator mais importante na persistência dos pesticidas no solo. A porcentagem de carbono orgânico (%C) pode variar de menos de 1% até 50%. Todas as evidências indicam que quanto maior a %C maior será a persistência dos pesticidas no solo.

Conteúdo de argila: o conteúdo de material coloidal pode ser tão importante quanto a %C. Os solos que apresentam um grande conteúdo de argila possuem uma grande área superficial interna e portanto, espera-se que eles retenham mais os pesticidas, devido a maior área para adsorção.

Acidez do solo: a concentração de íons hidrogênio pode influenciar a quebra das moléculas dos pesticidas no solo de muitas maneiras. Ela pode afetar a estabilidade do material argiloso, a capacidade de troca iônica, ou a taxa pela quais as decomposições químicas e bacterianas ocorrem. Entretanto, não há muitas evidências diretas de que a acidez influencie na persistência dos pesticidas no solo.

Conteúdo de minerais: a quantidade e variedade dos minerais no solo influenciam seu tipo e estrutura e também a persistência dos pesticidas. Por exemplo, a adsorção é provavelmente a primeira etapa no processo de decomposição catalítica, sendo que ela ocorre muito rapidamente em solos com alto teor de ferro.

Temperatura: os pesticidas desaparecem dos solos principalmente devido à degradação química, decomposição bacteriana ou volatilização, e todos estes processos são influenciados pela temperatura. À baixas temperaturas estes processos ocorrem muito lentamente e são pequenas as perdas de pesticidas.

Umidade do solo: a principal influência da umidade na persistência dos pesticidas no solo é devido aos efeitos da adsorção deles nas varias frações do solo. A água pode competir com os pesticidas pelos sítios de adsorção, pois ela é uma molécula muito polar e fortemente adsorvida pelos colóides do solo.

Sistema de estabelecimento da cultura: de acordo com a plantação, o solo pode estar exposto à maiores quantidades de chuva, vento e sol, fatores que influenciam fortemente a persistência de pesticidas no solo.

2.4.8 A degradação e a dissipação de pesticidas no solo

As principais rotas de degradação e/ou dissipação dos pesticidas no solo são (MULLER *et al.*, 2007):

Volatilização: quanto menor a volatilidade, e quanto menor pressão de vapor, menor será a evaporação dos pesticidas e menores as perdas. Evidências mostram que, mesmo pesticidas considerados não-voláteis, quando expostos à atmosfera por longos períodos de tempo, podem volatilizar. Principalmente em solos cultivados, restringe-se a volatilização na superfície do solo e ela irá depender dos transportes

para a superfície do solo. O transporte ocorre por movimentos de capilaridade ou por difusão molecular e ambos estes processos podem ser lentos.

Lixiviação: o movimento dos pesticidas através do solo, causado pela água, pode ser dividido em dois componentes distintos: movimento lateral dos pesticidas na superfície do solo e movimento de penetração dos pesticidas com a água drenada. O grau de lixiviação de um pesticida no solo está correlacionado com a sua solubilidade em água, mas este relacionamento não é simples, pois ele é afetado pela capacidade do pesticida de adsorver nas frações do solo.

Degradação microbiológica: Há muitas evidências de que os microrganismos são muito importantes na degradação de pesticidas persistentes, entretanto é bastante difícil diferenciar entre a degradação biológica e não-biológica. Os maiores grupos de microrganismos do solo são os actinomicetes, fungos e bactérias. Eles podem degradar os pesticidas através de β-oxidação, clivagem-éter, hidrólise éster e amida, oxidação de álcoois e aldeídos, dealquilação, hidroxilação, hidroalogenação, epoxidação, dealquilação redutiva, N-dealquilação, etc. A característica mais importante dos sistemas de degradação por microrganismos é serem redutivos.

Degradação pela luz solar: A luz solar, particularmente a radiação ultravioleta (UV), parece ser o fator mais significativo em relação aos efeitos da natureza. Um dos fatores mais importantes que afetam a degradação dos pesticidas pela luz solar é a presença de fotossensibilizadores. A primeira informação nesta área foi obtida quando se descobriu que a riboflavina sensibiliza a fotodecomposição do 2,4-D. Quatro tipos básicos de reações fotoquímicas podem ocorrer quando pesticidas aromáticos são expostos à radiação ultravioleta. São elas: substituição no anel, hidrólise (em solução aquosa), oxidação e polimerização. A reação de substituição mais comum no anel para clorados aromáticos é a troca do cloro do anel por um grupo hidroxila.

Sorção e Dessorção de pesticidas no solo: Grande parte dos processos e reações que ditam o destino de pesticidas no ambiente, como lixiviação, retenção e degradação, inicia-se na solução do solo. Dentre as reações que determinam esta disponibilidade, a dessorção é de fundamental importância. A sorção avalia o efeito das interações entre os pesticidas, o solo e água, e a mobilidade ou imobilidade do pesticida nesta fase sólida do solo (ZHU & SELIM, 2000; BARIZON *et al.*, 2005; MULLER *et al.*, 2007). As taxas de degradação, volatilização, hidrólise e fotólise são

diretamente dependentes dos processos de sorção e finalmente determinam a concentração do pesticida na solução do solo. A sorção é considerada como sendo um dos principais processos que afetam a interação que ocorre entre o pesticida e a fase sólida do solo. Os principais constituintes que representam a fase sólida no solo são: argila, minerais, matéria orgânica, óxidos e hidróxidos de alumínio e de ferro e sílica.

2.4.9 Herbicidas usados na cultura do arroz

Existe no mercado um grande número de compostos para controle de plantas daninhas, insetos, fungos e outros organismos que prejudicam a produção das lavouras, além de uma demanda crescente de novos produtos para controlar esses organismos.

Na Tabela 6, estão relacionados os herbicidas recomendados para a cultura do arroz irrigado, registrados no Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), levando-se em consideração os produtos disponíveis no mercado e a suscetibilidade das diferentes espécies daninhas aos diversos ingredientes ativos.

Na Região Sul do Brasil, a cultura do arroz irrigado sofre com a ação de pragas, como insetos, fungos, plantas daninhas entre outras que prejudicam a produtividade. O uso de pesticidas é a principal maneira para a prevenção e controle destas pragas.

Tabela 6 - Herbicidas recomendados para cultura do arroz irrigado Brasil (AGROFIT, 2007; ANVISA, 2007).

Nome Comum	Grupo Químico	IDA ($mg\ kg^{-1}$ pc)	Classe Toxicológica
2,4-D	ácido ariloxialcanóico	1	I
Azinsulfurom	sulfoniluréia	0,1	III
Bentazona	benzotiadiazinona	0,1	III
Bispiribaque-sódico	ácido pirimidiniloxibenzóico	0,01	III
Carfentrazona-etílica	triazolona	0,03	IV

Cialofope-butílico	ácido ariloxifenoxipropiônico	0,003	III
Ciclossulfamurom	sulfoniluréia	0,03	III
Clomazona	isoxazolidinona	0,04	III
Dibrometo de diquate	bipiridílio	0,002	II
Dicloreto de paraquate	bipiridílio	0,004	I
Etoxissulfurom	sulfoniluréia	0,04	III
Glifosato	glicina substituída	0,042	IV
Imazapique	imidazolinona	0,5	II
Imazetapir	imidazolinona	0,25	III
Metsulfurom-metílico	sulfoniluréia	0,01	III
Molinato	tiocarbamato	0,02	II
Oxadiazona	oxadiazolona	0,005	III
Oxifluorfem	éter difenílico	0,003	III
Pendimetalina	dinitroanilina	0,1	III
Penoxsulam	sulfonanilida triazolopirimidina	0,05	III
Picloram	ácido piridinocarboxílico	0,07	III
Pirazossulfurom-etílico	sulfoniluréia	0,006	III
Propanil	anilida	0,005	III
Quincloraque	ácido quinolinocarboxílico	0,38	III
Sulfosato	glicina substituída	0,03	III
Tiobencarbe	tiocarbamato	0,01	III
Triclopir-butotílico	ácido piridiniloxialcanóico	0,05	III
Trifluralina	dinitroanilina	0,02	III

IDA = Ingestão Diária Aceitável; pc = peso corporal

Alguns dos herbicidas mais recomendados e empregados na cultura do arroz no estado do Rio Grande do Sul são demonstrados na Tabela 7 (IRGA, 2007), sendo clomazona, metsulfuron metílico, quincloraque e propanil os mais empregados na cultura de arroz irrigado na Região central do estado segundo informações do Departamento de Fitotecnia da UFSM e do Instituto Riograndense do Arroz (IRGA, 2007).

Tabelas 7 - Herbicidas freqüentemente empregados na cultura do arroz no estado do RS (IRGA, 2007).

Ingrediente Ativo	Nome Comercial	Grupo Químico	Ação
Bentazona	Basagran®	Bentiadiazole	Pós-emergente
Clomazona	Gamit®	Isoxazolidinona	Pré e pós-emergente
Glifosato	Roundup®	Derivado da Glicina	Sistêmico, total
Metsulfuron metílico	Ally®	Sulfoniluréia	Sistêmico, seletivo, pós-emergente
Pendimetalina	Herbadox®	Dinitroanilina	Seletivo, pré-emergente
Propanil	Stam®	Cloroanilida	Contato, pós-emergente
Quincloraque	Facet®	Quinolina	Seletivo, pós-emergente
Imazapique + Imazetapir	Only®	Imidazolinonas	Sistêmico, seletivo, Pré e pós-emergente

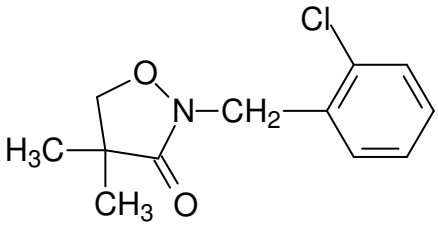
Muitas áreas cultivadas com arroz irrigado no Rio Grande do Sul estão infestadas com arroz vermelho que causam prejuízos na produção, na indústria e na comercialização dos grãos. Neste sentido, foi desenvolvida uma cultivar que foi adaptada ao cultivo de arroz irrigado tolerante à herbicidas usados para o controle do arroz vermelho. O desenvolvimento desta cultivar foi feito através de um retrocruzamento, utilizando-se uma linhagem como fonte doadora do gene que confere tolerância ao herbicida e feito o cruzamento com uma cultivar recorrente. Foram realizadas cinco gerações de retrocruzamento, ensaios de rendimento e avaliações para características fenotípicas (ÁVILA *et al.*, 2005; SHIVRAIN *et al.*, 2007). A linhagem selecionada deu origem a uma cultivar que se distingue da cultivar original por possuir o gene que confere tolerância ao herbicida Only®, herbicida da classe das imidazolinonas que é uma mistura dos princípios ativos do imazapique e imazetapir. Esta tolerância é resultado de uma mutação de um nucleotídeo simples no gene do ácido acetohidróxido (AHAS), alterando o sítio de ligação do herbicida na enzima (SHIVRAIN *et al.*, 2007).

Esta cultivar deve ser utilizada no sistema de produção Clearfield® (BASF, 2007), onde somente o herbicida Only® é recomendado para a aplicação.

2.4.10 Herbicidas escolhidos para o estudo

Dentre os principais pesticidas empregados em larga escala na agricultura brasileira, optou-se por desenvolver método para determinar resíduos dos herbicidas clomazona, imazapique e imazetapir em água e solos. A escolha baseou-se, principalmente, no intenso emprego destes na região central do estado do RS, grande produtora de arroz irrigado. Outro fator que determinou a escolha destes herbicidas foram as poucas informações científicas publicadas com relação à contaminação das águas e solos por estes herbicidas na nossa região. Abaixo são apresentados os herbicidas estudados e algumas propriedades obtidas no The e-Pesticide Manual (TOMLIN, 2003), no Guia de Herbicidas (RODRIGUES & ALMEIDA, 1998) e ANVISA (2006) as demais propriedades físico-químicas encontram-se na Tabela 4.

2.4.10.1 Clomazona



Grupo Químico: isoxazolidinona

Nome químico (IUPAC): 2-[(2-clorobenzil)]-4,4-dimetil-1,2-oxazolidin-3-ona

Classe: Herbicida

Número no CAS: 81777-89-1

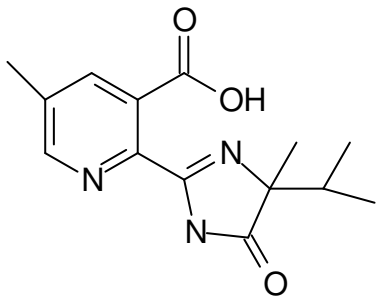
Massa molar: 239,7 g mol^{-1}

Classe toxicológica: III, medianamente tóxico

Nomes comerciais: Gamit®

O herbicida clomazona, de nome comercial Gamit® e da família das isoxazolidinonas, é um dos herbicidas mais utilizados na cultura do arroz irrigado no estado do RS. De aplicação pré-emergente, o herbicida também é utilizado no Brasil para culturas de soja, cana-de-açúcar, fumo e algodão.

2.4.10.2 Imazapique



Grupo químico: imidazolinona

Nome químico (IUPAC): (*RS*)-5-metil-2-(4-isopropil-4-metil-5-oxo-1*H*-imidazol-2-il) ácido nicotínico

Classe: herbicida

Fórmula molar: $C_{14}H_{17}N_3O_3$

Número no CAS: 81334-60-3

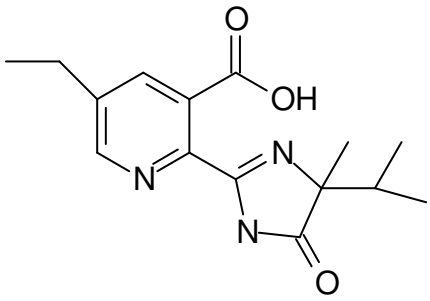
Massa molar: 275,3 g mol^{-1}

Classe toxicológica: III, medianamente tóxico

Nomes comerciais: Plateau®, Only®

É um herbicida seletivo para controle em pré e pós emergência de algumas plantas daninhas. Age inibindo a produção de aminoácidos de cadeia ramificada que são responsáveis pela síntese de proteínas e o crescimento da célula. É relativamente atóxico para mamíferos, pássaros e anfíbios. Tem um tempo de meia vida no solo de até 120 dias, e é rapidamente degradado pela luz solar em solução aquosa. Não é registrado para uso em sistemas aquáticos, quando aplicado individualmente. É mais indicado o uso para as culturas de cana-de-açúcar e algodão. A aplicação em ambiente aquático é para a cultura de arroz irrigado no sistema Clearfield®, quando aplicado na formulação Only®.

2.4.10.3 Imazetapir



Grupo químico: imidazolinona

Nome químico (IUPAC): (*RS*)-5-etil-2-(4-isopropil-4-metil-5-oxo-1*H*-imidazol-2-il) ácido nicotínico

Classe: herbicida

Fórmula molar: $C_{15}H_{19}N_3O_3$

Número no CAS: 81335-77-5

Massa molar: 289,3 g mol^{-1}

Classe toxicológica: III, medianamente tóxico

Nomes comerciais: Pivot®, Vezir®, Only®

O herbicida imazetapir é registrado no Brasil para o controle em pós-emergência precoce de mono e dicotiledôneas na cultura da soja e em pré e pós-emergência das plantas infestantes na cultura do arroz. Os produtos Pivot® e Vezir® são indicados como herbicidas para uso na cultura da soja. O produto comercial Only®, composto de uma mistura dos herbicidas imazetapir (75%) e imazapique (25%) é indicado para uso em pré e pós-emergência no cultivo de arroz irrigado, principalmente para controle do arroz vermelho. Essa mistura é apenas aplicada no sistema Clearfield®, que utiliza cultivares de arroz tolerantes aos herbicidas do grupo químico das imidazolinonas, de tal forma que o herbicida inibe o crescimento das plantas daninhas e não destrói as plantas de arroz.

As imidazolinonas são uma classe de pesticidas relativamente nova, o primeiro apareceu no mercado em 1981, e o mais recente em 1988 (WARE, 1994). Apesar disso, o imazetapir esteve na 7ª posição dos herbicidas mais usados nos EUA, nos anos 90 (SHORT & COLBORN, 1999). Eles possuem atividade foliar e no

solo. Os primeiros sintomas da atividade herbicida se manifestam na interrupção do crescimento, que ocorre dentro de 48 horas após a aplicação.

Herbicidas dessa classe são caracterizados por seus efeitos a baixas doses de aplicação, amplo espectro de atuação no controle de plantas daninhas e alta persistência no solo. O imazetapir não lixivia através do solo, é fraca a moderadamente adsorvido, não é perdido por volatilização a partir do solo e não é significativamente degradado pelos microorganismos do solo (EXTOXNET, 2006). A persistência destes compostos no solo é afetada por fatores como umidade, pH, matéria orgânica e tipo de solo. Estes fatores determinam a disponibilidade do herbicida na solução do solo e então sua degradação, principalmente devido a atividade microbial e também devido à hidrólise e decomposição (ALISTER & KOGAN, 2005). Esta alta persistência no solo pode levar a interferência destes compostos em outras culturas que venham a ser cultivadas, as quais sejam sensíveis aos herbicidas dessa classe.

2.5 Técnicas de extração e pré-concentração em amostras ambientais

A recuperação total (quantitativa) e a pureza do produto isolado são as principais medidas da eficiência da extração. Um procedimento de extração ideal deve ser rápido, seletivo e produzir uma recuperação quantitativa da espécie de interesse. Desde que a maioria das técnicas espectrométricas e cromatográficas, normalmente utilizam amostras líquidas, todo o procedimento de extração deveria produzir uma solução que não necessitasse posteriormente, de etapas de *clean up* e pré-concentração. Portanto, deverá ter como características principais: o mínimo de operações instrumentais, simplicidade, baixo custo e possibilidade de automação.

2.5.1 Extração de compostos orgânicos em amostras de solo

Pesticidas são normalmente recuperados de matrizes complexas (biológicas e ambientais) por extração exaustiva com uma variedade de solventes orgânicos, como por exemplo: hexano, éter de petróleo, acetona, acetonitrila, metanol e suas combinações. Os métodos variam desde simples agitação e outros mais exaustivos como a extração por Soxhlet (DEAN, 2003) até métodos mais modernos como Extração por Fluido Supercrítico ou (SFE, do inglês *Supercritical Fluid Extraction*) ou até mesmo Extração Assistida por Microondas (MAE, do inglês *Microwave Assisted Extraction*) (DEAN, 2003). Isso deve-se ao fato de que pesticidas que estiveram em contato com a matriz por algum tempo, poderiam interagir com a mesma e como resultado, mais difíceis de serem extraídos do que os que foram aplicados ou fortificados recentemente. Tentativas de distinguir os níveis totais e disponíveis de pesticidas envolvem o uso marcadores radioativos para determinar a eficiência de extração do solvente (DEAN, 2003). A seguir é feita uma breve descrição de alguns métodos que são mais comumente utilizados na extração de pesticidas de amostras de solo (MISTURA, 2003):

Extração com agitação mecânica: Normalmente é realizada à temperatura ambiente, podendo ser considerada uma versão simplificada da extração por soxhlet. Envolve grandes volumes de solventes e uma etapa posterior concentração. Na maioria das vezes, para uma extração quantitativa, tornam-se necessárias múltiplas extrações. A transferência da amostra é sempre dificultada, pois normalmente formam-se fases emulsionadas. Este processo é bastante limitado quanto ao tipo de amostra e espécies a serem extraídas (DEAN, 2003).

Extração por aparelhagem Soxhlet: A extração por Soxhlet tem sido o procedimento padrão de extração por mais de 100 anos. O tempo médio de extração com soxhlet pode variar de 1 a 72 h, aumentando assim os riscos de contaminação. Uma extração completa produz uma solução diluída, de volume grande que, usualmente, necessita ser concentrada (recuperado o solvente) antes mesmo das primeiras etapas da análise e sendo assim, os riscos de perdas são grandes. Na maioria dos casos, o processo de extração não é seletivo e, basicamente, quem controla o poder de solvatação e a temperatura de extração é a natureza do solvente. Comparado com outros métodos de extração, este é o de menor custo e

não exige grande habilidade do operador. A maior desvantagem do uso do soxhlet para extração é a utilização de grandes quantidades de solventes, normalmente de alta pureza, caros e tóxicos, tais como diclorometano, hexano e acetona (DEAN, 2003).

Extração por ultra-som: Nas últimas duas décadas, a aplicação de ultra-som aos processos químicos vem aumentando significativamente. Procedimentos usando o ultra-som vêm sendo efetivamente empregadas para limpeza, extração, esterilização, flotação, secagem, desgaseificação, desemulsificação, filtração, homogeneização, rompimento de células biológicas, cristalização e em outras reações químicas. Como técnica de extração, o ultra-som vem sendo usado como uma alternativa ao soxhlet. Neste caso a amostra é misturada ao solvente e colocada num recipiente que é imerso num banho de ultra-som ou em sondas de ultra-som. A dissolução é favorecida pelo processo de ultra-som e o calor muitas vezes melhora o rendimento. O procedimento é rápido e seguro, o consumo de solventes é pequena e podem ser realizadas simultaneamente múltiplas extrações.

Extração com fluido supercrítico (SFE): é uma técnica de extração e purificação simples e rápido, na etapa de preparação da amostra, apresentando alta velocidade de extração, uma vez que fluidos supercríticos possuem baixa viscosidade e ausência de tensão superficial, facilitando sua passagem através da amostra. Na presença de um modificador químico é possível extrair compostos de diferentes polaridades e características físico-químicas. Entre as principais vantagens desta técnica cita-se: redução do tempo de análise, quantidades mínimas de solvente, potencial de extração para compostos termicamente instáveis e compatibilidade com métodos *on-line* e automação. Entretanto, a SFE requer um investimento elevado em instrumentação.

Extração assistida por microondas, também conhecida por extração de solvente assistida por microondas (MAE) foi utilizada pela primeira vez para irradiar matrizes sólidas tais como solo, sementes, alimentos e pastos na presença de solventes de extração com altos momentos de dipolo. A extração MAE tem sido reportado como técnica de preparação de amostras para várias matrizes sólidas. Pesticidas organoclorados têm sido extraídos de amostras de solos e sedimentos utilizando-se um forno de microondas doméstico com 5 a 6 exposições de 30 s à energia de microondas utilizando-se um sistema de digestão de microondas modificado com dispositivos de segurança adicionais. Com esse procedimento, o

tempo de preparação da amostra pode ser reduzido para menos de 30 min e os volumes de consumo de solvente para menos de 50 mL.

2.5.2 Extração de compostos orgânicos em amostras de água

Quando tratamos da extração de pesticidas em amostras de água, devemos levar em consideração que estes encontram-se na maioria das vezes em concentrações muito baixas, o que requer além de uma extração eficiente, também uma etapa de pré-concentração.

A busca por esses limites de quantificação cada vez mais baixos conduziu a um crescente desenvolvimento de técnicas de extração e pré-concentração de pesticidas, cada vez mais eficientes, visando alcançar os limites impostos pela legislação (KUSTER *et al.*, 2006).

Os métodos mais freqüentemente empregados são a Extração Líquido Líquido (LLE, do inglês *Liquid Liquid Extraction*) e a Extração em Fase Sólida (SPE, do inglês *Solid Phase Extraction*).

A LLE é uma técnica muito usada em métodos padrões, sendo recomendada pela EPA (BARCELÓ & HENNION, 1997; PICÓ *et al.*, 2007), conhecida pela sua simplicidade, baseia-se na partição de diferentes analitos entre a fase aquosa e a fase orgânica (FONT *et al.*, 1993). Entretanto, tem inúmeras desvantagens como o fato de poder formar emulsão, requerer grandes volumes de solventes, muitas vezes tóxicos e inflamáveis, demandarem longo tempo de extração, além de ser trabalhosa e de difícil automação (FONT *et al.*, 1993).

A SPE, apesar de ser mais recente que a LLE, apresenta uma maior aceitação como uma ferramenta eficiente na extração e enriquecimento de traços de pesticidas em soluções onde se encontram muito diluídos como a água, gerando concentrações suficientes do analito para detecção (PICÓ *et al.*, 2007). A SPE utiliza uma coluna contendo um sorvente apropriado para reter o analito. A eluição da amostra e a vazão do solvente podem ser por gravidade, pressões de uma seringa ou bombas de vácuo. Tem as vantagens de possuir pequeno tempo de análise, consumo reduzido de solvente orgânico, ser menos trabalhosa e de fácil automação (BARCELÓ, 1991; WELLS, 2000b).

A SPE, na sua forma moderna, tem mais de 25 anos. Têm se tornado uma das técnicas mais comuns de concentração e *clean-up* da amostra usada pelos químicos analíticos. Através dos anos, o uso da SPE tem crescido devido ao fato de que essa técnica atende as necessidades dos analistas (MAJORS, 2006; MAJORS, 2007).

O desenvolvimento de novos sorventes e a grande variedade encontrada no mercado como resinas poliméricas, grupos C8, C18, amino ou ciano ligados ao suporte de sílica, ao carbono grafitizado ou alumina faz com que cresça o emprego da SPE (WELLS & YU, 2000a; LISKA, 2000, PICÓ *et al.*, 2007). A extração utilizando resinas poliméricas ocorre devido a adsorção dos analitos por meio de forças de Van der Waals, que permitem uma dessorção fácil. As resinas poliméricas mais comumente utilizadas são as do copolímero estireno-divinilbenzeno, tais como Amberlite XAD-2, XAD-4 e polímeros acrilatos (XAD-7 e XAD-8) (WELLS & YU, 2000a; PICO *et al.*, 2007).

A aplicação da SPE em substituição a LLE, pelo fato de que produz melhores resultados com menos complicações, tem provado que esta técnica é a melhor opção para determinação de pesticidas em amostras de águas (WELLS, 2000b).

O sorbente mais popular para extração de pesticidas em água possui o grupo octadecil (C18) ligado à sílica. O principal mecanismo de retenção é a partição, devido às interações apolares entre as ligações C-H do grupo C18 e C-H do analito (JUNKER-BUCHHEIT & WITZENBACHER, 1996; LISKA, 2000; PICO *et al.*, 2007).

2.6 Métodos cromatográficos para análise de pesticidas

Antes de se executar um plano de monitoramento e avaliação dos impactos ambientais de resíduos de pesticidas é necessário que sejam definidos e se disponha de métodos de preparação das amostras e de análise adequados para os baixos níveis de resíduos freqüentemente encontrados (RICHARDSON, 2006). Os baixos níveis de resíduos permitidos, impostos pelas agências regulamentadoras, requerem o desenvolvimento de métodos analíticos de altas sensibilidade, seletividade, exatidão e precisão elevadas para determinações quantitativas de pesticidas (BALINOVA, 1996, KUSTER *et al.*, 2006). A exatidão e precisão de uma

análise dependem da técnica empregada no preparo da amostra e do desempenho do equipamento utilizado. No passado, utilizaram-se várias técnicas para a determinação da qualidade das águas, como técnicas espectrofotométricas e métodos biológicos. A situação foi modificada com a introdução das técnicas cromatográficas (LISKA & SLOBODNÍK, 1996). As análises de resíduos de pesticidas em amostras biológicas e ambientais, desde meados de 1950, basearam-se, primeiramente, na GC (GC, do inglês *Gas Chromatography*) e em outras técnicas afins como a Cromatografia em Camada Delgada (TLC, do inglês *Thin Layer Chromatography*). Segundo MOYE (1990), o uso da Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC, do inglês *High Performance Liquid Chromatography*) em determinações de resíduos começaram a ser publicados no inicio dos anos 70, onde resíduos de inseticidas foram determinados em reservatórios de água com limite de detecção de 0,05 $\mu g\ L^{-1}$.

2.6.1 Cromatografia Líquida acoplada à Espectrometria de Massas (LC-MS)

Uma correta determinação e quantificação de um número grande de pesticidas de classes de substância química diferentes à baixas concentrações em matrizes complexas é um desafio. A tendência para o uso de pesticidas mais polares impulsionou a aplicação da cromatografia líquida na análise de pesticidas, especialmente quando aliada à espectrometria de massas. Juntas representam uma importante ferramenta analítica para a determinação de pesticidas e os seus produtos de degradação, uma vez que a maioria deles são polares, possuem baixa volatilidade e/ou termolábeis, o que tornam estas análises incapazes de serem realizadas por cromatografia gasosa. A Cromatografia Líquida acoplada ao Espectrômetro de Massas (LC-MS, do inglês *Liquid Chromatography - Mass Spectrometry*) tem apresentado alta sensibilidade e seletividade, se tornando uma importante ferramenta para esta finalidade, entre outras (KUSTER *et al.*, 2006). A determinação e quantificação corretas de um número grande de pesticidas de classes de substâncias químicas diferentes à baixas concentrações em matrizes complexas, é um grande desafio.

A Figure 5 ilustra as classes de pesticidas (classificadas de acordo com a atividade biológica e estrutura química) analisados através de LC-MS. Como mostra a figura, herbicidas seguidos por inseticidas, são os pesticidas mais investigados, considerando que os metabólitos ou produtos de transformação (TP) representam aproximadamente 20% de todos os pesticidas analisados com esta técnica.

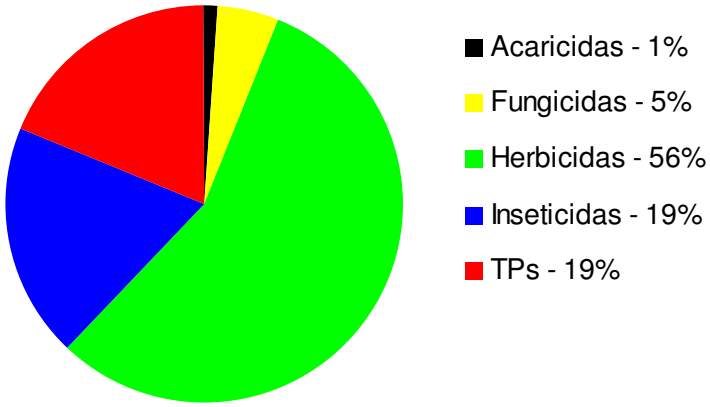


Figura 5 - Pesticidas analisados em amostras de água por LC-MS/MS (N=16 ≈200 pesticidas) (Adaptado de KUSTER *et al.*, 2006).

Nesta técnica analítica o espectrômetro de massas é usado como detector da cromatografia líquida, mas pode ser usado também um detector convencional não destrutivo colocado antes do espectrômetro de massas.

O ponto crítico da técnica LC-MS é a transferência dos constituintes do eluato da coluna cromatográfica que se encontra em uma fase líquida para uma fase gasosa na forma de íons, uma vez que o espectrômetro de massas opera em condições de alto vácuo (10^{-4} a 10^{-8} torr) (SKOOG, 1992;).

No caso do LC-MS existem diferentes métodos para introduzir o eluato da coluna no espectrômetro de massas, sendo que os íons já podem estar presentes na solução ou serem formados no processo de transferência (HARRIS, 2001; KUSTER *et al.*, 2006). Quanto aos espectrômetros de massas também existem diferentes tipos e que operam em diferentes modos

As moléculas da amostra são analisadas através de dois modos de ionização: *electrospray* (ESI, do inglês *Electrospray Ionization*) ou ionização química por pressão atmosférica (APCI, do inglês *Atmospheric Pressure Chemical Ionization*).

A sensibilidade de resposta em espectrometria de massas é claramente dependente da tecnologia da interface empregada. A interface termospray (TSP) (KIENHUIS & GEERDINK, 2000; GEERDINK *et al.*, 2002) foi muito empregada no passado para análise de pesticidas (HOGENBOOM *et al.*, 2001). Porém, esta interface raramente é encontrada em publicações mais recentes. Foi substituída pela ionização à pressão atmosférica (API, do inglês *Atmospheric Pressure Ionization*) que utiliza como fonte de ionização a ionização química à pressão atmosférica (APCI) e a ionização por *electrospray* (ESI). Estas duas representam a melhor escolha hoje em dia para análise de pesticidas. Em geral, APCI e ESI permitem uma melhor calibração linear com várias ordens de grandeza e uma eficiente ionização para compostos de diferentes polaridades (HOGENBOOM *et al.*, 2001). A seleção da fonte de ionização mais apropriada para análise de pesticidas depende muito das classes de compostos investigados. THURMAN *et al.* (2001), e BAGLIO *et al.* (1999) avaliaram a resposta de um grande número de pesticidas em LC-MS usando APCI ou ESI, pesticidas neutros e básicos (carbamatos, feniluréias, triazinas) e a fonte APCI apresentou uma melhor sensibilidade (especialmente no modo de íon positivo), considerando que herbicidas catiônicos e aniônicos (íons de bipiridílio, nitrofenóis, bentazona) melhor ionizados com ESI (especialmente no modo de íon negativo), a ionização não só depende dos parâmetros da interface, mas também das condições usadas no LC como a fase móvel. O uso de sais não voláteis na fase móvel (comum em outros métodos cromatográficos) tem que ser descartado, pois interferem na fonte de ionização. A composição da móvel fase e o seu pH também precisam ser otimizados, pois podem influenciar a eficiência de ionização do analitos (HOGENBOOM *et al.*, 2001).

Devido às publicações recentes citarem a substituição das interfaces *termospray* por outras com ionização à pressão atmosférica (API), a ionização química à pressão atmosférica (APCI) e a ionização por *electrospray* (ESI), representam a melhor escolha hoje em dia para análise de pesticidas. Abaixo será feito uma breve descrição destas fontes de ionização (FERNADEZ-ALBA, 2005).

2.6.1.1 Ionização por *Electrospray* (ESI)

É uma técnica apropriada para determinação da massa molar e da estrutura. É preferencialmente aplicada para a análise de moléculas iônicas grandes ou íons pequenos com uma única carga, podendo ser usada no modo positivo ou negativo.

Esta técnica gera, em solução, íons dos analitos antes que eles cheguem ao espectrômetro de massas (KUSTER *et al.*, 2006). O eluato é pulverizado (nebulizado) dentro de uma câmara que está sob pressão atmosférica, na presença de um forte campo eletrostático e de um gás aquecido. O aquecimento causa a evaporação do solvente das moléculas do analito. O gás aquecido promove aglomeração do solvente dentro da gota para evaporação. Com a diminuição da gota, ocorre à concentração da carga dentro da gota, e o processo acima descrito se repete. Os íons são transportados ao analisador de massas através de uma série de estágios de vácuo e elementos iônicos que focam o caminho. Algumas reações da fase gasosa, a maioria de transferência de prótons e troca iônica, também podem ocorrer no intervalo de tempo em que os íons são ejetados de dentro das gotas até alcançarem o analisador de massas (FERNADEZ-ALBA, 2005).

2.6.1.2 Ionização Química sob Pressão Atmosférica (APCI)

É uma técnica apropriada para determinação de massas molares menores do que 2000 unidades e da estrutura. É aplicada para análise de moléculas iônicas, polares e apolares, podendo ser usada no modo positivo e negativo.

No modo APCI, o eluato do LC é vaporizado através de um vaporizador aquecido (normalmente de 250 a 400 ºC), sob pressão atmosférica. O aquecimento vaporiza o líquido, e as moléculas do solvente na fase gasosa são ionizadas por uma descarga de elétrons a partir uma agulha condutora. Então, os íons do solvente transferem cargas para as moléculas do analito através de reações químicas

(ionização química) (FERNADEZ-ALBA, 2005). Os íons do analito passam através de um capilar de vidro dielétrico e de um orifício de amostragem para dentro do analisador de massas, como ESI e fotoionização sob pressão atmosférica (APPI, do inglês *Atmospheric Pressure Photoionization*). A APCI é aplicada a uma larga faixa de moléculas polares e apolares. Devido a isso, e devido ao fato de altas temperaturas estarem envolvidas, a APCI é menos utilizada do que o *electrospray* para a análise de biomoléculas grandes que podem ser termicamente instáveis. APCI é usada com cromatografia em fase normal mais freqüentemente do que o *electrospray*, porque os analitos são usualmente apolares (KUSTER *et al.*, 2006).

O desenvolvimento de analisadores, quadrupolo, triplo quadrupolo, quadrupolo-ion trap, entre outros são de grande importância, pois a sensibilidade alcançada pelo método vai depender do analisador utilizado.

2.6.1.3 Analisadores

A configuração de LC-MS/MS mais freqüentemente usada na análise de resíduos de pesticidas apresenta o sistema de LC aliada a um analisador com triplo quadrupolo que opera no modo MRM (MRM, do inglês *Multiple Reaction Monitoring*) por meio de interfaces de API. KUSTER *et al.* (2006) mostraram que aproximadamente 70% dos métodos revisados na literatura estão baseados nesta configuração. Os analisadores Q-Trap também foi empregado e, nos últimos anos, Q-TOF (Q-Time of Flight) ganharam em popularidade, especialmente na identificação de metabolitos. A seleção do analisador é determinada pela sensibilidade e seletividade e o objetivo geral do trabalho. Assim, para determinação de analitos, analisadores triplo quadrupolo são a melhor opção, considerando que para compostos desconhecidos, é mais indicado usar o analisador Q-TOF.

Analisadores Triplo Quadrupolo (*QqQ*): consiste de dois analisadores quadrupolo que tem entre eles uma cela de colisão. As vantagens principais de empregar um Triplo Quadrupolo para análise de pesticidas estão na alta sensibilidade e seletividade. Um QqQ pode operar em modos diferentes que são scan do íon-produto, scan do íon-precursor, perda neutra, além do modo MRM. O uso de QqQ para analisar uma classe específica (organofosforados, carbamatos,

feniluréias, e triazinas) operando no modo de perda neutra e íon-precursor foi revisado por HOGENBOOM *et al.* (2001). Infelizmente, para ambos a sensibilidade e especificidade foram limitadas na identificação dos compostos. MRM é sem nenhuma dúvida o mais conveniente e o modo mais usado de operação para pesticidas (e em geral outros contaminantes). MRM oferece uma alta sensibilidade e seletividade (LAGANA *et al.*, 2002; ATRACHE *et al.*, 2005). Os Limites de Detecção do instrumento geralmente estão na ordem de µg L^{-1} ou ng L^{-1} e geralmente percorre aproximadamente três ordens de grandeza.

Analisadores Quadrupolo-Trap (*Q-Trap*): Instrumentos com analisadores Q-Trap consistem de três elétrodos, em três configurações dimensionais que produzem um campo quadrupolar dentro do analisador. O uso destes analisadores para a análise de pesticidas foi reportado por vários autores (BAGLIO *et al.*, 1999; JEANNOT *et al.*, 2000; SUN & LEE, 2003; SOLER *et al.*, 2007), o desenvolvimento destes analisadores, de modo que os eletrodos funcionem de modo linear, vai tornar este tipo de analisadores com uma capacidade maior de escanear íons filho (MARCH, 2000).

Quadrupolo-TOF: oferecem, vantagens como uma medida de massa precisa, e completa informação do espectro de massas do composto (HOGENBOOM *et al.*, 2001). Essas características fazem do Q-TOF um instrumento ideal para compostos desconhecidos (REEMTSMA, 2003). Foi usado por vários autores na identificação e quantificação de pesticidas e seus produtos de transformação (TPs) em amostras de água (MAIZELS & BUDDE, 2001; SANCHO *et al.*, 2004). O uso do TOF precedido por um quadrupolo (Q-TOF) pode dar informação mais especificas sobre a estrutura de um composto (HERNANDEZ *et al.*, 2005). Os autores compararam o desempenho de QqQ e Q-TOF na análise de aproximadamente 30 pesticidas em água e os resultados obtidos pelo QqQ foram melhores, e confirmaram os resultados através de análise de Q-TOF. Porém, em alguns casos a confirmação não foi possível por causa da mais baixa sensibilidade alcançada com o Q-TOF. Outra limitação do Q-TOF foram as limitadas faixas lineares alcançados (HERNANDEZ *et al.*, 2005). Assim, apesar do alto potencial reconhecido desta técnica, ainda não apresenta sensibilidade e uma linearidade satisfatória, apesar de um alto preço comercial, o que restringe suas aplicações.

Nas últimas duas décadas, com o desenvolvimento do API, as aplicações de LC-MS aumentaram progressivamente e permitiram monitorar uma faixa mais ampla

de compostos polares. A LC-MS foi aplicada durante anos, mas hoje é reconhecido a necessidade por usar LC-MS/MS para alcançar a sensibilidade e, especialmente, a seletividade requerida para análises ambientais e evitar falsos positivo. Para este propósito, são indicados ESI e APCI (a seleção da fonte depende do composto) e analisadores diferente Triplo quadrupolo, Q-Trap. Os analisadores Triplo quadrupolo foram os amplamente usados para fins de quantificação; já os analisadores Q-Trap receberam pequena aplicação nos últimos anos. Os Q-TOF estão tendo uma aplicação crescente, basicamente na identificação de metabólitos de pesticidas. O LC-MS/MS para análise direta de amostras de água foi tentado em algumas ocasiões. Porém, é necessário, em geral, um passo de SPE prévio que muito freqüentemente é executado on-line e permite baixar os limites de detecção até ng L^{-1} ou pg L^{-1}. É esperado que a aplicação desta técnica para a análise de pesticidas em água com sensibilidade adequada deva a ocorrer num futuro próximo devido ao rápido desenvolvimento tecnológico no campo de LC-MS/MS. Assim, no futuro, a análise direta de amostras de água sem pré-tratamento provavelmente será possível, assim como a aplicação de critérios de confirmação rígidos, e o uso crescente de analisadores Q-TOF para quantificação e identificação.

2.7 Aplicações de métodos cromatográficos para determinação de pesticidas

A determinação de pesticidas é um desafio considerando as baixíssimas concentrações dos analitos, sua diversidade e diferentes propriedades físicas e químicas, em presença de altas concentrações de compostos interferentes (BIZIUK *et al.*, 1996, KUSTER *et al.*, 2006).

A determinação de resíduos de pesticidas em amostras biológicas e ambientais, desde meados de 1950, baseou-se, primeiramente, na GC e em outras técnicas afins como a Cromatografia em Camada Delgada (TLC do inglês *Thin Layer Chromatography*). Já o uso da HPLC em determinações de resíduos de pesticidas é de ocorrência mais recente.

Os métodos tradicionais para determinação de resíduos de pesticidas em amostras de água envolvem LLE com um solvente orgânico seguido pela análise direta por GC com detectores específicos (NPD, ECD e FPD, do inglês *Nitrogen-*

Phosphorus Detector, Electron-Capture Detector e Flame Photometric Detector, respectivamente), alcançando-se boa seletividade e excelente detectabilidade (ZAUGG *et al.*, 1995; GEERDINK *et al.*, 2002).

Atualmente, há um aumento no desenvolvimento e uso de pesticidas de caráter mais polar, considerados mais facilmente degradáveis (SÁNCHEZ-MARTÍN *et al.*, 1996; KUSTER *et al.*, 2006), que não são diretamente analisáveis por GC. Consequentemente há uma necessidade maior em se desenvolver métodos utilizando HPLC para determinação destes compostos, bem como seus metabólitos (AYANO *et al.*, 2004; GEERDINK *et al.*, 2002).

A detecção feita na região do ultravioleta (UV) em um único comprimento de onda ou em vários comprimentos de onda utilizando Detecção por Arranjo de Diodos (DAD, do inglês *Diode Array Detector*) é comumente empregada em HPLC, assim como as detecções por ECD e MS são bastante utilizadas em GC. Os limites de detecção alcançados em HPLC-DAD são a níveis de $\mu g\ L^{-1}$ e normalmente comparáveis aos obtidos por GC-MS, os quais são, geralmente, mais sensíveis que os obtidos por GC-ECD (WELLS, 2000b).

Publicações mostram que há uma tendência em se utilizar, na determinação de resíduos de pesticidas em águas, técnicas sofisticadas como GC-MS e LC-MS (PLANAS *et al.*, 2006; RICHARDSON, 2006; BECEIRO-GONZÁLEZ *et al.*, 2007; BARCELÓ & PETROVIC, 2007).

No entanto, os fatores mais importantes na escolha da técnica para análise de pesticidas são o comportamento do analito no sistema cromatográfico, a necessidade de derivatização do analito e o trabalho necessário para isso, a disponibilidade da técnica no laboratório e o propósito geral da análise (LISKA & SLOBODNÍK, 1996).

2.7.1 Revisão bibliográfica sobre análise de pesticidas utilizando HPLC-DAD e LC-MS

A seguir, são descritas algumas publicações encontradas no ISI Web of Science sobre a determinação dos compostos em estudo ou de compostos relacionados, no período de 1990 à 2007.

Dentre os herbicidas que fazem parte do grupo químico das imidazolinonas, o imazaquim, imazapir e imazetapir foram analisados por ANISUZZAMAN *et al.* (2000) que utilizaram GC-MS para estudar a eficiência de um método de extração em amostras de água e solo. Os extratos das amostras foram derivatizados para posterior análise e os limites de quantificação chegaram a µg L^{-1} e µg kg^{-1}.

NOVAKOVA (1994) usando HPLC-UV, com detecção em 260 e 236 nm analisou amostras de solo contendo os herbicidas imazetapir e imazapir. Os extratos de solo foram obtidos a partir da adição de uma solução aquosa 0,1 mol L^{-1} de carbonato de sódio e após ajuste do pH 2,0 foi adicionado diclorometano. O limite de quantificação para imazetapir e imazapir foi de 3,0 µg kg^{-1} para ambos e as recuperações obtidas ficaram entre de 55 - 75% para ambos herbicidas na faixa de 3 – 100 µg kg^{-1} no solo.

STOUT *et al.* (1997) utilizaram a extração assistida por microondas (MAE) para a determinação do herbicida imazaquim em amostras de solo, e quantificação por GC-ECD e GC-MS com ionização química. Para amostras de água usaram a LC-MS com ionização por *electrospray*. A etapa de *clean up* das amostras de solo, não foi necessária para analisar por LC-MS, o que reduziu o tempo de preparo da amostra, assim como a etapa de derivatização utilizada para análise por GC-ECD e GC-MS foi eliminada. As recuperações obtidas para amostras de solo fortificadas aos níveis de 1 – 50 µg kg^{-1} ficaram acima de 92%. O limite de quantificação foi de 0,2 µg kg^{-1}.

JIMÉNEZ *et al.* (1997) estudaram um método para determinação de resíduos de pesticidas de diferentes classes (organoclorados, organofosforados, triazinas, benzimidazóis, acetamidas, feniluréias e outros) em águas de 40 poços da Espanha. O procedimento de SPE usando C18 foi otimizado em relação ao modo de eluição, solvente e volume de eluição, volume de *breakthrough,* concentração, bem como o procedimento de *clean up* em colunas de florisil. Os compostos foram analisados por HPLC ou GC. O sistema HPLC–DAD utilizou coluna ODS-2, fase móvel acetonitrila:água e detecção em 220 e 245 nm. O sistema GC é equipado com ECD e NPD, e coluna de FE 50% fenilmetilpolisiloxano. Melhores resultados foram obtidos com 300 mL de amostra, 4 mL de MeOH para eluição e 30 mL de n-hexano-DCM (1:1) para o *clean up* em florisil. Os LOQ variaram de 3 a 1240 ng L^{-1}. Todos os compostos foram detectados, em concentrações entre 0,01 e 7,8 µg L^{-1}.

RODRIGUEZ & ORESCAN (1998) desenvolveram um método multirresíduo para determinação de 16 herbicidas sulfoniluréias, imidazolinonas (incluindo imazetapir) e sulfonamida em água de superfície. SPE em cartuchos de SDVB, amostras de 250 mL de água e eluição com 10 mL de metanol; *clean-up* com cartuchos de troca aniônica adaptados no topo de cartuchos de alumina. Sistema de LC-MS, com ionização por *electrospray* no modo positivo. Os compostos foram separados em coluna C8, fase móvel de acetonitrila com 0,15% ácido acético em água. As recuperações para água de rio, lago, torneira, lagoa, córrego e pântano, variaram de 70 a 114%, com RSD < 13%. Para imazapir, imazetapir e imazaquim as recuperações foram < 80%. O LOQ foi de 0,1 µg L^{-1} para todos os compostos.

LAGANA *et al.* (1998) desenvolveram um método para quantificação simultânea dos herbicidas imidazolinonas imazapir, *m*-imazametabenzo, *p*-imazametabenzo, *m,p*-imazametabenzometilico, imazetapir, e imazaquim em amostras de água e solo. As amostras de água foram pré-concentradas com SPE e foram quantificados por HPLC-UV com detecção em 240 nm. As recuperações ficaram acima de 89%. Os limites de detecção em 43-51 ng L^{-1}. O método envolveu análise confirmatória por LC-MS/MS. As amostras de solo foram extraídas utilizando extração por coluna de solo combinada com SPE e a quantificados por LC-MS/MS no modo SIM. A recuperação total de cada imidazolinona em amostras de solo variou 87 a 95%. O limite de detecção foi de 0,1-0,05 ng g^{-1} em solo.

FURLONG *et al.* (2000) desenvolveram um método para determinação de 12 sulfoniluréias (SU), 3 imidazolinonas (IMI), incluindo imazetapir e 1 sulfonamida (SA) em 196 amostras de água de superfície e de profundidade. Dois cartuchos em série foram usados para SPE, um contendo resina aniônica, que removeu grande parte do carbono orgânico e reteve as IMI, e outro de SDVB que reteve os outros compostos. A determinação e quantificação foi feita utilizando LC-MS, modo *fullscan*, com ionização por *electrospray*, a fase móvel utilizado foi acetonitrila e tampão de ácido fórmico-formiato de amônio. As recuperações variaram de 56 a 86% (70% para imazetapir), para água pura e de 46 a 163% (50% para imazetapir) para água de superfície. Os LOD foram da ordem de 10 ng L^{-1}.

SANTOS *et al.* (2000) desenvolveram um método simultâneo para determinação de herbicidas ácidos, neutros e seus produtos de degradação em canais de drenagem e lagoas que recebem água de irrigação de lavouras de arroz. Para extração utilizaram SPE *on line* com sorvente de copolímero de SDVB, e

volume de amostras de 5 a 50 mL e a eluição por gradiente usando ACN e solução tampão de formiato de amônio-ácido fórmico 5 mmol L^{-1} com pH ajustado a 3,0. A detecção e quantificação por acoplamento *on line* SPE-LC-DAD-MS. Alguns compostos não puderam ser detectados por ambos os detectores. As recuperações foram maiores que 76%, com RSDs menores que 10%. LOD variaram de 0,1 a 0,02 µg L^{-1}. Bentazona, seu produto de degradação e MCPA foram persistentes no ambiente.

HERNANDEZ *et al.* (2001) desenvolveram um método multirresíduo, sensível e específico para determinar 29 pesticidas (1 fungicida, 16 inseticidas, 10 herbicidas e 2 acaricidas) em amostras de solo e água de superfície. O método está baseado no uso da SPE *on-line* com LC-MS/MS. Apresentou bons resultados para todos compostos, sendo que a maioria poderia ser quantificada em concentrações abaixo de 25 ng L^{-1}. A eficiência e aplicabilidade deste método foram avaliadas pela análise de várias amostras incluídas em um programa de monitoramento.

CARABIAS-MARTÍNEZ *et al.* (2002) desenvolveram um método para determinação simultânea de 3 herbicidas amplamente usados (atrazina, terbutrina e clorotoluron) e 7 de seus mais comuns produtos de degradação em águas de rios e poços. Utilizaram para extração SPE com 4 diferentes cartuchos: 3 poliméricos (Oasis® HLB, Oasis® MCX e LiChrolut® EN) e 1 à base de sílica (C18). Foi pré-concentrado um volume de 250 mL de amostra e como solventes para eluição utilizaram metanol e acetonitrila. Para detecção foi utilizado HPLC-DAD, com coluna ODS2, e fase móvel de acetonitrila-tampão fosfato 0,005 mol L^{-1} e leitura nos comprimentos de onda de 210, 220, 230 e 245 nm. Os melhores resultados foram obtidos com o cartucho polimérico LiChrolut® EN devido as características polares dos metabólitos. As recuperações variaram de 69 a 109% e os LODs de 0,01 a 0,1 µg L^{-1}. Foi detectada a presença de 3 dos compostos analisados.

PRIMEL, (2003) desenvolveu um procedimento para a determinação de resíduos de quincloraque, bentazona, 2,4-D, clomazona e propanil em águas de superfície, utilizando SPE e HPLC-UV. Utilizando como fase móvel a mistura metanol:água, 60:40, com pH ajustado a 4,0. Foram pré-concentrados 250 mL de amostras em cartuchos de SPE com sorvente C18. O níveis de concentração para o método entre ficaram entre 0,1 e 0,5 µg L^{-1}. As recuperações variaram de 85,7 a 109,8% com RSD de 1,8 a 13,4%. A método foi aplicada para análises de água de irrigação da lavoura de arroz, que contém resíduos de pesticidas, na região central

do estado do RS. Os limites de detecção e de quantificação obtidos permitiram analisar amostras de água com concentrações de até 0,5 µg L^{-1} de quincloraque e bentazona e de até 0,1 µg L^{-1} de 2,4-D, clomazona e propanil. Também foi acompanhada a degradação do herbicida clomazona aplicando o processo de fotodegradação com luz UV, utilizado GC-MS para identificar seus principais produtos de degradação.

AYANO *et al.*, (2004) estudaram a determinação de 5 sulfoniluréias (incluindo pirazossulfurom) e 3 uréias em amostras de água pura, potável e de rio. Para extração utilizaram SPE com 3 tipos de cartuchos: polímero de poliestireno (PS2), C18 e polímero de *N*-vinil-pirrolidona (Oasis®), Usando 500 mL de amostra e eluição com metanol (para os cartuchos Oasis) ou acetonitrila (para os demais). O sistema de detecção utilizado foi LC-ESI-MS, no modo de ionização positivo, com coluna C18 e fase móvel composta por ácido acético 0,15% e acetonitrila. De maneira geral, as melhores recuperações foram obtidas com cartuchos Oasis. Para pirazossulfurom, elas ficaram entre 45,2 e 75,8% utilizando PS2; entre 9,1 e 98,5% para C18 e 86,4 e 112,9% para Oasis®, nos 3 tipos de água. Os LOQs variaram de 0,6 a 65,9 ng L^{-1}.

CARABIAS-MARTINEZ *et al.* (2004) estudaram dois métodos, empregando LC-DAD ou LC-MS, para detecção simultânea de fenil- e sulfoniluréias em amostras de água natural. Testando cartuchos de SPE com diferentes sorventes: poliméricos (Oasis® HLB ou Lichrolut® EM) ou C18. O volume de amostra pré-concentrado foi de 500 mL e eluição com acetonitrila. Os sistemas de detecção consistiam de um LC-DAD a 245 nm, com fase móvel ACN-tampão fosfato e um LC-MS no modo *fullscan* (ionização positiva) e quantificação no modo SIM, usando fase móvel ACN:formiato de amônio. Entre os cartuchos de SPE testados o Oasis foi escolhido como melhor sorvente. O método por LC-DAD foi mais afetado por interferências. As recuperaçãoes obtidas ficaram entre 70 e 95%. Os procedimentos, SPE HPLC–DAD e SPE–LC–MS, foram aplicados para análise de amostras de água de rio, os limites de detecção obtidos ficaram abaixo de 50 ng L^{-1} para ambos os procedimentos.

PALMA *et al.* (2004) estudaram a presença de resíduos dos pesticidas simazina, hexazinona, 2,4-D, picloram e carbendazim em águas de superfície do Chile, nos anos de 2001 e 2003. SPE com 500 mg de C18, 500 mL de amostra e eluição com 3 mL de acetonitrila. HPLC-DAD com fase reversa (RP do inglês *Reverse Phase*), usando fase móvel de acetonitrila:acetato de amônio 1 mmol L^{-1}

(1:3) e detecção a 220 nm para simazina, hexazinona e carbendazim e acetonitrila:ácido acético 17 mmol L^{-1} (1:1, *v/v*), 230 nm para 2,4-D e picloram. As recuperações ficaram entre 88 e 99%, com RSD menores que 20% e LOD de 0,1 µg L^{-1} para todos os pesticidas. Todos os pesticidas analisados foram detectados nas amostras de água, em concentrações que variaram de 0,2 a 4,5 µg L^{-1}.

VEGA *et al.* (2005) descreveram o desenvolvimento de um método analítico para determinar 32 pesticidas, usado em áreas agrícolas do sul da Espanha, através de LC-MS com ionização *electrospray* (ESI) no modo positivo. A extração dos compostos de amostras de solo foi feita por sonicação, extração líquido-sólida com metanol e água, além de uma etapa de *clean up* por SPE com cartuchos Oasis HLB. Os limites de detecção variaram entre 10 e 50 ng L^{-1} para águas e 0,5-2,5 µg kg^{-1} para solos, enquanto que os limite de quantificação variaram de 25 a 50 ng L^{-1} para água e 1,5 a 5,0 µg kg^{-1} para solos. As recuperações entre 60-110% foram obtidas para todos os compostos. Carbendazim, simazina e diuron foram os pesticidas mais freqüentemente detectados nas amostras de água, enquanto que nos solos foram detectados os herbicidas simazina, diuron e terbutilazina.

TRAN *et al.* (2007) neste estudo descreveram a aplicação de diferentes técnicas de extração para a pré-concentração de dez herbicidas polares ácidos e não-ácidos (2,4-D, atrazina, bensulfurom-metilico, clomazona, dicamba, diuron, MCPA, metolaclor, simazina e triclopir) em amostras de água de rio. A eficiência da extração foi feita através da comparação entre a LLE com diclorometano e SPE usando cartuchos Oasis HLB ou discos SBD-XC. Os herbicidas foram separados e quantificados por HPLC-UV. Para a aplicação no método foi escolhido SPE usando discos SDB-XC. Foi observado um aumento na concentração dos herbicidas avaliados em dois pontos de coletas depois de um período de chuvas. Este aumento foi de: 0,1-17,8 µg L^{-1}, <0,1-0,9 µg L^{-1}e 0,2-17,8 µg L^{-1} no ponto de coleta 1; <0,1-3,5 µg L^{-1}, <0,1-0,2 µg L^{-1}e <0,2-3,2 µg L^{-1}no ponto de coleta 2 para simazina, atrazina e diuron que foram os herbicidas encontrados.

CHEN *et al.* (2007) utilizando metanol e água como solventes para extração e cartuchos de SPE com sorbente de troca iônica para realização do *clean up* do extrato para a extração e a quantificação foi feita por HPLC-UV. As recuperações obtidas para o método foram de 90,7 e 100,6%, e os limites de detecção estimados de 0,0015 mg kg^{-1} e a concentração mínima quantificada de 0,005 mg kg^{-1}.

KURZ (2007) desenvolveu e validou um método para determinação, em águas, de resíduos dos herbicidas imazetapir, bispiribaque-sódico e pirazossulfurom etílico e do inseticida fipronil, incluindo seus principais metabólitos: desulfinil fipronil, fipronil sulfeto e fipronil sulfona. Os herbicidas foram determinados por HPLC-DAD e o fipronil e seus metabólitos foram determinados por GC-ECD. Os LOQ para o método foram de 0,5 µg L^{-1} para os herbicidas, de 0,0125 µg L^{-1} para fipronil e de 0,005 µg L^{-1} para seus metabólitos. As recuperações ficaram entre 90,8 e 114,2%, com RSD menores que 13,4% para os herbicidas e recuperações entre 81,3 e 112,3% com RSD menores que 14,2% para fipronil e metabólitos. Este método foi aplicado em estudos de degradação e dissipação de pesticidas em lavouras de arroz irrigado, onde foram aplicados os pesticidas, nas safras de 2004/05 e 2005/06.

2.8 Validação de métodos cromatográficos para a determinação de pesticidas

Para determinar resíduos de pesticidas devem ser desenvolvidos procedimentos de extração eficientes, bem como métodos analíticos com alta seletividade, a fim de assegurar que, caso esses resíduos estejam presentes nas amostras analisadas, seja possível a sua separação e posterior quantificação.

A validação do método é o processo realizado para demonstrar que é aceitável para seu propósito pretendido. Deve levar em consideração todas as incertezas do processo analítico, incluindo àquelas atribuídas aos equipamentos, padrões, calibrações, analista e ambiente (RIBANI *et al.*, 2004; SANCO, 2007). A validação faz parte de qualquer documentação submetida às agências governamentais de regulamentação da União Européia, Japão, Estados Unidos e outros países, quando se pretende o registro de métodos usados para a quantificação de produtos como fármacos em fluidos biológicos e determinação de resíduos de pesticidas em vários tipos de matrizes (TATE & HEINY, 1996; SANCO, 2007; RIBANI *et al.*, 2004).

A validação de um método que emprega técnicas cromatográficas pode ser considerada como a soma de diferentes etapas de validação a serem incluídas no processo analítico. Em geral, a validação do método envolve a execução e a interpretação de uma série de experimentos planejados a fim de avaliar as

características do método. Desta forma, todas as variáveis de um método devem ser consideradas, tais como: procedimento de amostragem, preparação da amostra, separação cromatográfica, detecção e avaliação dos dados (SANCO, 2007; RIBANI *et al.*, 2004; ICH, 1996).

Os parâmetros geralmente envolvidos no procedimento de validação dos métodos analíticos são: curva analítica, linearidade, limite de detecção e quantificação, precisão (repetibilidade e precisão intermediária) e exatidão (SANCO, 2007; LANÇAS, 2004, RIBANI *et al.*, 2007).

2.8.1 Curva analítica e linearidade

A calibração é um dos estágios fundamentais na análise química. A curva analítica é a ferramenta de quantificação mais freqüentemente utilizada e consiste na determinação da resposta de determinado instrumento às várias concentrações da substância em estudo (ZANELLA *et al.*, 2000; SHABIR, 2003, FEINBERG, 2007).

Para a maioria das técnicas analíticas cromatográficas, uma relação linear de primeira ordem é observada entre a resposta do detector (y) e a concentração (x) do analito em estudo, podendo ser descrita pela Equação 1 da regressão linear.

$$y = ax + b \qquad \textbf{Equação 1}$$

Onde *b* é a intersecção da curva analítica e *a* é a inclinação da reta. Idealmente, *a* deve ser reprodutível e *b* não deve ser estatisticamente diferente de zero. A regressão linear deve também ter um alto coeficiente de correlação ($r > 0,9999$) (RIBANI *et al.*, 2004; SANCO, 2007; ICH, 1996).

A linearidade de um método analítico é a capacidade de gerar resultados proporcionais à concentração da espécie em análise, na qual é possível relacionar o valor de uma variável dependente (y), que é a resposta do detector, através do conhecimento da concentração que é a variável independente (x) (FEINBERG, 2007; LANÇAS, 2004).

A linearidade é determinada através da análise de uma série de soluções analíticas, de diferentes concentrações, variando estas de acordo com a finalidade da análise.

2.8.2 Limite de Detecção e Limite de Quantificação

Segundo RAWN *et al.* (2001) os métodos analíticos utilizados na análise de pesticidas devem ser os mais sensíveis possíveis. A sensibilidade do método analítico como um todo é normalmente definida em termos de Limite de Detecção (LOD, do inglês *Limit of Detection*) e Limite de Quantificação (LOQ, do inglês *Limit of Quantification*) ou determinação (LANÇAS, 2004; RIBANI *et al.*, 2007).

O LOD é a menor concentração de soluto detectada pelo procedimento em estudo e é geralmente expresso em unidades de concentração (RIBANI *et al.*, 2007).

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

2.8.3 Precisão (repetitividade e precisão intermediária)

A precisão determina a dispersão nos resultados obtidos de análises múltiplas de uma amostra homogênea. A precisão é um dos critérios mais importantes para o julgamento do desempenho de um procedimento analítico. A precisão pode ser determinada em termos de repetitividade e precisão intermediária (RIBANI *et al.* 2004; SANCO, 2007; HUBER *et al.*, 2007):

<u>Repetitividade</u> é o grau de concordância dos resultados de testes individuais quando o procedimento é aplicado repetitivamente a amostragens múltiplas de uma amostra homogênea ou a amostras artificialmente preparadas. A repetitividade é expressa pela estimativa do desvio padrão relativo (RSD, do inglês *Relative Standard Deviation*), ou pela estimativa do desvio padrão absoluto (s). Este teste é

realizado pelo mesmo analista, no mesmo laboratório e utilizando o mesmo instrumento.

Precisão intermediária indica o grau de concordância dos resultados de testes obtidos para análise de uma mesma amostra feita por diferente analista e/ou diferente instrumento e em diferentes dias. O valor numérico usado para avaliar a precisão, RSD, pode ser calculado através da Equação 2.

$$RSD = \frac{s}{Xm} \times 100 \qquad \textbf{Equação 2}$$

onde:

s = estimativa do desvio padrão absoluto = $\{\sum(x_i - x_m)^2 / N - 1\}^{1/2}$;

x_i = valores individuais;

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

N = número de medidas.

2.8.4 Exatidão (Recuperação)

Representa o grau de concordância entre os resultados individuais encontrados em um determinado ensaio e um valor de referência aceito como verdadeiro. É importante observar que um valor exato ou verdadeiro é o valor obtido por uma medição perfeita e este valor é indeterminado por natureza (RIBANI *et al.*, 2004; SANCO, 2007; HUBER *et al.*, 2007).

A exatidão é sempre considerada dentro de certos limites, a um dado nível de confiança (ou seja, aparece sempre associada a valores de precisão). Estes limites podem ser estreitos em níveis de concentração elevados e mais amplos em níveis de traços. O número de ensaios varia segundo a legislação ou diretriz adotada e também com as características da pesquisa. A ICH (1996) estabelece que um mínimo de nove determinações envolvendo um mínimo de três diferentes níveis de concentração deve ser obedecido. Por exemplo, ensaios em triplicata para três níveis de concentração.

A recuperação (ou fator de recuperação), R, é definida como a proporção da quantidade da substância de interesse, presente ou adicionada na porção analítica do material teste, que é extraída e passível de ser quantificada.

A recuperação geralmente é dependente da concentração, por isso deve ser avaliada na faixa de concentração esperada para a amostra e utilizando-se níveis próximos a esta faixa para fortificação. A recuperação é calculada através da Equação 3, onde é expressa em porcentagem de recuperação.

$$\mathrm{R}\ (\%) = \frac{\mathrm{C}_1 - C_2}{\mathrm{C}_3} \times 100 \qquad \textbf{Equação 3}$$

onde:

C_1 = concentração determinada na amostra fortificada

C_2 = concentração determinada na amostra não fortificada

C_3 = concentração fortificada

3 MATERIAIS E MÉTODOS

O desenvolvimento experimental consistiu na utilização de dois diferentes métodos de extração, SPE para amostras de água e extração por solvente em banho de ultra-som para amostras de solo e quantificação por HPLC-DAD e LC-MS/MS (Figura 6).

Parte deste trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Análise de Compostos Orgânicos e Metais (LACOM), na Fundação Universidade Federal do Rio Grande (FURG).

O estudo da dissipação dos compostos foi desenvolvido em um experimento de campo, realizado na várzea experimental do Departamento de Fitotecnia da Universidade Federal de Santa Maria, seguindo as Boas Práticas Agrícolas (RODRIGUES & ALMEIDA, 1998) onde foram aplicados os herbicidas indicados para a cultura de arroz irrigado.

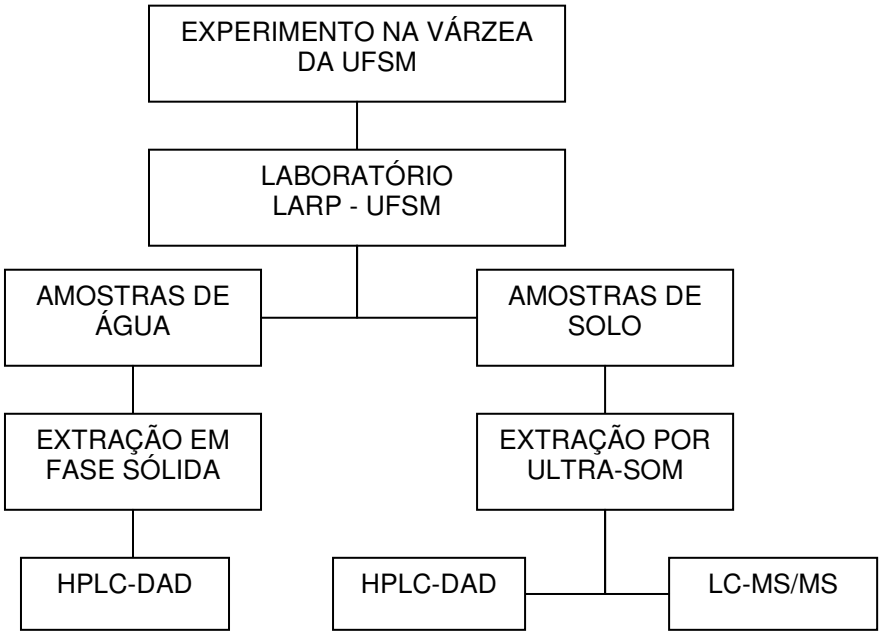


Figura 6 – Fluxograma do estudo realizado neste trabalho.

3.1 Instrumentação

A instrumentação utilizada no desenvolvimento do método está descrita a seguir:

- ✓ Bomba à vácuo Tecnal TE-058 (Piracicaba, SP, Brasil);
- ✓ Centrífuga Jouan G 412 (Saint Nazaire, França)
- ✓ *Manifold* para SPE Varian (Palo Alto, CA, USA) para a pré-concentração simultânea de 20 amostras;
- ✓ pHmetro modelo pH500 Cole Parmer equipado com eletrodo de vidro combinado (Vernon Hills, Illinois, EUA)
- ✓ Ultra-som Bandelin Sonorex RK 510 (Mörfelden-Walldorf, Alemanha);
- ✓ Balança analítica de precisão modelo AG 245 Mettler Toledo (Greifensee, Suíça);
- ✓ Sistema de purificação de água Direct-Q UV3 Millipore (Bedford, MA, USA)
- ✓ Sistema de filtração em membrana Advantec com membranas HA em ésteres de celulose de 0,45 µm e 47 mm.
- ✓ Sistema HPLC-DAD: Cromatógrafo a líquido Varian (Palo Alto, CA, USA) equipado com:
    - ✓ Válvula de injeção modelo 7125 (Rheodyne, EUA) equipada com alça de injecão de 20 µL;
    - ✓ Bomba ternária modelo 9010 com sistema ternário de eluição;
    - ✓ Sistema de aquisição de dados Star Workstation 6.0
    - ✓ Coluna analítica Synergi 4 µ Fusion RP-80 (250 × 4,6 mm de d.i.; 4 µm) e coluna de guarda do mesmo material (4 × 3 mm), ambas da firma Phenomenex (Torrance, CA, USA);
    - ✓ Detector por Arranjo de Diodos (DAD) ProStar 335 (Varian,);

- ✓ Sistema LC-MS/MS: Cromatógrafo a líquido *Alliance Separations Module* 2695 (Waters, EUA) equipado com:
    - ✓ Amostrador automático, bomba quaternária, forno para coluna e sistema de desgaseificação;

- ✓ Coluna XTerra® MS C-18, 50 x 3,0 mm de d.i. e 3,5 µm de tamanho de partícula (Waters, Irlanda),
- ✓ Detector MS, Micromass® Quatro Micro™ API (Waters, Inglaterra) com fonte API, utilizando o modo de ionização por *Electrospray*;
- ✓ Sistema de aquisição de dados através do *software* MassLynx e QuanLynx 4.0 (Waters, Inglaterra).
- ✓ Sistema gerador de nitrogênio Peak Scientifics (Instruments Ltda., Escócia)

3.2 Reagentes solventes e materiais.

- ✓ Acetonitrila, diclorometano e metanol grau resíduo - Nanograde® (Mallinckrodt, EUA);
- ✓ Extran® neutro e alcalino (Merck, Brasil);
- ✓ Água destilada e deionizada;
- ✓ Água purificada em sistema Direct-Q UV3® Millipore (resisitividade 18,2 MΩ cm);
- ✓ Ácido fórmico p.a. 98 - 100% (Merck, Brasil)
- ✓ Ácido fosfórico p.a. 85% (Merck, Brasil)
- ✓ Cartuchos para SPE Strata® C18-E, 500 mg/3 mL e Strata-X® 200 mg/6 mL (Phenomenex, EUA).
- ✓ Tubo de polipropileno, com tampas rosqueadas, capacidade de 50 mL (Sarstedt, Alemanha)
- ✓ Gás argônio usado para como gás de colisão no sistema LC-MS/MS (White Martins)
- ✓ Gás usado para evaporação dos extratos: Nitrogênio 99,99% de pureza (Air Products, Brasil)
- ✓ Membrana em ésteres de celulose 0,45 µm, 47 mm (Millipore, Brasil)

3.3 Padrões analíticos dos herbicidas estudados

A Tabela 8 apresenta os fornecedores e o grau de pureza dos padrões analíticos utilizados nesse trabalho.

Tabela 8 - Informações dos padrões analíticos sólidos utilizados.

Pesticida	Fornecedores	Grau de pureza (%)
Clomazona	Dr. Ehrenstorfer	93,0
Imazapique	Dr. Ehrenstorfer	99,0
Imazetapir	Dr. Ehrenstorfer	98,0

As soluções analíticas estoque, na concentração de 1000 mg L^{-1} dos herbicidas foram preparadas individualmente através da dissolução em acetonitrila e armazenadas em frascos âmbar a temperatura de -18 °C. A partir das soluções estoque 1000 mg L^{-1}, foram feitas soluções padrões na concentração de 100 mg L^{-1} para cada um dos herbicidas clomazona, imazapique e imazetapir. A partir das soluções de 100 mg L^{-1} foram preparadas soluções de trabalho, utilizadas para a construção das curvas analíticas. Todas as soluções de trabalho para HPLC foram preparadas em acetonitrila.

3.4 Otimização do sistema cromatográfico para determinação dos herbicidas

3.4.1 Escolha da fase móvel e da vazão

Sistema HPLC-DAD: A fase móvel foi preparada medindo-se separadamente partes de acetonitrila ou metanol grau HPLC e partes de água purificada em sistema

Direct-Q UV3®, a mistura foi acidificada, e desaerada em ultra-som por 10 min, a temperatura ambiente.

Para a escolha da composição da fase móvel para a separação cromatográfica testaram-se as seguintes composições conforme abaixo, nas vazões de 0,7; 0,8; 1,0 e 1,2 mL min^{-1}:

- Metanol:água (60:40, v/v),
- Metanol:água (65:35, v/v),
- Acetonitrila:água (50:50, v/v),
- Acetonitrila:água (40:60, v/v),

Todas as composições foram acidificadas conforme item 3.4.3 e testadas.

Sistema LC-MS/MS: foram testados diferentes composições dos solventes da fase móvel conforme abaixo, nas vazões de 0,05; 0,07; 0,1 e 0,2 mL min^{-1};

- Metanol:água (60:40, v/v);
- Metanol:água (65:35, v/v);
- Acetonitrila:água (50:50, v/v);
- Acetonitrila:água (40:60, v/v);

Toda a água usada na composição da fase móvel foi purificada em sistema Direct-Q UV3® e acidificada com 0,1% (v/v) de ácido fórmico.

3.4.2 Escolha do comprimento de onda de máxima absorção de cada herbicida no HPLC-DAD

Os espectros de absorção na região do ultravioleta foram obtidos fazendo a injeção individual de cada pesticida no cromatógrafo a líquido acoplado a um detector por arranjo de diodos. A partir do espectro, determinou-se o comprimento de onda máximo de cada herbicida. O espectro do padrão foi utilizado para confirmar a identidade dos picos nas amostras.

3.4.3 Ajuste do pH da fase móvel

Em HPLC de fase reversa, quanto mais hidrofóbico for o analito, mais ele é retido. Quando o analito se torna ionizado, fica menos hidrofóbico, e sua retenção diminui. Por isso, para garantir uma maior interação dos herbicidas em estudo com a fase estacionária utilizada é necessária a acidificação da fase móvel. Para esse fim, foram testadas soluções aquosas de ácido fórmico (1:1, *v/v*) e ácido fosfórico (1:1, *v/v*), com ajustes de pH em 4,0; 3,0 e 2,0. Escolheu-se o ácido fosfórico porque esse apresenta uma baixa absorção na região do UV.

Para o sistema LC-MS/MS a fase aquosa da fase móvel foi acidificada com ácido fórmico adicionado 0,1% deste ácido. No sistema LC-MS é indicado o uso de ácidos orgânicos, mais voláteis para evitar que estes se cristalizem na interface, e esta acidificação também irá ajudar na fragmentação dos compostos a serem determinados.

3.5 Condições de Análise por LC-MS/MS

3.5.1 Condições do sistema de detecção

Para otimizar as condições do espectrômetro de massas foram feitas infusões, ou seja, injeções diretas no espectrômetro de massas, com solução analítica padrão 1 mg L^{-1} de cada herbicida individualmente. A partir das infusões foi escolhido o modo de ionização da fonte, voltagem do capilar, voltagem do cone e energias de colisão. Os parâmetros de temperatura da fonte, temperatura e vazão do gás de dessolvatação e do cone da amostra foram usados dentro de uma faixa indicada pelo fabricante.

Após a escolha destas condições foram selecionados os íons a serem monitorados para quantificação e qualificação.

3.6 Otimização dos parâmetros para quantificação das amostras

3.6.1 Amostras de água

As amostras de água utilizadas para a validação do método foram coletadas em um açude, situado na Várzea Experimental da Universidade Federal de Santa Maria. Os parâmetros físico-químicos desta água são: DQO (Demanda Química de Oxigênio) = 15,42; Turbidez = 22 UT; pH = 6,49; Cor real = 10 mg Pt L^{-1}; Alcalinidade total = 8,7 mg L^{-1} e Sólidos totais 100 mg L^{-1}. Estas análises foram efetuadas no Setor de Química Industrial e Ambiental, UFSM.

Para a etapa de otimização do sistema SPE utilizou-se amostras de água purificada em sistema Direct-Q UV3®.

As amostras provenientes do experimento de degradação em lavoura de arroz caracterizam-se por conter alta quantidade de sólidos em suspensão e matéria orgânica dissolvida, tais como ácidos húmicos e fúlvicos, sendo propensas a apresentar interferências na análise cromatográfica. Por isso, na etapa de validação do método, utilizou-se amostras de água de superfície, coletadas em um açude localizado no Campus da UFSM, em uma região supostamente livre de contaminação por pesticidas. Para avaliar a existência de possíveis interferentes que poderiam prejudicar a quantificação por HPLC-DAD foram feitas extrações utilizando-se essas amostras.

O armazenamento das amostras, necessário devido ao grande número de amostras coletadas por dia, foi feito diretamente nos cartuchos de SPE. As amostras foram recebidas no laboratório, filtradas em membranas de ésteres de celulose 0,45 µm, 47 mm, e extraídas em cartuchos de SPE, os quais foram envoltos em papel alumínio e armazenados em freezer a -18 ºC até o momento da quantificação.

3.6.1.1 Sistema SPE para a pré-concentração dos herbicidas

A Figura 7 apresenta o sistema *manifold* utilizado para a pré-concentração de amostras de água em cartuchos para SPE.

O sistema empregado é composto por uma caixa de vácuo com espaço para trabalhar, simultaneamente, com 20 cartuchos para SPE. Esse sistema é conveniente quando é necessário pré-concentrar um número considerável de amostras. As amostras, colocadas em balões volumétricos, foram transferidas para os cartuchos SPE através de tubulações de politetrafluoretileno (PTFE). A transferência ocorreu por sucção em função do vácuo aplicado no sistema, controlado para cada cartucho através das torneiras e válvulas. Adotou-se uma vazão da ordem de 5 mL min^{-1} para a pré-concentração das amostras.

Figura 7 - Sistema SPE utilizado para a pré-concentração dos herbicidas em amostras de água.

3.6.1.1.1 Sorventes avaliados

Para a pré-concentração dos herbicidas, foram avaliados dois diferentes sorventes, sendo octadecilsilano (C18) contendo 500 mg de fase em tubos tipos seringa e capacidade para um volume de 3 mL e tamanho médio das partículas de

55 µm e outro sorbente polimérico denominado Strata-X® (polímero de estireno-divinilbenzeno com superfície modificada), contendo 200 mg de fase em tubos de 6 mL e tamanho médio das partículas de 33 µm.

3.6.1.1.2 Volume da amostra

O volume de amostra foi escolhido em função do volume de *breakthrough*, o qual ocorre quando os pesticidas não são fortemente retidos pelo sorbente ou quando a capacidade do sorbente é excedida. Essa última situação é difícil de ocorrer, uma vez que, em análises ambientais, as concentrações reais são da ordem de µg L^{-1} (BARCELÓ & HENNION, 1997). Para um dado sorbente do tipo fase reversa, o volume de *breakthrough* é função da hidrofobicidade do soluto e a massa de sorbente usada (SIMPSON & WELLS, 2000; PERREAU *et al.*, 2007).

Uma das formas de se avaliar o volume de *breakthrough* consiste em se pré-concentrar amostras de água de volumes crescentes, cada um contendo a mesma quantidade do analito, e então medir as áreas ou alturas dos picos eluídos. Quando o volume de amostra aumenta, a concentração do analito diminui, de tal forma que a quantidade de analito pré-concentrada permanece constante e as áreas dos picos também deveriam ser constantes. Quando o *breakthrough* ocorre, a quantidade extraída é reduzida, e a área do pico diminui.

Foram estudados volumes variando de 50 até 500 mL, contendo a mesma massa de cada um dos analitos. A Tabela 9 mostra os volumes e as concentrações dos herbicidas que foram estudados para se chegar ao volume de *breakthrough*.

Tabela 9 - Volume de amostra e concentração dos analitos utilizados para obtenção do volume de *breakthrough.*

Volume (mL)	Concentração (µg L^{-1})
	Herbicidas
50	2,000
100	1,000
150	0,666
200	0,500
250	0,400
300	0,333
500	0,200

3.6.1.1.3 Ajuste do pH da amostra de água

Compostos ionizáveis apenas são retidos em sílica modificada com C18 se estiverem na sua forma neutra, de tal forma que o pH da amostra é um parâmetro importante, especialmente para a extração de pesticidas fracamente ácidos ou básicos (BARCELÓ & HENNION, 1997; SIMPSON & WELLS, 2000).

Na pré-concentração dos herbicidas, foram testados os valores de pH da amostra ajustados em 2,0; 3,0 e amostra sem ajuste de pH (em torno de 6,0). O pH da amostra foi ajustado com uma solução aquosa de ácido fosfórico 1:1 (v/v).

3.6.1.1.4 Escolha do solvente de eluição

Para a eluição dos cartuchos contendo os extratos dos herbicidas foram testadas as diferentes composições de solventes:

- metanol puro;
- acetonitrila puro.
- diclorometano:metanol (65:35, *v/v*),

- diclorometano:metanol (80:20, *v/v*),
- diclorometano:acetonitrila (50:50, *v/v*),

  Também foram testados volumes de eluição de 1 e 2 mL.

3.6.2 Amostras de solo

O solo utilizado nos estudos é classificado como Planossolo Hidromórfico Eutrófico Arênico, pertencente à unidade de mapeamento Vacacaí. Apresenta relevo plano a suavemente ondulado, substrato de sedimentos aluviais recentes. Em geral, essa unidade de mapeamento apresenta textura média (15 a 25% de argila), com baixos a médios teores de matéria orgânica, pobres em nutrientes e mal drenados, bastante influenciados pela presença de água, condicionada pelo relevo (MARCHEZAN *et al.*, 2006).

As propriedades físico-químicas do solo usado para validação foram determinadas no Laboratório de Análise de Solos do Departamento de Solos da Universidade Federal de Santa Maria e estão descritas na Tabela 10.

Tabela 10 - Propriedades físico-químicas do solo onde foi realizado o experimento. Santa Maria, RS. 2007.

Análise Química		*Análise Física*	
		Distribuição do tamanho das partículas	*%*
pH (H_2O 1:1)	5,8	Areia Grossa (2 - 0,0 mm)	10,2
pH (SMP)*	6,4	Areia Fina (0,2 - 0,05 mm)	34,3
P (mg L^{-1})	11,5	Silte (0,05 - 0,002 mm)	32,5
K (mg L^{-1})	68,0	Argila (< que 0,002 mm) – (m/v)	23,0
Al ($cmol_c$ L^{-1})	0,0	M.O. (m/v) = 1,8%	
Mn (mg L^{-1})	7,8	Classe Textural 4	
Ca ($cmol_c$ L^{-1})	5,1		
Mg ($cmol_c$ L^{-1})	3,1		
H + Al ($cmol_c$ L^{-1})	2,7		
CTC efetiva ($cmol_c$ L^{-1})	8,4		
CTC/pH 7 ($cmol_c$ L^{-1})	11,1		
Saturação Bases (%)	75		
Relação Ca/Mg	1,6		
Relação Ca/K	33,1		
Relação Mg/K	20,1		

*Solução SMP (SHOEMAKER, MCLEAN E PRATT) mistura de sais neutros com vários tampões (SILVA, 1999).

Para a escolha do melhor procedimento de extração dos pesticidas das amostras de solo foram testadas algumas variações no tipo de solvente, o melhor pH e a quantidade de amostra a ser pesada.

Todas as amostras foram submetidas a um banho de ultra-som por 30 min e após esse tempo eram levadas para centrifugação por 5 min com rotação de 3600 rpm.

3.6.2.1 Quantidade de amostra de solo

Nesta etapa da extração testou-se diferentes quantidades de solo, a fim de também minimizar o volume de solvente para extração e gerar o menor volume de resíduos. Foram pesadas e testadas massas de 2,0, 5,0 e 10,0 g de solo.

3.6.2.2 Solventes de extração e ajuste do pH

Para a escolha do melhor solvente para extração dos herbicidas do solo foram testadas as diferentes composições de solventes com ajuste de pH:

- metanol puro;
- metanol puro pH 3,0;
- metanol puro pH 9,0;
- acetonitrila pura;
- acetonitrila pura pH 3,0;
- acetonitrila pura pH 9,0;
- metanol:água (90:10, v/v),
- metanol:água (90:10, v/v) pH 3,0;
- metanol:água (90:10, v/v), pH 9,0;
- acetonitrila:água (90:10, v/v);
- acetonitrila:água (90:10, v/v) pH 3,0;
- acetonitrila:água (90:10, v/v), pH 9,0;

Todos os ajustes de pH foram feitos utilizando solução aquosa de ácido fosfórico 1:1 (v/v) e solução aquosa de KOH 1 mol L^{-1}.

3.6.2.3 Volumes de solvente testados na extração

A utilização de um volume reduzido de solvente no momento da extração se faz necessário para tornar a análise menos dispendiosa além de gerar um menor

volume de resíduo. Com essa finalidade testaram-se diferentes volumes do solvente de extração. Os volumes testados foram de 5,0, 10,0 e 30,0 mL, sendo que os 30 mL foram adicionados em três etapas de 10 mL.

3.7 Validação do método para amostras aquosas

Definidas as melhores condições para a separação dos pesticidas, foi feita a validação dos métodos. Existem muitas citações na literatura apresentando procedimentos para validação de métodos (ZANELLA *et al.*, 2000; SANCO, 2007; RIBANI *et al.*, 2004; RIBANI *et al.*, 2007), com parâmetros bem definidos por diferentes grupos de trabalho de organizações nacionais ou internacionais.

3.7.1 Curva analítica e linearidade

As curvas analíticas para os herbicidas foram construídas nas faixas de concentração descritas nas Tabelas 19 e 20 para HPLC-DAD e LC-MS/MS, respectivamente. Todas as soluções foram preparadas em acetonitrila. Cada solução foi injetada 6 vezes, tanto no HPLC-DAD quanto no LC-MS/MS, e o gráfico da área x concentração foi obtido com auxílio do programa Microsoft® Office Excel 2003. A partir das curvas analíticas, avaliou-se a linearidade do método.

3.7.2 Limite de Detecção e limite de Quantificação

Para determinar o LOD foi considerada a concentração cujo sinal cromatográfico obtido foi três vezes maior, em relação ao sinal do ruído da linha base, no tempo de retenção dos picos de interesse e dez vezes maior para o LOQ.

Os valores de LOD e LOQ teóricos foram estabelecidos com base na Figura 8, onde o LOD corresponde a 3 vezes o ruído da linha de base e o LOQ corresponde à concentração que produz uma relação sinal-ruído superior a 10.

Mediu-se, com auxílio de um paquímetro, a altura do ruído próximo ao tempo de retenção dos compostos e determinou-se a concentração que corresponde a 3 e 10 vezes essa altura.

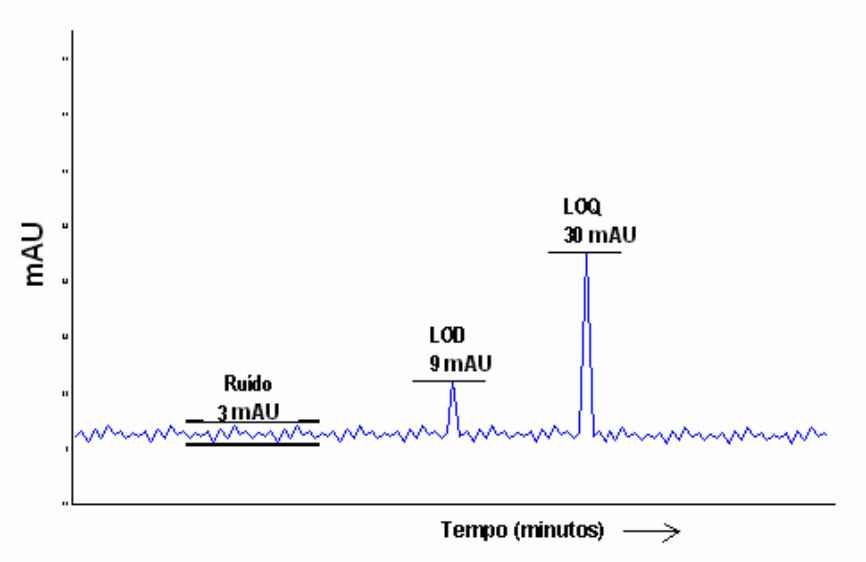


Figura 8 - Diagrama demonstrando a forma de estabelecimento dos valores de LOD e LOQ.

3.7.3 Precisão (repetitividade e precisão intermediária)

Neste trabalho, o estudo da precisão do instrumento foi realizado efetuando-se 6 injeções de cada concentração das soluções analíticas no sistema HPLC-DAD e seis injeções no sistema LC-MS/MS. Sendo que no HPLC-DAD as injeções foram feitas manualmente e no LC-MS/MS foram feitas através do injetor automático

A precisão do método, em termos de repetitividade (RSD_r) foi efetuada procedendo-se a extração e análise das amostras fortificadas. Cada nível de fortificação foi extraído em triplicata e cada extrato injetado três vezes.

Para avaliar a precisão intermediária (RSD_{pi}) do método por HPLC-DAD, utilizaram-se dias e operadores diferentes para a análise.

3.7.4 Exatidão (recuperação)

Para os ensaios de recuperação as amostras de água e solo utilizadas estão descritas nos itens 3.6.1 e 3.6.2, respectivamente.

Fortificou-se as amostras com adição de pequenos volumes de uma solução estoque contendo a mistura dos herbicidas avaliados no estudo, a fim de se obter os níveis de fortificação desejados.

As recuperações para os herbicidas foram avaliadas nos níveis de 1, 5 e 10 vezes o LOQ do método desenvolvido, tanto para amostras de água quanto para os solos.

3.8 Aplicação do método

3.8.1 Estudo da dissipação dos herbicidas em lavouras de arroz irrigado

O método desenvolvido foi aplicado no estudo da dissipação dos compostos em um experimento de campo, realizado na várzea experimental do Departamento de Fitotecnia da Universidade Federal de Santa Maria. Seguindo as Boas Práticas Agrícolas (RODRIGUES & ALMEIDA, 1998) foram aplicadas doses recomendadas dos herbicidas para a cultura de arroz irrigado.

O estudo foi realizado nos anos agrícolas de 2004/2005, 2005/2006 e 2006/2007, os dados de aplicação e formulações encontram-se no Anexo A, Tabelas 1, 2 e 3.

Na safra 2004/2005 o arroz foi cultivado no sistema pré-germinado, com parcelas de 40 m^2 (10 x 4 m). A semeadura foi feita no dia 02/12/2004 e a aplicação dos herbicidas foi realizada no dia 21/12/2004. Na safra 2005/2006, utilizou-se a variedade de arroz IRGA 422 CL, o qual foi cultivado no sistema pré-germinado, com parcelas de 40 m^2 (10 x 4 m). A aplicação dos herbicidas foi realizada no dia 06/12/2004. Na safra 2006/2007, utilizou-se a variedade de arroz IRGA 422 CL, o

qual foi cultivado no sistema pré-germinado, com parcelas de 73,72 m^2 (9,7 x 7,6 m) e a aplicação foi realizada no dia 28/11/2006.

A aplicação dos herbicidas foi realizada com pulverizador costal (pressão de pulverização: 275 kPa; com 4 pontas Teejet XR110.01 e vazão de 111 L ha^{-1}). A altura da lâmina de água de 10 cm. As amostragens foram feitas no 1º, 2º, 3º, 5º, 7º, 10º, 14º, 21º, 28º, 35º, 42º, 49º, 56º dias após a aplicação dos pesticidas.

3.8.2 Cinética de degradação e tempos de meia-vida

Modelos descritivos da dissipação de pesticidas são importantes para assegurar que a quantidade aplicada é adequada para o controle da erva daninha e para reduzir a chance de resíduos excessivos. Os modelos mais usados para descrever o decaimento de pesticidas relacionam o resíduo (R) a uma função de tempo (t) após aplicação do pesticida e podem ser utilizados para se determinar a cinética de reação (MORTON *et al.*, 2001).

$$\ln R = a + bt \qquad \textbf{Equação 4}$$

$$\ln R = a + bt^{1/2} \qquad \textbf{Equação 5}$$

$$R^{-1/2} = a + bt^{-1/2} \qquad \textbf{Equação 6}$$

$$R^{-1} = a + bt^{1/2} \qquad \textbf{Equação 7}$$

O modelo mais comum usado para descrever a degradação de pesticidas está expresso na Equação 8, a qual corresponde a uma cinética de 1ª ordem.

$$-\ln C/C_o = kt \qquad \textbf{Equação 8}$$

Onde:

C = resíduo no tempo t

C_0 = resíduo no tempo zero

k = constante de reação

Se for construído um gráfico de ln C em função de t obter-se-á uma reta cujo coeficiente angular é –k, que é determinado pela natureza dos reagentes e pela temperatura, e é um valor numérico característico de cada reação (PEÑUELA & BARCELÓ, 1998).

Outra maneira de se caracterizar os sistemas é pela determinação do tempo de meia-vida ($t_{1/2}$) do composto. O tempo de meia-vida é definido como o tempo necessário para o pesticida sofrer degradação até a metade de sua concentração inicial. A determinação do $t_{1/2}$ em estudos de campo depende fortemente das condições ambientais e ele é influenciado por diferentes processos, incluindo degradação por microrganismos, migração por volatilização, escoamento superficial, lixiviação, adsorção na planta, entre outros (BARCELÓ & HENNION, 1997).

Para calcular o tempo de meia-vida na água de lavoura de cada composto em estudo foi usada a Equação 9, onde k é a inclinação da reta (BARCELÓ & HENNION, 1997) e a cinética de reação é de 1ª ordem.

$$t_{1/2} = (\ln 2)/k \qquad \textbf{Equação 9}$$

Muitos dos dados sobre tempo de meia-vida disponíveis na literatura foram obtidos em estudos realizados nos EUA e Europa, e eles normalmente não são aplicáveis a países tropicais, onde as condições climáticas e a composição dos solos são completamente diferentes (BARCELÓ & HENNION, 1997).

3.8.3 Determinação da concentração residual no solo na entre-safra do arroz irrigado

O herbicida imazapique e o imazetapir são registrados no Brasil para o controle em pós-emergência precoce de mono e dicotiledôneas na cultura da soja, onde são aplicados individualmente e em pré e pós-emergência das plantas infestantes na cultura do arroz, principalmente para controle do arroz vermelho. A formulação comercial que contém esta mistura é o Only® e é apenas aplicada no sistema Clearfield®, que utiliza cultivares de arroz tolerantes aos herbicidas do grupo químico das imidazolinonas, de tal forma que o herbicida inibe o crescimento das plantas daninhas e não destrói as plantas de arroz (ÁVILA *et al.*, 2005; SHIVRAIN *et al.*, 2005).

Herbicidas deste grupo químico são caracterizados por seus efeitos a baixas doses de aplicação, amplo espectro de atuação no controle de plantas daninhas e alta persistência no solo. Esta alta persistência no solo pode levar a interferência

destes compostos em outras culturas que venham a ser cultivadas, as quais sejam sensíveis aos herbicidas dessa classe.

Em vista desta necessidade, foi conduzido um experimento na Várzea Experimental da UFSM, com o objetivo de determinar a concentração residual de imazapique e imazetapir no solo, após dois anos de plantio de arroz com tecnologia Clearfield®.

Para a realização deste experimento foram coletadas amostras de solo em 4 datas diferentes no período da entre-safra do arroz, e também amostras com diferentes profundidades de 0 a 5, 5 a 10, 10 a 15 e 15 a 20 cm.

3.8.4 Coletas e amostragens

Amostras de água: As coletas das amostras de água foram feitas em frascos de vidro âmbar, em 4 diferentes pontos dos canteiros: no centro, nas extremidades norte e sul e na lateral até o volume de 1 L. As coletas foram feitas na superfície da camada de água para evitar a amostragem excessiva do material sólido presente no fundo da lâmina. As datas das coletas foram escolhidas com base em estudos anteriores de PRIMEL (2003) e KURZ (2007), sendo definido que até o quinto dia após aplicação dos herbicidas fossem coletadas diariamente e, aumentando este período para a cada dois dias até 10 dias e, depois a cada 7 dias.

Amostras de solo: as amostras de solo foram coletadas com auxílio de um lisimetro, e coletadas em diferentes profundidades de 0 à 5 cm, 5 à 10 cm e de 10 à 15 cm. Após a coleta as amostras foram colocadas ao sol para secara e depois moídas a fim de ficarem mais homogêneas.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Condições cromatográficas otimizadas para análise dos herbicidas por HPLC-DAD

4.1.1 Escolha da fase móvel e da vazão

Dentre as composições apresentadas no item 3.4.1, a que forneceu melhor separação dos analitos foi a mistura acetonitrila:água (40:60, v/v), acidificada até pH 3,0 com solução aquosa de ácido fosfórico (1:1, v/v).

Dentre as vazões testadas para a fase móvel, foi feita uma programação de vazão e que apresentou uma melhor separação (resolução) e um menor tempo de retenção, a qual começou com 0,7 mL min^{-1} e de 8 a 9 min esta vazão começou a aumentar até 1,0 mL min^{-1} mantendo-se esta vazão constante até o final da análise. Vazões iniciais mais baixas de fase móvel tornaram o tempo de análise excessivo. Esta programação de vazão permitiu uma melhor separação com pressões de aproximadamente 90 atm e tempo total de análise de 16 min.

Os picos cromatográficos, dos respectivos princípios ativos, foram identificados de duas maneiras: primeiro injetando, separadamente, um a um no sistema cromatográfico sob as mesmas condições e observando o tempo de retenção, e segundo, fazendo uma adição de padrão em uma mistura dos três compostos e observando o aumento de sinal do respectivo herbicida, comparando com os espectros obtidos.

4.1.2 Determinação do comprimento de onda de máxima absorção de cada herbicida

Os espectros de absorção obtidos no HPLC-DAD para soluções individuais dos herbicidas na concentração de 1,0 mg L^{-1} foram utilizados para se obter o comprimento de onda máximo de cada herbicida, e também para confirmar a identidade dos analitos comparando-se o espectro obtido para os padrões e os obtidos para as amostras.

Com base nos espectros (Figura 9), foram escolhidos o comprimento de onda máximo para cada herbicida, os quais foram monitorados em cada análise. Para imazapique e imazetapir, o comprimento de onda escolhido foi 254 nm e para o clomazona foi escolhido o comprimento de onda de 220 nm.

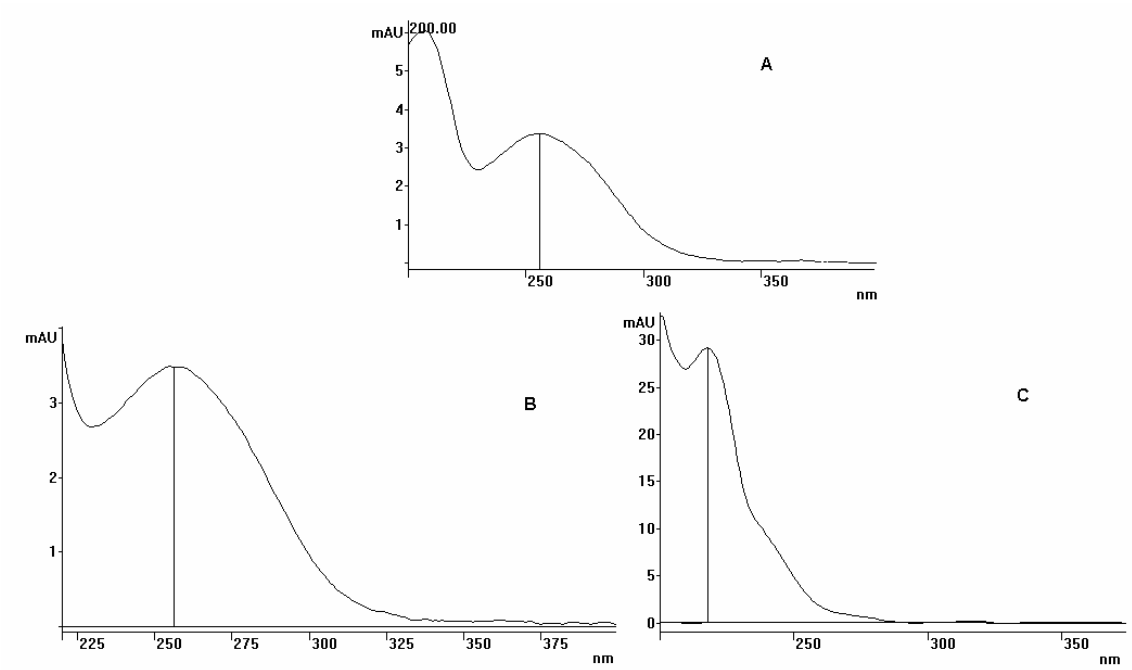


Figura 9 – Espectros de absorção, de 200 a 400 nm, obtidos por HPLC-DAD de uma solução analítica contendo 1,0 mg L^{-1} de cada herbicida: (A) Imazetapir, (B) Imazapique e (C) Clomazona.

As melhores condições cromatográficas obtidas para a separação e detecção dos herbicidas no sistema HPLC-DAD estão demonstradas na Tabela 11.

Tabela 11 - Condições cromatográficas utilizadas para a quantificação dos herbicidas por HPLC-DAD.

Coluna analítica	Synergi 4 μ Fusion RP-80 C18 (250 × 4,6 mm, 4 μm)
Fase móvel	Acetonitrila:Água (40:60, *v/v*), ajustada a pH 3,0 com H_3PO_4 (1:1, *v/v*)
Vazão da fase móvel	De 0 até 8 minutos – 0,7 mL min^{-1} De 8 até 9 minutos – 0,7 à 1,0 mL min^{-1} De 9 até 16 min – 1,0 mL min^{-1}
Detector	Por arranjo de diodos, monitorando em 254 nm para imazetapir e imazapique e em 220 nm para o clomazona
Alça de injeção	20 μL

Com estas condições, o perfil de um cromatograma típico de separação dos três herbicidas pode ser observado na Figura 10, obtido com a injeção de 20 μL de uma solução analítica contendo 1,0 mg L^{-1} de cada herbicida. Os herbicidas imazapique e imazetapir foram monitorados no comprimento de onda de 254 nm, pois neste comprimento de onda há menor interferência facilitando a quantificação quando determinados em amostras reais (ver Figura 15). Para o clomazona foi escolhido o de 220 nm devido a maior absorção neste comprimento de onda

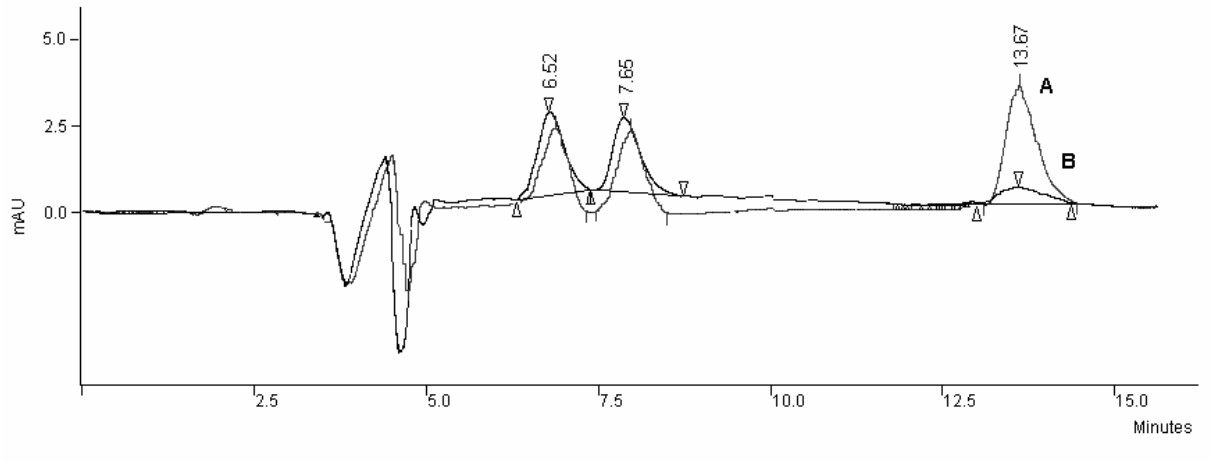


Figura 10 - Cromatograma típico de uma solução analítica contendo 1,0 mg L^{-1} dos herbicidas imazapique (t_R 6,5 min), imazetapir (t_R 7,6 min), e clomazona (t_R 13,7 min) (A) λ = 220 nm; (B) λ = 254 nm.

4.2 Condições cromatográficas otimizadas para análise dos herbicidas por LC-MS

4.2.1 Condições do sistema de injeção e de detecção

Para o sistema de injeção da amostra ficou estabelecido que as melhores condições seriam utilizando uma fase móvel com 60% de solução aquosa com 0,1 % de ácido fórmico e 40% de acetonitrila numa vazão constante de 0,07 mL min^{-1}, com um tempo total de análise de 9 minutos.

Para o espectrômetro de massas, a partir da realização das infusões foi determinado que as melhores condições de fragmentação dos íons monitorados seriam utilizando a fonte de ionização por API com *electrospray* no modo positivo com temperatura da fonte em 100 ºC. A temperatura do gás de dessolvatação foi de 350 ºC, as vazões do gás nitrogênio para dessolvatação da amostra e para o cone da amostra, respectivamente 500 e 50 L h^{-1}, estes valores ficaram dentro da faixa de trabalho indicada pelo fabricante. A Tabela 12 apresenta os herbicidas analisados por LC-MS/MS, usando modo de ionização ESI+, e modo de aquisição MRM, os íons precursores e íons produtos, energia de colisão, para as duas transições com uma voltagem do cone de 40 V e do capilar de 4,0 kV.

Tabela 12 - Herbicidas quantificados por LC-MS/MS, modo de ionização ESI positivo e modo de aquisição MRM, íons precursores e íons produtos, e energia de colisão, para as duas transições.

Herbicida	Massa Molar	1ª Transição (quantificação)			2ª Transição (confirmação)			*Dwell Time* (s)
		Íon Precursor	Íon Produto	Energia Colisão (eV)	Íon Precursor	Íon Produto	Energia Colisão (eV)	
Clomazona	239	240	125	25	240	101	20	0,3
Imazapique	275	276	231	20	276	185	30	0,3
Imazetapir	289	290	177	20	290	230	25	0,3

A Figura 11 apresenta um cromatograma total obtido no modo ESI+ para uma solução analítica contendo os herbicidas, empregando-se as condições selecionadas para o LC-MS/MS. A Figura 12 apresenta um cromatograma no modo MRM, onde foram monitorados apenas os íons utilizados para a quantificação dos compostos nas condições selecionadas para o sistema LC-MS/MS.

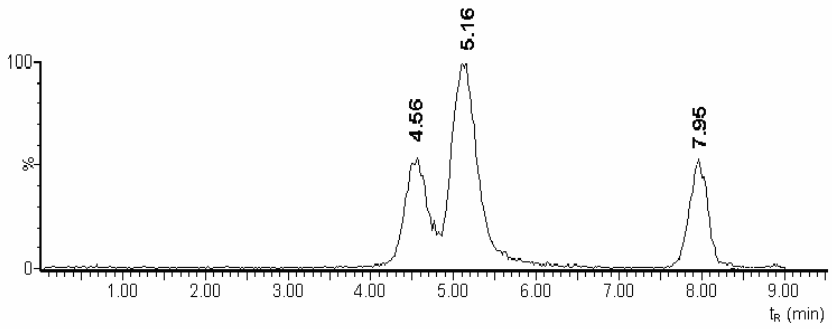


Figura 11 – Cromatograma total obtido no modo ESI+ para uma solução analítica contendo os três herbicidas (imazapique, t_R = 4,6; imazetapir, t_R = 5,2 e clomazona, t_R = 8,0).

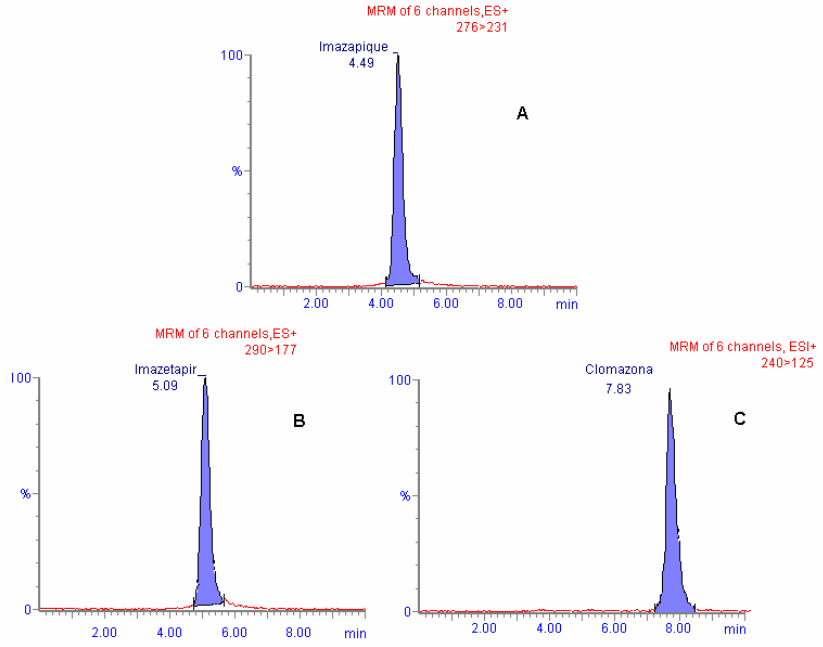


Figura 12- Cromatograma MRM obtido para uma solução analítica contendo 0,25 mg L^{-1} dos herbicidas: (A) imazapique (t_R 4,5 min), imazetapir (t_R 5,1 min), e clomazona (t_R 7,8 min).

4.3 Estudo da extração em fase sólida dos herbicidas

Para testar a eficiência da extração e definir o melhor método de extração para os compostos, foram testados diferentes procedimentos.

Para a pré-concentração dos herbicidas, foram testados 2 diferentes cartuchos e diferentes solventes de eluição. Os resultados estão demonstrados na Tabela 13.

Tabela 13 - Recuperações obtidas, utilizando-se diferentes cartuchos de fase estacionária (C18 e Strata-X) e diferentes solventes de eluição.

Herbicidas	Recuperação (%)*					
	C18			Strata-X		
	S1	S2	S3	S1	S2	S3
Imazapique	92,8 ± 2,1	74,3 ± 2,2	75,0 ± 2,1	106,3 ± 9,2	82,0 ± 2,2	78,4 ± 2,3
Imazetapir	82,6 ± 3,2	65,7 ± 4,4	88,3 ± 9,9	88,7 ± 1,3	46,5 ± 4,1	73,5 ± 1,9
Clomazona	85,8 ± 3,0	70,1 ± 2,5	71,3 ± 1,8	94,3 ± 3,2	72,2 ± 1,1	57,7 ± 8,2

*Nível de fortificação: 5 µg L^{-1}; amostra: pH ajustado em 2,0; 100 mL de água Milli-Q; volume de eluição 2 mL, evaporação com auxílio de N_2 e redissolução em 500 µL de fase móvel; S1 = diclorometano:metanol (65:35, *v/v*); S2 = diclorometano:metanol (80:20, *v/v*); S3 = diclorometano:acetonitrila (50:50, *v/v*)

Tanto o sorvente C18 quanto a fase polimérica proporcionaram recuperações para os herbicidas clomazona, imazapique e imazetapir dentro da faixa 70-120% [RIBANI *et al.*, 2004], estes resultados também concordam com os obtidos por VIGNA *et al.* (2006) usando tanto cartuchos com C18 quanto com cartuchos poliméricos. Por isso, o sorvente C18 foi o escolhido para a pré-concentração da mistura de herbicidas em água.

Quanto ao solvente de eluição para o sorvente escolhido, as misturas de diclorometano:metanol (80:20, *v/v*) e diclorometano:acetonitrila (50:50, *v/v*) proporcionaram bons resultados. No entanto, percentuais mais próximos de 100% foram obtidos com a mistura de diclorometano:metanol 65:35 (*v/v*), a qual foi escolhida como ideal para eluição dos herbicidas. Metanol e acetonitrila também foram testados, mas não proporcionaram bons resultados (recuperações muito baixas) para os herbicidas imazetapir e imazapique. Em cromatografia de fase reversa, a solubilidade dos compostos na fase móvel é muito importante e muitos compostos hidrofóbicos têm uma limitada solubilidade em metanol ou acetonitrila, sendo então necessário um grande volume para eluição (BARCELÓ & HENNION, 1997). A adição de diclorometano aumenta a solubilidade dos analitos e ajuda a dar melhor contato com o sorvente, uma vez que traços de água sempre estão presentes no cartucho.

Definido o sorbente (C18) e o solvente de eluição (mistura diclorometano:metanol, 65:35, *v;v*), foi testado o volume de solvente necessário para

eluir quantitativamente os herbicidas. Os resultados estão demonstrados na Tabela 14.

Tabela 14 - Recuperações obtidas para os herbicidas utilizando-se diferentes volumes do solvente de eluição.

	Recuperação (%)*	
Volume de solvente	1 mL	2 mL
Imazapique	67,1 ± 10,1	92,8 ± 2,1
Imazetapir	72,2 ± 9,1	82,6 ± 3,2
Clomazona	112,0 ± 8,0	85,8 ± 3,0

*Nível de fortificação: 5 µg L^{-1}; 100 mL de água Milli-Q; amostra: pH ajustado a 2,0; mistura de eluição DCM:MeOH (65:35, *v/v*), evaporação com auxílio de N_2 e redissolução em 500 µL de fase móvel

A eluição com 2 x 1 mL da mistura diclorometano:metanol (65:35, *v/v*) foi a que proporcionou melhores resultados. Esse volume é posteriormente evaporado e o extrato redissolvido em 500 µL de fase móvel para que o volume final seja exato e o fator de pré-concentração seja maior.

Também foram testados diferentes valores para o pH da amostra. Avaliou-se valores de pH de 2 e 3, os quais foram obtidos com adição de solução aquosa de ácido fosfórico 1:1 (v/v), e amostra sem correção de pH. Os resultados estão demonstrados na Tabela 15.

Tabela 15 - Recuperações obtidas para os herbicidas utilizando-se diferentes valores de pH.

	Recuperação (%)*		
Valores de pH	pH 2,0	pH 3,0	pH 6,0
Imazapique	99,8 ± 4,1	71,3 ± 8,4	72,0 ± 10,2
Imazetapir	89,6 ± 6,1	74,9 ± 5,6	80,6 ± 7,3
Clomazona	85,8 ± 3,0	96,7 ± 10,1	98,8 ± 9,8

*Nível de fortificação: 5 µg L^{-1}; 100 mL de água Milli-Q; eluição com 2 mL da mistura DCM:MeOH (65:35, *v/v*), evaporação com auxílio de N_2 e redissolução em 500 µL de fase móvel

Herbicidas do grupo das imidazolinonas são normalmente determinados em amostras com valores de pH entre 2,0 e 3,0 (FURLONG *et al.*, 2000; VIGNA *et al.*, 2006). Quando o pH da amostra torna-se menor, os compostos ácidos passam a ter maiores interações com o sorvente e por este motivo tendem a ficarem mais retidos no sorvente. Por outro lado, quando as amostras de águas são acidificadas a baixos valores de pH (2,0 ou 3,0) surgem nos cromatogramas picos interferentes, devido aos ácidos húmicos e fúlvicos. Com pH ajustado em 3,0 e amostra sem correção de pH foram obtidas recuperações entre 72 e 98%. No entanto, como os herbicidas estudados apresentam valores de pK_a 3,9 para imazetapir e imazapique (pKa do clomazona não existe registro), melhores resultados foram obtidos com pH 2,0, sendo esse o valor utilizado na validação do método. O volume de *breakthrough* para os herbicidas foi estudado utilizando-se volumes de amostra variando de 50 a 500 mL. Os resultados estão demonstrados na Tabela 16.

Tabela 16 - Recuperações obtidas para os herbicidas utilizando-se diferentes volumes de amostra.

	Recuperação (%)*		
Volume (mL)	Imazapique	Imazetapir	Clomazona
50	101,3	105,4	108,9
100	92,8	82,6	98,8
150	81,6	70,5	93,4
200	60,9	63,2	101,2
250	54,6	60,9	105,9
300	39,9	50,8	102,8
500	32,9	42,8	72,4

*Massa de cada herbicida: 0,1 µg; amostra a pH 2,0; eluição com 2 mL da mistura DCM:MeOH (65:35, *v/v*), evaporação com auxílio de N_2 e redissolução em 500 µL de fase móvel

Para imazetapir e imazapique ocorre diminuição na recuperação a partir de 100 mL, sendo que a partir de 150 mL já não se obtém mais recuperações aceitáveis para esses 2 compostos. Para o clomazona, a diminuição na recuperação ocorre apenas com um volume de amostra acima de 300 mL. Foi escolhido o volume de 100 mL para a pré-concentração das amostras por apresentar recuperações dentro de uma faixa aceitável.

O volume de *breakthrough* pode ser baixo quando os pesticidas não são fortemente retidos pelo sorvente e está relacionado com a hidrofobicidade do soluto e a massa de sorvente usada (SIMPSON, 2000). Isso justifica os resultados obtidos, uma vez que clomazona, com K_{ow} de 350, é o mais hidrofóbico dos herbicidas e imazetapir e imazapique, com K_{ow} de 31, 0,01, respectivamente, são menos hidrofóbicos.

A Figura 13 apresenta as curvas de *breaktrough* obtidas para os 3 herbicidas.

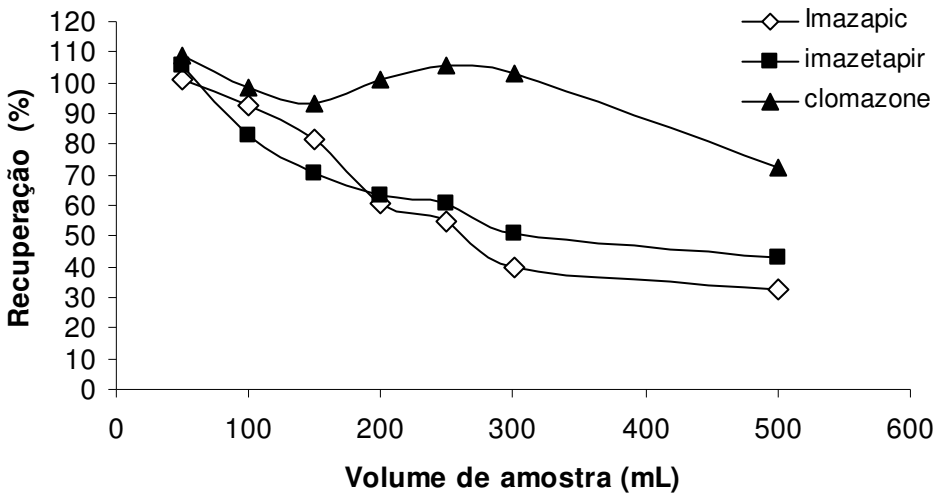


Figura 13 - Gráfico que relaciona o volume de *breakthrough* para os três herbicidas.

4.4 Procedimento experimental otimizado

A partir dos testes que foram realizados, obteve-se o procedimento de extração otimizado, utilizado posteriormente na validação do método e para extração e pré-concentração das amostras para acompanhamento da dissipação experimental à campo e o residual no solo.

4.4.1 Procedimento experimental otimizado para análise dos herbicidas em amostras de água

O sistema de extração em fase sólida para análise dos herbicidas é primeiramente condicionado com 3 mL de metanol, 3 mL de água Milli-Q para retirar o excesso de metanol e 3 mL de água Milli-Q pH 2,0. Um volume de 100 mL de água de superfície com e pH 2,0 ajustado com ácido fosfórico 1:1, v/v, contendo os analitos de interesse é percolada através do cartucho contendo o sorvente à uma vazão de aproximadamente 5 mL min^{-1} sob vácuo. Após a etapa de pré-concentração passou-se 3 mL de água desionizada para minimizar substâncias interferentes solúveis na mesma, seguida de vácuo por 15 min. Na seqüência, fez-se a eluição dos analitos retidos na C18 utilizando-se duas alíquotas de 1,0 mL da mistura diclorometano:metanol (65:35, *v/v*). Recolheu-se o analito em um frasco e reduziu-se o volume até secura com auxílio de N_2. Para a análise via HPLC-DAD foi feita a redissolução em 500 µL da fase móvel, resultando em um fator de pré-concentração de 200 vezes.

4.5 Estudo da extração dos herbicidas nas amostras de solo

Nesta etapa da extração testou-se diferentes quantidades de solo, a fim de também minimizar o volume de solvente para extração, gerando um menor volume de resíduos. Foram pesadas e testadas massas de 2, 5 e também 10 g de solo. A massa escolhida para a realização foi de 5 g que apresentou melhores resultados de recuperação, comparada às outras. Quando testado 10 g foi necessário também um volume maior de solvente.

Os ensaios utilizando 30 mL de solvente foram testados de 2 maneiras. A primeira, adicionando o volume em uma única alíquota, e na segunda maneira eram feitas adições em 3 etapas, onde a amostra era sonicada, centrifugada e retirado o sobrenadante e adicionado mais uma alíquota de solvente, repetindo o processo por 3 vezes. Neste ensaio as recuperações não foram superiores aos obtidos quando utilizado 10 mL em uma única alíquota

A Tabela 17 apresenta os valores de recuperações obtidos para os solventes testados com uma massa de 5 g de amostra fortificadas com 0,025 mg L^{-1} de cada herbicida e extraídos com 10 mL de solvente.

Tabela 17 - Recuperações obtidas para os herbicidas utilizando-se diferentes solventes de extração.

Solvente	Recuperação (%)*		
	Imazapique	Imazetapir	Clomazona
Metanol	67,5 ± 6,4	55,2 ± 5,9	77,3 ± 8,1
Metanol:água (9:1, v/v)	72,5 ± 2,3	61,5 ± 7,1	70,8 ± 6,4
Acetonitrila	87,0 ± 4,9	83,2 ± 2,1	90,8 ± 4,1
Acetonitrila:água (9:1, v/v)	89,1 ± 5,1	87,2 ± 6,3	112,8 ± 9,1

*A concentração de cada herbicida foi de 0,025 mg L^{-1} e a extração feita com 10 mL de solvente

A acetonitrila pura e a mistura de acetonitrila:água (9:1, v/v) apresentaram resultados de recuperação melhores para os três herbicidas, mas por conter um volume de água a mistura tornou a etapa de evaporação mais lenta. Por esse motivo foi escolhido como solvente de extração a acetonitrila pura.

O pH é outro fator crítico em uma etapa de extração. Foram avaliadas extrações com 3 diferentes valores de pH. No primeiro teste o pH do solvente de extração foi ajustado a pH 2 com solução aquosa de ácido fosfórico 1:1 (v/v), no segundo a pH 9,0 com de KOH 1 mol L^{-1}, e no terceiro não foi alterado o valor pH do solvente (pH 6,0).

O ajuste de pH mais baixos, entre 2,0 e 3,0 é indicado para amostras onde desejamos quantificar herbicidas do grupo das imidazolinonas (FURLONG *et al.*, 2000; VIGNA *et al.*, 2006). A acidificação da amostra a baixos valores de pH fez com que fossem extraídos mais interferentes da amostra, como os ácidos húmicos e fúlvicos que geram picos que são interferentes na análise cromatográfica.

A Tabela 18 apresenta os valores de recuperação obtidos quando do ajuste de pH do solvente de extração.

Tabela 18 - Recuperações obtidas para os herbicidas utilizando-se diferentes ajustes de pH dos solventes de extração.

	Recuperação (%)*		
Valores de pH	pH 2,0	pH 9,0	pH 6,0
Imazapique	89,8 ± 4,1	71,3 ± 8,4	86,0 ± 6,2
Imazetapir	92,6 ± 6,1	74,9 ± 5,6	87,2 ± 7,0
Clomazona	104,8 ± 3,0	46,7 ± 8,1	85,8 ± 8,5

*A concentração de cada herbicida foi de 0,025 mg L^{-1} e a extração feita com 10 mL de acetonitrila

Quando utilizado o solvente sem o ajuste de pH (pH 6,0) a resposta em termos de recuperação foi equivalente aos valores de pH mais baixos sem que coeluissem estes interferentes ou a interferência fosse muito minimizada. Por isso para aplicação foi escolhido o pH sem ajuste.

A Figura 14 mostra um cromatograma típico de duas extrações de amostras "branco" onde foi feita extração com ajuste de pH a 2 e a outra sem ajuste de pH (pH 6,0).

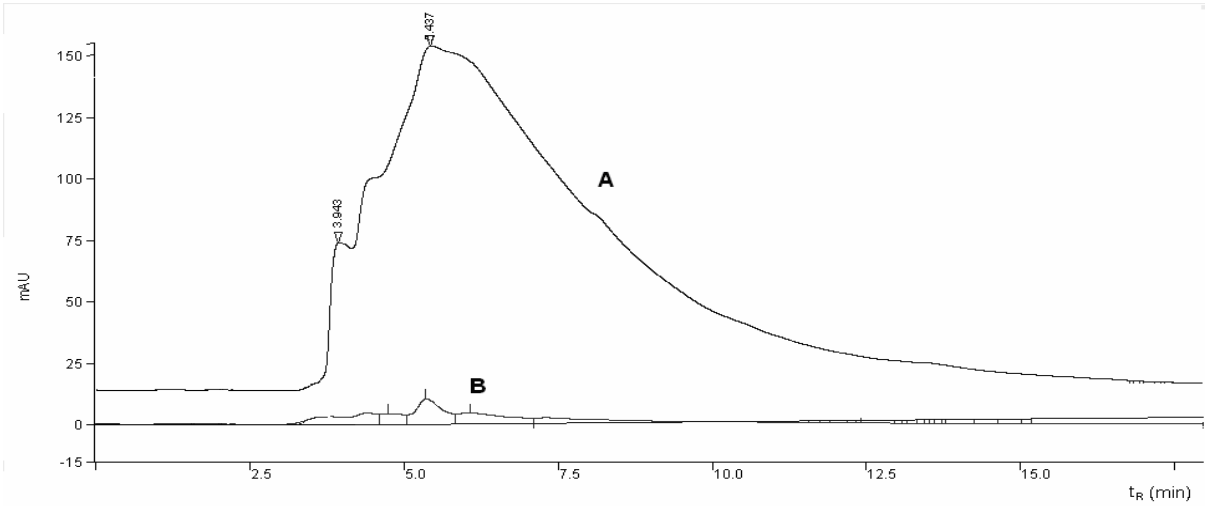


Figura 14 - Cromatograma típico obtidos por HPLC-DAD para extrações de amostra "branco" com pH 2,0 (A) e pH 6,0 (B).

4.5.1 Procedimento experimental otimizado para análise das amostras de solo

Para extração dos herbicidas em amostras de solo foram pesados 5 g de amostra, e em seguida adicionados 10 mL de acetonitrila em um tubo de extração. Estes foram para um banho de ultra-som por 30 minutos. Após o processo de sonicação os tubos foram levados para centrifuga com rotação de 3600 rpm por um tempo de 10 minutos. Após a centrifugação o volume sobrenadante de solvente foi transferido quantitativamente para um tubo de vidro graduado, o volume foi completado até 10 mL com acetonitrila, este volume foi evaporado sob N_2. A amostra foi redissolvida com 500 µL da fase móvel.

4.6 Validação dos métodos em amostras aquosas

4.6.1 Curva analítica e linearidade

A Tabela 19 apresenta as equações da curva analítica para os herbicidas, obtidas por HPLC-DAD.

Tabela 19 - Resultados obtidos para calibração dos herbicidas no sistema HPLC-DAD.

Herbicida	Equação da reta (y= ax + b)	r^2	Intervalo linear (mg L^{-1})
Imazapique	y = 82,079x - 1,0578	0,9994	0,025-2,5
Imazetapir	y = 66,026x + 0,1315	0,9991	0,025-2,5
Clomazona	y = 59,314x + 0,44	0,999	0,05-2,5

Pelos coeficientes angulares (a) das equações das retas pode-se perceber que o imazapique apresenta a maior sensibilidade dentre os herbicidas.

Tabela 20 - Resultados obtidos para calibração dos herbicidas no sistema LC-MS/MS.

Herbicida	Equação da reta (y= ax + b)	r^2	Intervalo linear (µg L^{-1})
Imazapique	y = 11320x - 61142	0,9993	0,25-1000
Imazetapir	y = 14015x + 10740	0,9996	0,25-1000
Clomazona	y = 11336x - 66271	0,9994	0,25-1000

Analisando-se as equações das curvas obtidas para HPLC-DAD e para o LC-MS/MS (Tabela 20) pode-se deduzir que os modelos lineares são bastante adequados. A ANVISA recomenda um coeficiente de correlação igual a 0,99 e o INMETRO um valor acima de 0,90, assim como um coeficiente de determinação maior que 0,999 é considerado como evidencia de ajuste ideal dos dados para linha de regressão (RIBANI *et al.*, 2004; SANCO, 2007).

4.6.2 Limite de detecção e limite de quantificação

Os resultados obtidos para os limites de detecção e de quantificação para as amostras de água estão nas Tabelas 21 e 22.

Tabela 21 - Valores de LOD e LOQ para os herbicidas determinados por HPLC-DAD em amostras de água.

Herbicida	Limites do instrumento (mg L^{-1})		Limites do método (µg L^{-1})	
	LOD	LOQ	LOD[a]	LOQ[b]
Imazapique	0,008	0,025	0,04	0,12
Imazetapir	0,008	0,025	0,04	0,12
Clomazona	0,02	0,05	0,08	0,25

a = teórico; b = experimental

Os valores de LOQ obtidos para os herbicidas para amostras de água ficaram abaixo do limite permitido para herbicidas individuais em água destinada a

tratamento para posterior consumo humano que é de 1 µg L^{-1} para pesticidas individuais e 3 µg L^{-1} para o total de pesticidas (KUSTER *et al.*, 2006). Na literatura brasileira ou americana não foram encontrados valores de limites máximos para nenhum destes compostos em águas, e os valores obtidos estão abaixo dos recomendados para outros herbicidas (BRASIL, 2004; BRASIL, 2005; EUA, 2001).

Tabela 22 - Valores de LOD e LOQ para os herbicidas determinados por HPLC-DAD em amostras de solo.

	Limites do instrumento (mg L^{-1})		Limites do método (µg kg^{-1})	
Herbicida	LOD	LOQ	LOD[a]	LOQ[b]
Imazapique	0,008	0,025	0,8	2,5
Imazetapir	0,008	0,025	0,8	2,5
Clomazona	0,02	0,05	1,5	5,0

a = teórico; b = experimental

A Tabela 23 contém os valores calculados dos LOD e LOQ estimados para o LC-MS/MS, tanto para instrumento quanto para o método, que foram calculados conforme descrito no item 3.7.2, a partir da análise das soluções preparadas em acetonitrila.

Tabela 23 - Valores de LOD e LOQ para os herbicidas determinados por LC-MS/MS em amostras de solo.

	Limites do instrumento (µg L^{-1})		Limites do método (ng kg^{-1})	
Herbicida	LOD	LOQ	LOD[a]	LOQ[b]
Imazapique	0,08	0,25	8,0	25,0
Imazetapir	0,08	0,25	8,0	25,0
Clomazona	0,08	0,25	8,0	25,0

a = teórico; b = experimental

4.6.3 Precisão (repetitividade e precisão intermediária)

A repetitividade (RSD_r) e a precisão intermediária (RSD_{pi}) para o instrumento (n=6), para os níveis de concentração utilizadas na elaboração das curvas analíticas dos herbicidas, ficaram entre 3,08 e 6,96% e 0,02 e 9,51%, respectivamente. O teste de precisão intermediária foi realizado empregando-se dias diferentes dos utilizados para os estudos de repetitividade.

Os resultados de precisão para o método estão demonstrados juntamente com os resultados de recuperação, nas Tabelas 24 e 25. A precisão intermediária para os herbicidas foi realizada empregando-se dias e operadores diferentes daqueles dos estudos de repetitividade. Os valores para a repetitividade dos herbicidas em amostras de água ficaram entre 1,3 e 7,7% e para a precisão intermediária ficaram entre 2,5 e 9,0%. Para amostras de solo estes valores foram de 0,7 e 8,7% para repetitividade e de 0,8 e 7,2% para precisão intermediária.

Para matrizes ambientais e de alimentos, a precisão é dependente da matriz da amostra, da concentração do analito e da técnica de análise, podendo variar entre 2% e mais de 20% (HUBER, 2001).

Para validação de métodos cromatográficos, na faixa de concentração avaliada nesse trabalho, recomenda-se que a precisão deve apresentar RSD ≤ 20% (RIBANI *et al.*, 2004; SANCO, 2007). Portanto, todos os resultados obtidos estão dentro dos limites sugeridos.

4.6.4 Exatidão (Recuperação)

As Tabelas 24 e 25 apresentam os valores de recuperação obtidos para as fortificações, em diferentes níveis de concentração, para os herbicidas em amostras de água e solo, respectivamente, utilizando-se o procedimento descrito no item 3.7.4.

A recuperação depende da matriz da amostra, do procedimento de extração e da concentração do analito. Neste trabalho, seguiu-se a recomendação de que, para validação de métodos cromatográficos, as recuperações devem estar entre 70 e

120% (RIBANI *et al.*, 2004). Todos os valores obtidos apresentaram-se dentro desse intervalo e, portanto, o método está de acordo com os parâmetros exigidos.

Tabela 24 - Recuperação, RSD_r e RSD_{pi} do método para os herbicidas em amostras de água determinados por HPLC-DAD.

Herbicida	Nível de fortificação (µg L^{-1})	Repetitividade	Precisão intermediária
		Recuperação (%)	Recuperação (%)
Imazapique	0,12	98,1 ±3,1	95,2 ±9,0
	0,60	80,9 ±5,2	93,1 ±7,2
	1,20	106,6 ±4,7	89,4 ±5,7
Imazetapir	0,12	89,3 ±1,4	93,7 ±2,5
	0,60	94,9 ±5,4	101,3 ±3,1
	1,20	106,7 ±7,1	96,1 ±2,6
Clomazona	0,25	86,4 ±7,7	94,8 ±7,3
	1,25	105,5 ±1,3	91,2 ±5,3
	2,50	94,1 ±3,2	105,2 ±4,1

n=9 (3 extrações × 3 injeções) de cada extrato

Tabela 25 - Recuperação, RSD_r e RSD_{pi} do método para os herbicidas em amostras de solo determinados por HPLC-DAD.

Herbicida	Nível de fortificação (µg kg^{-1})	Repetitividade	Precisão intermediária
		Recuperação (%)	Recuperação (%)
Imazapique	2,5	90,1 ±2,1	102,2 ±7,2
	12,5	94,7 ±8,5	98,1 ±3,5
	25,00	89,3 ±3,2	93,4 ±4,1
Imazetapir	2,5	101,2 ±2,1	89,7 ±0,8
	12,5	97,9 ±8,7	91,3 ±2,1
	25,00	96,7 ±6,3	103,1 ±6,6
Clomazona	5,00	95,4 ±0,7	94,1 ±2,1
	25,00	105,5 ±1,3	98,0 ±6,9
	50,00	91,1 ±2,1	105,7 ±4,1

n=9 (3 extrações × 3 injeções) de cada extrato

4.7 Aplicação do método

4.7.1 Estudo de dissipação em lavouras de arroz irrigado

Os métodos desenvolvidos foram aplicados no estudo da dissipação dos compostos em um experimento de campo, realizado na várzea experimental do Departamento de Fitotecnia da Universidade Federal de Santa Maria. O estudo foi realizado em três anos agrícolas, 2004/2005, 2005/2006 e 2006/2007.

O perfil cromatográfico obtido para amostras de água de lavoura, coletadas aos três dias após aplicação dos pesticidas, está demonstrado na Figuras 15.

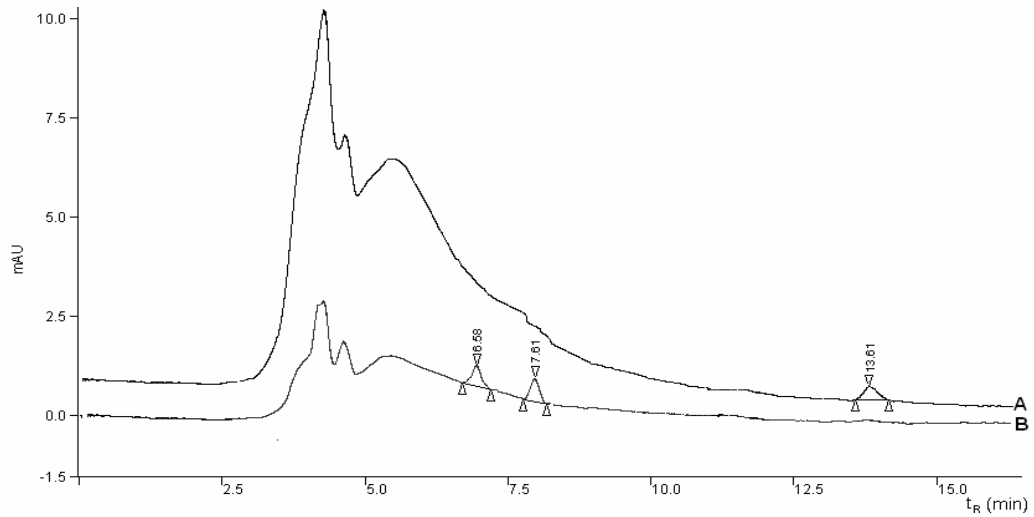


Figura 15 - Cromatogramas de amostras de água de lavoura contendo os herbicidas, coletadas aos 3 dias após aplicação dos herbicidas, imazapique (t_R 6,6 min), imazetapir (t_R 7,6 min), e clomazona (t_R 13,6 min), obtidos em 220 nm (A) e 254 nm (B).

As amostras de água foram analisadas conforme o método validado e os resultados obtidos para a degradação dos herbicidas estão demonstrados nas Figuras 16, 17 e 18, para as safras 2004/05, 2005/2006 e 2006/2007, respectivamente.

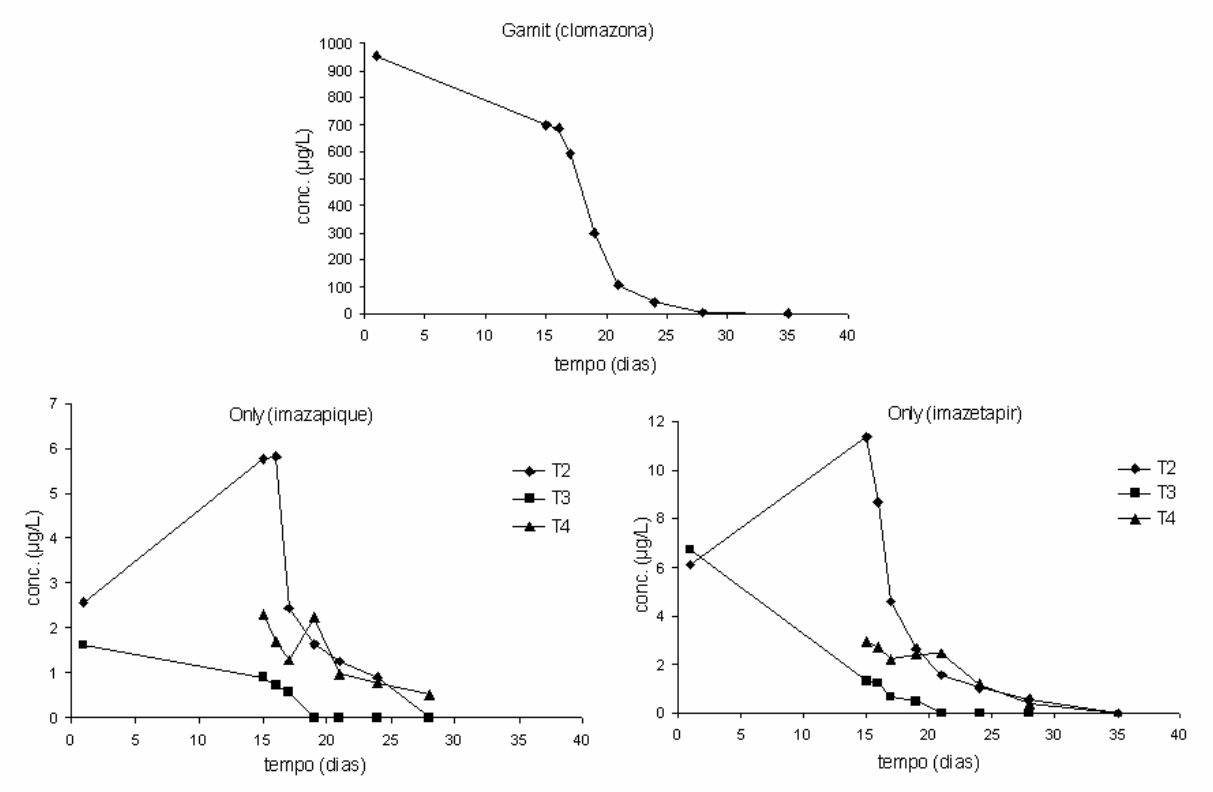


Figura 16 - Perfil da dissipação dos herbicidas na safra 2004-2005, onde T2 = aplicação de Only® em pré e pós-emergência, T3= uma aplicação em pré-emergência e T3=uma aplicação em pós-emergência.

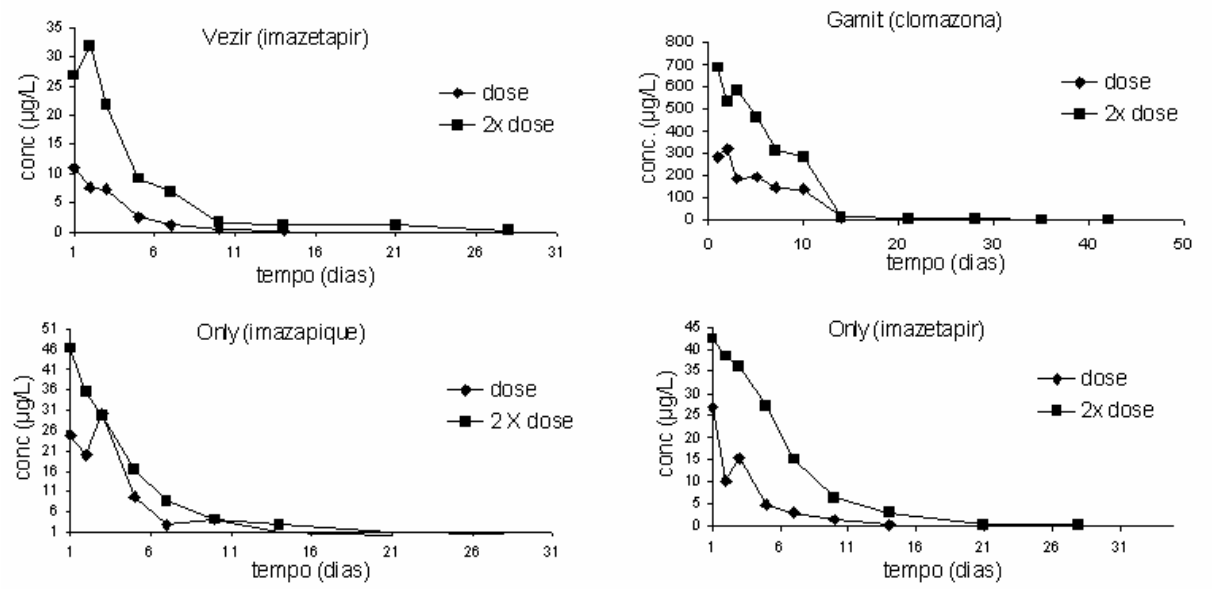


Figura 17 - Perfil da dissipação dos herbicidas na safra 2005-2006.

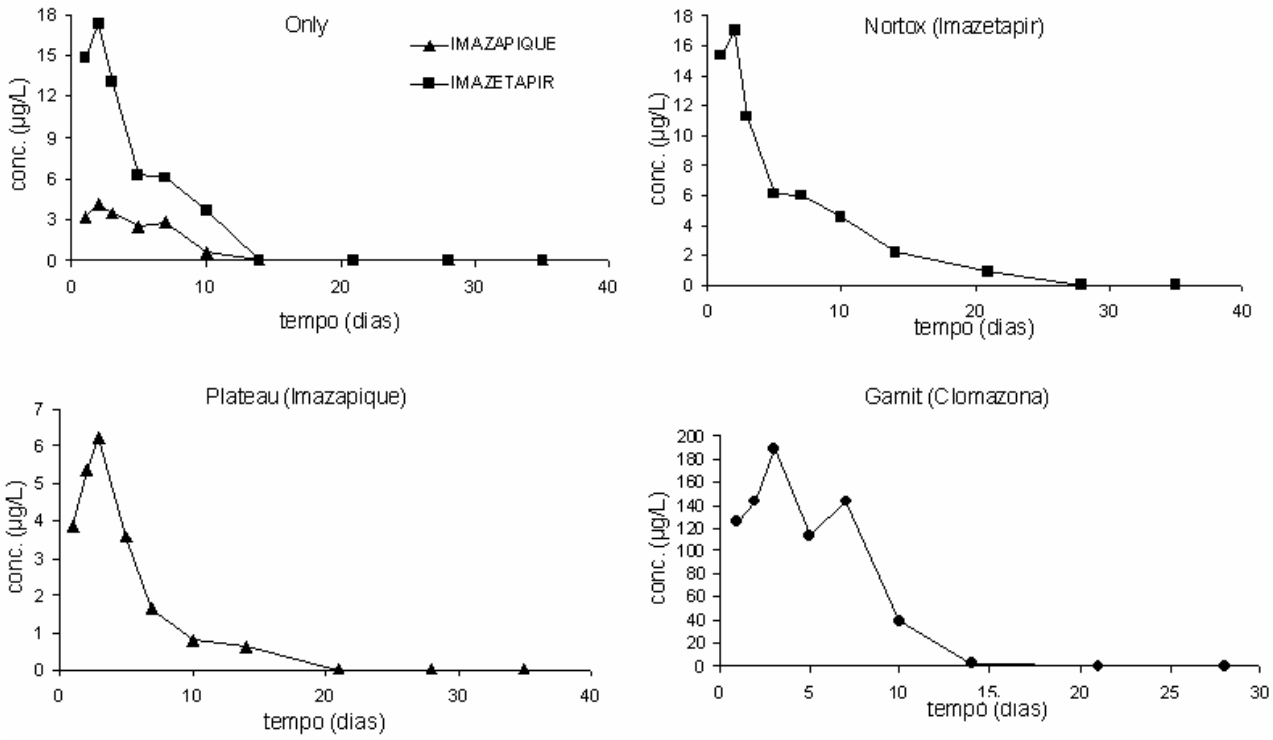


Figura 18 - Perfil da dissipação dos herbicidas na safra 2006-2007.

A persistência variável dos herbicidas na água pode ser explicada pelo coeficiente de adsorção no carbono orgânico (K_{oc}), meia-vida ($t_{1/2}$), constante da lei de Henry (K_H) e também pelas condições hidrometeorológicas. A importância do K_{oc} é destacada por MATTOS *et al.* (1999) no potencial de contaminação de água e solo. O fato da concentração dos herbicidas na água ser baixa não exclui a possibilidade de que concentrações elevadas possam ocorrer após chuvas de grande intensidade, especialmente em áreas próximas a pequenos mananciais hídricos que recentemente foram tratadas com herbicidas. A persistência é também dependente de outros fatores como a dose aplicada, características físicas e químicas da água e do sedimento e do método de aplicação. Adicionalmente, a solubilidade é uma característica que controla a mobilidade do herbicida.

O herbicida imazetapir, no primeiro ano de estudo, foi aplicado em três tratamentos diferentes, utilizando a formulação Only®: T2 (aplicação em pré e pós-emergência), T3 (aplicação em pré-emergência) e T4 (aplicação em pós-emergência). Em T2 foram quantificados resíduos de imazetapir até 28 dias após aplicação, sendo que 15 dias após a aplicação em pré-emergência foi feita a aplicação em pós-emergência, a concentração encontrada foi de 0,57 µg L^{-1}. No

segundo tratamento, T3, foram encontrados resíduos até 19 dias após aplicação, na concentração de 0,47 µg L^{-1}. No tratamento onde foi feita apenas uma aplicação em pós-emergência, T4, foram quantificados resíduos até os 14 dias após a aplicação na concentração de 0,4 µg L^{-1}.

No segundo ano de estudo o herbicida imazetapir foi avaliado com a aplicação de duas formulações diferentes e duas aplicações, uma da dose recomendada e outra do dobro da dose. O herbicida imazetapir foi quantificado até 14 dias após aplicação tanto nas formulações Only® quanto Vezir® e apresentou concentração de 0,4 e 0,32 µg L^{-1} respectivamente, quando aplicado na dose recomendada e 0,35 e 0,34 µg L^{-1} respectivamente quando no dobro da dose recomendada. No terceiro ano do estudo, foram usadas as formulações Only® e Vezir®. Foram encontrados resíduos até 14 dias para o herbicida na formulação Only® na concentração de 0,8 µg L^{-1}; já na formulação Vezir®, o herbicida apresentou resíduos até 21 dias, na concentração 0,95 µg L^{-1}.

O herbicida imazapique, aplicado na formulação Only®, no primeiro ano de estudo em três tratamentos T2 (aplicação em pré e pós-emergência), T3 (aplicação em pré-emergência) e T4 (aplicação em pós-emergência). Em T2 foram quantificados resíduos até 24 dias após aplicação, sendo que aos 15 dias após a aplicação em pré-emergência foi feita uma nova aplicação em pós-emergência, a concentração encontrada foi de 0,9 µg L^{-1}. No segundo tratamento, T3, foram encontrados resíduos até 17 dias após aplicação, na concentração de 0,57 µg L^{-1}. No tratamento onde foi feita apenas uma aplicação em pós-emergência, T4, foram quantificados resíduos até os 14 dias após a aplicação na concentração de 0,52 µg L^{-1}. No segundo ano de tratamento, o imazapique aplicado na formulação Only®, aplicado na dose recomendada e no dobro da dose. Quando aplicado na dose recomendada foram encontrados resíduos até 10 dias após aplicação, na concentração de 1,93 µg L^{-1} e quando aplicado no dobro da dose foram detectados até 21 dias após aplicação na concentração de 0,41 µg L^{-1}. No terceiro ano de estudo foi aplicado utilizando duas formulações diferentes, Only® e Plateau®. Foi quantificado até 10 e 14 dias após aplicação nas formulações Only® quanto Plateau® e apresentou concentração de 0,58 e 0,61 µg L^{-1}, respectivamente.

O herbicida clomazona, aplicado na formulação Gamit® no primeiro ano, na concentração de três vezes a dose recomendada (T5; aplicação em pré-emergência), foi detectado no primeiro ano de estudo até 35 dias após aplicação na

concentração de 0,4 µg L^{-1}. No segundo ano de tratamento foram aplicados na dose recomendada onde foram detectados resíduos na concentração de 0,30 µg L^{-1} até 35 dias e no dobro da dose até 42 dias após aplicação, na concentração 0,42 µg L^{-1}. No terceiro ano de aplicação foi quantificado até 21 dias após aplicação e apresentou concentração de 0,24 µg L^{-1}.

Conclui-se, pelos resultados obtidos, que há persistência dos herbicidas na lâmina de água. Portanto, recomenda-se a retenção da água na lavoura de arroz, onde foram aplicados estes compostos, por no mínimo, 35 dias. Os herbicidas imazetapir e imazapique estariam em concentração menor que 0,08 µg L^{-1} (o LOD do método), uma vez que ele não foi mais detectado. Para o clomazona a partir dos resultados obtidos nestes três anos de acompanhamento recomenda-se a retenção por, no mínimo 35 dias após aplicação. Estes resultados obtidos para o clomazona conferem com o monitoramento realizado por PRIMEL (2003) durante os anos agrícolas de 2000/01, 2001/02 e 2002/03 onde foi recomendada a manutenção da lâmina d'água por no mínimo 28 dias após aplicação. Neste caso a persistência do clomazona por mais tempo, se deve ao fato de a concentração aplicada ter sido diferente da dose recomendada como no experimento realizado no primeiro ano.

Eventos como a precipitação pluvial, escoamento superficial e a suplementação de água na lavoura são fatores adicionais que podem modificar a concentração do herbicida na água resultando em perdas e picos de concentração. Por estes motivos a persistencia dos herbicidas na água podem sofrer algumas alterações. Durante esse período, a irrigação deve ser feita apenas para manutenção da lâmina, evitando-se que a água contendo herbicidas seja drenada para os manaciais, com risco de contaminação das águas.

4.7.2 Cinética de degradação e tempos de meia-vida

As Tabelas 26, 27 e 28 apresentam os resultados obtidos para a cinética de degradação dos herbicidas estudados, para os três anos agrícolas.

Tabela 26 - Cinética de degradação para os herbicidas, na safra 2004-2005.

Herbicida		Dose (g i.a. ha^{-1})	Equação da reta (y= ax + b)	r^2	$t_{1/2}$ (dias)
Imazetapir	T2	75+75	-0,0973x + 2,8204	0,5385	7,12
	T3	75	-0,1375x + 2,1204	0,9433	5,04
Imazapique	T2	25+25	-0,0431x + 1,5485	0,1965	16,08
	T3	75	-0,0562x + 0,5623	0,8939	12,33
Clomazona		1500	-0,2430x + 9,3491	0,7685	2,85

onde T2 = aplicação de Only® em pré e pós-emergência, T3= uma aplicação em pré-emergência e T3=uma aplicação em pós-emergência.i.a.= ingrediente ativo

Tabela 27 - Cinética de degradação para os herbicidas, na safra 2005-2006.

Herbicida	Dose (g i.a. ha^{-1})	Equação da reta (y= ax + b)	r^2	$t_{1/2}$ (dias)
Imazetapir	100	-0,2960x + 2,5667	0,9469	2,34
(Vezir®)	200	-0,1652x + 3,2048	0,8868	4,20
Imazetapir	75	-0,3059x + 3,3261	0,9681	2,27
(Only®)	150	-0,2009x + 4,0345	0,969	3,45
Imazapique	25	-0,4732x + 3,7672	0,8890	1,46
(Only®)	50	-0,2333x + 3,9507	0,9783	4,19
Clomazona	500	-0,1892x + 6,0043	0,9492	4,3
(Gamit®)	1000	-0,191x + 6,6838	0,9192	3,8

i.a.= ingrediente ativo

Tabela 28 - Cinética de degradação para os herbicidas, na safra 2006-2007.

Herbicida	Dose (g i.a. ha^{-1})	Equação da reta (y= ax + b)	r^2	$t_{1/2}$ (dias)
Imazetapir (Only®)	75	-0,2209x + 3,16	0,944	3,1
Imazapique (Only®)	25	-0,1788x + 1,701	0,7273	3,9
Imazapique (Plateau®)	17,5	-0,1867x + 1,9627	0,8864	3,7
Imazetapir (Vezir®)	75	-0,142x + 2,8459	0,9697	4,9
Clomazona (Gamit®)	500	-0,3356x + 6,1459	0,9059	2,1

i.a.= ingrediente ativo

No primeiro ano de estudo (Tabela 26) o herbicida imazetapir, aplicado na formulação Only®, na dose recomendada, apresentou um tempo de meia-vida de 7,12 e 5,04, para aplicação em pré e pós-emergência (T2) e pré-emergência (T3), respectivamente. Para a formulação Vezir®, no segundo ano de estudo (Tabela 27), os tempos de meia-vida foram de 2,34 e 4,20 dias, respectivamente para a aplicação da dose e o dobro da dose recomendada para imazetapir. Para a formulação Only®, o tempo de meia-vida de imazetapir para a dose e dobro da dose foram de 2,27 e 3,45 dias, respectivamente. No terceiro ano de estudo (Tabela 28), os tempos de meia-vida foram de 3,1 e 4,9 dias para Only® e Vezir®, respectivamente.

O imazapique, aplicado na formulação Only®, na dose recomendada, apresentou um tempo de meia-vida de 16,08 e 12,33, para aplicação em pré e pós-emergência (T2) e pré-emergência (T3), respectivamente no primeiro ano. Para a formulação Only, no segundo ano de estudo, o tempo de meia-vida foi de 1,46 e 4,19 dias, respectivamente para a aplicação da dose e o dobro da dose recomendada para imazapique. No terceiro ano de estudo, os tempos de meia-vida foram de 3,9 e 3,7 dias para Only® e Plateau®, respectivamente.

Observando os dados climáticos, apresentados no Anexo B, observa-se que os valores de precipitação e as temperaturas médias em 2004/05 foram abaixo da média, principalmente a precipitação nos meses de dezembro/2004 a março/2005. Já na safra 2005/06, as temperaturas médias ficaram levemente acima da média em todos os meses, assim como a precipitação, nos meses de outubro e janeiro; e o número de horas de insolação foi levemente maior que em 2004/05. Na safra de 2006/07 as médias de precipitação e temperatura foram superiores aos anos anteriores, e a média de insolação foi inferior à 2005/06, mas superior a 2004/05. Estes fatos podem justificar de os tempos de meia-vida para o imazetapir e imazapique terem sido maiores no primeiro do que nos demais.

O herbicida clomazona foi aplicado no primeiro ano do estudo na formulação Gamit®, o tempo de meia-vida deste herbicida foi de 2,85 dias, a dose aplicada foi 3 vezes a dose recomendada. No segundo ano de estudo foram feitas aplicações na dose recomendada em um outro experimento com o dobro da dose. O tempo de meia-vida para o clomazona neste ano foi de 3,7 e 3,6 dias, para dose recomendada e o dobro da dose, respectivamente. No terceiro ano de estudo, aplicada a dose

recomendada para clomazona na formulação Gamit®, o tempo de meia-vida deste herbicida foi de 2,1 dias. As médias de temperatura e precipitação mais baixas na safra 2004/05 que nos anos seguintes podem ter influenciado no tempo de meia vida do clomazona.

As concentrações atingidas por um pesticida nos diferentes compartimentos ambientais (solo, água, planta e atmosfera) dependem do modo e das condições de aplicação, das propriedades físico-químicas, da quantidade ou dose usada e das condições ambientais (condições de fotólise, temperatura, pH da água, presença de microorganismos) (SPADOTTO *et al.*, 2004; ROCHA *et al.*, 2004; BARCELÓ & HENNION, 1997). A precipitação pluvial, o escorrimento superficial e a suplementação de água podem modificar a concentração dos pesticidas resultando em perdas e/ou picos de concentração (MACHADO, 2003). Os tempos de meia-vida dependem fortemente da temperatura, estudos realizados com o inseticida fenitrotion indicaram uma redução no $t_{1/2}$ de 49,5 para 4,7 dias quando a temperatura foi elevada de 23 para 49,7 ºC (BARCELÓ & HENNION, 1997).

4.7.3 Determinação da concentração residual no solo na entre-safra do arroz irrigado

A aplicação do método desenvolvido para a determinação dos resíduos de imazetapir e imazapique em solo, foi em amostras coletadas na Várzea Experimental da UFSM no período da entre-safra no ano de 2006. A Figura 19 mostra o cromatograma de uma amostra de solo, e uma solução analítica contendo 0,5 mg L^{-1} dos herbicidas imazapique.

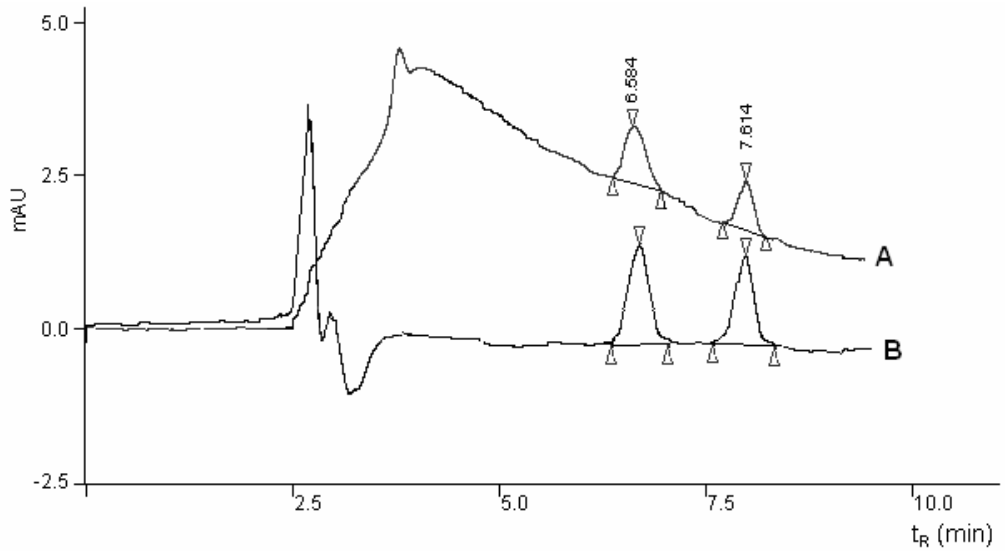


Figura 19 – Cromatograma obtido por HPLC-DAD para uma amostra de solo (A), e uma solução analítica contendo 0,5 mg L^{-1} dos herbicidas imazapique (B) (t_R 6,5 min), imazetapir (t_R 7,6 min).

Estes herbicidas são caracterizados por seus efeitos a baixas doses de aplicação, amplo espectro de atuação no controle de plantas daninhas e alta persistência no solo. Esta alta persistência no solo pode levar a interferência destes compostos em outras culturas que venham a ser cultivadas, as quais sejam sensíveis aos herbicidas dessa classe.

A aplicação do método foi realizada em 244 amostras, coletadas a partir de solos que foram cultivados arroz irrigado no sistema Clearfield®. A Figura 20 mostra o número de amostras que deram resultado positivo, para imazapique ou imazetapir.

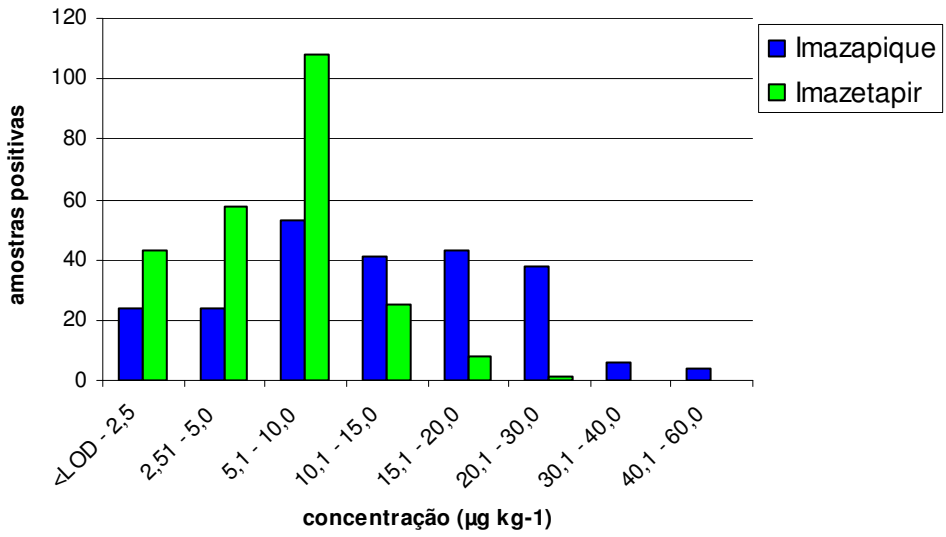


Figura 20 – Gráfico representando o número de amostras positivas obtidas na análise do solo.

Dentre as amostras, algumas foram coletadas em diferentes profundidades e os resultados estão expressos na Tabela 29. As maiores concentrações, tanto para o imazapique quanto para imazetapir, encontram-se, na faixa de profundidade de 10 a 15 cm, o que elevam o risco de ocorrer a fitotoxicidade, reduzindo o crescimento das plantas. PASQUALETTO *et al.* (1999) realizaram estudos para avaliar o processo de lixiviação dos herbicidas do grupo das imidazolinonas utilizando solos com diferentes características físico-químicas, e nestes estudos encontraram a maior concentração dos herbicidas desta classe na profundidade de 12,5 cm.

Tabela 29 – Concentração média de imazetapir e imazapique em amostras de solo coletadas a diferentes profundidades.

Profundidade (cm)	Imazapique (µg kg^{-1})	Imazetapir (µg kg^{-1})
0 – 5	7,3	4,0
5 – 10	11,2	5,6
10 – 15	9,4	8,1
15 – 20	4,1	3,9

5 CONCLUSÕES

A SPE provou ser uma excelente técnica para o preparo das amostras aquosas deste trabalho. É rápida, pois permite o preparo simultâneo de várias amostras e possibilita extração e pré-concentração dos herbicidas ao mesmo tempo, tem baixo consumo de solvente e, consequentemente, gera poucos resíduos. Os cartuchos contendo C18 possibilitaram a extração dos herbicidas clomazona, imazapique e imazetapir com rapidez e eficiência.

O método por HPLC-DAD mostrou-se adequado para a determinação dos herbicidas, permitindo a análise em um tempo de 16 min. A fase móvel de acetonitrila: água (40:60, *v/v*) separou adequadamente os compostos entre si e também das interferências provenientes da matriz. A detecção por DAD foi adequada, atingindo-se bons limites de detecção e possibilitando, também, a confirmação da identidade dos compostos pelo espectro molecular.

O método desenvolvido para determinação dos herbicidas em amostras de solo, com extração com solvente e ultra-som mostrou-se eficiente, uma vez que foram obtidas boas respostas de precisão e exatidão para os herbicidas estudados.

Para as amostras de solo também foi utilizado sistema LC-MS/MS no modo de ionização ESI+, e modo de aquisição MRM para quantificação dos resultados obtidos por HPLC-DAD. Pode-se dizer que ambas apresentaram resultados satisfatórios, uma vez que os resultados obtidos por HPLC-DAD foram confirmados por LC-MS/MS. A análise por LC-MS/MS apresenta a vantagem de fornecer informação qualitativa obtida a partir de fragmentos de massa característicos para cada composto, além de limites de quantificação bem mais baixos.

Na validação dos métodos obtiveram-se resultados satisfatórios. As curvas analíticas apresentaram valores de r^2 maiores que 0,99 para as faixas de concentração necessárias às aplicações. Os valores de limite de detecção e de quantificação foram adequados para análise de pesticidas em águas de superfície. Para os herbicidas, obtiveram-se valores de LOQ de 0,12 µg L^{-1} para imazapique e imazetapir e 0,25 µg L^{-1} para clomazona. Os LOQs para as amostras de solo foram

de 2,5 µg kg^{-1} para imazapique e imazetapir e de 5,0 µg kg^{-1} para clomazona, obtidos por HPLC-DAD. Para o sistema LC-MS/MS estes valores foram de 25 ng kg^{-1} para os herbicidas estudados. As recuperações para as amostras de água apresentaram valores entre 80,9 e 106,7% e para amostras de solo entre 89,3 e 105,7% com valores de precisão adequados.

Os resultados obtidos no estudo de dissipação dos herbicidas em lavoura de arroz irrigado permitem concluir que há persistência dos herbicidas na lâmina de água e a concentração aplicada assim como o tempo de insolação e precipitação influenciam diretamente nas concentrações dos herbicidas. Assim, durante o período inicial do cultivo de arroz irrigado, a irrigação deve ser feita apenas para manutenção da lâmina, evitando-se que a água contendo herbicidas seja drenada para rios e riachos, com risco de contaminação das águas.

As análises das amostras de solo coletadas na entre-safra do cultivo de arroz irrigado no sistema Clearfield® mostraram que os herbicidas imazapique e imazetapir permanecem retidos no solo, o que pode interferir no cultivo de uma nova cultura, levar a fitotoxicidade das sementes ou fazer com que as plantas daninhas desenvolvam resistência.

Através dos estudos de dissipação também foi possível a determinação da cinética de degradação e dos tempos de meia-vida desses compostos, os quais são importantes para predizer a persistência dos compostos nos compartimentos ambientais. Pesticidas usados na cultura do arroz irrigado têm efeitos prejudiciais para a vida aquática, pois a drenagem da água da lavoura das culturas de arroz coincidem com a época de reprodução dos peixes. Então, todo sistema de cultivo de arroz que libera água para o meio ambiente precisa ser monitorado com relação à concentração de pesticidas, e planos de gerenciamento, de manejo da cultura de arroz irrigado e de desempenho para proteger a vida aquática precisam ser implementados.

SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Aplicar os métodos desenvolvidos no monitoramento de águas de superfície e/ou profundidade para avaliar a possível contaminação pelos compostos estudados.

Aplicar a tecnologia de Processos Oxidativos Avançados para a degradação em laboratório dos compostos estudados com o objetivo de comparar com a degradação a campo.

Estudar a rota de degradação dos compostos através do emprego de técnicas como GC-MS e LC-MS.

Identificar os principais metabólitos e desenvolver métodos para determinação destes em amostras de água e solo.

Desenvolver um método para determinar estes herbicidas no grão de arroz.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGILENT TECHNOLOGIES. **Basics of LC/MS**. New York, 2001. 36 p

AGROFIT; AGROFIT – Sistema de Agrotóxicos Fitossanitários; Ministério da Agricultura, Pecuária e Abasteciento. Disponível em: <http://extranet.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons> Acesso em 5 jan 2008.

ALISTER, C.; KOGAN, M. Efficacy of imidazolinone herbicides applied to imidazolinone-resistant maize and their carryover effect on rotational crops. **Crop Protection**, v. 24, p. 375-379, 2005.

ANA; AGÊNCIA NACIONAL DAS ÁGUA. Brasília. Disponível em: <http://www.ana.gov.br>, Acesso em 08 ago 2007

ANISUZZAMAN, A. K. M. *et al.* Synthesis of Dimethyl Derivatives of Imidazolinone Herbicides: Their Use in Efficient Gas Chromatographic Methods for the Determination of These Herbicides. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.48, p. 5893-5902, 2000.

ANVISA; AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Brasília. Disponível em <http://www.anvisa.gov.br/AGROSIA/asp/frm_pesquisa_ingrediente.asp>. Acesso em: 13 nov. 2006.

ATRACHE, L. L. E, *et al.* Identification of phenyl-Nmethylcarbamates and their transformation products in Tunisian surface water by solid-phase extraction liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Talanta,** v 65, 603–612, 2005.

AVILA, L. A, *et al.* Assessment of acetolactate synthase (ALS) tolerance to imazethapyr in red rice ecotypes (*Oryza* spp) and imidazolinone tolerant/ resistant rice (*Oryza sativa*) varieties. **Pest Management Science,** v. 61, p.171–178, 2005.

AYANO, E. *et al.* Determination and quantitation of sulfonylurea and urea herbicides in water samples using liquid chromatography with electrospray ionization mass spectrometric detection. **Analytica Chimica Acta**, v. 507, p. 211-218, 2004.

AZEVEDO, A. C.; DALMOLIN, R. S. D. **SOLOS E AMBIENTE: UMA INTRODUÇÃO**. Santa Maria: Ed. Pallotti, 2006, 100 p.

BAGLIO D, *et al.* Atmospheric pressure ionization multiple mass spectrometric analysis of pesticides. **Journal of Chromatography A,** v.854, p. 207–220, 1999.

BAIRD, C. **Química Ambiental**. Porto Alegre: Bookman, 2. ed. 2002. p. 313-400.

BALINOVA, A. Ion-pairing mechanism in the solid-phase extraction and reversed-phase high-performance liquid chromatographic determination of acidic herbicides in water. **Journal of Chromatography A,** v. 728, p. 319-324, 1996.

BARBOSA, L. C. A. **Os pesticidas, o homem e o meio ambiente**. Viçosa: UFV, 2004. p. 15-34.

BARCELÓ, D. Analysis of soil, sediment and sludge. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 23: p. 677-679, 2004.

BARCELÓ, D. Ocurrence, handling and chromatographic determination of pesticides in the aquatic environment. A review. **Analyst**, v. 116, p. 681-689, 1991.

BARCELÓ, D.; HENNION M. C. Trace determination of pesticides and their degradation products in water. 3. ed. The Netherlands: Elsevier, 1997. 542 p.

BARCELÓ, D.; PETROVIC, M. Challenges and achievements of LC-MS in environmental analysis: 25 years on. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 26, p. 2-11, 2007.

BARIZON, R. R. M.; et al, Sorção e dessorção do imazaquim em solos com diferentes características granulométricas, químicas e mineralógicas. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 29, p. 695-703, 2005

BASF, Disponível em: http://agro.basf.com.br/hotsites/clearfield/clearfield/clearfield.asp?area=1 Acesso em 10 out 2007.

BECEIRO-GONZÁLEZ, E. *et al.* Optimization and validation of a solid-phase microextraction method for simultaneous determination of different types of pesticides in water by gas chromatography–mass spectrometry. **Journal of Chromatography A,** v. 1141, p. 165-173, 2007.

BIZIUK, M. *et al.* Ocurrence and determination of pesticides in natural and treated waters. **Journal of Chromatography A,** v. 754, p. 103-123, 1996.

BRASIL Decreto nº 4.074, de 4 de janeiro de 2002, que regulamenta a Lei nº 7802/1989, que dispõe sobre a pesquisa, a experimentação, a produção, a embalagem e rotulagem, o transporte, o armazenamento, controle, a inspeção e a fiscalização de agrotóxicos, e dá outras providências. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 08 jan 2002. Disponível em: www.planalto.gov.br/ccivil_03/Decreto/2002/D4074.htm. Acesso em 21 set 2007.

BRASIL. Portaria nº 518, de 25 de março de 2004. Estabelece os procedimentos e responsabilidades relativos ao controle e vigilância da qualidade da água para consumo humano e seu padrão de potabilidade, e dá outras providências. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 26 março 2004. Disponível em: <dtr2004.saude.gov.br/dab/saudebucal/legislacao/portaria518_25_03_04.pdf:>. Acesso em 23 nov. 2006.

BRASIL. Resolução nº 357, de 17 de março de 2005. Dispõe sobre a classificação dos corpos de água e diretrizes ambientais para o seu enquadramento, bem como estabelece as condições e padrões de lançamento de efluentes, e dá outras providências. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 18 março 2005. Disponível em: <www.mma.gov.br/conama/res/res05/res35705.pdf>. Acesso em 23 nov. 2006.

CARABIAS-MARTINEZ, R., *et al.* Simultaneous determination of phenyl- and sulfonylurea herbicides in water by solid-phase extraction and liquid chromatography with UV diode array or mass spectrometric detection. **Analytica Chimica Acta,** v. 517, p. 71–79, 2004.

CARABIAS-MARTÍNEZ, R. *et al.* Determination of herbicides and metabolites by solid-phase extraction and liquid chromatography. Evaluation of pollution due to herbicides in surface and groundwaters. **Journal of Chromatography A,** v. 950, p. 157-166, 2002.

CAUSON, R. Validation of chromatographic methods in biomedical analysis - Viewpoint and discussion. **Journal of Chromatography B**, v. 689, p. 175-180, 1997.

CETESB, COMPANHIA DE TECNOLOGIA DE SANEAMENTO AMBIENTAL. Disponível em <http://www.cetesb.sp.gov.br/Solo/solo/definicao.asp> Acesso em 23 mai 2007.

CHEN, X. Y., *et al.* Determination of imazaquin residues in soil by solid-phase extraction and high-performance liquid chromatography. **Journal of AOAC International**, v.90, p. 568-574, 2007.

CIT, CENTRO DE INFORMAÇÕES TOXICOLOGICAS; http://www.cit.rs.gov.br/v2/nova/?p=p_109&sName=ano-2003; Acesso em 27 set 2007.

CONAB; COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. Quarto levantamento de avaliação da safra 2006/2007. 2007. Disponível em: <http://www.conab.gov.br> Acesso em 16 jan 2007.

DEAN, J.R.; **Methods for Environmental Trace Analysis: Sample Preparation for organic analysis**, John Wiley & Sons. Ltda; 2003, p 108-139,

DIRECTIVE 86/363/EEC; **it contains MRLs already established by Directive 86/362/EEC (MRLs on cereals), Directive 86/363/EEC (MRLs for foodstuffs of animal origin) and Directive 90/642/EEC MRLs for foodstuffs of plant origin).** Disponível em: http://ec.europa.eu/food/plant/protection/pesticides/pesticides_res_annex_ii.xls. Acesso em 08 jan 2008.

DORES, E. F. G. C.; DE-LAMONICA-FREIRE, E. M. Contaminação do ambiente aquático por pesticidas. Estudo de caso: Águas usadas para consumo humano em Primavera do Leste, Mato Grosso – Análise Preliminar. **Química Nova**, v. 24, p. 27-36, 2001.

EMBRAPA, Arroz Irrigado: Recomendações Técnicas da Pesquisa para o Sul da Brasil, Embrapa Clima Temperado /IRGA/EPAGRI. Documento 57, 1999

EMBRAPA, Cultivo do arroz irrigado no Brasil. Embrapa Clima Temperado, 2007. Disponível em: <http://www.cpact.embrapa.br/sistemas/arroz/>. Acesso em 20 ago 2007.

EMBRAPA, Cultivo do arroz irrigado no Brasil. Embrapa Clima Temperado, 2003. Disponível em: <http://www.cpact.embrapa.br/sistemas/arroz/?cao=07>. Acesso em 16 jul 2007.

EPA. ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. **National Primary Drinking Water Standards**., março 2001. Disponível em: <www.epa.gov/safewater>. Acesso em 23 ago 2007.

EXTOXNET. EXTENSION TOXICOLOGY NETWORK. **Pesticide Information Profiles**. 2006. Disponível em:<http://ace.orst.edu/info/extoxnet>. Acesso em 28 dez 2006.

FAO; FOOD AND AGRICULTURE ORGANISATION OF THE UNITED NATIONS. **Produção mundial de grãos e arroz** (Dezembro de 2004). Disponível em:http://www.fao.org/documents/show_cdr.asp?url_file=/docrep/007/j3877e/ 3877e05.htm> Acesso em 17 ago 2007

FAO; FOOD AND AGRICULTURE ORGANISATION OF THE UNITED NATIONS. **Economics and the International Year of Rice**. Italy, 2004b. Disponível em: <http://www.rice2004.org>. Acesso em 17 ago 2007.

FAO; FOOD AND AGRICULTURE ORGANISATION OF THE UNITED NATIONS. **Rice is life**. Italy, 2004a. Disponível em: <http://www.fao.org/rice2004>. Acesso em 16 nov. 2006.

FEINBERG, M. Validation of analytical methods based on accuracy profiles. **Journal of Chromatography A**, v.1158, p. 174–183, 2007.

FERNANDEZ-ALBA, A. **Chromatographic-mass spectrometric food analysis for the trace determination of pesticides residues**. In. Comprehensive analytical chemistry. The Netherlands: Elsevier. 2005, 287 p.

FONT, G.; *et al.* Solid-phase extraction in multi-residue pesticide analysis of water. **Journal of Chromatography A,** v. 642, p 135 - 161, 1993

FURLONG, E. T. *et al.* Routine determination of sulfonylurea, imidazolinone, and sulfonamide herbicides at nanogram-per-liter concentrations by solid-phase extraction and liquid chromatography mass spectrometry. **The Science of the Total Environment**, v. 248, p. 135-146, 2000.

GEERDINK, R. B., *et al.* Trace-level determination of pesticides in water by means of liquid and gas chromatography. **Journal of Chromatography A,** v. 970:65–93, 2002.

HARRIS, D. C. **Análise Química Quantitativa**. 5.ed. Rio de janeiro: LTC Editora, 2001. p. 640-645;

HERNANDEZ F, *et al.* Strategies for quantification and confirmation of multi-class polar pesticides and transformation products in water by LC-MS using triple quadrupole and hybrid quadrupole time-of-flight analyzers. **Trends Analytical Chemistry** 24:596–612, 2005.

HERNANDEZ, F.; *et al.* Rapid direct determination of pesticides and metabolites in environmental water samples at sub-µg L^{-1} level by on-line solid-phase extraction-liquid chromatography–*electrospray* tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A,** v. 939, p. 1-11, 2001.

HOGENBOOM, A. C., *et al.* T. The role of column liquid chromatography-mass spectrometry in environmental trace-level analysis. Determination and identification of pesticides in water. **Jounal of Separation Science,** v. 24, p. 331–354, 2001.

HUBERT, P. *et al.*, Analysis of recent pharmaceutical regulatory documents on analytical method validation. **Journal of Chromatography A**, v.1158, p. 111–125, 2007.

IBGE (INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA). **Produção Agrícola Municipal – Cereais, Leguminosas e Oleaginosas**, 2005. Disponível em:<http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/economia/pamclo/2005/pamclo2005.pdf >. Acesso em 19 mar 2007.

ICH; INTERNATIONAL CONFERENCE ON HAMONISATION. **Validation of Analytical Procedures: Methodology**, 2QB (CPMP/ICH/281/95), 1996

INMETRO; INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA, NORMALIZAÇÃO E QUALIDADE INDUSTRIAL. **DOQ-CGCRE-008**: Orientações sobre validação de métodos de ensaios químicos. Brasília, 2003. 35p.

IRGA; INSTITUTO RIOGRANDENSE DO ARROZ. Disponível em <http://www.irga.rs.gov.br>, Acesso em 20 jul 2007

JEANNOT, R.; *et al.* E. Application of liquid chromatography with mass spectrometry combined with photodiode array detection and tandem mass spectrometry for monitoring pesticides in surface waters. **Journal of Chromatography A,** v. 879, p. 51–71, 2000.

JIMÉNEZ, J. J. *et al.* Determination of pesticide residues in waters from small loughs by solid-phase extraction and combined use of gas chromatography with electron-capture and nitrogen-phosphorus detection and high-performance liquid chromatography with diode array detection. **Journal of Chromatography A,** v. 778, p. 289-300, 1997.

JUNKER-BUCHHEIT, A.; WITZENBACHER, M. Pesticide monitoring of drinking water with the help of solid-phase extraction and high-performance liquid chromatography. **Journal of Chromatography A,** v. 737, p. 67-74, 1996.

KAH, M.; *et al.* Factors Influencing Degradation of Pesticides in Soil, **Journal of Agricultural and Food Chemistry,** v. 55, 4487-4492, 2007.

KIENHUIS, P. G. M.; GEERDINK, R. B. Liquid chromatography-tandem mass spectrometric analysis of surface and waste water with atmospheric pressure chemical ionisation: II. Applications. **Trends in Analytical Chemistry,** v. 19, p. 460–474, 2000.

KRAUSE, G., **Política Nacional de Recursos Hídricos: Brasil em Ação**, Secretaria de Recursos Hídricos, Ministério do Meio Ambiente, 1997, p. 1

KURZ, M. H. S, **Estudo de métodos empregando extração em fase sólida e análise por HPLC-DAD e GC-ECD para determinaçãod eresíduos de pesticidas em águas e degradação a campo**. 2007. 161 p. Tese (Doutorado em Química) - UFSM, Santa Maria, RS.

KUSTER, M., *et al.* Analysis of in water by liquid chromatography-tandem mass spectrometric techniques, **Mass Specrtometry Reviews**; v. 25, p. 900-916, 2006.

LAGANA, A., et. al. Occurrence and determination of herbicides and their major transformation products in environmental waters. **Analytica Chimica Acta,** v. 462, p. 187– 198, 2002.

LAGANA, A. *et al.* Simultaneous Determination of Imidazolinone Herbicides from Soil and Natural Waters Using Soil Column Extraction and Off-Line Solid-Phase Extraction Followed by Liquid Chromatography with UV Detection or Liquid Chromatography/ Electrospray Mass Spectroscopy. **Analytical Chemistry,** v. 70, p. 121-130, 1998.

LANÇAS, F. M. **Validação de Métodos Cromatográficos de Análise**. São Carlos: RiMa, 2004, 62p.

LISKA, I. Fifty years of solid-phase extraction in water analysis – historical development and overview. **Journal of Chromatography A**, v. 885, p. 3-16, 2000.

LISKA, I.; SLOBODNÍK, J. Comparison of gas and liquid chromatography for analyzing polar pesticides in water samples. **Journal of Chromatography A,** v. 733, p. 235-258, 1996.

MACHADO, S. L. O. **Sistemas de Implantação da Lavoura de Arroz Irrigado, Consumo de Água, Perdas de Nutrientes na Água de Drenagem, Persistência de Herbicidas na Água e Efeito no Jundiá**. 2003. 160f. Tese (Doutorado em Agronomia) - UFSM, Santa Maria, RS.

MAIZELS, M.; BUDDE, W. L. Exact mass measurements for confirmation of pesticides and herbicides determined by liquid chromatography/timeof- flight mass spectrometry. **Analytical Chemistry**, v. 73, p. 5436–5440, 2001.

MAJORS, R. E. A review of EPA sample preparation techniques for organic compound analysis of liquid and solid samples. In: LCGC. Estados Unidos, 2001a. Disponível em: <http://www.chromatographyonline.com>. Acesso em 12 set 2007.

MAJORS, R. E. New designs and formats in solid-phase extraction sample preparation. In: LCGC. Europa, 2001b. Disponível em: <http://www.lcgceurope.com>. Acesso em 12 ago 2006

MARCH, R. E. Quadrupole ion trap mass spectrometry: a view at the turn of the century. **International Journal of Mass Spectrometry**, v. 200, p. 285–312, 2000.

MARCHEZAN, E. *et al.* Consumo de água e perdas de nutrientese e de sedimentos na água de drenagem inicial do arroz irrigado. **Ciência Rural**, v. 36, p. 65-71, 2006.

MATTOS, L.M., SILVA, E.F. Influência das propriedades de solos e de pesticidas no potencial de contaminação de solos e águas subterrâneas. Pesticidas: **Revista de Ecotoxicologia e Meio Ambiente**, Curitiba, v.9, p.102-124, 1999

MISTURA, C. M., **Validação de metodologia para determinação de resíduos de pesticidas organoclorados em sedimentos do lago da barragem Capingui, RS empregando GC-ECD e GC-MS**. 2003. 208f. Dissertação (Mestrado em Química) – UFSM, Santa Maria, RS.

MOYE, H. A., **Analysis of Pesticides Residues**, Flórida, Publishing Company, p. 157, 1990

MULLER, K, *et al.* A critical review of the influence of effluent irrigation on the fate of pesticides in soil. **Agriculture, Ecosystems and Environment,** v.120, p.93–116, 2007.

NOVAKOVA, O. Determination of imazethapyr and imazapyr residues in soil by coupled-column liquid-chromatography. **Chromatographia,** v.39, p. 62-66,1994.

NPIC, NATIONAL PESTICIDE INFORMATION. **OSU Extension Pesticide Properties Database**. Disponível em: http://npic.orst.edu/ppdmove.htm. Acesso em 01 nov 2007.

OLIVEIRA, C. F. **Censo da lavoura de arroz irrigado do Rio Grande do Sul – safra 2004/5**. Porto Alegre: IRGA - Política Setorial, 2006. 122 p. Disponível em: <http://www.irga.rs.gov.br>. Acesso em 16 jan 2007.

PALMA, G. *et al.* Pesticide levels in surface waters in an agricultural-forestry basin in Southern Chile. **Chemosphere,** v. 57, p. 763-770, 2004.

PASQUALETTO, A.; *et al.* Lixiviação de imazetapir e imazamox em diferentes solos. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, v. 29, p. 29-34, 1999.

PEÑUELA, G. A.; BARCELÓ, D. Photodegradation and stability of chlorothalonil in water studied by solid-phase disk extraction, followed by gas chromatographic techniques. **Journal of Chromatography A**, v. 823, p. 81-90, 1998.

PERREAU, F. *et al.* Trace analysis of sulfonylurea and their metabolites in water using a combination of off-line or on-line solid-phase extraction and liquid chromatography-tandem mass spectrometry, **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 388, p. 1265-1273, 2007.

PICÓ, Y., *et al.* Current trends in solid-phase-based extraction techniques for the determination of pesticides in food and environment. **Journal of Biochemical and Biophysical Methods,** v. 70, p. 117–131, 2007.

PIMENTEL, M. F.; NETO, B. D., Calibration: A review for analytical chemists. **Química Nova***,* v. 19, p. 268-277, 1996.

PIZZUTTI, I. R. **Validação de Métodos Multirresíduos 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**. 2006. 297p Tese (Doutorado em Química) - UFSM, Santa Maria, RS.

PLANAS, C. *et al.* Analysis of pesticides and metabolites in Spanish surface waters by isotope dilution gas chromatography/mass spectrometry with previous automated solid-phase extraction. Estimation of the uncertainty of the analytical results, **Journal of chromatography A**, v. 1131, p. 242-252, 2006.

PRIMEL, E. G. **Aplicação da Extração em Fase Sólida e técnicas cromatográficas para a determinação de herbicidas em águas de superfície e acompanhamento da degradação a campo e no laboratório**. 2003. 170 p. Tese (Doutorado em Química) - UFSM, Santa Maria, RS.

PRIMEL, E. G. *et al.* Poluição das águas por herbicidas utilizados no cultivo do arroz irrigado na região central do estado do Rio Grande do Sul, Brasil: Predição Teórica e monitoramento. **Química Nova**, v. 28, p. 605-609, 2005

QUYEN P.B., *et al.* Environmental pollution in Vietnam – Analytical estimation and environmental priorities. **Trends in Analytical Chemistry,** v. 14, p. 383-388, 1995.

RAWN, D. F. K., *et al.* Historical contamination of Yukon Lake sediments by PCBs and organochlorine pesticides: influence of local sources and watershed characteristics. **The Science of the Total Environment**, v. 280, p. 17-37, 2001

REBOUÇAS, A., *et al.* **Águas Doces no Brasil** – Capital Ecológico Uso e Conservação, São Paulo, Escritura Editora e Distribuidora de Livros, 2002.

REEMTSMA, T. Liquid chromatography-mass spectrometry and strategies for trace-level analysis of polar organic pollutants. **Journal of chromatography A**, v. 1000, p. 477–501, 2003.

RESENDE, M. *et al.* **PEDOLOGIA: BASE PARA DISTINÇÃO DE AMBIENTES**. Viçosa, UFV, 2002, 338 p.

RIBANI, M. *et al.* Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Química Nova,** v. 27, p. 771-780, 2004.

RIBANI, M., *et al.* Validation of chromatographic methods: Evaluation of detection and quantification limits in the determination of impurities in omeprazole, **Journal of Chromatography A**, v. 1156, p. 201–205, 2007.

RICHARDSON, S. D. Environmental Mass Spectrometry: Emerging Contaminants and Current Issues, **Analytical Chemistry,** v. 78, p. 4021-4045, 2006.

ROCHA, J. C.; *et al.* **Introdução à Química Ambiental.** Porto Alegre: Bookman, 2004, p. 44-47.

RODRIGUES, B. N.; ALMEIDA, F. S. de. **Guia de Herbicidas**. 4. ed. Londrina: IAPAR, 1998. 648 p.

RODRIGUEZ, M.; ORESCAN, D. B. Confirmation and quantitation of selected sulfonylurea, imidazolinone, and sulfonamide herbicides in surface water using *electrospray* LC/MS. **Analytical Chemistry,** v. 70, p. 2710-2717, 1998.

SÁNCHEZ-MARTÍN, M. J. *et al.* Determination of linuron in aqueous soil extracts by high-performance liquid chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 754, p. 295-299, 1996.

SANCHO, J. V., *et al.* Liquid chromatography and tandem mass spectrometry: A powerful approach for the sensitive and rapid multiclass determination of pesticides and transformation products in water. **Analyst** 129:38–44, 2004.

SANCO, COMISSION OF THE EUROPEAN COMMUNITIES (2003). **Document nº SANCO/2007/3131. Method validation and quality control procedures for pesticide residues analysis in food and feed**. 3ª ed., Bruxelas, Bélgica. 31/10/2007.

SANTOS, F.M. **Alternativas de controle quimico do arroz-vermelho e persistência dos herbicidas (Imazetapir + Imazapique) e clomazona na água e no solo**. 2006, 62 p. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - UFSM, Santa Maria, RS

SANTOS, T. C. R.; *et al.* Determination of rice herbicides, their transformation products and clofibric acid using on-line solid-phase extraction followed by liquid chromatography with diode array and atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometric detection. **Journal of Chromatography A,** v. 879, p. 3-12, 2000.

SCHUETTE, S. A.; *et al.*; Solid-phase extraction of herbicides from well water for determination by gas-chromatography mass-spectrometry. **Analytica Chimica Acta**, v. 236, p. 141, 1990;

SHABIR, G. A. Validation of high-performance liquid chromatography methods for pharmaceutical analysis. Understanding the differences and similarities between validation requirements of the US Food and Drug Administration, the US Pharmacopeia and the International Conference on Harmonization. **Journal of Chromatography A**, v. 987, p.57-66, 2003.

SHIVRAIN, V. K., *et al.* Gene flow between Clearfield^{TM} rice and red rice. **Crop Protection,** v.26, p. 349–356, 2007

SHORT, P.; COLBORN, T. Pesticide use in the U.S. and policy implications: A focus on herbicides. **Toxicology and Industrial Health,** v. 15, p. 240-275, 1999.

SIBCS; Sistema Brasileiro de Classificação de Solos. EMBRAPA. Disponível em http://www.cnps.embrapa.br/sibcs/. Acesso em 10 set 2007

SILVA, F.C. **Manual de análises químicas de solos, plantas e fertilizantes**; EMBRAPA, Brasília, 1999, 370 p.

SIMPSON, N. J. K.; WELLS, M. J. M. Introduction to solid-phase extraction. In: SIMPSON, N. J. K. (Ed.) **Solid-phase extraction: principles, techniques and applications**. New York: Marcel Dekker, Inc., 2000. p. 1-17.

SINDAG; SINDICATO NACIONAL DA INDUSTRIA DE PRODUTOS PARA DEFESA AGRÍCOLA Vendas – Culturas – 2004 – US$. Disponível em: <http://www.sindag.com.br/dados_mercado.php> Acesso em 16 jan 2007.

SKOOG, D. A.; LEARY, J. J. **Principles of Instrumental Analysis**. 4.ed. Orlando: Saunders College Publishing, 1992. p. 423.

SOLER, C., *et al.* Capabilities of different liquid chromatography tandem mass spectrometry systems in determining pesticide residues in food Application to estimate their daily intake. **Journal of Chromatography A**, v. 1157, p. 73–84, 2007.

SOSBAI; SOCIEDADE SUL-BRASILEIRA DE ARROZ IRRIGADO; **Arroz irrigado: Recomendações técnicas da pesquisa para o sul do Brasil**. Balneário Camboriú: Elf Editora e Indústria Gráfica Ltda. 2003, 126 p.

SPADOTTO, C. A. *et al.* **Monitoramento do risco ambiental de agrotóxicos: princípios e recomendações**. 1ª ed. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente. 2004, 29 p. disponível em: <http://www.cnpma.embrapa.br>. Acesso em 22 ago 2007.

SPADOTTO, C.A. Comportamento e Destino Ambiental de Herbicidas. Comitê de Meio Ambiente, Sociedade Brasileira da Ciência das Plantas Daninhas. 2002

STEINHEIMER, T. R.; SCOGGIN, K. D. Estimation of imazethapyr in agricultural water by its cross-reactivity with either imazaquin or imazapyr ELISA kits. **Journal of Agricultural and Food Chemistry,** v. 46, p. 1883-1886, 1998.

STOUT, S. J., *et al.* Simplified determination of imidazolinone herbicides in soil at parts-per-billion level by liquid chromatography *electrospray* ionization tandem mass spectrometry. **Journal of AOAC International,** v. 80, p. 426-432, 1997.

SUN, L, LEE, H. K. Stability studies of propoxur herbicide in environmental water samples by liquid chromatography-atmospheric pressure chemical ionization ion-trap mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1014, p. 153–163, 2003.

SUTHERLAND, D. J., *et al.* Development of an analytical scheme for simazine and 2,4-D in soil and water runoff from ornamental plant nursery plots. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 51, p.14-20, 2003

TATE, C. M., HEINY, J. S., Organochlorine compounds in bed sediment and fish tissue in the South Platte River Basin, USA, 1992-1993. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v.30, p. 62-78, 1996.

THURMAN, E. M., *et al.* Choosing between atmospheric pressure chemical ionization and *electrospray* ionization interfaces for the HPLC/MS analysis of pesticides. **Analytical Chemistry**, v. 73, p. 5441–5449, 2001.

TOMLIN, C. D. S. **The e-Pesticide Manual**, **Thirtheen Edition, Version 3.0**. Londres, 2003. CD-ROM.

TRAN, A. T.K., *et al.* Determination of commonly used polar herbicides in agricultural drainage waters in Australia by HPLC. **Chemosphere,** v. 67, p. 944–953, 2007

TRAUBEBERHARD, U., *et al.* Influence of different field sites on pesticides movement into subsurface drains. **Pesticide Science,** v. 43 , p. 121-129, 1995.

USDA; UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURAL; **Environmental Indicators of Pesticides Leaching and Runoff from Farm Fields; National Resources Conservation Service – NRCS, 2000**. 15p. Disponível em: <http//:www.nrcs.usda.gov/technical/land/pubs/eip_pap.html> Acessado em 28 mar de 2007.

VEGA, A. B., *et al.* Monitoring of pesticides in agricultural water and soil samples from Andalusia by liquid chromatography coupled to mass spectrometry. **Analytica Chimica Acta,** v. 538; p. 117–127; 2005.

VENCILL, W. K. **Herbicide Handbook.** Lawrence: Weed Science Society of America, 8 ed. 2002.

VIEIRA, N. R. A.; CARVALHO, J. L. V. Qualidade Tecnológica do Arroz; In: VIEIRA, N. R. A.; SANTOS, A. B.; SANT'ANA, E. P.; **A cultura de Arroz no Brasil**. Embrapa Arroz e Feijão: Goiás, 1999, 633 p.

VIGNA, C. R. M. *et al.* Poly(methyloctylsiloxane) immobilized on silica as a sorbent for solid-phase extraction of some pesticides. **Journal of Chromatography A,** v. 1114, p. 211-215, 2006.

WARE, G. W. **The Pesticide Book.** Fresno: Thomson Publications, 4 ed. 1994. p. 3-12.

WELLS, M. J. M. Handling large volume samples: applications of SPE to environmental matrices. In: SIMPSON, N. J. K. (Ed.) **Solid-phase extraction: principles, techniques and applications**. New York: Marcel Dekker, Inc., 2000b. p. 97-123.

WELLS, M. J. M.; YU, L. Z. Solid-phase extraction of acidic herbicides. **Journal of Chromatography A**, v. 885, p. 237-250, 2000a.

WRI. World Resources Institute, World Resources, 1998/1999, Oxford University Press, UK., 114 p., 1998. Disponível em: http://www.wri.org/pubs/pubs_description.cfm?pid=2889. Acesso em 31 out 2007.

ZAFFARONI, E.; TAVARES, V. E. **O licenciamento ambiental dos produtores de arroz irrigado no Rio Grande do Sul, Brasil**. Disponível em: < http://www.iica.org.uy/p2-8.htm>. Acesso em 24 out 2006.

ZANELLA, R.; et. al. Development and validation of a high-performance liquid chromatographic method for the determination of clomazone residues in surface water. **Journal of Chromatography A**, v. 904, p. 257–262, 2000.

ZAUGG, S. D. *et al.* **Methods of analysis by the U. S. Geological Survey National Water Quality Laboratory – Determination of Pesticides in Water by C-18 Solid-Phase Extraction and Capillary-Column Gas Chromatography/Mass Spectrometry with Selected-Ion Monitoring**. U.S. Geological Survey Open File Report 95-181; U.S. Geological Survey: Reston, VA, 1995.

ZHU, H. X.; SELIM, H. M. Hysteretic behavior of metolachlor adsorption-desorption in soils. **Soil Science**, v. 165, p. 632-645, 2000.

ANEXOS

ANEXO A– Herbicidas aplicados nos experimentos realizados para o estudo

Tabela 1 - Pesticidas aplicados nos experimentos realizados na safra 2004-2005 [SANTOS, 2006]

Herbicidas aplicados	Marca comercial	Concentração	Formulação comercial	Doses ha^{-1} g (i.a.)	Doses ha^{-1} PC (kg ou L)	Concentração teórica na água (µg L^{-1})
Clomazona	Gamit®	500 g L^{-1}	CE	1500*	3,0*	**1500**
Imazapique	Only®	75gL^{-1} + 25 g L^{-1}	SL	120	1,00	**75 e 25**
Imazetapir	Only®	75g L^{-1} + 25 g L^{-1}	SL	60	1,00	**75 e 25**

*triplo da dose recomendada
i.a. = ingrediente ativo; CE = Concentrado Emulsionável; SC = suspensão concentrada; SL = Solução Líquida; PC= Produto Comercial

Tabela 2 - Pesticidas aplicados nos experimentos realizados na safra 2005-2006

Herbicidas aplicados	Marca Comercial	Concentração	Formulação comercial	Doses ha^{-1} g (i.a.)	Doses ha^{-1} PC (kg ou L)	Concentração teórica na água (µg L^{-1})
Clomazona	Gamit CE®	500 g L^{-1}	CE	500	1,0	**500**
Clomazona	Gamit CE®	500 g L^{-1}	CE	500*	1,0*	**1000**
Imazetapir+imazapique	Only®	75 g L^{-1} + 25 g L^{-1}	SL	75+25	1,00	**75 e 25**
Imazetapir+imazapique	Only®	75 g L^{-1} + 25 g L^{-1}	SL	150+50*	2,00*	**150 e 50**
Imazetapir	Vezir®	100g eqa	SA	100	1,00	**100**
Imazetapir	Vezir®	100g eqa	SA	200*	2,00*	**200**

*dobro da dose
eqa = equivalente ácido; i.a. = ingrediente ativo; SA = solução aquosa concentrada; SL = Solução Líquida; CE = Concentrado Emulsionável; PC= Produto Comercial

Tabela 3 - Pesticidas aplicados nos experimentos realizados na safra 2006-2007

Herbicidas aplicados	Marca Comercial	Concentração ($g\ L^{-1}$ ou $g\ kg^{-1}$)	Formulação comercial	Doses ha^{-1}		Concentração teórica na água ($\mu g\ L^{-1}$)
				g (i.a.)	PC (kg ou L)	
Clomazona	Gamit CE®	500 $g\ L^{-1}$	CE	500	1,0	**500**
Imazetapir+imazapique	Only®	75 $g\ L^{-1}$ + 25 $g\ L^{-1}$	SL	75+25	1,0	**75 e 25**
Imazapique	Plateau®	700 $g\ kg^{-1}$	WG	**17,5**	0,25	**17,5**
Imazetapir	Vezir®	106 $g\ L^{-1}$	CS	75	0,75	**75**

eqa = equivalente ácido; i.a. = ingrediente ativo; SL = Solução Líquida; CE = Concentrado Emulsionável; WG= Pó Molhável; CS= Concentrado Solúvel; PC= Produto Comercial

ANEXO B – Dados climáticos referentes ao período de cultivo de arroz irrigado, nos anos de estudo

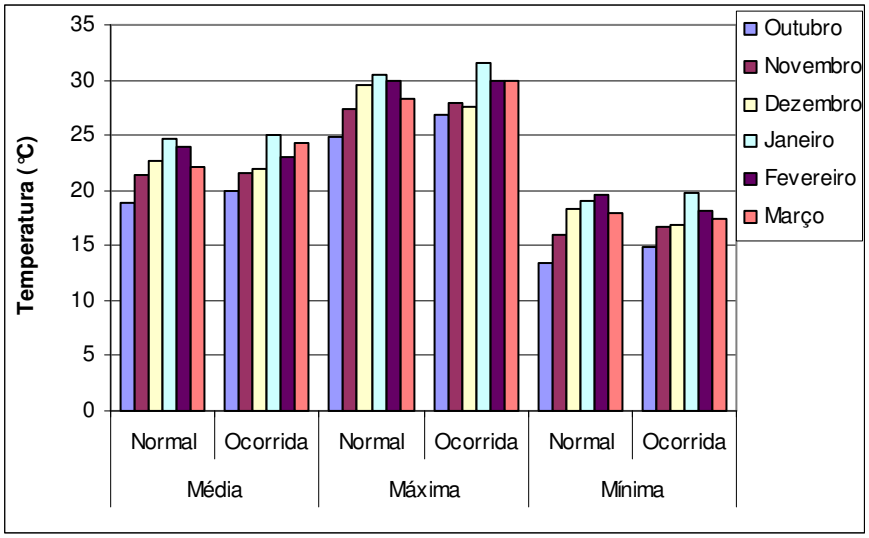


Figura 1 - Temperaturas normais da região (média, máxima e mínima), de outubro de 2004 a março de 2005

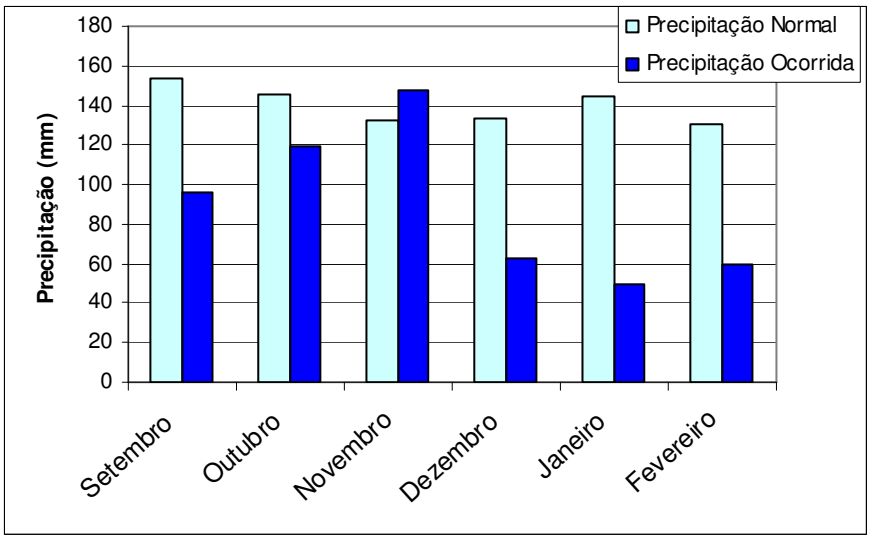


Figura 2 - Precipitação (mm) normal e ocorrida de setembro de 2004 a fevereiro de 2005

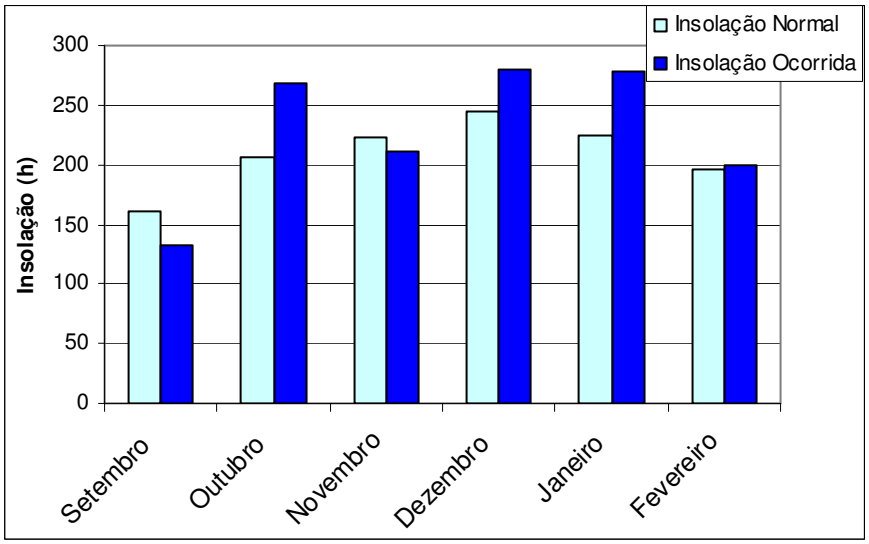


Figura 3 - Insolação (h) normal e ocorrida de setembro de 2004 a fevereiro de 2005

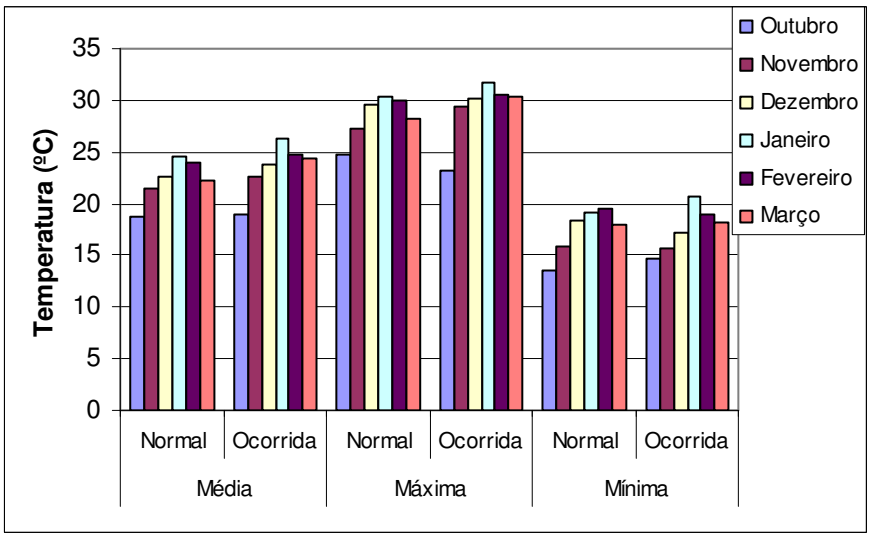


Figura 4 - Temperaturas normais da região (média, máxima e mínima), de outubro de 2005 a março de 2006

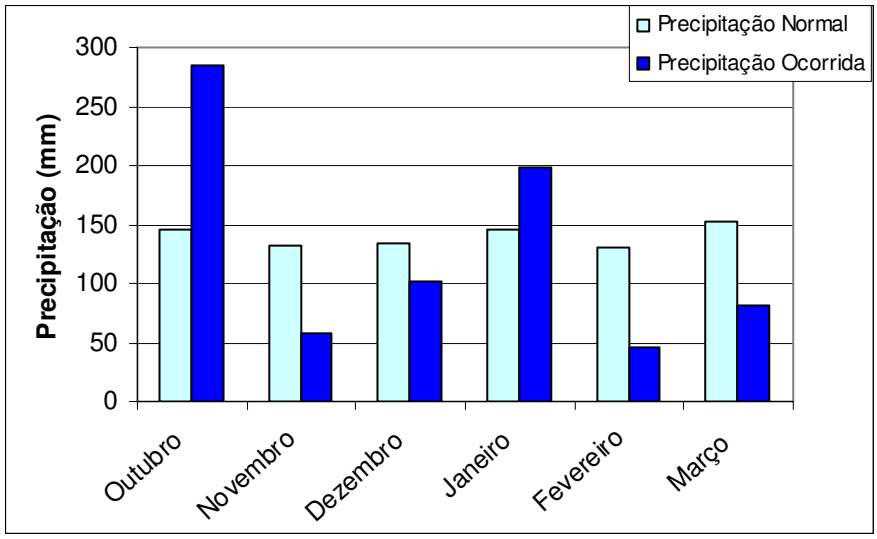


Figura 5 - Precipitação (mm) normal e ocorrida de outubro de 2005 a março de 2006

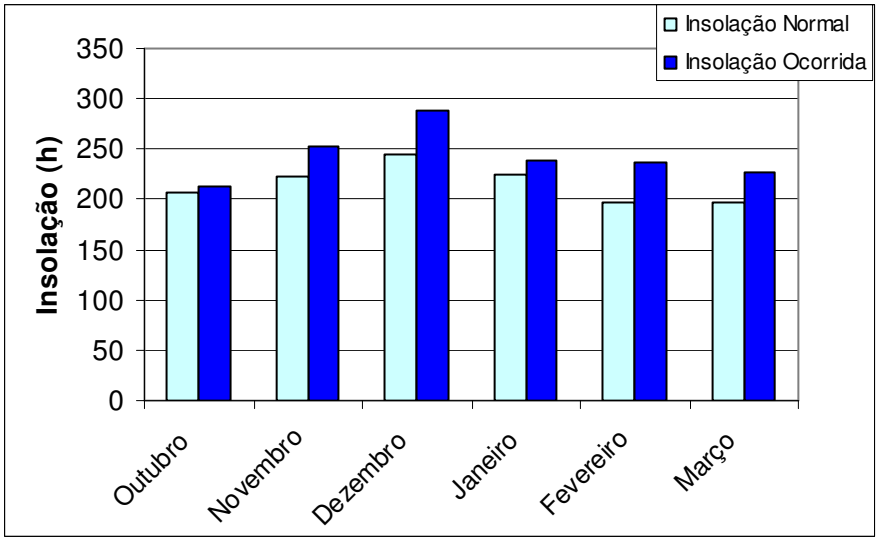


Figura 6 - Insolação (h) normal e ocorrida de outubro de 2005 a março de 2006

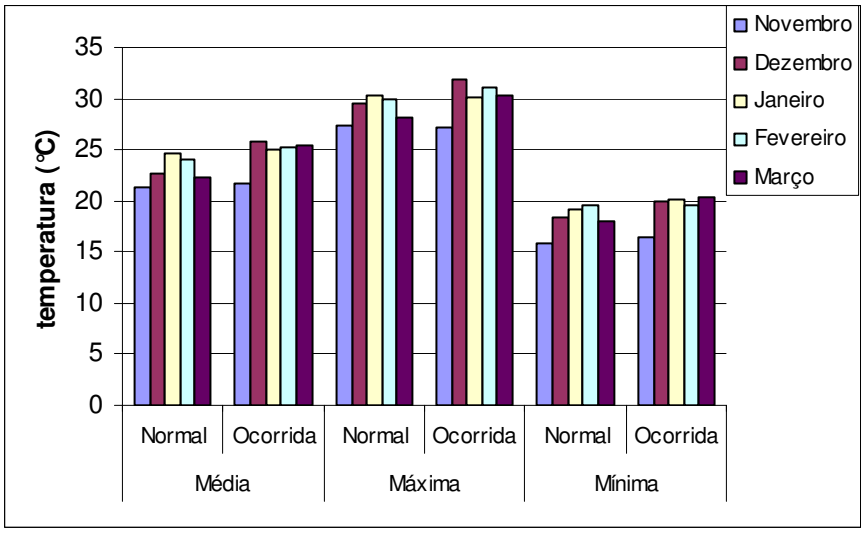


Figura 7 - Temperaturas normais da região (média, máxima e mínima), de novembro de 2006 a março de 2007

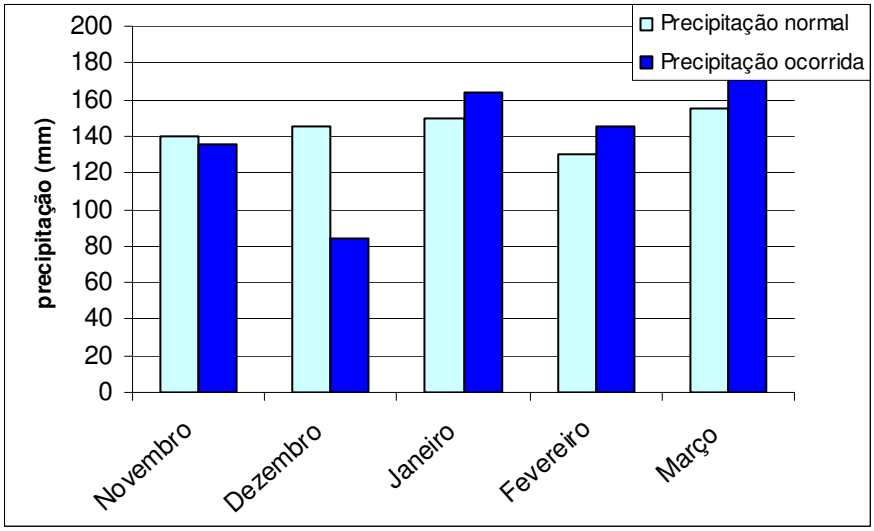


Figura 8 - Precipitação (mm) normal e ocorrida de novembro de 2006 a março de 2007

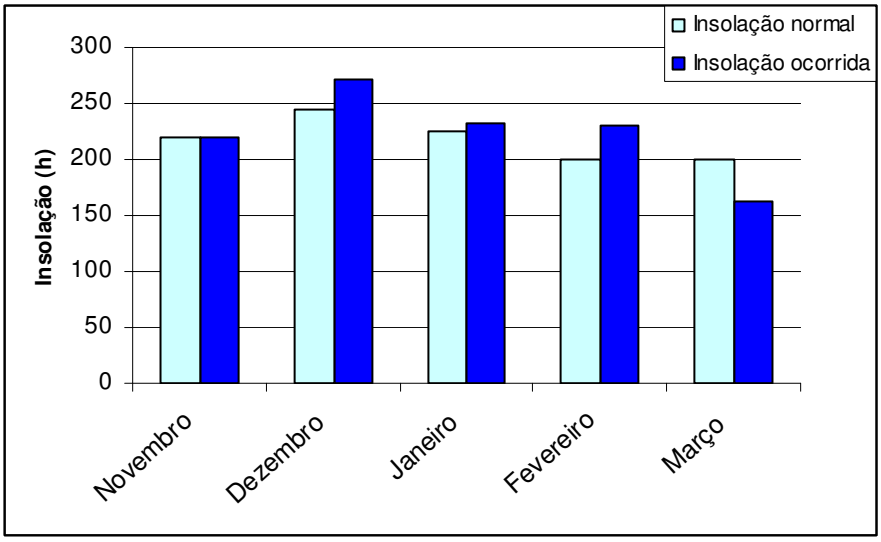


Figura 9 - Insolação (h) normal e ocorrida de novembro de 2006 a março de 2007

PRODUÇÃO CIENTÍFICA REFERENTE AO PRESENTE TRABALHO

GONÇALVES, F. F., ADAIME, Martha Bohrer, KURZ, Márcia Helena Scherer, ZANELLA, Renato, PIZZOLATO, T. M. Avaliação da eficiência de novos materiais para a extração em fase sólida de herbicidas presentes em amostras de água In: 14º Encontro de Química Analítica - ENQA, 2007, João Pessoa. **14º Encontro de Química Analítica - ENQA**. , 2007.

GONÇALVES, F. F., FRIGGI, Caroline do Amaral, KURZ, Márcia Helena Scherer, DEMOLINER, Adriana, PRIMEL, Ednei Gilberto, ZANELLA, Renato. Desenvolvimento de método para determinação de herbicidas em amostras de solo utilizando LC-MS/MS In: Sociedade Brasileira de Espectrometria de Massas – 2 º BrMASS, 2007, Campinas. **Sociedade Brasileira de Espectrometria de Massas**. , 2007.

GONÇALVES, F. F.; KURZ, Marcia Helena Scherer, AVILA, Luis Antonio de, MARCHESAN, E., MACHADO, Sergio Luis de Oliveira, MACEDO, Vera Regina Mussoi, GARCIA, Gabriel Adolfo, ZANELLA, Renato, SARTORI, Gérson Meneghetti Sarzi, ROSSATO, Tiago Luis. Monitoramento de herbicidas e inseticidas em dois rios da depressão central do RS, durante o cultivo do arroz irrigado In: V Congresso Brasileiro do Arroz Irrigado; XXVII Reunião da Cultura do Arroz Irrigado, 2007, Pelotas. **V Congresso Brasileiro do Arroz Irrigado; XXVII Reunião da Cultura do Arroz Irrigado**. , 2007. v.2. p.428 - 430

GONÇALVES, F. F.; MACHADO, Sergio Luis de Oliveira, MARCHESAN, E., KURZ, Márcia Helena Scherer, ZANELLA, Renato, REIMCHE, Geovane Boschmann, AVILA, Luis Antonio de, PRIMEL, Ednei Gilberto. Persistência de herbicidas na água de irrigação na cultura do arroz irrigado In: V Congresso de Arroz Irrigado - XXVII Reunião da Cultura do Arroz Irrigado, 2007, Pelotas. **SOSBAI, 2007**. , 2007. v.2. p.423 - 424