

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

Bárbara Diana Jänisch

**DETERMINAÇÃO MULTICLASSE DE AGROTÓXICOS EM CAMAS
BIOLÓGICAS EMPREGANDO CROMATOGRAFIA LÍQUIDA
ACOPLADA A ESPECTROMETRIA DE MASSAS**

Santa Maria, RS
2022

Bárbara Diana Jänisch

**DETERMINAÇÃO MULTICLASSE DE AGROTÓXICOS EM CAMAS
BIOLÓGICAS EMPREGANDO CROMATOGRAFIA LÍQUIDA ACOPLADA A
ESPECTROMETRIA DE MASSAS**

Dissertação apresentada ao Programa
de Pós Graduação em Química, da
Universidade Federal de Santa Maria,
com requisito parcial para obtenção do
título de Mestra em Química

Orientadora: Prof^a Dr^a Ionara Regina Pizzutti

Santa Maria, RS
2022

Jänisch, Bárbara Diana
DETERMINAÇÃO MULTICLASSE DE AGROTÓXICOS EM CAMAS
BIOLÓGICAS EMPREGANDO CROMATOGRÁFIA LÍQUIDA ACOPLADA A
ESPECTROMETRIA DE MASSAS / Bárbara Diana Jänisch.- 2022.
98 p.; 30 cm

Orientadora: Ionara Regina Pizzutti
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa
Maria, Centro de Ciências Naturais e Exatas, Programa de
Pós-Graduação em Química, RS, 2022

1. Camas biológicas 2. Agrotóxicos 3. Cromatografia
líquida 4. Espectrometria de massas 5. Herbicidas I.
Pizzutti, Ionara Regina II. Título.

sistema de geração automática de ficha catalográfica da usm. dados fornecidos pelo
autor(a). sob supervisão da direção da divisão de processos técnicos da biblioteca
central. biblioteca responsável saula schoenfeldt ratta cma 10/1728.

Declaro, BÁRBARA DIANA JÄNISCH, para os devidos fins e sob as penas da
lei, que a pesquisa constante neste trabalho de conclusão de curso
(Dissertação) foi por mim elaborada e que as informações necessárias
objeto de consulta em literatura e outras fontes estão devidamente
referenciadas. Declaro, ainda, que este trabalho ou parte dele não foi
apresentado anteriormente para obtenção de qualquer outro grau
acadêmico, estando ciente de que a inveracidade da presente declaração
poderá resultar na anulação da titulação pela Universidade, entre outras
consequências legais.

Bárbara Diana Jänisch

**DETERMINAÇÃO MULTICLASSE DE AGROTÓXICOS EM CAMAS
BIOLÓGICAS EMPREGANDO CROMATOGRAFIA LÍQUIDA ACOPLADA A
ESPECTROMETRIA DE MASSAS**

Dissertação apresentada ao Programa
de Pós Graduação em Química, da
Universidade Federal de Santa Maria,
com requisito parcial para obtenção do
título de Mestra em Química

Aprovado em 14 de fevereiro de 2022.

Ionara Regina Pizzutti, Prof^a Dr^a, UFSM
(Presidente/Orientadora)

Simone NoreMBERG Kunz, Dr^a, UFSM

Luciano Gebler, Dr., CNPUV

Santa Maria, RS
2022

AGRADECIMENTOS

Agradeço aos meus pais, Sulani e Francisco, minha irmã Djeimi por todo apoio, incentivo e conselhos sempre e que apesar da distância estavam sempre presentes. Aos meus sobrinhos Bernardo e Catarina pelas doses de alegria.

Agradeço a todos os amigos que estiveram presentes durante esses anos com quem pude dividir vários momentos que serão sempre lembrados.

Agradeço a minha orientadora Prof^a Dr^a Ionara, por ter confiado a mim este trabalho, por todas as oportunidades e ensinamentos durante todos estes anos junto ao CEPARC.

Agradeço ao Marlos por todos os ensinamentos e ajuda desde a execução deste trabalho, que no começo parecia que não sairia do lugar, mas no final deu tudo certo, e em todos os momentos do convívio.

Agradeço a todos os amigos e colegas de laboratório, Priscila, Lisandra, Júlia, Robson, Paola e Naiara por toda a ajuda, desde a pesagem dos sais, extração, etc, até aos momentos de descontração que deixavam o trabalho mais leve e alegre. A Prof^a Dr^a Carmem por demonstrar a importância de um sistema de gestão da qualidade e a Prof^a Dr^a Simone pelas sugestões no trabalho durante os seminários em grupo.

Agradeço ao Prof. Dr. Luciano, pela parceria no desenvolvimento do trabalho, desde o preparo, coleta e envio das amostras, e por acreditar e apostar nesta tecnologia no Brasil.

Agradeço a banca avaliadora do exame de qualificação, Dr^a Rosselei e Dr. Luciano por todas as sugestões e dicas no desenvolvimento deste trabalho.

Agradeço a companhia Agilent pela oportunidade de trabalhar com o Agilent 1260 Infinity II Prime – TQ Ultivo, no desenvolvimento deste projeto.

Enfim, agradeço a todos que fizeram com que este trabalho fosse possível, muito obrigada.

RESUMO

Determinação multiclasse de agrotóxicos em camas biológicas empregando cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas

AUTORA: Bárbara Diana Jänisch

ORIENTADORA: Prof^a Dr^a Ionara Regina Pizzutti

Os agrotóxicos são mundialmente empregados na produção agrícola de diferentes culturas a fim de evitar perdas na produção devido ao ataque de pragas e doenças. Devido ao aumento na produção de alimentos e, conseqüentemente o uso de agrotóxicos, cresce a preocupação com a destinação correta de seus resíduos. Assim, a partir de 1990 começaram a ser desenvolvidas camas biológicas a fim de reduzir a contaminação por derramamentos acidentais durante o preparo da calda e na lavagem de pulverizadores. A biomistura, composta por solo, palha e turfa, que compõe as camas biológicas é a principal responsável por reter e biodegradar os agrotóxicos. Dentre as diferentes classes de agrotóxicos existentes, os herbicidas representam um grande percentual (59,56%) dos princípios ativos mais vendidos no Brasil. Portanto, o principal objetivo deste estudo foi desenvolver e validar dois métodos de extração para determinação de agrotóxicos. Um método multiclasse, composto por cinco classes distintas de herbicidas, além de uma classe de inseticida e um método individual, para os herbicidas da classe das imidazolinonas, na biomistura que compõe as camas biológicas e sua determinação empregando HPLC-MS/MS. Também objetivou-se avaliar a eficiência das camas biológicas através da contaminação de reatores, com os princípios ativos em estudo e verificar sua degradação ao longo do tempo com coletas e posterior análise. No estudo de validação, foram avaliados os critérios de linearidade, faixa linear, efeito matriz, limite de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ), precisão, precisão intermediária e exatidão. Para os agrotóxicos do método individual, do imazapique e imazetapir, os limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) foram de 12,5 $\mu\text{g kg}^{-1}$ e 20 $\mu\text{g kg}^{-1}$ respectivamente. Já para os agrotóxicos do método multiclasse, composto pelo 2,4-D, acetocloro, atrazina, diuron, dicamba e metidationa, o LD foi de 8 $\mu\text{g kg}^{-1}$ e

LQ de 20 $\mu\text{g kg}^{-1}$. O efeito matriz positivo para o método de extração das imidazolinonas ficou bem evidente através da comparação das curvas analíticas preparadas em solvente orgânico e no extrato branco da matriz, pois além da biomistura ser uma matriz complexa, o procedimento de extração apresenta uma alta variação de pH, o que influencia na coextração de interferentes. A análise de amostras de biomistura de camas biológicas contaminadas demonstrou que a maior parte (2,4-D, atrazina, diuron, metidationa) dos agrotóxicos em estudo foi degradada. A exceção foi para o imazetapir, que não foi biodegradado, possivelmente devido a sua conhecida persistência no ambiente e dependência de condições específicas para estar disponível e poder ser biodegradado. Além disso, o dicamba teve uma menor biodegradação em comparação com os demais agrotóxicos, fato que pode estar associado com possíveis interações deste com os demais agrotóxicos aplicados nas camas biológicas.

Palavras – chave: Camas biológicas. Agrotóxicos. Cromatografia líquida. Espectrometria de massas. Herbicidas. Imidazolinonas. Multiclasse.

ABSTRACT

Multiclass determination of pesticides in biobeds using liquid chromatography coupled with mass spectrometry

AUTHOR: Bárbara Diana Jänisch

ADVISOR: Prof.^a Dr.^a Ionara Regina Pizzutti

Pesticides are used worldwide in the agricultural production of different crops in order to avoid losses in production due to the attack of pests and diseases. Due to the increase in food production, consequently, the concern about the correct disposal of pesticide residues is growing. Thus, from 1990 onwards, biobeds began to be developed in order to reduce contamination from accidental spills during pesticide formulation dissolution and in the washing of sprayers. The biomix, made up of soil, straw and peat, which makes up the biobeds, is primarily responsible for retaining and biodegrading pesticides. Among those different classes of pesticides, herbicides represent a large percentage (59,56%) of the most sold active ingredients in Brazil. Therefore, the meangoal of this study was to develop and to validate two extraction methods for pesticide determinations. A multiclass method composed of five distinct classes of herbicides, in addition to an insecticide class and an individual method, for the imidazolinone class herbicides, in the biomix that compose biobeds and its determination applying HPLC-MS/MS. To evaluate biobeds efficiency through the contamination of reactors, with those active ingradients under study and verifying their degradation over time with collections and subsequent analysis at different times, was also a goal in this project. To method validation studies, the criterias of linearity, linear range, matrix effect, limit of detection (LD) and limit of quantification (LQ), precision, intermediate precision and accuracy were evaluated. For those pesticides determined via individual method, imazapic and imazethapyr, the detection and quantification limits were $12.5 \mu\text{g kg}^{-1}$ and $20 \mu\text{g kg}^{-1}$ respectively. For all pesticides determined via multiclass method, 2,4-D, acetochlor, atrazine, diuron, dicamba and methidathione, the LOD was $8 \mu\text{g kg}^{-1}$ and LOQ $20 \mu\text{g kg}^{-1}$. The positive matrix effect for the imidazolinone extraction method was very evident by

comparing the analytical curves data, prepared in organic solvent and in blank matrix extract, because the biomix is a very complex matrix and the extraction procedure has a high pH variation, which influences the interferences co-extraction. The analysis of biomix samples from contaminated biobeds showed that most of pesticides (2,4-D, atrazine, diuron, methidathione) under study were degraded. The exception was for imazethapyr, which possibly due to its known persistence in environment and dependence on specific conditions to be available and to be biodegraded, was not degraded. Further more, dicamba presented a lower biodegradation compared to other pesticides, that may be due to interactions with other pesticides discharged in to the biobed.

Keywords: Biobeds. Pesticides. Liquid chromatography. Mass spectrometry. Herbicides. Imidazolinones. Multiclass.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Comparação de com era e como passou a ser a nova classificação dos agrotóxicos.	22
Figura 2 - Estrutura química do ácido diclorofenoxiacético.	25
Figura 3 - Estrutura química do acetocloro.....	26
Figura 4 - Estrutura química da atrazina.	27
Figura 5 - Estrutura química do dicamba.....	28
Figura 6 - Estrutura química do diurom.	29
Figura 7 - Estrutura química do imazapique.....	30
Figura 8 - Estrutura química do imazetapir.....	31
Figura 9 - Estrutura química da metidationa.....	32
Figura 10 - Processos que os agrotóxicos podem sofrer no meio ambiente	35
Figura 11 – Esquema básico de uma cama biológica	36
Figura 12 - Modelo de cama biológica permeável com: a) camada de argila adicionada e b) camada de argila natural.	36
Figura 13 - Modelo de cama biológica impermeável	37
Figura 14 - Imagem do fungo da podridão branca	40
Figura 15 - Representação de uma partícula de fase estacionária do tipo Poreshell	44
Figura 16 - Representação dos parâmetros de uma curva analítica: linearidade, faixa de trabalho, faixa linear de trabalho e sensibilidade.	47
Figura 17 - Equilíbrio iônico do Imazapique	58
Figura 18 - Equilíbrio iônico do Imazetapir	58
Figura 19 - Gráfico das recuperações % obtidos com os diferentes tipos de <i>clean-up</i> utilizados	64
Figura 20 - Fluxograma do procedimento de extração de agrotóxicos do método das Imidazolinonas.....	67
Figura 21 - Fluxograma do procedimento de extração de agrotóxicos do método das Multirresidual.	69
Figura 22 - Comparação entre curvas analíticas obtidas a partir de solução analítica de Imazapique preparadas em solvente (Acetonitrila) e em extrato "branco" da matriz	72

Figura 23 – Desvios (em %) de concentração calculados da curva analítica do herbicida Acetocloro obtida a partir de soluções analíticas preparadas em extrato "branco" da matriz.	77
Figura 24 - Desvios (em %) de concentração calculados da curva analítica do herbicida 2,4 - D obtida a partir de soluções analíticas preparadas em extrato "branco" da matriz	77
Figura 25 - Comparação entre curvas analíticas obtidas a partir de solução analítica de Acetocloro preparadas em solvente orgânico (Acetonitrila) e em extrato "branco" da matriz	79
Figura 26 - Comparação entre curvas analíticas obtidas a partir de solução analítica de 2,4 - D preparadas em solvente orgânico (Acetonitrila) e em extrato "branco" da matriz	79

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Classificação toxicológica levando em consideração a dose letal 50 (LD 50).	23
Tabela 2 - Agrotóxicos estudados com suas respectivas fórmulas moleculares, classes, grupos químicos, fabricantes e pureza dos materiais de referência utilizados.....	52
Tabela 3 - Dados dos agrotóxicos que ionizam no modo positivo referentes a espectrometria de massas – LC-MS/MS	55
Tabela 4 - Dados dos agrotóxicos que ionizam no modo negativo referentes a espectrometria de massas – LC-MS/MS	56
Tabela 5 - Métodos testados para extração dos agrotóxicos em estudo	61
Tabela 6 - Teste imidazolinonas com fortificação 24h antes e no dia da extração.	63
Tabela 7 - Agrotóxicos descartados nas camas biológicas, suas respectivas concentrações dos produtos formulados e o volume utilizado de cada um.	70
Tabela 8 - Parâmetros das curvas analíticas obtidos para os agrotóxicos analisados por HPLC-MS/MS a partir das soluções 2,5; 5; 12,5; 25, 50, 100, 250 $\mu\text{g L}^{-1}$	71
Tabela 9 - Valores médios (n=7) de recuperação e RSD%, nos estudos de fortificação/recuperação em três diferentes níveis de fortificação, sendo 20, 50 e 100 $\mu\text{g kg}^{-1}$	74
Tabela 10 - Valores médios (n=7) de recuperação e RSD%, nos estudos de fortificação/recuperação em três diferentes níveis de fortificação, com dois diferentes analistas, para os níveis de concentração 20, 50 e 100 $\mu\text{g kg}^{-1}$	75
Tabela 11 - Parâmetros das curvas analíticas obtidos para os agrotóxicos analisados por HPLC-MS/MS a partir das soluções 2; 5; 25; 50; 100; 200 e 500 $\mu\text{g L}^{-1}$	76
Tabela 12 - Efeito matriz percentual dos agrotóxicos analisados por HPLC-MS/MS a partir de soluções preparadas em solvente orgânico (Acetonitrila) e em extrato "branco" de matriz.	78

Tabela 13 - Valores médios (n=7) de recuperação e RSD%, nos estudos de fortificação/recuperação em quatro diferentes níveis de fortificação, sendo 20, 50, 100 e 150 $\mu\text{g kg}^{-1}$	81
Tabela 14 - Valores médios (n=7) de recuperação e RSD%, nos estudos de fortificação/recuperação em três diferentes níveis de fortificação, com dois diferentes analistas, para os níveis de concentração 20, 50, 100 e 150 $\mu\text{g kg}^{-1}$	82
Tabela 15 - Resultados da análise das amostras de biomistura coletada em diferentes períodos.....	84

SUMÁRIO

1.INTRODUÇÃO	17
2.REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	20
2.1 AGROTÓXICOS	20
2.1.1 Classificação dos agrotóxicos	21
2.1.1.1 Classificação toxicológica.....	21
2.1.1.2 Classificação quanto ao organismo alvo que controla.....	23
2.2 AGROTÓXICOS EM ESTUDO	24
2.2.1 Ácido diclorofenoxiacético (2,4-D).....	25
2.2.2 Acetocloro.....	26
2.2.3 Atrazina	27
2.2.4 Dicamba	28
2.2.5 Diurom.....	29
2.2.6 Imazapique.....	30
2.2.7 Imazetapir.....	31
2.2.8 Metidationa	32
2.3 AGROTÓXICOS E O PERIGO AMBIENTAL E HUMANO.....	32
2.4 CAMAS BIOLÓGICAS: ALTERNATIVA PARA MINIMIZAR CONTAMINAÇÃO AO MEIO AMBIENTE	35
2.4.1 Elementos que compõem uma cama biológica	38
2.4.2 Biomistura.....	39
2.4.2.1 Alternativas disponíveis a substituição de componentes da biomistura	41
2.5 MÉTODO CROMATOGRÁFICO.....	42
2.5.1 Cromatografia Líquida	42
2.5.2 Espectrometria de massas	44
2.6 VALIDAÇÃO DE MÉTODOS ANALÍTICOS	45
2.6.1 Seletividade	46
2.6.2 Linearidade/Faixa de trabalho/Faixa linear de trabalho/Sensibilidade	46
2.6.3 Limite de detecção e limite de quantificação.....	47
2.6.4 Tendência/Recuperação	48
2.6.5 Precisão	49
2.6.6 Efeito Matriz	49

3.MATERIAIS E MÉTODOS	50
3.1 INSTRUMENTAÇÃO	50
3.2 MATERIAIS	51
3.3 REAGENTES E SOLVENTES	51
3.4 AGROTÓXICOS SELECIONADOS PARA ESTUDO	51
3.5 PREPARO DE SOLUÇÕES ANALÍTICAS	52
3.5.1 Preparo da solução estoque	52
3.5.2 Preparo de soluções analíticas de trabalho	53
3.5.3 Preparo de solução mistura	53
3.6 CONDIÇÕES CROMATOGRÁFICAS	53
3.6.1 Condições cromatográficas para agrotóxicos do modo de ionização positivo	54
3.6.2 Condições cromatográficas para agrotóxicos do modo de ionização negativo	55
3.7 PROCEDIMENTOS DE EXTRAÇÃO	56
3.7.1 Procedimento de extração agrotóxicos da classe das imidazolinonas	57
3.7.2 Procedimento de extração método multirresíduo	64
3.8 VALIDAÇÃO DE MÉTODO INDIVIDUAL – IMIDAZOLINONAS	66
3.8.1 Curva analítica e Linearidade	66
3.8.2 Exatidão	67
3.8.3 Precisão e Precisão Intermediária	68
3.9 VALIDAÇÃO DO MÉTODO MULTIRRESIDUAL	68
3.9.1 Curva analítica e Linearidade	68
3.9.2 Exatidão	68
3.9.3 Precisão e Precisão Intermediária	69
3.10 AMOSTRAS	69
4.RESULTADOS E DISCUSSÃO	70
4.1 VALIDAÇÃO DO MÉTODO INDIVIDUAL – IMIDAZOLINONAS	70
4.1.1 Curva analítica e Linearidade	71
4.1.2 Efeito Matriz	72
4.1.3 Limites de detecção e quantificação	73
4.1.4 Exatidão	73
4.1.5 Precisão e Precisão Intermediária	75

4.2 VALIDAÇÃO MÉTODO MULTIRRESIDUAL.....	76
4.2.1 Curva analítica e Linearidade	76
4.2.2 Efeito Matriz	78
4.2.3 Limite de detecção e quantificação	80
4.2.4 Exatidão	81
4.2.5 Precisão e Precisão Intermediária	82
4.3 ANÁLISE DE AMOSTRAS DE BIOMISTURA	83
5.CONCLUSÃO	88
6.REFERÊNCIAS	90

1. INTRODUÇÃO

Considerando a crescente produção agrícola ao longo dos anos no país e no mundo, há um aumento nos números referentes à produtividade, principalmente das culturas relacionadas a grãos, como soja e milho. Para a safra 2021/2022, a estimativa de produção de grãos no Brasil foi de 288,61 milhões de toneladas, representando um aumento de 14,2 % em comparação com a safra 2020/2021. Desse total, as culturas de milho e principalmente soja, são aquelas que apresentam produções recorde a cada safra, correspondendo a uma grande parcela da produção de grãos, o que contribui para que o Brasil seja considerado o maior produtor mundial de soja (CONAB, 2020 e 2021).

No Brasil geralmente são produzidas duas safras de grãos ao ano, podendo chegar até três no caso do feijão. Isso devido às condições climáticas, que são favoráveis a produção de diferentes culturas durante todas as estações do ano todo, possibilitando grandes produções (CONAB, 2020). A estimativa da área plantada nesta nova safra é de 71,5 milhões de hectares, demonstrando um aumento de 3,6 % em relação à safra anterior (CONAB, 2021).

Em um período menor do que 40 anos o Brasil passou de importador de alimentos para um dos grandes celeiros do mundo (EMBRAPA, 2018). Isto se deve a diversos fatores como as condições climáticas e as novas tecnologias que incluem além de implementos agrícolas, o tratamento e o aumento da qualidade das sementes, o uso de fertilizantes e ainda o extenso território agricultável. Esta combinação de fatores possibilitou essa elevação na produção agrícola brasileira, bem como que esta seja obtida durante o ano todo (ALVES; CONTINI; GASQUES, 2008). Além disso, o uso de agrotóxicos demonstrou grande importância para que, de forma preventiva ou curativa, se evite perdas e redução de produtividade (GASQUES; BACCHI; BASTOS, 2018).

Dentre as diversas classes de agrotóxicos existentes, os herbicidas, classe utilizada no controle de plantas daninhas, representam 59,56% do total de 620.537,98 toneladas de ingredientes ativos vendidos no ano de 2019 (IBAMA, 2020).

Ao serem aplicados no ambiente, os agrotóxicos possuem um comportamento bem complexo o que determina o seu destino final. Como por exemplo, devido a

ventos e chuvas principalmente, estes podem atingir o solo e águas superficiais e subterrâneas. E, ao atingir esses ambientes, as condições como temperatura, umidade, composição do solo, entre outros terão influência no seu comportamento. Desta maneira pode ocorrer a deriva, a lavagem das folhas contendo o agrotóxico aplicado, a lixiviação, a erosão entre outros, sendo que independente do caminho que este percorre sistematicamente o potencial receptor de seus resíduos é o homem (MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE, 2012) (GEBLER; SPADOTTO, 2008).

Visto a necessidade de uma maneira simples e eficaz para reduzir a contaminação ambiental pelo uso de agrotóxicos, principalmente em fontes pontuais, como durante o preparo da calda bem como na limpeza do pulverizador, foi desenvolvido na Suécia, no ano de 1993, o sistema *Biobed* ou camas biológicas. Este consiste de um leito, isolado ou não, contendo uma camada de biomistura de solo, turfa e palha, sendo que estes componentes podem ser substituídos por outros com características semelhantes e disponíveis no local. Nesta biomistura é onde ocorre a biodegradação dos agrotóxicos (CASTILLO; TORSTENSSON; STENSTRÖM, 2008b).

Desde o surgimento até o presente momento este sistema sofreu diversas modificações, porém sem perder o intuito inicial de reter e degradar agrotóxicos. Exemplos disto são os modelos de biofiltros desenvolvido na Bélgica, *Phytobac* e *Biobac* na França entre outros (CASTILLO; TORSTENSSON; STENSTRÖM, 2008a). Na América Latina o sistema está em fase de teste, porém há a necessidade de adaptá-lo, visto que as condições, sejam elas climáticas e/ou econômicas, são diferentes em comparação aos países europeus, onde o sistema se originou e já está implementado. A Guatemala possui o sistema *biobed* como tecnologia oficial, porém países como Brasil, Argentina, Costa Rica entre outros, estão estudando às melhores alternativas para a implantação deste sistema (DIAS et al., 2020).

Para que a eficácia do sistema de camas biológicas seja demonstrada, são necessários métodos analíticos de extração e de determinação de agrotóxicos, precisos e exatos. Os métodos de extração multirresiduais são de difícil desenvolvimento, levando em consideração a necessidade de se obter baixos níveis de detecção, as diferentes características físico-químicas dos analitos, bem como a complexidade das matrizes de camas biológicas (MARTINS et al., 2014). As técnicas cromatográficas geralmente acopladas à espectrometria de massas são as mais

utilizadas para a identificação e quantificação de moléculas de agrotóxicos nestas matrizes (VARELI et al., 2019).

Portanto o objetivo principal deste trabalho foi o desenvolvimento de dois métodos analíticos para determinação de herbicidas em camas biológicas e posteriormente aplicar estes métodos para a avaliação destas na biodegradação dos agrotóxicos estudados.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 AGROTÓXICOS

Agroquímico, pesticida, defensivo agrícola, produto fitossanitário e ainda o termo oficial no Brasil, agrotóxico. Apesar das diferentes designações todos estes se referem a produtos que são amplamente utilizados desde os primórdios, principalmente na agricultura, para o controle de pragas e doenças (REDAÇÃO BOAS, 2019).

Dentre as diversas definições, a legislação brasileira, através da Lei nº 7.802, de 11 de julho de 1989 (BRASIL, 1989), define agrotóxicos e afins como:

”...os produtos e os 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 implantadas, e de outros ecossistemas e também 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...”

Há milhares de anos têm-se registros do uso de substâncias químicas para o controle de pragas e doenças que assolavam as plantações.

O uso do enxofre e arsênio no controle de pragas é descrito desde o século XIV. Além disso, o controle de pragas utilizando substâncias naturais produzida naturalmente por plantas ou animais, começava a ser desenvolvida. Isto incluía ervas, óleos, cinzas entre outros. Um exemplo é o piretro ou pó da Pérsia, que era extraído de flores secas de *Chrysanthemum cinerariaefolium* e *Chrysanthemum coccineum*, planta encontrada na Iugoslávia e no Cáucaso.

No século XVIII, com o desenvolvimento da agricultura e inclusão de novas práticas agrícolas, como utilização de fertilizantes em grande escala e máquinas em todo o processo de produção, houve um agravamento no problema com pragas, sendo que elas foram se tornando cada vez mais resistentes aos agrotóxicos (BRAIBANTE; ZAPPE, 2012).

Surgiram então os primeiros estudos científicos relacionando o uso de substâncias químicas no controle de pragas agrícolas.

A ascensão dos pesticidas orgânicos sintéticos surgiu com o desenvolvimento da uréia a partir do composto inorgânico cianato de amônio, realizada por Friedrich Wöhler, em 1828.

Já durante a segunda guerra mundial, em 1940, os inseticidas orgânicos sintéticos foram amplamente usados para proteger os soldados de pragas transmissoras de doenças, como a malária, o que impulsionou o desenvolvimento de novos pesticidas, sendo muitos, usados até hoje, como é o caso do DDT (1, 1, 1,-tricloro-2,2-di(p-clorofenil) etano (BRAIBANTE; ZAPPE, 2012).

Outro exemplo é o agente Laranja que ficou conhecido durante a guerra do Vietnã em 1959, que consistia em partes iguais de dois herbicidas, o 2,4-D, e o 2,4,5-T, era utilizado como desfolhante aplicado sobre a mata a fim de desfazer o esconderijo dos soldados. Porém, na época não se sabia era que esse composto continha uma dioxina altamente tóxica, a TCDD (2,3,7,8-tetraclorodibenzeno-p-dioxina), que era formada em elevadas concentrações durante a produção do agente laranja. Substância essa que tinha características hidrofóbicas que acabava adsorvida sobre as plantas, entrando na cadeia alimentar e persistindo por longos períodos (CRIADO, 2019).

2.1.1 Classificação dos agrotóxicos

Os agrotóxicos podem ser classificados de diferentes maneiras, levando em conta sua toxicidade, o organismo alvo a ser controlado, a composição química, o modo de entrada no organismo alvo (YADAV; DEVI, 2017).

2.1.1.1 Classificação toxicológica

Levando em conta a classificação toxicológica, recentemente, no ano de 2019, houve uma nova reclassificação dos agrotóxicos. Isto ocorreu devido ao novo marco regulatório do setor que buscou usar novos parâmetros para a classificação

toxicológica dos agrotóxicos, baseando-se em padrões internacionais, visando o fortalecimento da comercialização de produtos no exterior. Estas alterações foram baseadas nos padrões internacionais, conhecido pela sigla GHS (*Globally Harmonized System of Classification and Labeling of Chemicals*) (ANVISA, 2019).

Desta forma, houve uma ampliação quanto às categorias de classificação toxicológica, passando de quatro para cinco, e também houve a inclusão do item “não classificado”, que inclui nesta categoria produtos com baixíssimo potencial de causar dano ao ser humano, como produtos de origem biológica (ANVISA, 2019).

A figura 1 demonstra uma comparação desta nova classificação com a anterior.

Figura 1 - Comparação de como era e como passou a ser a nova classificação dos agrotóxicos.

Como era	Nova classificação
Classe I	
 <p>Extremamente tóxico Causa corrosão da pele. Nos olhos, causa opacidade da córnea reversível em 7 dias ou não, além de oferecer persistente irritação na área.</p>	 <p>Extremamente tóxico Fatal se ingerido, em contato com a pele ou inalado.</p>
	 <p>Altamente tóxico Idem. A diferença para o pior grau está na quantidade de exposição ao produto.</p>
Classe II	
 <p>Altamente tóxico Causa irritação severa na pele. Nos olhos, não causa opacidade da córnea, apenas irritação reversível em 7 dias.</p>	 <p>Moderadamente tóxico Causa intoxicação se ingerido, em contato com a pele ou inalado.</p>
Classe III	
 <p>Medianamente tóxico Causa irritação moderada na pele. Nos olhos, não causa opacidade da córnea, apenas irritação reversível em 72 horas.</p>	<p>Pouco tóxico Nocivo se ingerido, em contato com a pele ou inalado.</p>
	<p>Improvável de causar dano agudo Pode ser perigoso se ingerido, em contato com a pele ou inalado.</p>
Classe IV	
 <p>Pouco tóxico Pode causar irritação leve na pele. Nos olhos, não causa opacidade da córnea, apenas irritação reversível em 24 horas.</p>	<p>Não Classificado Sem riscos ou recomendações.</p>
	<p>SEM ADVERTÊNCIA</p>

Adaptado de: (TOOGE; MANZANO, 2019)

Este tipo de classificação, geralmente leva em consideração os valores da Dose Média Letal (DL50), que se refere à quantidade em miligramas de ingrediente ativo do produto por quilograma de peso vivo, necessários para matar 50% da população de animais utilizados no teste, como visto na tabela 1: (BARRIGOSI, [s.d.]

Tabela 1 - Classificação toxicológica levando em consideração a dose letal 50 (LD 50).

Classe		LD50 (mg/kg peso corporal)	
		ORAL	DÉRMICA
I a	Extremamente tóxico	< 5	< 50
I b	Altamente tóxico	5 - 50	50 - 200
II	Moderadamente tóxico	50 - 2000	200 - 2000
III a	Pouco tóxico	> 2000	> 2000
III b	Improvável de causar dano agudo	5000 ou mais	
NÃO CLASSIFICADO	Não classificado		

Adaptado de WHO,(2019)

2.1.1.2 Classificação quanto ao organismo alvo que controla

Desta forma, os agrotóxicos são classificados considerando-se o organismo alvo. Existem diversas classes, como por exemplo, acaricida, fungicida, nematicida entre outros. Segundo o IBAMA, no Brasil, em 2020 as três classes mais vendidas foram os herbicidas, fungicidas e inseticidas, nesta ordem, totalizando mais de 80% das vendas. (IBAMA, 2020)

Herbicidas

Os herbicidas compreendem uma classe de agrotóxicos utilizados no controle de plantas que muitas vezes disputam espaço, água e nutrientes com a cultura inserida no espaço. (ADAMA, [s.d.]) Podem ser classificado de diversas maneiras, como por exemplo quanto ao espectro de ação, mecanismo de ação, época de

aplicação, porém, a mais conhecida seria quanto à seletividade, sendo que a classe dos seletivos compreende os herbicidas que controlam apenas as plantas daninhas, não causando efeito na cultura agrícola onde está inserido, como o é o caso do 2,4-D para a cultura de cana-de-açúcar, atrazina para o milho entre tantos outros. Já a classe dos não seletivos causa efeito tanto na planta daninha como pode levar a morte de toda a cultura agrícola, como o glifosato (CARVALHO, 2013).

Esta classe de agrotóxicos vem sendo utilizada há muitos anos, sendo que em 1941, o 2,4-D foi o primeiro agrotóxico sintetizado pela indústria e utilizado como herbicida seletivo, o que impulsionou o desenvolvimento da indústria química na agricultura (OLIVEIRA JR., 2011), (MATTE et al., 2017).

Inseticidas

Os inseticidas são amplamente usados em diversas culturas agrícolas no controle de infestações de insetos, nocivos as lavouras. Além disso, essa classe combate também pragas que sugam a seiva das plantas, introduzindo doenças e alimentando-se de partes essenciais para o bom desenvolvimento destas (ADAMA, [s.d.]).

Estes, por sua vez também podem ser classificados de diferentes formas, um exemplo, é quanto ao grupo químico como organoclorado, organofosforados, carbamatos, piretróides, entre outros (NASCIMENTO; MELNYK, 2016).

Os organofosforados constituem uma importante classe, sendo que tem como característica átomos de carbono e fósforo em sua estrutura. Apesar de se degradarem facilmente no meio, apresentam alta toxicidade e inibem a enzima colinesterase podendo levar ao coma (SANCHES et al., 2003) (YADAV; DEVI, 2017).

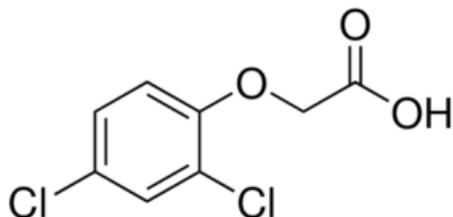
2.2 AGROTÓXICOS EM ESTUDO

Os agrotóxicos selecionados para este estudo compreendem sete herbicidas, de diferentes classes químicas, que são mais utilizados nas culturas que possuem altas produções no Brasil, ou seja, a soja e o milho. E ainda um inseticida, utilizado na cultura de maçã.

Abaixo estão descritos os agrotóxicos utilizados no estudo, bem como sua estrutura e algumas informações mais relevantes sobre os mesmos.

2.2.1 Ácido diclorofenoxiacético (2,4-D)

Figura 2 - Estrutura química do ácido diclorofenoxiacético (2,4-D).



Grupo químico: ácido ariloxialcanóico

Nome químico: ácido 2,4-diclorofenoxiacético

Classe: herbicida

Fórmula molecular: C₈H₆Cl₂O₃

Massa molar: 221,02 g mol⁻¹

Classe toxicológica: Classe I

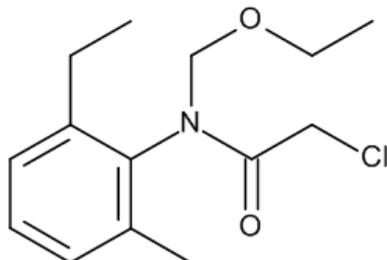
Nomes comerciais: Tordon, Disparo

Sendo o segundo entre os ingredientes ativos mais vendidos no Brasil, o 2,4-D é um herbicida seletivo, de ação sistêmica e com baixo custo. Utilizado no controle de plantas daninhas em diversas culturas como trigo, milho, soja, pastagens entre outros (CALISTO, 2020) (MORAES, 2019).

A persistência deste herbicida no solo, é considerada de curta a média, e o período residual não exceder quatro semanas, em solo argiloso e com clima quente, isto quando aplicado em doses comerciais. Porém, por ele ser muito utilizado e sua aplicação muitas vezes ser necessária em várias etapas até a colheita, há uma preocupação, relacionada a persistência dos resíduos, o que pode vir a afetar até as próximas culturas (SILVA et al., 2011).

2.2.2 Acetocloro

Figura 3 - Estrutura química do acetocloro



Grupo químico: cloroacetanilida

Nome químico: 2 – cloro-N-(etoximetil) – N - (2-etil-6metilfenil)acetamida

Classe: Herbicida

Fórmula molecular: C₁₄H₂₀ClNO₂

Massa molar: 269,77 g mol⁻¹

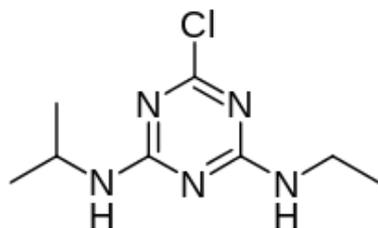
Classe toxicológica: Classe III

Nomes comerciais: Kadett CE, Surpass EC, FistCE

O acetocloro é usado no Brasil como herbicida pré emergente, ou seja, são aplicados no solo antes que ocorra a emergência do organismo alvo, nas culturas de café, cana de açúcar, milho e soja (ANVISA, [s.d.]). Este não é um agrotóxico muito persistente no solo, visto que permanece por um período entre 35 e 70 dias, podendo ter variações dependendo das características do solo (FERRI; VIDAL, 2002).

2.2.3 Atrazina

Figura 4 - Estrutura química da atrazina.



Grupo químico: Triazina

Nome químico: 6 – cloro – N – etil – N – isopropil – 1,3,5 – triazina – 2,4 -
diamina

Classe: herbicida

Fórmula molecular: C₈H₁₄ClN₅

Massa molar: 215,68 g mol⁻¹

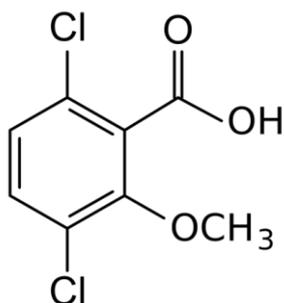
Classe toxicológica: Classe III

Nomes comerciais: Nortox 500 SC, Coyote 500 SC, Siptran, Aclamado BR

Por possuir uma baixa pressão de vapor e moderada solubilidade em água, a atrazina, em um sistema água-solo, apresenta elevada persistência em solos e hidrólise lenta, o que leva a contaminação de solo e águas subterrâneas. Essa persistência varia conforme o tipo de solo bem como o clima (CARMO et al., 2013).

2.2.4 Dicamba

Figura 5 - Estrutura química do dicamba.



Grupo químico: Ácido benzóico

Nome químico: ácido 3,6 - dicloro - 2 - metoxibenzóico

Classe: Herbicida

Fórmula molecular: C₈H₆Cl₂O₃

Massa molar: 221,03 g mol⁻¹

Classe toxicológica: art. 38 resolução da diretoria colegiada - RDC nº 294, de 29 de julho de 2019

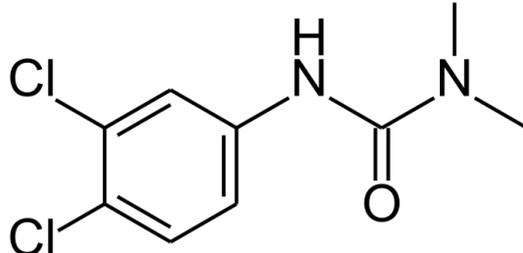
Nomes comerciais: Banvel 480, Dicamax, Atectra

O dicamba é um herbicida seletivo usado para o controle em pós emergência de plantas daninhas de folha larga e plantas lenhosas. Por ser um produto solúvel em água e móvel no perfil do solo, tem-se a preocupação com a evaporação e transporte deste, podendo após sua aplicação volatilizar, e dependendo as condições ambientais ser transportado por até 1 km, fato que causa preocupação aos produtores.

Porém por esse herbicida ser uma alternativa para o controle de biótipos resistentes, principalmente ao glifosato como a buva (*Conyza bonariensis*) e o caruru (*Amaranthus viridis*), empresas trabalharam na modificação da formulação do produto, tornando-a menos volátil, com apenas 0,55% de volatilidade, trazendo mais segurança nas questões ligadas a deriva (BROCHADO et al., 2021).

2.2.5 Diurom

Figura 6 - Estrutura química do diurom.



Grupo químico: Uréia

Nome químico: 3-(3,4-diclorofenil)-1,1-dimetilureia

Classe: Herbicida

Fórmula molecular: C₉H₁₀Cl₂N₂O

Massa molar: 233,1 g mol⁻¹

Classe toxicológica: Classe III

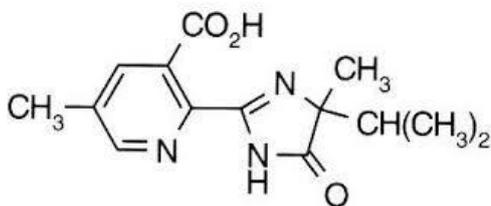
Nomes comerciais: Diuron Nortox 500 SC, Diuron 500 SC Milenia

O diurom é um herbicida considerado persistente no solo, água bem como lençóis freáticos, podendo levar de um mês até um ano para se degradar, porém seu produto de biodegradação 3,4-dicloroanilina (3,4-DCA) possui uma maior toxicidade e persistência no meio ambiente. Além disto, o 3,4-DCA não é facilmente degradado, principalmente em condições anaeróbias (GIACOMAZZI; COCHET, 2004).

Visto que o diurom é seguidamente encontrado na água do mar e rios, (GIACOMAZZI; COCHET, 2004) estudos mostram que ele e seus metabólitos podem causar alterações na concentração plasmática de hormônio esteróide, impactando assim a reprodução e desenvolvimento de peixes (BOSCOLO et al., 2017).

2.2.6 Imazapique

Figura 7 - Estrutura química do imazapique.



Grupo químico: Imidazolinona

Nome químico: Ácido 2-[4,5-dihidro-4-metil-(1-metiletil)-5-oxo-1H-imidazol-2-il-5-metil-3 piridina carboxílico

Classe: Herbicida

Fórmula molecular: C₁₄H₁₇N₃O₃

Massa molar: 275,30 g mol⁻¹

Classe toxicológica: Classe II

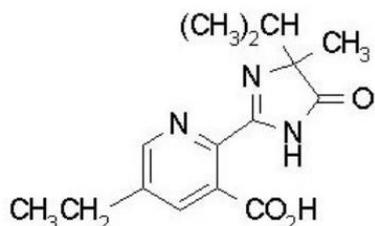
Nomes comerciais: Plateau, Amplexus

O imazapique, assim como outros herbicidas da classe das imidazolinonas, apresenta alta persistência no solo devido a sua lenta degradação, podendo permanecer no solo por até dois anos (SU et al., 2019). Devido a seu longo efeito residual no solo, o que pode levar a intoxicação em culturas semeadas em rotação, muitas vezes é necessário um intervalo de segurança antes do plantio de outra cultura no local (VASCONCELO et al., 2020).

Herbicidas desta classe são degradados principalmente por microrganismos presentes no solo, desta maneira, esta associada às condições do solo, como umidade, pH, conteúdo de matéria orgânica (SU et al., 2019).

2.2.7 Imazetapir

Figura 8 - Estrutura química do imazetapir.



Grupo químico: Imidazolinona

Nome químico: Ácido (RS)-5-ethyl-2-(isopropyl-4-methyl-5-oxo-2-imidazolin-2-yl) nicotínico

Classe: Herbicida

Fórmula molecular: C₁₅H₁₉N₃O₃

Massa molar: 289,33 g mol⁻¹

Classe toxicológica: Classe III

Nomes comerciais: Imazetapir Plus Nortox, Pivot 100 SL,

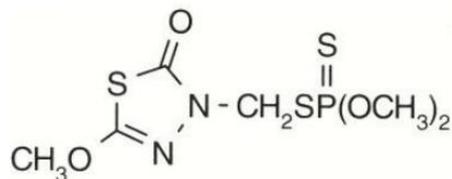
Assim como o Imazapir, o Imazetapir também pertence à classe das imidazolinonas, apresentando assim alta persistência no solo bem como as características citadas no item anterior (SU et al., 2019).

No Brasil, seu uso é permitido, tanto como pré e pós emergência em diferentes culturas, como amendoim, arroz, feijão e soja (ANVISA, [s.d.]).

Em relação a sua estrutura, a classe das imidazolinonas possui em sua estrutura química o grupamento imidazol. A variação da estrutura cíclica ligada ao grupamento imidazol leva a três diferentes subgrupos, sendo eles: imidazolinona piridina, imidazolinona benzeno e imidazolinona quinolina. Sendo ainda possível uma segunda classificação da imidazolinona piridina quanto ao radical R do grupamento piridina (KRAEMER et al., 2009).

2.2.8 Metidationa

Figura 9 - Estrutura química da metidationa.



Grupo químico: Organofosforado

Nome químico: S-2,3-dihidro-5-metoxi-2-oxo-1,3,4-tiadiazol-3-ylmethyl O,O-dimetilPhosphorodithioate

Classe: Inseticida e Acaridida

Fórmula molecular: C₆H₁₁N₂O₄PS₃

Massa molar: 302,33 g mol⁻¹

Classe toxicológica: específica para cada produto, conforme art. 38 da Resolução da Diretoria Colegiada – RDC nº 294, de 29 de julho de 2019

Nomes comerciais: Suprathion 400 EC, Supracid 400 EC

A metidationa é um inseticida amplamente usado devido a sua alta eficácia e baixa persistência no ambiente (STIVAKTAKIS et al., 2017).

No Brasil este inseticida é usado nas culturas de maçã e algodão através da aplicação foliar (ANVISA, 2020).

2.3 AGROTÓXICOS E O PERIGO AMBIENTAL E HUMANO

O desenvolvimento agrícola no país é de suma importância para a economia. No ano de 2020, as exportações de produtos agropecuários somaram 100,81 bilhões de dólares, entre estes, a soja foi o produto que correspondeu a 35% das exportações, sendo o principal produto exportado no setor (NASCIMENTO, 2021).

Porém, para que as culturas não sejam afetadas, principalmente por pragas e doenças, os agrotóxicos são amplamente utilizados para o manejo de culturas. E

dados do IBGE/CENSO2017 mostram que o uso de agrotóxicos cresceu em comparação com o último CENSO realizado em 2006 (IBGE).

Logo esse aumento no uso de agrotóxicos traz a tona inúmeras questões, principalmente ambientais e de saúde pública, visto que o uso indiscriminado dos agrotóxicos pode levar a contaminações do solo, água e por consequência atingir organismos não-alvo, como os seres humanos e animais. (AGRO, 2019)

Ainda, durante a aplicação do produto pode haver a exposição humana direta aos agrotóxicos, principalmente durante o preparo e aplicação deste, por vezes realizada de maneira incorreta, seja pela falta de ética e responsabilidade em usar uma dose adequada ou pela falta de conhecimento e/ou assistência técnica. Entre estes se enquadram os principalmente, os agricultores familiares, onde incide os maiores riscos de intoxicação, seja por exposição ocupacional ou acidental, pois geralmente o modo de aplicação é através da utilização de pulverizadores costais manuais, como o preparo da calda feita em local inadequado, muitas vezes não afastado do espaço doméstico, de animais, e de corpos de água, como dita a legislação. Ademais, em muitos casos o uso de equipamentos de proteção individual (EPIs) é falho ou inexistente (VALADARES; ALVES; GALIZA, 2020) (VIERO et al., 2016) (GEBLER; BRUNCH; LISBÔA, 2017).

Já quando se trata de grandes lavouras, onde a aplicação manual é inviável, utilizam-se grandes pulverizadores ou em determinadas situações, aviões, onde a problemática é a deriva, tanto para outras culturas próximas, como a intoxicação de pessoas que tem suas casas próximas ao local de aplicação.

Como exemplo disso, um caso ocorrido em maio de 2013, em Goiás, onde um avião pulverizou agrotóxicos sobre plantações de milho e soja, atingindo uma escola localizada no meio rural. Após o ocorrido, cerca de 90 pessoas, a maioria crianças, tiveram que ser hospitalizadas, pois apresentaram sintomas de intoxicação, como sudorese, frequência cardíaca elevada, vômitos, náusea, dor de cabeça e tontura (HUMAN RIGHTS WATCH, 2018).

Outra situação é referente à deriva de agrotóxicos, ocorrido em 2018 no município de Candiota, no Rio Grande do Sul, onde o considerado maior produtor de oliveiras do país, teve perdas significativas devido à deriva de agrotóxicos, no caso o 2,4-D (GAÚCHA ZH, 2020).

Devido ao aumento expressivo no número de casos de deriva de agrotóxicos devido à aplicação em condições inviáveis, a Secretaria da Agricultura, Pecuária e

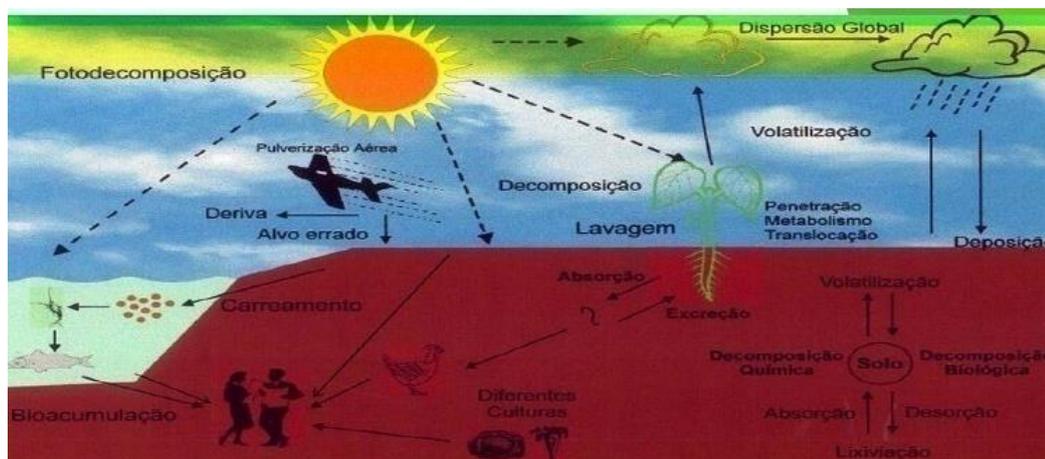
Desenvolvimento Rural do Rio Grande do Sul, criou um canal de denúncias exclusivo para casos de deriva de 2,4-D e outros agrotóxico hormonais como o Dicamba, Piroclam entre outros, em culturas sensíveis como oliveiras, macieiras, erva-mate entre outros. Além disso, também foram criadas instruções normativas para o controle de uso de agrotóxicos hormonais no RS, a IN 005/2019, onde constam obrigações para profissionais que prescrevem bem como fabricantes e comerciantes e a IN 06/2019 onde constam regras para o cadastramento de pessoas responsáveis pela aplicação deste tipo de agrotóxico bem como a necessidade de o produtor informar sobre o uso destes (FRANCISCATTO COVATTI, 2019) (SECRETARIA DA AGRICULTURA, [s.d.]).

Os efeitos do uso de xenobióticos como, por exemplo, os agrotóxicos, sobre a saúde humana são inúmeros, estes podem ser de dois tipos, no caso os efeitos agudos que são resultantes da exposição a concentrações capazes de causar dano aparente em um período de 24h, e os efeitos crônicos são resultantes de uma exposição continua a baixas doses da substância (PERES; MOREIRA; DUBOIS, 2003). Portanto, a exposição aos agrotóxicos pode desencadear diversos sintomas, como dor de cabeça, náusea, dor de estomago, além de estar associado a alterações celulares que podem levar a diversos tipos de cânceres como neoplasia no cérebro, melanoma cutâneo, câncer no sistema digestivo, respiratório entre vários outros (LOPES; ALBUQUERQUE, 2018).

No meio ambiente esses efeitos são ainda maiores, visto que existe todo um ecossistema envolvido, além de danos ao ambiente onde esses animais vivem, pode ainda haver o acúmulo dessas substâncias ao longo da cadeia alimentar, principalmente em áreas próximas da aplicação de agrotóxico. Além do mais, o dano ao solo, devido a fragilização deste e ainda conseqüente impacto na absorção de minerais, e por conseqüência essa contaminação pode chegar a rios e lençóis freáticos, podendo modificar a biota do meio (PERES; MOREIRA; DUBOIS, 2003).

Após a aplicação do agrotóxico, este pode sofrer diversos processos, no meio ambiente, como a lixiviação, volatilização, fotodegradação biodegradação entre outros, como pode ser visto na figura 10. Estes processos podem fazer com que os agrotóxicos sejam degradados, concentrados, diluídos, o que define isso é o processo ao qual ele passa (RIBEIRO; VIEIRA, 2010).

Figura 10 - Processos que os agrotóxicos podem sofrer no meio ambiente



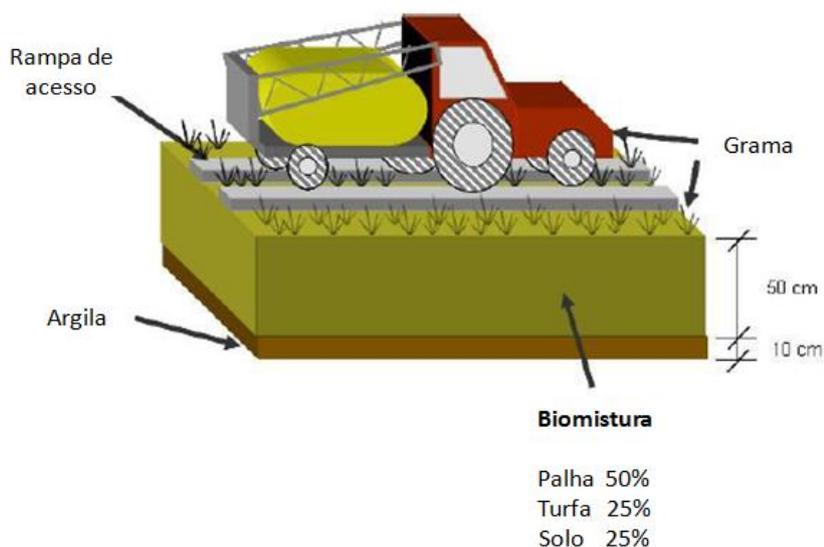
(PIGNATI, 2012)

2.4 CAMAS BIOLÓGICAS: ALTERNATIVA PARA MINIMIZAR CONTAMINAÇÃO AO MEIO AMBIENTE

A manipulação de agrotóxicos sem os devidos cuidados pode ser uma grande fonte de contaminação pontual, pois durante o preparo da calda, pode haver derramamentos do produto formulado concentrado, repetidamente em um mesmo ponto. Este tipo de derrame tem o mesmo efeito da multiplicação da dose comercial a ser aplicada por hectare em até mil vezes. Ou ainda durante a lavagem dos tanques de pulverização, a água residual, se descartada em local inapropriado pode vir a contaminar rios, bem como ambos os casos podem contaminar além do solo, águas subterrâneas (FAO, 2016).

Com o intuito de evitar este tipo de contaminação, foi desenvolvido na Suécia no ano de 1993 o sistema *biobed* conhecido também por cama biológica. Sendo esta uma alternativa eficaz e barata para evitar este tipo de contaminação. Um sistema de cama biológica consiste basicamente de uma cova de aproximadamente 60 cm de profundidade, uma camada de argila ao fundo, seguida de uma camada de biomistura, composta basicamente por palha, solo e turfa e coberto por uma camada de grama. Este pode ainda conter uma rampa de acesso aos maquinários, como pode ser visto na figura 3 (DIEZ JEREZ et al., 2013) (CASTILLO; TORSTENSSON; STENSTRÖM, 2008a).

Figura 11 – Esquema básico de uma cama biológica

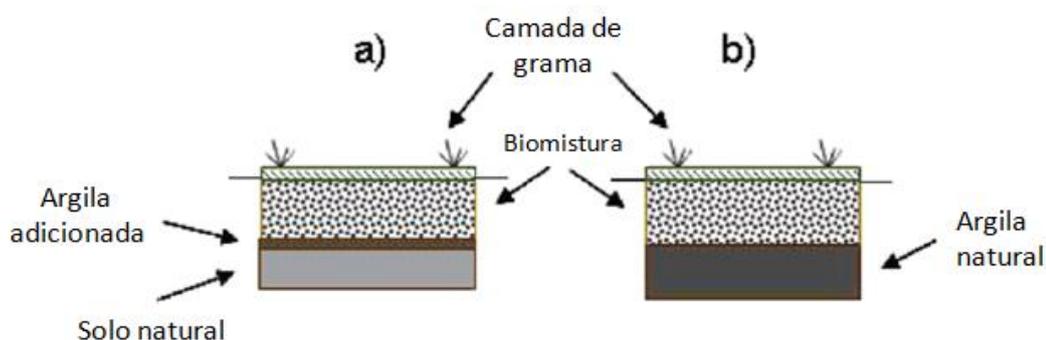


Adaptado de (CASTILLO; TORSTENSSON; STENSTRÖM, 2008a)

O modelo apresentado na figura 11 representa o modelo criado inicialmente. Ao longo dos anos e buscando o aperfeiçoamento das condições de segurança ambiental para cada lugar, foram surgindo outros modelos.

Existem basicamente dois modelos: permeável e impermeável. As camas biológicas permeáveis não possuem nenhuma camada sintética de revestimento, visto que neste caso, existe uma camada de argila natural que permite a drenagem do excedente de líquido depositado, ou então esta pode ser adicionada ao fundo do leito, como visto na figura 12 (CASTILLO; TORSTENSSON; STENSTRÖM, 2008b).

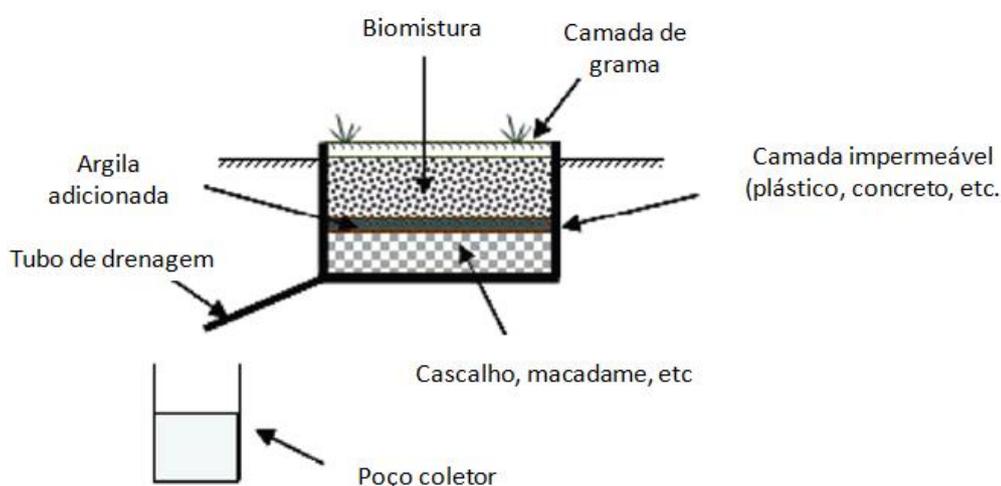
Figura 12 - Modelo de cama biológica permeável com: a) camada de argila adicionada e b) camada de argila natural.



Adaptado de (CASTILLO; TORSTENSSON; STENSTRÖM, 2008b)

Já o modelo impermeável (figura 13) possui uma barreira artificial feita de cimento, plástico ou outro material que isole o material do solo e ainda permita a coleta do permeado para outro poço anexo a cama biológica através de tubulações. Para evitar que obstrução das tubulações, neste modelo geralmente é adicionada uma camada de cascalho e/ou areia para reter partículas maiores (CASTILLO; TORSTENSSON; STENSTRÖM, 2008b).

Figura 13 - Modelo de cama biológica impermeável



Adaptado de (CASTILLO; TORSTENSSON; STENSTRÖM, 2008b)

A manutenção da cama biológica deve ser feita a cada temporada, visto que a cada ano, devido à compactação e decomposição da biomistura, o leito diminui em torno de 10 centímetros. Sendo assim, necessária a adição de biomistura e restauração da camada de grama do leito. A duração média de uma cama biológica é em torno de 4 a 5 anos, período no qual a biomistura se mostra eficaz, sendo necessária, após esse período, a substituição da mesma. Esta substituição deve ser realizada de 2 a 3 meses antes do uso, visto que este é o tempo que a biomistura leva para se estabilizar (DIEZ JEREZ et al., 2013).

Para o descarte da biomistura antiga, recomenda-se realizar a compostagem do material por um período de seis meses, a fim de garantir que todos os agrotóxicos tenham se degradado. Após este período, o substrato pode ser disperso em áreas agrícolas, obedecendo aos limites físicos legais (GEBLER et al., 2015).

2.4.1 Elementos que compõem uma cama biológica

Os elementos de uma cama biológica variam conforme o modelo, porém o fundamento e elementos são basicamente os mesmos.

A cobertura vegetal, geralmente composta por grama, aumenta a eficiência da cama biológica, visto que ajuda a reter os agrotóxicos na parte superior, evitando sua lixiviação, além de ajudar no controle da umidade bem como degradação em nível de raiz. Esta cobertura ajuda também na visualização dos derrames de agrotóxicos, bem como defeitos que causam vazamentos nos equipamentos utilizados na pulverização (DIEZ JEREZ et al., 2013).

A biomistura é o principal componente, visto que esta é responsável pela retenção e degradação dos agrotóxicos através dos microrganismos que se desenvolvem no meio, levando assim a redução da concentração bem como eliminação dos agrotóxicos. Está é composta por 50% de palha, 25% de turfa e 25% de solo (DIEZ JEREZ et al., 2013).

Quando a cama biológica é do modelo com drenagem, é necessário acrescentar alguns componentes como uma camada de cascalho, que é colocado ao fundo, que serve como um filtro para reter partículas maiores provenientes da biomistura evitando assim que o sistema de drenagem seja obstruído. Outro componente utilizado com a mesma função do cascalho é a areia, porém ela ajuda a reter partículas menores, sendo assim um componente opcional (DIEZ JEREZ et al., 2013).

Quando a cama biológica é do tipo sistema fechado, se utiliza um sistema de impermeabilização, que evita o contato dos agrotóxicos com o solo abaixo da cama biológica. Esta camada consiste geralmente de uma camada de concreto ou outro material impermeável, e sobre este é colocado uma geomembrana a fim de filtrar os líquidos e possibilitar que estes sejam recirculados através de uma bomba, novamente para a cama biológica (CASTILLO; TORSTENSSON; STENSTRÖM, 2008b).

Um sistema de acesso pode ser colocado, consistindo de uma rampa de material que resista ao peso do trator bem como equipamento de pulverização, geralmente sendo recomendado o uso de aço.

O teto de proteção é útil para isolar a cama biológica, evitando assim acúmulo de água em dias chuvosos, sendo que caso isto ocorra, é necessário esperar evaporar o excesso de água (DIEZ JEREZ et al., 2013).

2.4.2 Biomistura

A biomistura é o principal componente de uma cama biológica, sendo esta a responsável pela absorção e degradação dos agrotóxicos. Portanto a composição bem como o tipo de material orgânico, é crucial para uma degradação efetiva, seja quanto à retenção dos agrotóxicos como também a atividade dos microrganismos responsáveis pela degradação (CASTILLO; TORSTENSSON, 2007).

O solo, que corresponde a 25% da biomistura, além de sua riqueza em microrganismos é útil devido sua capacidade de sorção. Este é extraído de até 20 cm da superfície da terra, sem conter camada de vegetais.

Quanto ao tipo de solo, os mais adequados são aqueles com alto teor de matéria orgânica, sendo possível utilizar também o solo arenoso. Porém, deve-se evitar o uso de solo argiloso devido à dificuldade de homogeneização na biomistura além deste tender a interagir com a água, afetando assim a movimentação dos líquidos pela cama biológica (DIEZ JEREZ et al., 2013).

A turfa devido a sua capacidade de sorção dos agrotóxicos, bem como retenção de água é de grande importância para a regulação da umidade, controle de pH e degradação abiótica. Esta é um material orgânico esponjoso, provindo de um tipo de musgo extraído de depósitos naturais. A composição da turfa é basicamente carbono compreendendo 60%, 3% de oxigênio, 6% de hidrogênio e 2% de nitrogênio e esta constitui 25% da biomistura (DIEZ JEREZ et al., 2013) (CASTILLO; TORSTENSSON, 2007).

Por se tratar de um recurso natural, não renovável e com características físico-químicas específicas, a substituição da turfa por outros materiais tem sido um processo difícil. Na região do Chile, experimentos buscaram agregar biocarvão, produzido pela pirólise de *Pinus radiata*, com a turfa, demonstrando resultados promissores porém com uma taxa de degradação mais lenta. (DIAS et al., 2020) (DIEZ et al., 2013).

A palha é o material que constitui 50% da biomistura, esta pode ser obtida no campo, através dos resíduos de colheita de leguminosas e gramíneas, como trigo e arroz (DIEZ JEREZ et al., 2013).

A palha é um elemento importante, pois ela dá a estrutura de túneis e macroporos para que ocorra a passagem de ar para as camadas mais profundas, aumentando a atividade dos microorganismos aeróbios, que são mais eficientes em comparação aos aeróbios, tornando assim o sistema *Biobed* mais eficiente em comparação a degradação dos agrotóxicos apenas no solo (GEBLER et al., 2015).

Além disso, por a palha possuir alto teor de lignina, estimula ainda a formação de fungos que degradam poluentes orgânicos, como o fungo da podridão branca (figura 14), além da formação de fenoloxidas. No sistema de degradação da lignina, muitos microrganismos são ativados devido à limitação de nutrientes, como nitrogênio e carbono. As fenoloxidas incluem peroxidases e polifenoloxidas que são capazes de degradar uma vasta gama de produtos tóxicos, entre eles os agrotóxicos. Logo, este é um componente de grande importância em uma cama biológica, visto que estudos mostram que materiais orgânicos com limitação do teor de lignina bem como alto nível de nitrogênio, podem não ter uma atividade microbiana suficiente para a degradação de agrotóxicos e seus metabólitos (CASTILLO; TORSTENSSON, 2007) (CASTILLO; TORSTENSSON; STENSTRÖM, 2008b).

Figura 14 - Imagem do fungo da podridão branca



(CASTILLO; TORSTENSSON; STENSTRÖM, 2008b)

2.4.2.1 Alternativas disponíveis a substituição de componentes da biomistura

A adaptação da composição da biomistura de uma cama biológica é de grande importância, visto que em alguns casos o material comumente usado é escasso. Desta forma se buscam sempre componentes que sejam sustentáveis e de baixo custo. Para isso, é importante se ter o conhecimento da disponibilidade de cada tipo de material no local a ser construída a cama biológica e da eficácia destes (LESCANO et al., 2018). Porém para que se possa realizar essa substituição é de grande importância saber se os componentes substitutos são eficazes para a finalidade pretendida.

A palha, por ser um componente importante, fonte de lignina, necessário para o desenvolvimento dos fungos, deve ser substituída por componentes que possuam esta mesma característica. Uma alternativa são os resíduos de cultura de girassol, folhas de oliveiras, talos de uva, casca de laranja, espigas de milho, entre outros (KARANASIOS et al., 2010).

LESCANO et al., (2018) demonstrou que para a degradação de glifosato, biomisturas empregando palha de alfafa, restolhos de trigo, resíduos de rios e solo foram eficazes.

Já a turfa, devido a suas características importantes para o *biobed*, como alta capacidade de retenção de água, o que é essencial para manter a umidade e pH do sistema muitas vezes se torna difícil a substituição por outro material. Além do fato deste ser de alto custo e muitas vezes pouco disponível no local, e também por não ser um recurso renovável (DIEZ JEREZ et al., 2013).

KARANASIOS et al., (2010) utilizou como substituto a turfa, folhas de oliveiras após passarem pelo processo de compostagem, demonstrando ser uma alternativa eficaz (OMIROU et al., 2012). Outra alternativa para a substituição da turfa são os resíduos de rios, ou seja, o local do rio onde se tem um acúmulo de resíduos vegetais e estes em condições anaeróbicas (LESCANO et al., 2018) (DI BENEDETTO; KLASMAN; BOSCHI, 2004). Substratos residuais provenientes do cultivo de cogumelos comestíveis (GAO et al., 2015). O uso de minhocas (*Eisenia fetida* species) junto a biomistura foi estudado por LESCANO et al., 2020, demonstrando eficiência na biodegradação do glifosato. Ainda resíduo de pinus e vermicomposto foram testados no Brasil como potenciais substituto para a turfa em biomistura que compõem as camas biológicas, demonstrando eficientes na

degradação do fosmete, reduzindo sua ecotoxicidade, (DIAS et al., 2021).

Além de seu uso para remoção de pesticidas, estudos recentes demonstraram que as camas biológicas são eficientes para remoção/degradação de poluentes emergentes, bem como na indústria farmacêutica, em hospitais, estações de tratamento de águas por ser um sistema barato e eficiente (DELGADO-MORENO et al., 2019).

2.5 MÉTODO CROMATOGRÁFICO

A cromatografia está incluída entre os métodos de análise, isto se deve a sua facilidade em efetuar separações, identificação bem como quantificação de compostos químicos, seja ela por si só ou conjuntamente com outras técnicas instrumentais de análise, como a espectrometria de massas.

É um método físico-químico de separação de compostos de uma mistura, esta é realizada pela distribuição destes, entre duas fases em contato. Sendo um dessas fases a estacionária e a outra a móvel, onde então durante a passagem da fase móvel pela estacionária, ocorre a distribuição dos compostos em ambas as fases de forma que cada composto é retido seletivamente pela fase estacionária, ocorrendo migrações diferenciais desses compostos (COLLINS; BRAGA; BONATO, 2006).

Existem diversas classificações na cromatografia, sendo as mais comuns as relacionadas à técnica empregada, ao mecanismo de separação e os diferentes tipos de fases (COLLINS; BRAGA; BONATO, 2006).

2.5.1 Cromatografia Líquida

A cromatografia líquida é uma das técnicas mais utilizadas para a análise de compostos não voláteis e/ou que sejam termicamente instáveis (LANÇAS, 2009). A técnica é baseada na diferença de solubilidade dos analitos entre uma fase móvel líquida e a fase estacionária.

Desde seu início, em 1950, até hoje, muitos avanços relacionados à cromatografia líquida surgiram, sendo que a grande maioria buscando um desenvolvimento contínuo de novos materiais para a fase estacionária, que possam

trazer colunas mais seletivas, eficientes e estáveis química e mecanicamente (MALDANER; JARDIM, 2009).

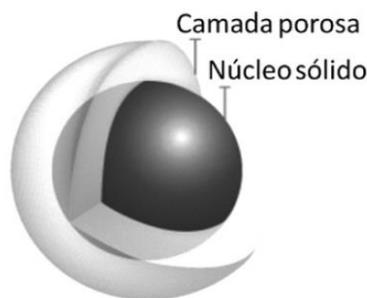
Devido à necessidade de análises confiáveis e em um curto período de tempo, a redução do tamanho das partículas da fase estacionária foi uma alternativa com conseqüente aumento da pressão no sistema, o que inviabilizava sua utilização em sistemas cromatográficos convencionais, levando mais algum tempo então, até o surgimento de um sistema mais eficiente (MALDANER; JARDIM, 2009).

Por se tratar de um método físico-químico de separação dos analitos, como adsorção, troca iônica, partição ou ainda por tamanho, existem hoje diversas fases estacionárias que seguem esses mecanismos. Sendo que a escolha depende das características do analito, como a polaridade.

Dentre os diferentes tipos, existem, por exemplo, a cromatografia de fase normal onde a fase estacionária possui uma polaridade mais alta em relação à fase móvel. Já a cromatografia em fase reversa é amplamente utilizada quando os analitos se tratam de compostos básicos ou muito polares, este tipo é muito usado atualmente por ter uma maior resistência e aplicabilidade. Neste caso a fase estacionária é apolar, geralmente hidrocarbonetos apolares, como C8 ou C18, e a fase móvel utilizada é polar (JÚNIOR, 2019).

Têm-se fases estacionárias onde apenas a superfície da partícula é porosa, possuindo um núcleo sólido, como demonstrado na figura 15. Apresentando vantagens como a baixa resistência a transferência de massa, possibilitando análises mais rápidas sem gerar altas pressões, alta resistência mecânica, desta forma apresentando alta eficiência se comparadas com partículas porosas. Esse tipo de partícula foi desenvolvida pela Agilent Technologies e denominada de Poroshell, possuindo hoje diversas variações, seja no tamanho do núcleo quanto da camada porosa (MALDANER; COLLINS; JARDIM, 2010).

Figura 15 - Representação de uma partícula de fase estacionária do tipo Poreshell



(MALDANER; COLLINS; JARDIM, 2010)

A cromatografia líquida é uma excelente técnica de separação, porém para análises qualitativa e quantitativa esta necessita de uma técnica confirmatória, ou seja, um sistema de detecção do analito de interesse (LANÇAS, 2009). O detector ideal de qualquer tipo deve ser sensível a pequenas mudanças na concentração do analito, fornecendo uma resposta linear.

Existem diferentes tipos de detectores, a escolha irá depender principalmente do limite de detecção e faixa linear necessário bem como das características físico-químicas do analito. Alguns exemplos são os detectores de ultravioleta, de índice de refração, de fluorescência, de espectrometria de massas (HARRIS; LUCY, 2017).

2.5.2 Espectrometria de massas

A espectrometria de massas é definida como o estudo da matéria através da formação de íons em fase gasosa e posterior caracterização por um espectrômetro de massas considerando sua massa, carga, estrutura ou propriedades físicas (HOSHI IGLESIAS, 2013).

O espectrômetro de massas é composto basicamente por um sistema de introdução de amostra, ionização, análise de massas, detecção dos íons gerados e processamento dos dados. Após os analitos serem introduzidos no espectrômetro de massas, ocorrerá a produção de íons na fonte de ionização e esses são direcionados ao analisador de massas e analisados de acordo com sua razão massa/carga (m/z) (DIAS, 2014).

Esta é uma técnica versátil para análise de misturas complexas de analitos em baixas concentrações. Combina pressões elevadas provindas do cromatógrafo líquido através do eluente, com o alto vácuo do MS, desta forma se tornando necessário o desenvolvimento de interfaces a fim de tornar as técnicas compatíveis (LANÇAS, 2009).

Além disso, geralmente os compostos separados pela CL são pouco voláteis e/ou sensíveis a temperaturas, sendo necessário então o desenvolvimento de interfaces e formas de ionização alternativas.

Em muitas dessas interfaces, também é realizada a ionização do analito, sendo assim, algumas dessas são conhecidas apenas com fonte de ionização. As mais utilizadas são a ionização química à pressão atmosférica (*atmospheric pressure chemical ionization* / APCI), fotoionização à pressão atmosférica (*atmospheric pressure chemical ionization* / APPI) e a ionização por eletronebulização (*electrospray ionization* / ESI) (CHIARADIA; COLLINS; JARDIM, 2008).

O modo de operação MS/MS inclui dois passos adicionais, entre a formação e a detecção dos íons, o isolamento de um íon precursor e sua posterior fragmentação em íons produtos característicos, a fim de formar um espectro completo. Sendo esse o motivo da utilização desta técnica para determinação de analitos em que cada um necessita de condições específicas (PIZZUTTI, 2006).

2.6 VALIDAÇÃO DE MÉTODOS ANALÍTICOS

A validação de método é de grande importância para demonstrar a qualidade de medições químicas através da comparabilidade, rastreabilidade e confiabilidade. A fim de garantir que um método analítico demonstre através de resultados, informações confiáveis e interpretáveis, ele deve passar por uma avaliação denominada de validação (RIBANI et al., 2004).

Existem diferentes órgãos que disponibilizam guias sobre como executar uma validação de método, no Brasil existe, por exemplo, a ANVISA, o MAPA e o INMETRO, que foi o seguido para este trabalho. Além disso, existem guias internacionais, como o SANTE, que dispõe de um guia de “Controle de Qualidade Analítica e Procedimentos de Validação de Método para Análise de Resíduo de Pesticidas em Alimentos e Ração” (PEREZ, 2010) (PIHLSTRÖM et al., 2019).

O INMETRO (Instituto Nacional de Metrologia e Qualidade Industrial) disponibiliza um documento de caráter orientativo denominado “Orientação sobre validação de métodos analíticos DOQ-CGCRE-008”, onde demonstra os parâmetros a serem adotados para uma validação, sendo eles: Seletividade, Linearidade / Faixa de trabalho / Faixa linear de trabalho / Sensibilidade, Limite de detecção (LD), Limite de quantificação (LQ), Tendência/Recuperação e Precisão. O item robustez é um procedimento opcional (INMETRO, 2018).

2.6.1 Seletividade

A seletividade é o grau em que o método consegue diferenciar o analito de interesse de outros analitos, matrizes ou material potencialmente interferente. Um método considerado seletivo é aquele capaz de responder a vários analitos, mas consegue distinguir cada um deles (INMETRO, 2018).

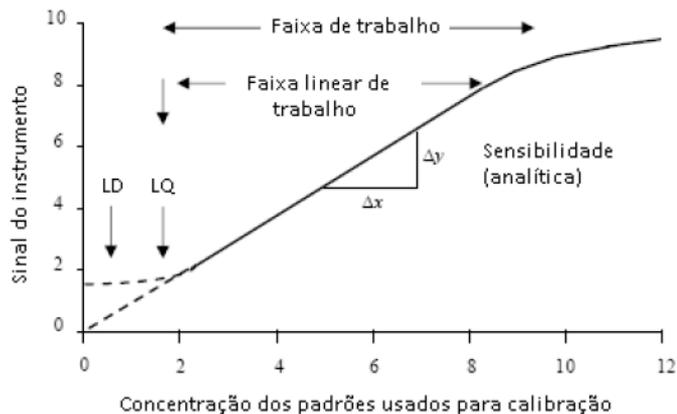
Segundo a literatura, os experimentos realizados para avaliação da seletividade, geralmente incluem ensaios com padrões ou material de referência, amostras na presença e ausência do analito, como também a avaliação do método em conseguir diferenciar o analito de interesse de interferentes. Se este parâmetro não for assegurado, haverá o comprometimento da linearidade, tendência e precisão (INMETRO, 2018).

2.6.2 Linearidade/Faixa de trabalho/Faixa linear de trabalho/Sensibilidade

A linearidade de um método analítico pode ser definida como a capacidade em obter resultados diretamente proporcionais à concentração do analito na amostra. A faixa de trabalho é o intervalo entre a menor e a maior concentração do analito em uma determinada amostra, no qual o método demonstra um nível satisfatório de precisão, exatidão e linearidade (INMETRO, 2018).

A faixa linear de trabalho é o intervalo onde os resultados do método são proporcionais a concentração do analito, sendo o limite inferior da faixa definido como o limite de quantificação. E a sensibilidade está interligada com a inclinação da curva analítica, ou seja, a resposta do equipamento de medição perante a quantidade medida. Sendo estes parâmetros apresentados na figura 16.

Figura 16 - Representação dos parâmetros de uma curva analítica: linearidade, faixa de trabalho, faixa linear de trabalho e sensibilidade.



Para que se possa quantificar o analito, deve se conhecer a relação entre a resposta medida e a linearidade da curva. A relação entre essas duas variáveis é observada através da equação a seguir:

$$\text{Equação da reta } y = a + bx$$

Onde:

y: resposta medida no instrumento

a: coeficiente linear

b: coeficiente angular

x: concentração

2.6.3 Limite de detecção e limite de quantificação

O limite de detecção (LD) refere-se à menor concentração de um analito que pode ser detectada, porém não necessariamente quantificada, através de um procedimento experimental (RIBANI et al., 2004).

Este pode ser calculado de diferentes maneiras, como pelo método visual, método da relação sinal-ruído e o método baseado em parâmetros da curva analítica, baseado na equação abaixo (RIBANI et al., 2004).

$$LD = 3,3 \frac{s}{a}$$

Onde:

s: desvio padrão da resposta do branco

a: coeficiente angular da curva analítica

O limite de quantificação (LQ) de um método analítico é a menor quantidade de um analito em uma determinada amostra que pode ser quantitativamente determinada e com precisão e exatidão aceitável (INMETRO, 2018).

Pode se utilizar os mesmos critérios para o calculo, utilizados para o limite de detecção, porém o que muda é a relação que neste caso é de 10:1, se tratando do calculo pelo método a partir da curva analítica, como indicado na equação abaixo (RIBANI et al., 2004).

$$LQ = 10 \frac{s}{a}$$

Onde:

s: desvio padrão da resposta do branco

a: coeficiente angular da curva analítica

Já o guia SANTE/2019, permite a determinação do LQ a partir dos testes de fortificação/recuperação, onde o LQ é definido como o nível mais baixo de fortificação que atenda aos requisitos de recuperação e precisão (PIHLSTRÖM et al., 2019).

2.6.4 Tendência/Recuperação

A tendência é uma combinação de erros aleatórios e sistemáticos, aplicados a uma série de resultados. Sendo determinada com relação a valores de referência apropriados. É expressa como recuperação analítica, através da equação abaixo (INMETRO, 2018).

$$\frac{\text{valor observado}}{\text{valor esperado}} \times 100\%$$

2.6.5 Precisão

A precisão é avaliada a fim de se observar a dispersão de resultados de ensaios independentes, repetidos de uma mesma amostra analisadas em condições definidas. Esta pode ser calculada de diferentes maneiras, sendo uma delas através da estimativa do desvio padrão relativo (RSD), como demonstrado na equação abaixo (RIBANI et al., 2004).

$$RSD \% = \frac{s}{x} \times 100$$

Onde:

s: desvio padrão

x: concentração média determinada

As maneiras mais comumente utilizadas para expressar a precisão são através da repetibilidade, precisão intermediária e reprodutibilidade (INMETRO, 2018).

A repetibilidade é a condição de medição num conjunto de condições, incluindo mesmo procedimento, operados, condições do sistema de análise. Ou seja, ela determina a dispersão dos resultados, isto pode ser feito a partir da fortificação de um “branco” da matriz em diferentes concentrações, repetida diversas vezes, sendo o valor dependente do guia de validação utilizado, geralmente entre 6 e 15 vezes (INMETRO, 2020).

A precisão intermediária é a precisão avaliada a partir da variação de algumas condições, como analista, equipamento, dia, porém utilizando o mesmo procedimento de extração. Ela representa a variabilidade dos resultados em um laboratório (INMETRO, 2020).

2.6.6 Efeito Matriz

O efeito matriz é entendido como a influência de compostos coextraídos da amostra na medição da concentração ou massa do analito. É observada como resposta do detector, aumentada ou diminuída, se comparado aquele produzido por

soluções do analito em solvente. A presença ou ausência desse efeito é demonstrada através da comparação da resposta produzida a partir do analito em uma solução solvente com aquela obtido da mesma quantidade de analito no extrato da amostra (PIHLSTRÖM et al., 2019) (SANTE 2019).

O efeito matriz é determinado através de um cálculo onde se tem a comparação da resposta do analito da solução em solvente e em extrato de matriz, de acordo com a equação abaixo.

$$\text{Efeito Matriz (\%)} = \left(\frac{\text{inclinação da curva analítica em matriz}}{\text{inclinação da curva analítica em solvente}} - 1 \right) \times 100$$

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 INSTRUMENTAÇÃO

- Cromatógrafo a líquido (Agilent, ULTIVO, modelo 1260 Infinity II Prime) acoplado a um detector de massa triplo quadrupolo
- Coluna InfinityLab Poroshell 120 EC-C18, 2,1 x 50mm, 1,9 µm (Agilent)
- Pré-coluna UHPLC Guard 3PK, InfinityLab Poroshell 120 EC-C18, 3,0 x 5mm, 2,7µm (Agilent)
- Gerador de nitrogênio Genius (Peak Scientific, Reino Unido)
- Centrífuga modelo Haraeus Megafuge 16R (Thermo Scientific, Alemanha)
- Concentrador modelo Rapidvap (Labconco Corporation, EUA)
- Balança analítica com precisão de quatro casas decimais, calibrada (Sartorius, Alemanha)
- Balança analítica com precisão de duas casas decimais PM 600, calibrada (Metler, Suíça)
- Sistema de purificação de água Milli-Q (Milipore, Brasil)
- pHmetro de bancada W3B (BEL,
- Pipetador automático HandyStep, calibrado (Brand, Alemanha)
- Pipetadores semiautomáticos de diferentes capacidades Transferpette (Brand, Alemanha)

- Homogeneizador Vórtex Genie 2 (Scientific Industries, EUA);

3.2 MATERIAIS

- Tubos de polipropileno, com tampas rosqueáveis de 15 e 50 mL (Nalgene, EUA);
- Frascos de fundo cônico para evaporação;
- Balões volumétricos certificados de 5, 10 e 50 mL;
- Frascos de vidro para armazenamento de soluções padrão;
- Tira universal de pH
- Filtro de seringa PTFE 13 mm, 0,2 µm (Agilent, China)
- Seringa
- Vidrarias comuns de laboratório

3.3 REAGENTES E SOLVENTES

- Acetato de sódio P.A. (Êxodo científica, Brasil)
- Acetonitrila grau HPLC (Macron, EUA)
- Ácido clorídrico P.A. (Synth, Brasil)
- Ácido fórmico (J.T.Baker, Brasil)
- Água Purificada em sistema Milli-Q ELIX
- Bondesil - C18, 40 µm (Varian)
- Cloreto de sódio P.A. (Êxodo científica, Brasil)
- Hidróxido de sódio P.A. (Vetec, Brasil)
- Sulfato de magnésio anidro (Sharlau, Brasil)

3.4 AGROTÓXICOS SELECIONADOS PARA ESTUDO

Neste estudo devido às características peculiares dos agrotóxicos do grupo das imidazolinonas, incluindo Imazapique e Imazetapir, foi necessário o desenvolvimento de dois métodos, sendo um específico para este grupo, e outro incluindo os demais agrotóxicos. Na tabela 2 encontram-se alguns dados como

classe, grupo químico, pureza do reagente utilizado e seu respectivo fabricante.

Tabela 2 - Agrotóxicos estudados com suas respectivas fórmulas moleculares, classes, grupos químicos, fabricantes e pureza dos materiais de referência utilizados

Agrotóxico	Fórmula molecular	Classe	Grupo químico	Fabricante	Pureza (%)
Acetocloro	C ₁₄ H ₂₀ ClNO ₂	Herbicida	Cloroacetanilida	Dr. Ehrenstorfer	98,5
Atrazina	C ₈ H ₁₄ ClN ₅	Herbicida	Triazina	Dr. Ehrenstorfer	99
Diurrom	C ₉ H ₁₀ Cl ₂ N ₂ O	Herbicida	Uréia	Dr. Ehrenstorfer	98
Dicamba	C ₈ H ₆ ClO ₃	Herbicida	Ácido benzóico	Accu Standard	98
Imazapique	C ₁₄ H ₁₇ N ₃ O ₃	Herbicida	Imidazolinona	Dr. Ehrenstorfer	98,5
Imazetapir	C ₁₅ H ₁₉ N ₃ O ₃	Herbicida	Imidazolinona	Sigma Aldrich	99,92
Metidationa	C ₆ H ₁₁ N ₂ O ₄ PS ₃	Inseticida	Organofosforado	Dr. Ehrenstorfer	96
2,4-D	C ₈ H ₆ ClO ₃	Herbicida	Ácido ariloxialcanóico	Dr. Ehrenstorfer	98

3.5 PREPARO DE SOLUÇÕES ANALÍTICAS

3.5.1 Preparo da solução estoque

As soluções estoques dos padrões de materiais de referências foram preparadas individualmente na concentração de 1000 mg L⁻¹. Separadamente cada padrão dos agrotóxicos em estudo foi pesado diretamente em um frasco de vidro e em seguida dissolvido em solvente orgânico adequado com o auxílio de um pipetador automático em volume exato previamente calculado. Após fechou-se o frasco e este foi agitado em vórtex e em seguida levado para banho de ultrassom a fim de solubilizar todo o material sólido. Estas soluções foram devidamente identificadas e armazenadas em congelador com temperatura controlada por termômetro a ≤ -18 °C.

3.5.2 Preparo de soluções analíticas de trabalho

As soluções analíticas de trabalho, na concentração de 10 mg L⁻¹ foram preparadas a partir das soluções estoque, para cada um dos agrotóxicos em estudo. Para isso, em balão volumétrico certificado de 10 mL adicionou-se aproximadamente metade do volume de acetonitrila, e com o auxílio de um pipetador automático, foram transferidos 100 µL da solução estoque. Após aferiu-se o menisco com acetonitrila e a solução foi homogeneizada em vórtex, transferida para frasco de vidro e armazenada em congelador com temperatura controlada por termômetro calibrado a ≤ -18 °C.

3.5.3 Preparo de solução mistura

Uma solução mistura contendo todos os agrotóxicos foi preparada na concentração de 1 mg L⁻¹ utilizando como solvente acetonitrila. Para isto, foi preparado um volume de 50 mL desta solução, onde inicialmente se colocou aproximadamente metade do volume de acetonitrila e em seguida se adicionou 50 µL de cada solução estoque dos agrotóxicos em questão, com o auxílio de um pipetador semiautomático calibrado. Em seguida o volume do balão foi completado com solvente e agitado vigorosamente. Após esta solução foi armazenada em frascos apropriados e armazenada em congelador com temperatura ≤ -18 °C, controlada por termômetro calibrado.

3.6 CONDIÇÕES CROMATOGRÁFICAS

Os métodos cromatográficos foram divididos em dois, um que compreende os agrotóxicos que possuem ionização no modo positivo e outro no modo negativo. Isso foi necessário devido à dificuldade inicial de determinação destes em um mesmo método, pois decorridos alguns testes, como o preparo de novas soluções, verificou-se da necessidade de um tempo maior de estabilização do equipamento entre cada corrida cromatográfica para os agrotóxicos com modo de ionização negativo, no caso o 2,4-D e o Dicamba.

3.6.1 Condições cromatográficas para agrotóxicos do modo de ionização positivo

- **Condições LC-MS/MS**

Volume de injeção: 2 uL

Fase móvel A: Acetonitrila 0,1% ácido fórmico

Fase móvel A: solução de ácido fórmico 0,1% em acetonitrila

Fase móvel B: solução aquosa de ácido fórmico 0,1%

Vazão fase móvel: 0,3 mL/min

Gradiente fase móvel:

0 min 10% A – 90%B

3,5 min 100% A

6 min 100% A

- **Parâmetros da fonte**

Temperatura do gás: 300 °C

Vazão do gás: 7.0 L/min

Nebulizer: 15 psi

Temperatura *sheath gas*: 250 °C

Vazão *sheath gas*: 11 L/min

Tabela 3 - Dados dos agrotóxicos que ionizam no modo positivo referentes a espectrometria de massas – LC-MS/MS

Agrotóxico	Tempo de retenção (min)	Precursor (m/z)	Produto MS1(m/z)	CE (V)	Produto MS2(m/z)	CE (V)	Modo de ionização
Acetocloro	5,2	270,1	224,2	9	148,1	17	Positivo
Atrazina	4,4	216,1	174,1	17	67,9	40	Positivo
Diuròm	4,47	233,0	160,1	29	72,0	21	Positivo
Imazapique	3,4	276,1	231,1	21	162,9	29	Positivo
Imazetapir	3,8	290,0	245,0	25	159,0	17	Positivo
Metidationa	4,8	303,0	144,9	5	84,9	17	Positivo

3.6.2 Condições cromatográficas para agrotóxicos do modo de ionização negativo

- **Condições LC-MS/MS**

Volume de injeção: 5 µL

Fase móvel A: solução de ácido fórmico 0,1% em acetonitrila

Fase móvel B: solução aquosa de ácido fórmico 0,1%

Vazão fase móvel: 0,3 mL/min

Gradiente fase móvel:

0 min 10% A – 90%B

3 min 100% A

4 min 100% A

5 min 10% A – 90% B

Post run: 3 min

- **Parâmetros da fonte**

Temperatura do gás: 300 °C

Vazão do gás: 7.0 L/min

Nebulizer: 15 psi

Temperatura *sheath gas*: 250 °C

Vazão *sheath gas*: 11 L/min

Tabela 4 - Dados dos agrotóxicos que ionizam no modo negativo referentes a espectrometria de massas – LC-MS/MS

Agrotóxico	Precursor (m/z)	Produto MS1 (m/z)	Tempo de retenção(min)	CE (V)	Modo de Ionização
2,4-D	219	160,7	4,3	-	Negativo
Dicamba	219	174,7	3,9	-	Negativo

3.7 PROCEDIMENTOS DE EXTRAÇÃO

Tendo em vista que os agrotóxicos da classe das imidazolinonas, neste caso o Imazetapir e Imazapique possuem características específicas que serão detalhadas posteriormente, foi necessário o desenvolvimento e aplicação de dois métodos de extração distintos, um apenas para esta classe de compostos e um método multirresidual para os demais agrotóxicos em estudo.

3.7.1 Procedimento de extração agrotóxicos da classe das imidazolinonas

Os herbicidas pertencentes à classe das imidazolinonas foram desenvolvidos entre na década de 1980 e 1990 e são utilizados no controle de diferentes espécies de plantas daninhas. Estes são absorvidos através das folhas e raízes das plantas e deslocados pelo floema e xilema a por fim são acumulados nos pontos de crescimento (KRAEMER et al., 2009) (SHANER; HORNFOR, 2005).

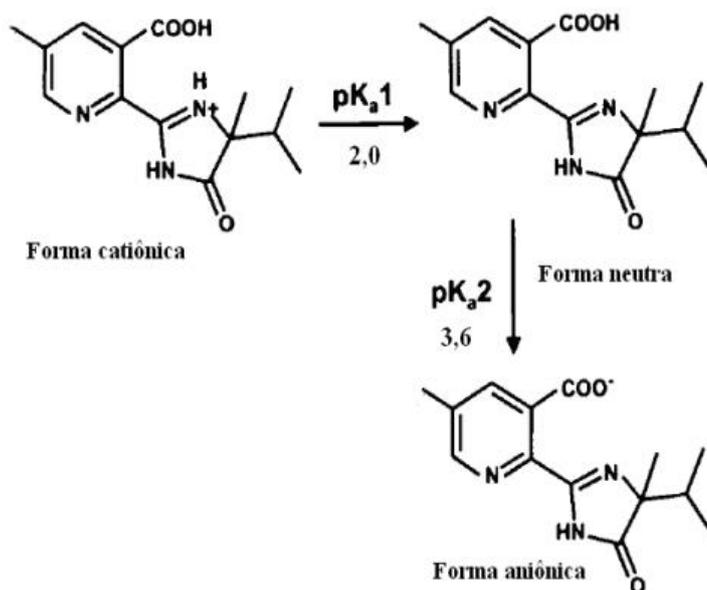
Após aplicação dos agrotóxicos o solo acaba sendo o destino final destes, seja por contato direto, escorrimento das folhas ou ainda quando a planta morre, esta é incorporada ao solo. Ao entrarem em contato com o mesmo, pode passar por diversos processos físico-químicos que irão regular o destino no meio ambiente. Entre os processos pode haver a retenção, lixiviação, fotodegradação, decomposição entre outros (OLIVEIRA; BRIGHENTI, 2011).

As imidazolinonas são persistentes no solo podendo ocasionar danos para as próximas culturas devido a seus resíduos. Estes dependem grandemente das características do solo, do manejo do solo bem como dos processos físico-químicos que ocorrem (KRAEMER et al., 2009).

Dentre as diversas características e fatores, os que mais influenciam na dinâmica destes é o pH da solução do solo e o teor de matéria orgânica. Visto que as imidazolinonas apresentam caráter anfótero, ou seja, podem apresentar caráter ácido ou básico dependendo do pH em que se encontram. Isto se deve pelo fato dessa classe possuir grupos ionizáveis em sua estrutura, onde de acordo com o pH onde se encontram, podem estar na forma ionizada, quando o valor do pH for superior a seu pKa, ou então na forma molecular quando o pH for menor que o seu valor de pKa. Além de ainda possuírem múltiplos valores de pKa's como observado nas figuras 17 e 18 (CHRISTOFFOLETI et al., 2008).

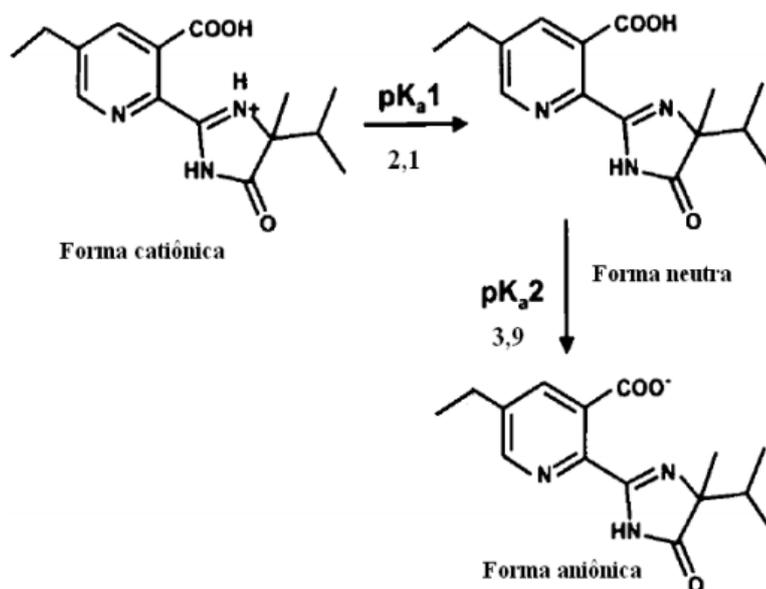
Sendo assim, quando o solo se apresenta em pH neutro ou alto, predomina a forma aniônica, estando fracamente ligado ao solo ou ainda repelido pelas cargas negativas dos colóides do solo, logo possui baixa adsorção. Quando o pH do solo é baixo, predominam as formas neutras e catiônicas, estando assim mais adsorvidos no solo (SHANER; HORNFOR, 2005).

Figura 17 - Equilíbrio iônico Imazapique



Adaptado de (SHANER; HORNFORN, 2005)

Figura 18 - Equilíbrio iônico Imazetapir



Adaptado de (SHANER; HORNFORN, 2005)

Logo esta relação entre pH e pKa dessa classe de herbicidas dificulta a etapa de extração de matrizes complexas como solo, e no caso em estudo a biomistura presente nas camadas biológicas, uma vez que há predominância de pH ácido nestes

ambientes. Geralmente a extração destes compostos é descrita na literatura de diferentes maneiras, como por exemplo, extração de fluido super crítico usando CO₂, extração em fase sólida (SPE), utilizando colunas de solo, entre outros. Existem ainda diversos artigos demonstrando o uso do método de QuEChERS modificado, empregando etapas adicionais de ajuste de pH e extração com solução alcalina (KEMMERICH et al., 2015).

Além do mais, métodos de extração de imidazolinonas, mais especificamente na matriz solo, são dificultados pelo fato da co-extração de muitas substâncias interferentes bem como dos baixos limites de detecção necessários (RAMEZANI et al., 2009).

A partir do método QuEChERS, houveram diversas modificações deste para que fosse possível a extração de imidazolinonas, que incluíam principalmente adaptações quanto a solvente de extração, sorventes para *clean-up* bem como tempo necessário para que, nos testes de recuperação, o analito pudesse interagir eficientemente com a matriz (DA COSTA MARINHO et al., 2019).

Um dos métodos tomados como base para o estudo foi o desenvolvido por (DA COSTA MARINHO et al., 2019) onde foi utilizado 5,0 g de amostra de solo, e para os testes de recuperação a amostra foi fortificada com solução contendo os agrotóxicos, homogeneizado por um minuto. Após, foi aguardado o solvente evaporar e então os tubos foram armazenados em ambiente escuro e mantidos a 4°C por 24h para que houvesse a sorção dos herbicidas no solo. Após foi adicionado 20 mL de uma solução saturada de hidróxido de cálcio (Ca(OH)₂) com pH 12 e agitado por um minuto e em seguida acrescentou-se 10 mL de acetonitrila e agitou-se novamente. Para a etapa de particionamento foram adicionados 4 g de sulfato de magnésio (MgSO₄) e 3 g de cloreto de sódio (NaCl). O pH foi ajustado para 3 com a adição de 390µL de ácido clorídrico (HCl) na concentração de 6 mol L⁻¹. Em seguida este foi centrifugado por 10 minutos a 3200 rpm. Então para a etapa de *clean-up*, 2 mL do extrato foram transferidos para tubo contendo 250 mg de MgSO₄ anidro agitado e centrifugado. Este extrato foi evaporado e redissolvido em água ultrapura, em seguida filtrado em cartucho Strata C18-E, que foi previamente condicionado e seguiu para análise em LC-MS/MS.

(RAMEZANI et al., 2009) desenvolveram um método de extração e *clean-up* para alguns agrotóxicos do grupo das imidazolinonas em solo. Durante o

desenvolvimento do método, foram testados diferentes solventes de extração, como cloreto de potássio (KCl) $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, hidróxido de sódio (NaOH) $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ e $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ e ainda $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ NaOH:MeOH (80:20) bem como diferentes cartuchos de SPE, sendo eles PPL, NH_2 + PPL e C18 + SCX. O método consistia em pesar 10 g de solo onde após fortificação e homogeneização, as amostras eram mantidas a 4°C pelo período de uma semana antes da extração. Como solvente de extração foram utilizados 40mL de NaOH $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ seguido de agitação por uma hora e posterior centrifugação por 10 minutos a 5860rpm. Após o sobrenadante foi acidificado até atingir pH 2 com HCl e seguiu para clean-up com o cartucho SPE C18 + SCX, sendo que estas foram as melhores condições, que demonstraram os melhores resultados dos testes realizados. E em seguida analisado por HPLC-DAD.

Visto todas estas especificidades para os agrotóxicos do grupo das imidazolinonas, buscou-se otimizar um método que fosse eficaz para essa classe e ainda para os demais agrotóxicos em estudo. Porém isto não foi possível, visto que grande parte dos métodos descritos na literatura para extração das imidazolinonas é feita em meio básico e posteriormente há a etapa de acidificação. Sendo assim foram feitos diferentes testes, como demonstrado na tabela 5.

Tabela 5 - Métodos testados para extração dos agrotóxicos em estudo

Ensaio	Nível de fortificação	Extração	Clean-up
1	50 ug kg ⁻¹	10 g amostra → 20mL acetona → turrax 20 seg., 3800rpm → 10mL isoctano + 10mL tolueno → turrax 20 seg., 3800rpm → centrifugação 5 min, 3300 rpm → Filtração de 2mL extrato em PTFE 0,2 µm → evaporação 1mL em concentrador → resuspensão em 1 mL de ACN:H2O (1:1)	--
2	50 ug kg ⁻¹ e 200 ug kg ⁻¹	10 g amostra → 10 mL água Milli-Q → 10 mL acetonitrila 1% ácido acético → agitação por 1 min → 4g MgSO ₄ + 1g AcNa → centrifugação 3 minutos a 4000 rpm	Filtração filtro PTFE 0,2 µm → diluição 1:1 em ACN:H2O
3	50 ug kg ⁻¹ e 200 ug kg ⁻¹	10 g amostra → 10 mL água Milli-Q → 10 mL acetonitrila 1% ácido acético → agitação por 1 min → 4g MgSO ₄ → centrifugação 3 minutos a 3500 rpm	Filtração filtro PTFE 0,2 µm → diluição 1:1 em ACN:H2O
4	50 ug kg ⁻¹ e 200 ug kg ⁻¹	5 g amostra → 30 mL de solvente extrator (acetona/H ₂ O/H ₃ PO ₄)(98:1:1) → ultraturrax 1 minuto → centrifugação 10 min, 3800 rpm a 20°C → evaporação 2mL em concentrador → resuspensão em 2 mL de ACN:H ₂ O (1:1)	Filtração filtro PTFE 0,2 µm → diluição 1:1 em ACN:H ₂ O
5	100 ug kg ⁻¹	5g amostra → 10mL acetonitrila → 1 min vórtex → ultrassom 30 min → centrifugação por 10 min, 3800rpm	Filtração em PTFE 0,2 µm → diluição 1:1 extrato + ACN:H ₂ O(1:1)
6	50 ug kg ⁻¹ e 200 ug kg ⁻¹	10g amostra → 10 mL H ₂ O → 30 seg. vórtex → 10mL ACN 1% Ác. Acético → 1 min vórtex → 4g MgSO ₄ + 1gAcNa → vórtex 1 min → centrifugação 3 min, 3500 rpm	Filtração em PTFE 0,2 µm → diluição 1:1 extrato + ACN:H ₂ O ambos 1% Ác. Fórmico (1:1)
7	50 ug kg ⁻¹ e 200 ug kg ⁻¹	10g amostra → 10 mL H ₂ O acidificada com ácido fosfórico (pH 2-3) → 30 seg. vórtex → 5mL ACN 1% Ác. Acético → 15 seg vórtex → 4g MgSO ₄ → vórtex 1 min → centrifugação 2 min, 5000 rpm → evaporação de 2 mL do extrato → resuspensão	Filtração em PTFE 0,2 µm → diluição 1:1 extrato + ACN:H ₂ O ambos 1% Ác. Fórmico (1:1)

		em 2mL ACN:H ₂ O ambos 1% Ác. Fórmico (1:1)	
8	50 ug kg ⁻¹ e 200 ug kg ⁻¹	5 g amostra → 20mL solução saturada de KOH (pH 13,08) → vortex por 1 min. → 10 mL acetonitrila → vortex 1 min → 4g MgSO ₄ + 3g NaCl → vortex 1 min → adição de 390 µL HCl 6 mol L ⁻¹ , para ajuste de pH 3 → centrifugação por 10 min a 4000 rpm	Trasferir 2 mL sobrenadante para tubo contendo 250mg MgSO ₄ + 200mg C18, após centrifugação, evaporação de 1,2 mL e resuspensão no mesmo volume com ACN:H ₂ O, filtração em filtro PTFE 0,2 µm → diluição 1:1 em ACN:H ₂ O
9	50 ug kg ⁻¹ e 200 ug kg ⁻¹	5g amostra → 10 mL acetato de amônio 0,5 mol L ⁻¹ (pH 6,84) → vortex 1 min + 15 seg turrax → centrifugação 5 min 4000 rpm	transferir 2 mL para tubo contendo 125 mg de PSA, após centrifugação, filtração com PTFE 0,2 µm. Adição de HCl 6M até pH 3 → diluição 1:1 em ACN:H ₂ O
10	50 ug kg ⁻¹ e 200 ug kg ⁻¹	5g amostra → 20 mL solução de NH ₄ OH 1 mol L ⁻¹ → vortex 1 min → 10 mL ACN → mesa agitadora 30 min → 4g MgSO ₄ + 3g NaCl → vortex 1 min → adição de 800µL de HCl 6M (pH 3) → centrifugação por 10 min a 3200rpm	Trasferir 2 mL sobrenadante para tubo contendo 250mg MgSO ₄ + 200mg C18, após centrifugação, evaporação de 1,2 mL e resuspensão no mesmo volume com ACN:H ₂ O → filtração em filtro PTFE 0,2 µm → diluição 1:1 em ACN:H ₂ O
11	50 ug kg ⁻¹ e 200 ug kg ⁻¹	5 g amostra → 20mL solução de NaOH 0,5 mol L ⁻¹ (pH 13) → vortex por 1 min. → 10 mL acetonitrila → vortex 1 min → 4g MgSO ₄ + 3g NaCl → vortex 1 min → adição de 390 µL HCl 6M, para ajuste de pH 3 → centrifugação por 10 min a 4000 rpm	Trasferir 2 mL sobrenadante para tubo contendo 250mg MgSO ₄ + 200mg C18, após centrifugação, avaporação de 1,2 mL e resuspensão no mesmo volume com ACN:H ₂ O → filtração em filtro PTFE 0,2 µm → diluição 1:1 em ACN:H ₂ O
12	50, 100 e 200 ug kg ⁻¹	5 g amostra → 20mL solução de NaOH 0,5 mol L ⁻¹ (pH 13) → vortex por 1 min. → 10 mL acetonitrila → vortex 1 min → 4g MgSO ₄ + 3g NaCl → vortex 1 min → adição de 1,105mL HCl concentrado, para ajuste de pH 3 → adição de 1mL tampão (Ác. Fórmico/ Formiato de amônio) → centrifugação por 10 min a 4000 rpm	Trasferir 2 mL sobrenadante para tubo contendo 250mg MgSO ₄ + 200mg C18, após centrifugação, evaporação de 1,2 mL e resuspensão no mesmo volume com ACN:H ₂ O → filtração em filtro PTFE 0,2 µm → diluição 1:1 em ACN:H ₂ O

Depois de realizados os testes, constatou-se que não seria possível a execução de um único método para todos os compostos, sendo que o ensaio 12 da tabela 5 foi o selecionado para os agrotóxicos do grupo das imidazolinonas, neste caso o Imazapique e Imazetapir, e o ensaio 2 para os demais agrotóxicos em estudo. A escolha se deu pelo fato de apresentarem os melhores resultados nos testes de recuperação.

Depois de definido o melhor teste, o próximo passo foi a otimização. Inicialmente os testes se basearam em se realmente era necessário o tempo de 24h ou mais, como citado em artigos já descritos anteriormente, para que os compostos interagissem com a matriz. Para isso, fortificaram-se três amostras “branco”, ou seja, livre dos compostos de interesse, na concentração de $100 \mu\text{g kg}^{-1}$ agitou-se por um minuto em vórtex e foi deixado na refrigerador pelo período de 24h antes da extração. Outras três amostras “branco” foram fortificadas e agitadas antes de se iniciar o processo de extração. Procedeu-se o processo de extração como citado na tabela 5 no ensaio 12 e em seguida injetou-se em LC-MS/MS.

Os resultados deste teste estão demonstrados na tabela 6, onde pode se perceber que não há muita diferença entre os resultados, sendo que a fortificação no dia obteve melhores recuperações se comparados a fortificação por 24h. Desta forma, os testes seguintes foram executados utilizando a fortificação no dia.

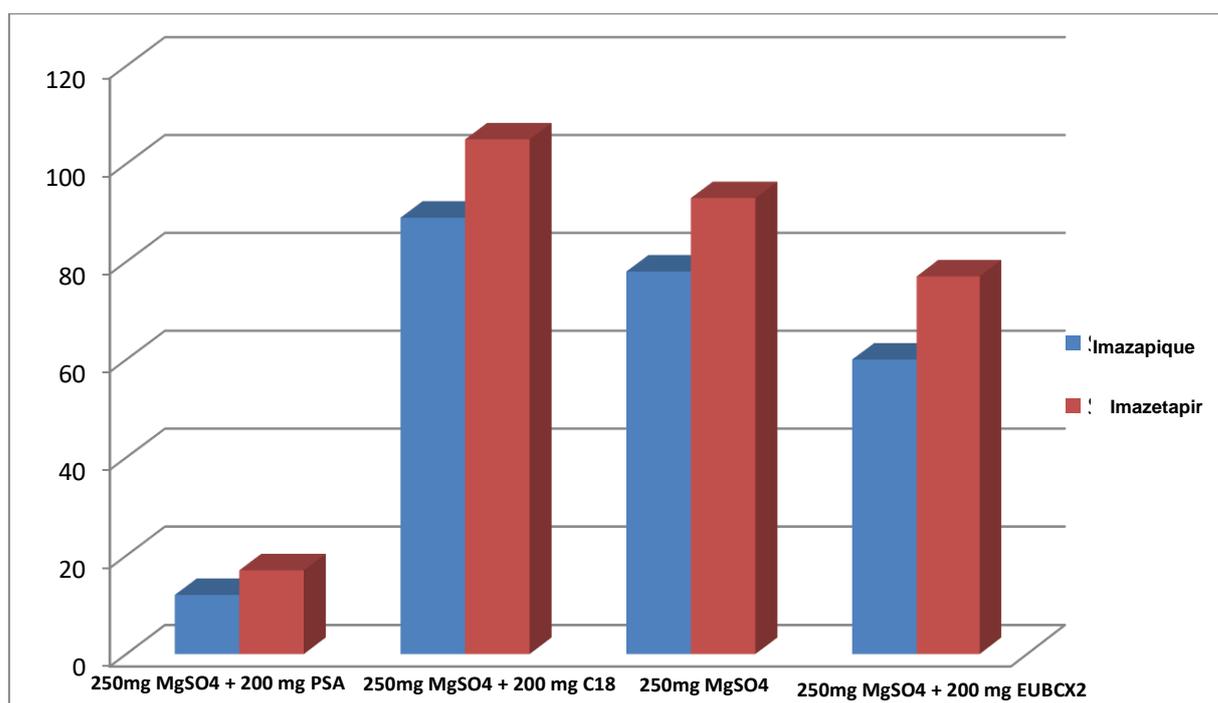
Tabela 6 - Teste imidazolinonas com fortificação 24h antes e no dia da extração.

Agrotóxico	Fortificação a $100 \mu\text{g kg}^{-1}$ (24h)		Fortificação a $100 \mu\text{g kg}^{-1}$ (no dia)	
	Rec %	RSD	Rec %	RSD
Imazapique	76	1	89	2
Imazetapir	81	2	105	4

Após, foi realizado um teste a fim de verificar se haveria muita diferença nos resultados levando em conta a questão do pH, onde o utilizado é o pH 3, porém foi testado o pH 2. Os resultados da recuperação % para o pH 2, foram de 115% e 126% para o Imazapique e Imazetapir, respectivamente. Logo, foi mantido o pH 3 usado anteriormente, pois o pH 2, além de apresentar recuperações mais elevadas, também promoveu uma maior extração de coextrativos, deixando o extrato mais “sujo”.

Por fim, foi realizada uma avaliação do melhor *clean-up* a ser utilizado, pois devido ao pH final ser baixo, isto promove a retirada de muitos coextrativos junto ao extrato final. Na figura 19 é possível observar os diferentes tipos de *clean-up* utilizados, bem como os resultados referentes ao percentual de recuperação obtido em cada um e para cada composto, onde os melhores resultados foram obtidos utilizando 250mg de MgSO₄ + 200mg C18.

Figura 19 - Gráfico das recuperações % obtidos com os diferentes tipos de *clean-up* utilizados



3.7.2 Procedimento de extração método multirresíduo

Os agrotóxicos são amplamente utilizados na agricultura a fim de se conseguir um aumento na produção, pelo fato de evitar e controlar o ataque de pragas e doenças, bem como na preservação e armazenamento de grãos, por exemplo. Estes podem ser subdivididos em diversas classes seja quanto a sua toxicidade ou ao organismo alvo. Porém, existe a preocupação quanto aos resíduos, sejam eles no próprio alimento, podendo desencadear doenças ou ainda quando estes acabam por contaminar solo e águas (OSHITA; JARDIM, 2015).

Visto o grande número de agrotóxicos existentes e utilizados mundialmente, com diferentes classes e características, tem-se a necessidade de métodos

abrangentes, onde seja possível tanto a extração bem como análise destes em conjunto (FERNÁNDEZ-ALBA; GARCÍA-REYES, 2008). Desta maneira, uma das etapas fundamentais no desenvolvimento métodos multirresiduais é a escolha do solvente utilizado na extração. Para que um solvente seja considerado ideal, este deve ser compatível tanto com os analitos, com o preparo da amostra bem como com o modo de análise, neste caso a cromatografia (MAŠTOVSKÁ; LEHOTAY, 2004).

Um exemplo de método multirresidual, que cobre uma ampla gama de agrotóxicos, desde polares até os apolares, em diversos tipos de matrizes, é o QuEChERS, assim denominado devido a sua sigla, do inglês *Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged, Safe*. Este método envolve uma extração inicial em fase única com acetonitrila seguida por uma etapa de particionamento com sulfato de magnésio e cloreto de sódio. Uma etapa posterior de remoção de água e limpeza é realizada simultaneamente, utilizando sulfato de magnésio ($MgSO_4$) e amina primária secundária (PSA), esta etapa também pode ser denominada de extração em fase sólida dispersiva (d-SPE) (ANASTASSIADES et al., 2003).

Após a ascensão do método de extração original, algumas modificações foram realizadas a fim de melhorar as recuperações de agrotóxicos sensíveis à mudanças de pH, desenvolvendo assim o método QuEChERS tamponado. Desta forma, as diferenças para o método original foram: o solvente de extração utilizado que ao invés de apenas acetonitrila, esta passou a ser acidificada com 1% ácido acético, cloreto de sódio (NaCl) foi substituído por acetato de sódio (AcNa) e por fim a quantidade de amostra foi alterada para 15 gramas (LEHOTAY; MAŠTOVSKÁ; LIGHTFIELD, 2005).

Desenvolvido inicialmente para extração de agrotóxicos em frutas e vegetais com alto teor de água, o método QuEChERS atualmente é utilizado para diferentes matrizes, como por exemplo em solo. Este que apesar de ser uma matriz complexa, sendo a extração uma das etapas críticas da análise, devido às características físico-químicas de cada tipo de solo, vem demonstrando bons resultados com o método citado, seja ele original ou com modificações. As principais modificações do método original incluem a hidratação e tamanho da amostra, bem como solvente de extração e o volume destes, quantidades dos sais e diferentes adsorventes d-SPE (PSZCZOLINSKA; MICHEL, 2016)(VERA et al., 2013).

A etapa de hidratação para amostras secas, como o solo, é essencial para o enfraquecimento das interações do analito com a matriz, e ainda permitindo que os poros da amostra se tornem mais acessíveis, facilitando a extração (VERA et al., 2013).

Desta forma, o método que apresentou os melhores resultados para os seguintes agrotóxicos: 2,4-D, Acetoclor, Atrazina, Dicamba, Diurom, Metidationa, foi o QuEChERS tamponado, onde o procedimento está descrito na tabela 5, como “ensaio 2”.

3.8 VALIDAÇÃO DE MÉTODO INDIVIDUAL – IMIDAZOLINONAS

3.8.1 Curva analítica e Linearidade

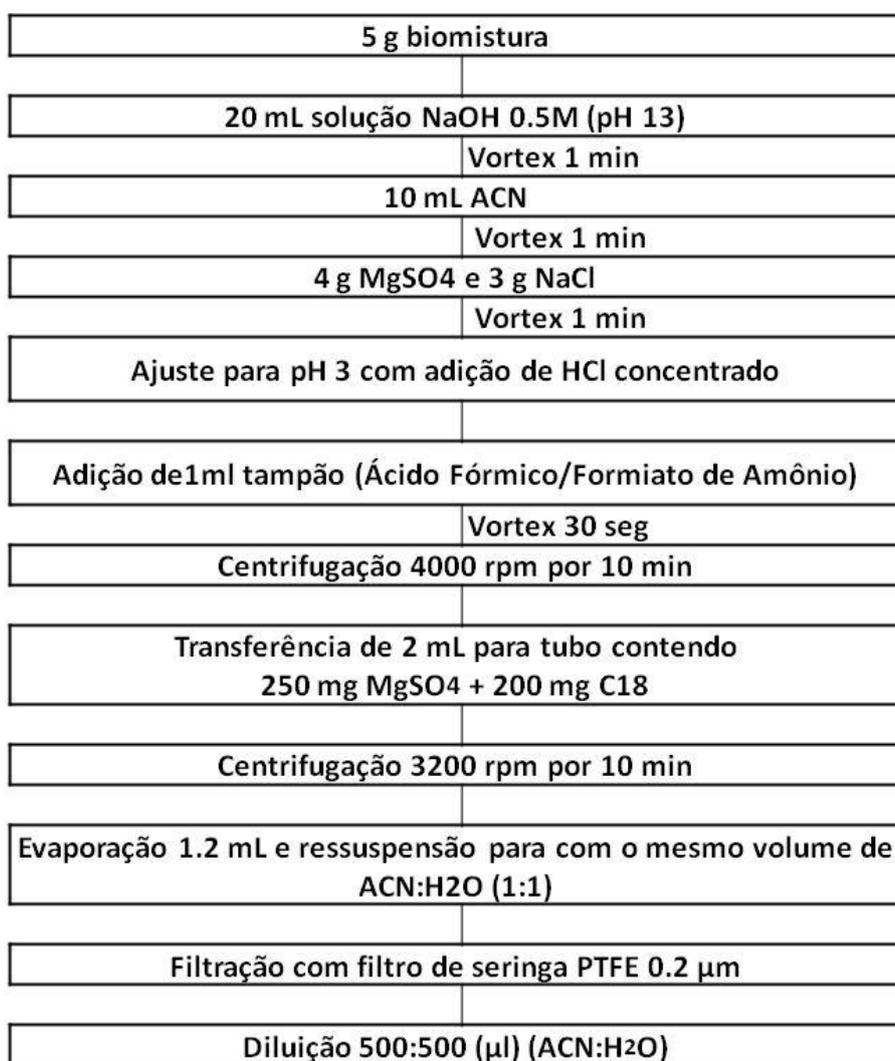
A linearidade das curvas analíticas foi avaliada através da resposta do sinal dos analitos presentes em soluções analíticas em sete concentrações, 2,5; 5; 12,5; 25; 50; 100; 250 $\mu\text{g L}^{-1}$, preparadas tanto em solvente orgânico (Acetonitrila), quanto no extrato “branco” da matriz, neste caso a biomistura. Essas soluções foram injetadas em condições de repetibilidade, sete vezes cada ponto, incluindo ainda o “branco” matriz e “branco” solvente.

A partir da área de cada pico cromatográfico, em cada uma das concentrações, foi calculada a área média das sete replicatas. Após, foi calculado o coeficiente de determinação (r^2), bem como os resíduos das curvas analíticas, preparadas em extrato “branco” da matriz.

3.8.2 Exatidão

Os estudos de fortificação e recuperação foram realizados a partir da fortificação de amostras da biomistura “branco” com solução analítica contendo os analitos de interesse nas concentrações 20; 50 e 100 $\mu\text{g kg}^{-1}$, adicionando-se 100, 250 e 500 μL respectivamente da solução 1 mg L^{-1} . Após seguiu-se a extração detalhada na figura 20.

Figura 20 - Fluxograma do procedimento de extração de agrotóxicos do método das Imidazolinonas.



3.8.3 Precisão e Precisão Intermediária

A precisão em termos de repetitividade, ou seja, a concordância entre os resultados obtidos nas mesmas condições foi avaliada pela injeção de sete vezes cada nível das fortificações.

A precisão intermediária, avaliada a partir do grau de concordância entre resultados obtidos nos ensaios de fortificação/recuperação, conforme descrito no item 2.6.5, em condições diferentes, neste caso alternando o dia bem como analista.

3.9 VALIDAÇÃO DO MÉTODO MULTIRRESIDUAL

3.9.1 Curva analítica e Linearidade

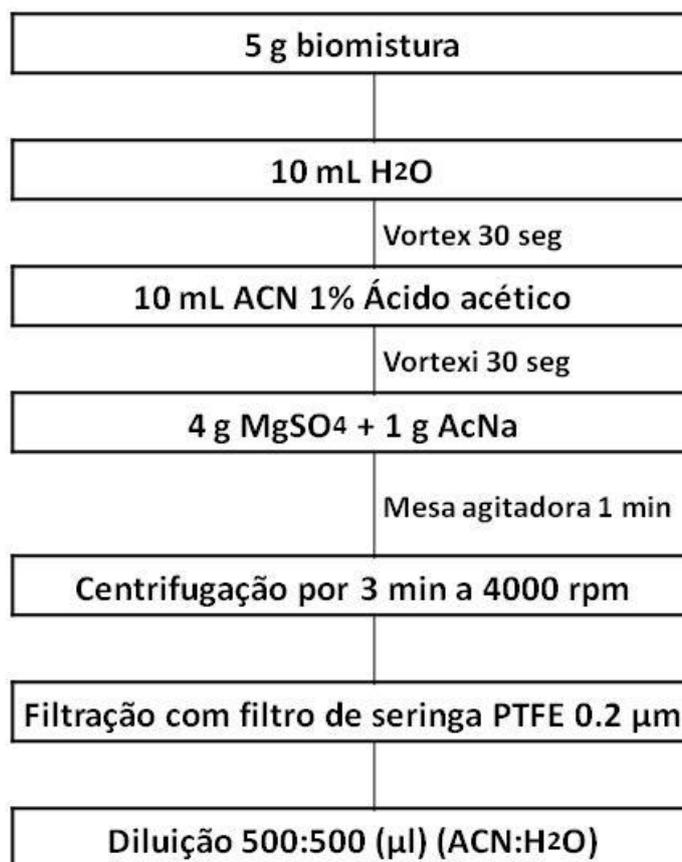
A linearidade das curvas analíticas foi avaliada através da resposta do sinal dos analitos presentes em sete concentrações, 2; 5; 25; 50; 100; 200 e 500 $\mu\text{g L}^{-1}$, preparadas tanto em solvente orgânico (Acetonitrila), quanto no extrato “branco” da matriz, neste caso a biomistura. Essas soluções foram injetadas em condições de repetibilidade, sete vezes cada ponto, incluindo ainda o “branco” matriz e “branco” solvente.

A partir da área de cada pico cromatográfico, em cada uma das concentrações, foi calculada a área média das sete replicatas. Após, foi calculado o coeficiente de determinação (r^2), bem como os resíduos das curvas analíticas, preparadas em extrato “branco” da matriz.

3.9.2 Exatidão

Os estudos de fortificação e recuperação foram realizados a partir da fortificação de amostras da biomistura “branco” com solução analítica contendo os analitos de interesse nas concentrações 20; 50; 100 e 150 $\mu\text{g kg}^{-1}$, adicionando-se 100, 250, 500 e 750 μL respectivamente da solução 1 mg L^{-1} e realizada a extração conforme o procedimento descrito na figura 21.

Figura 21 - Fluxograma do procedimento de extração de agrotóxicos do método das Multirresidual.



3.9.3 Precisão e Precisão Intermediária

A precisão em termos de repetitividade, ou seja, a concordância entre os resultados obtidos nas mesmas condições foi avaliada pela injeção de sete vezes cada nível das fortificações.

A precisão intermediária, avaliada a partir do grau de concordância entre resultados obtidos nos ensaios de fortificação/recuperação, conforme descrito no item 2.6.5, em condições diferentes, neste caso alternando o dia e o analista.

3.10 AMOSTRAS

As camas biológicas utilizadas para a avaliação da eficácia de degradação dos agrotóxicos em estudo foram preparadas na Estação Experimental Uva e Vinho de Vacaria-RS. Do total de quatro reatores, três deles foram contaminadas com os

agrotóxicos em estudo os quais foram possível a obtenção comercial destes e um destes serviu de “branco”.

Para o preparo da biomistura usada em todos os reatores, foram utilizadas duas partes de palha de trigo triturada, em um tamanho médio de 2 cm, uma parte de solo agrícola obtido de um pomar de maçãs, do qual foi retirado 10 cm da camada superficial e uma parte de turfa comercial. Esses componentes foram misturados diretamente dentro dos reatores buscando evitar a formação de camadas heterogêneas.

As doses aplicadas de cada um dos agrotóxicos estão descritos na tabela 7. Após a contaminação, foram realizadas coletas após diferentes períodos.

Tabela 7 - Agrotóxicos descartados nas camas biológicas, suas respectivas concentrações dos produtos formulados e o volume utilizado de cada um.

Agrotóxico	Nome do produto comercial	Concentração do produto formulado (g/L)	Volume do produto formulado utilizado (mL)	Volume de água em que o produto formulado foi diluído (L)
2,4-D	2,4 - D Nortox	670	100	10
Atrazina	Siptran	500	250	10
Dicamba	Atectra	480	10	1
Diurum	Stone	350	40	10
Imazetapir	Vezir	106	50	10
Metidationa	Suprathion	400	10	10

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 VALIDAÇÃO DO MÉTODO INDIVIDUAL – IMIDAZOLINONAS

Após definidas as melhores condições do método cromatográfico para a separação e quantificação do Imazetapir e Imazapique, que são os dois agrotóxicos da classe das imidazolinonas em estudo, realizou-se a validação do método analítico conforme os parâmetros a seguir.

4.1.1 Curva analítica e Linearidade

As equações das curvas analíticas em extrato “branco” de matriz e em solvente (acetonitrila), o coeficiente de determinação e o intervalo linear para cada pesticida encontram-se na tabela 8.

A linearidade das curvas analíticas foi avaliada a partir de injeções de soluções analíticas preparadas em solvente orgânico, neste caso a acetonitrila, e em extrato “branco” da matriz, no caso a biomistura, nas concentrações de 2,5; 5; 12,5; 25; 50; 100 e 250 $\mu\text{g L}^{-1}$. Sendo que cada solução foi analisada sete vezes e por fim foi feito a média entre as áreas para cada ponto, de cada solução.

Tabela 8 - Parâmetros das curvas analíticas obtidos para os agrotóxicos analisados por HPLC-MS/MS a partir das soluções 2,5; 5; 12,5; 25, 50, 100, 250 $\mu\text{g L}^{-1}$

Agrotóxico	Curva em extrato "branco" de matriz	r^2	Curva em solvente	r^2	Faixa Linear
Imazapique	$y = 609x - 573,7$	0,997	$y = 265,9x - 1437$	0,995	12,5 – 1.250 $\mu\text{g kg}^{-1}$
Imazetapir	$y = 372,9x - 259,3$	0,997	$y = \frac{215,4x - 67,98}{67,98}$	0,999	12,5 – 1.250 $\mu\text{g kg}^{-1}$

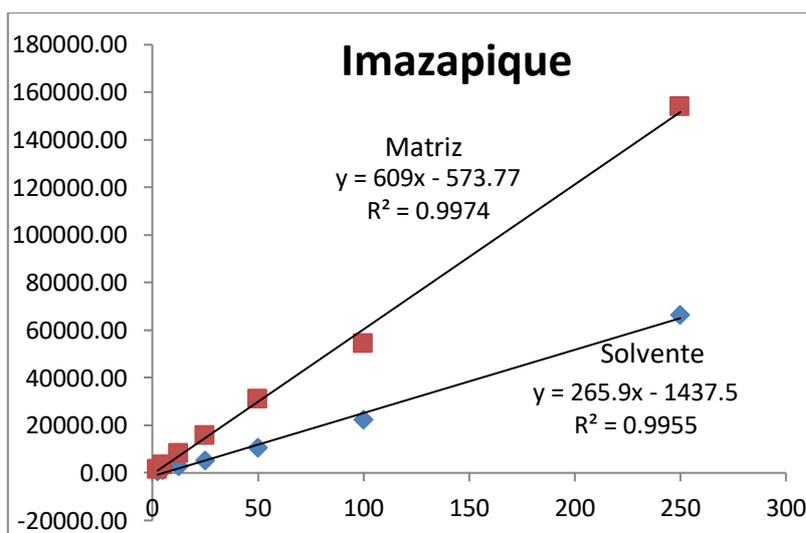
A partir da tabela 8, é possível observar que ambos os agrotóxicos apresentam coeficiente de determinação maior que 0,990. Para se confirmar a faixa linear de cada um dos agrotóxicos, foram analisados os resíduos das curvas analíticas preparadas em extrato “branco” de matriz, onde foram consideradas as concentrações na qual os desvios estavam dentro do limite considerado por DG-SANTE (2019), de $\pm 20\%$.

4.1.2 Efeito Matriz

O efeito matriz promove um aumento ou supressão da resposta do detector na presença de um analito no extrato da matriz comparado a este em solvente orgânico.

Comparando-se os sete pontos das curvas analíticas preparadas tanto em extrato “branco” da matriz como em solvente orgânico, pode se perceber que existe uma diferença na inclinação das retas das curvas analíticas, devido ao efeito matriz, como pode ser visto na figura 22 para imazapique, sendo que o Imazetapir teve o mesmo comportamento.

Figura 22 - Comparação entre curvas analíticas obtidas a partir de solução analítica de Imazapique preparadas em solvente (Acetonitrila) e em extrato "branco" da matriz



Os valores do efeito matriz calculado a partir dos coeficientes angulares, como demonstrado na equação em 2.6.6, mostram que para o Imazapique e Imazetapir o efeito matriz foi de 129% e 73% respectivamente. Estes altos valores de efeito matriz se devem pelo fato de a biomistura ser considerada uma matriz complexa, visto a diversidade de materiais que nela se encontram, bem como o método de extração utilizado para a classe das imidazolinonas, onde existe uma grande variação de pH, ocasionando assim a extração conjunta de um elevado teor de coextrativos.

4.1.3 Limites de detecção e quantificação

O limite de detecção (LD) do método para ambos os herbicidas foi de $12,5 \mu\text{g kg}^{-1}$, sendo este considerado a partir da curva da linearidade, como a concentração mais baixa injetada.

O limite de quantificação (LQ) do método é estabelecido a partir dos ensaios de fortificação/recuperação, como o nível mais baixo de fortificação que atende aos critérios de recuperação entre 70 e 120% e precisão RSD $\leq 20\%$ aceitáveis. Assim, o LQ para o método em estudo foi de $20 \mu\text{g kg}^{-1}$.

Não foi encontrado método específico na literatura, a fim de comparação, para a matriz em questão (biomistura), visto que é um sistema recente e que demanda estudos referentes à eficácia dos biobeds para diferentes classes de agrotóxicos. Assim, buscou-se comparar os limites obtidos com um estudo já existente, porém realizado para a matriz solo, onde foi desenvolvido um método para a determinação do tempo de meia-vida destes herbicidas, onde para imazetapir e imazapique os LD foram de 2,2 e $2,0 \mu\text{g kg}^{-1}$ e LQ de 6,6 e $6,1 \mu\text{g kg}^{-1}$ respectivamente (DA COSTA MARINHO et al., 2019).

Em outro trabalho, onde estes pesticidas também foram determinados em solo, os LD e LQ foram de 1,5 e $5,0 \mu\text{g kg}^{-1}$ respectivamente, para ambos os herbicidas (KEMMERICH et al., 2015). Os valores dos limites, tanto de detecção quanto de quantificação citados, foram abaixo dos encontrados neste estudo e se devem ao fato de que apesar do solo ser uma matriz complexa, não é tanto quanto a biomistura de biobed, que além de solo, inclui ainda principalmente palha e turfa, o que dificulta ainda mais a extração dos agrotóxicos.

4.1.4 Exatidão

Os valores de recuperação média com os respectivos RSD% estão descritos na tabela 9. Estes valores foram obtidos a partir do estudo de fortificação/recuperação realizado em 7 replicatas ($n=7$) para cada nível de concentração, onde foram calculados os valores recuperados frente ao valor da respectiva fortificação.

Tabela 9 - Valores médios (n=7) de recuperação e RSD%, nos estudos de fortificação/recuperação em três diferentes níveis de fortificação, sendo 20, 50 e 100 $\mu\text{g kg}^{-1}$

Agrotóxico	Nível de fortificação 20 $\mu\text{g kg}^{-1}$		Nível de fortificação 50 $\mu\text{g kg}^{-1}$		Nível de fortificação 100 $\mu\text{g kg}^{-1}$	
	Recuperação média %	RSD %	Recuperação média %	RSD %	Recuperação média %	RSD %
Imazapique	79	6	71	3	70	4
Imazetapir	82	7	73	8	71	7

Os resultados obtidos no estudo de fortificação/recuperação estão todos dentro dos limites aceitáveis, que segundo o DG-SANTE 2019, onde a recuperação deve de estar entre 70 – 120% e o RSD \leq 20%, logo são considerados satisfatórios.

4.1.5 Precisão e Precisão Intermediária

Para o estudo da precisão e precisão intermediária, o mesmo procedimento foi realizado pela primeira vez por um analista A, e em um diferente dia por uma diferente pessoa, esta denominada de analista B, o mesmo procedimento fora realizado a fim de se garantir a eficiência do método. Os resultados de recuperação média e RSD% encontrados para cada analista encontram-se na tabela 10.

Estes demonstram ser satisfatórios, visto que atendem aos critérios do DG-SANTE 2019, já citados anteriormente no item 4.1.4.

Tabela 10 - Valores médios (n=7) de recuperação e RSD%, nos estudos de fortificação/recuperação em três diferentes níveis de fortificação, com dois diferentes analistas, para os níveis de concentração 20, 50 e 100 $\mu\text{g kg}^{-1}$

Agrotóxico	Nível de fortificação 20 $\mu\text{g kg}^{-1}$				Nível de fortificação 50 $\mu\text{g kg}^{-1}$				Nível de fortificação 100 $\mu\text{g kg}^{-1}$			
	Analista A		Analista B		Analista A		Analista B		Analista A		Analista B	
	Recuperação média %	RSD %	Recuperação média %	RSD %	Recuperação média %	RSD %	Recuperação média %	RSD %	Recuperação média %	RSD %	Recuperação média %	RSD %
Imazapique	79	6	72	9	71	3	70	11	70	4	70	5
Imazetapir	82	7	74	7	73	8	77	6	71	7	70	8

4.2 VALIDAÇÃO MÉTODO MULTIRRESIDUAL

O método multirresidual compreende seis agrotóxicos, o 2,4-D, Acetocloro Atrazina, Dicamba, Diurom e Metidationa. Apesar de o método de extração ser igual para estes, o método cromatográfico se difere, principalmente pelo fato de o 2,4-D e o Dicamba serem compostos com o modo de ionização negativo.

4.2.1 Curva analítica e Linearidade

A linearidade das curvas analíticas foi avaliada a partir de injeções de soluções analíticas preparadas em solvente orgânico, neste caso a acetonitrila, e em extrato “branco” da matriz, no caso a biomistura, nas concentrações de 2; 5; 25; 50; 100; 200 e 500 $\mu\text{g L}^{-1}$. Sendo que cada solução foi analisada sete vezes e por fim foi feito a média entre as áreas para cada ponto, de cada solução.

As equações das curvas analíticas em extrato “branco” de matriz e em solvente orgânico (acetonitrila), o coeficiente de determinação e o intervalo linear para cada pesticida encontram-se na tabela 11.

Tabela 11 - Parâmetros das curvas analíticas obtidos para os agrotóxicos analisados por HPLC-MS/MS a partir das soluções 2; 5; 25; 50; 100; 200 e 500 $\mu\text{g L}^{-1}$

Agrotóxico	Curva em extrato "branco" de matriz	r^2	Curva em solvente	r^2	Faixa Linear
2,4 - D	$y = 183,3x - 687,0$	0,999	$y = 238,6x - 636,1$	0,999	20 - 400 $\mu\text{g kg}^{-1}$
Acetocloro	$y = 44,72x + 81,31$	0,999	$y = 44,63x + 62,56$	0,999	20 - 800 $\mu\text{g kg}^{-1}$
Atrazina	$y = 1194,5x + 4397,4$	0,998	$y = 1301,4x + 7998,8$	0,998	20 - 800 $\mu\text{g kg}^{-1}$
Dicamba	$y = 140,1x + 121,8$	0,999	$y = 177,6x + 77,01$	0,999	20 - 2.000 $\mu\text{g kg}^{-1}$
Diurom	$y = 147,6x + 513,9$	0,999	$y = 152,8x + 604,0$	0,999	8 - 800 $\mu\text{g kg}^{-1}$
Metidationa	$y = 11,15x + 13,03$	0,999	$y = 11,78x + 12,64$	0,999	20 - 800 $\mu\text{g kg}^{-1}$

As curvas analíticas tanto em extrato “branco” da matriz como em solvente de todos os agrotóxicos estudados apresentaram os coeficientes de determinação (r^2) \geq 0,998, demonstrando assim um indicativo da linearidade do método proposto.

Para a determinação da faixa linear, além do coeficiente de determinação, foram observados os resíduos da curva analítica preparada em extrato “branco” da matriz para cada agrotóxico. De acordo com o DG-SANTE 2019, os resíduos não devem estar fora da faixa de $\pm 20\%$. Assim, as concentrações nas quais os resíduos permaneceram fora dos $\pm 20\%$, foram consideradas fora da faixa linear.

Figura 23 – Desvios (em %) de concentração calculados da curva analítica do herbicida Acetocloro obtida a partir de soluções analíticas preparadas em extrato "branco" da matriz.

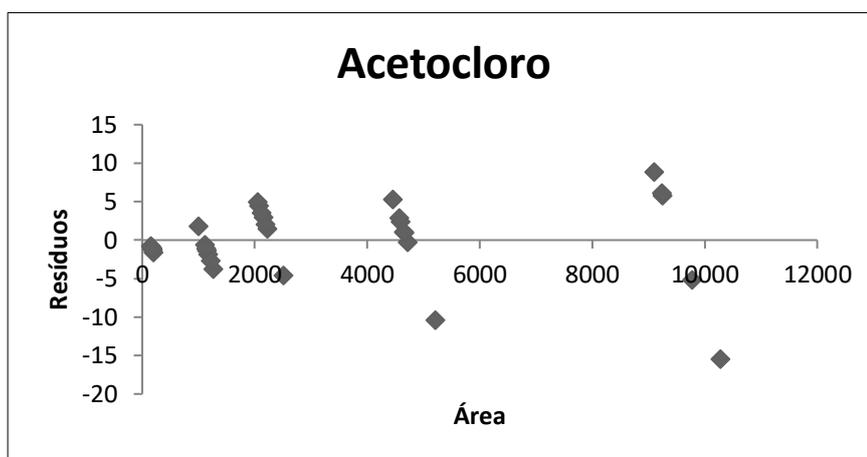
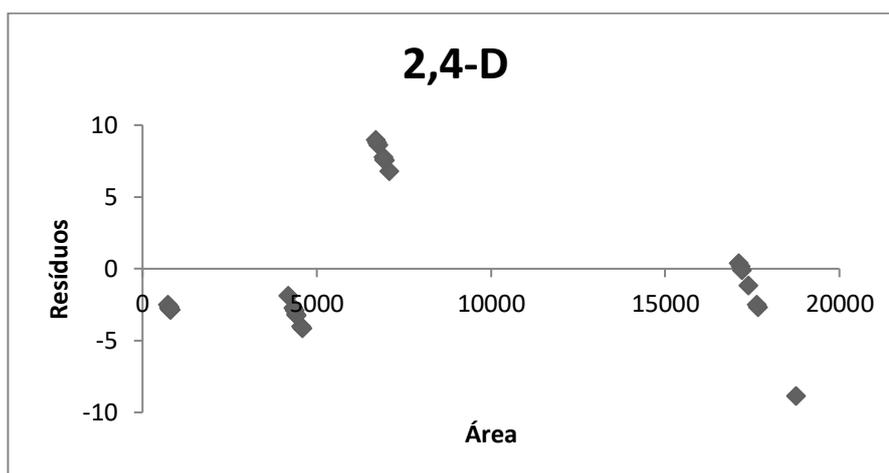


Figura 24 - Desvios (em %) de concentração calculados da curva analítica do herbicida 2,4 - D obtida a partir de soluções analíticas preparadas em extrato "branco" da matriz



4.2.2 Efeito Matriz

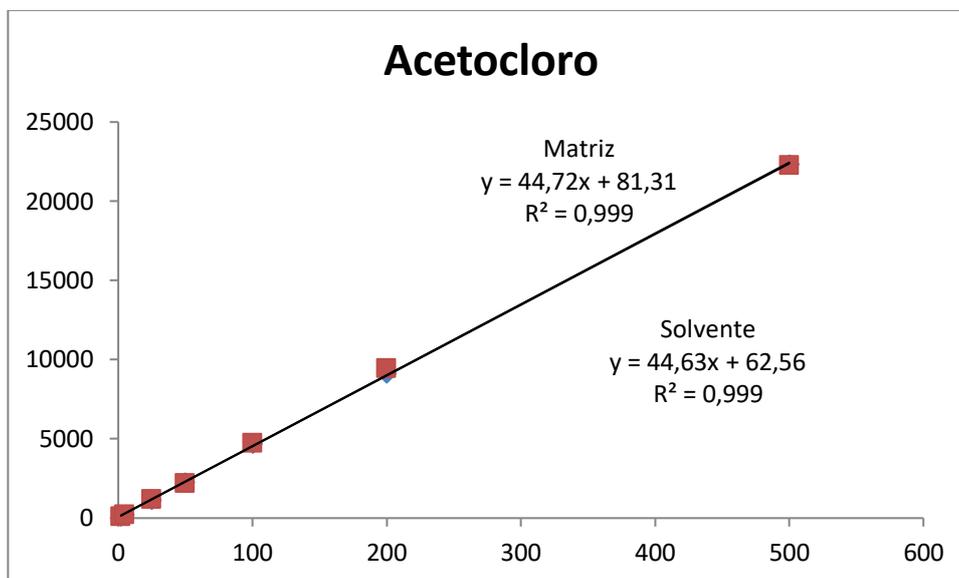
O efeito matriz é observado quando se tem um aumento ou supressão na resposta do detector quando comparado o analito em solvente orgânico e no extrato “branco” da matriz.

A partir da equação descrita no item 2.6.6, o efeito matriz foi calculado e é demonstrado na tabela 12. Para maioria dos compostos foi observada uma supressão no sinal, levando a valores de efeito matriz negativos, com exceção do Acetocloro, que apresentou efeito matriz de 0,21%, quase não sendo perceptível este efeito, se observado a figura 25 onde tanto a curva em solvente orgânico quanto em extrato “branco” da matriz ficaram praticamente sobrepostas.

Tabela 12 - Efeito matriz percentual dos agrotóxicos analisados por HPLC-MS/MS a partir de soluções preparadas em solvente orgânico (Acetonitrila) e em extrato "branco" de matriz.

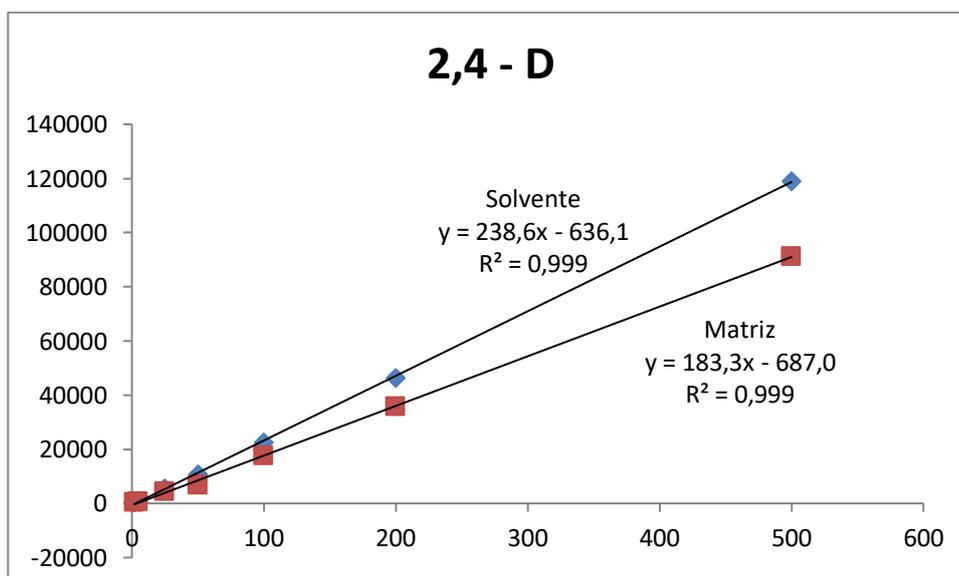
Agrotóxico	Efeito Matriz (%)
2,4 - D	-23,16
Acetocloro	0,21
Atrazina	-8,22
Dicamba	-21,12
Diurom	-3,37
Metidationa	-5,38

Figura 235 - Comparação entre curvas analíticas obtidas a partir de solução analítica de Acetocloro preparadas em solvente orgânico (Acetonitrila) e em extrato "branco" da matriz



Ao contrário do Acetocloro, o 2,4-D foi entre os agrotóxicos estudados, o que apresentou a maior supressão de sinal, fato observado pelo valor negativo do efeito matriz, como também através da análise das curvas em solvente orgânico e em extrato "branco" da matriz demonstrada na figura 26.

Figura 246 - Comparação entre curvas analíticas obtidas a partir de solução analítica de 2,4 - D preparadas em solvente orgânico (Acetonitrila) e em extrato "branco" da matriz



4.2.3 Limite de detecção e quantificação

O LD para o método multirresidual foi de $8 \mu\text{g kg}^{-1}$, sendo este determinado como a concentração mais baixa da curva da linearidade.

O LQ do método foi estabelecido a partir dos ensaios de fortificação/recuperação, como o nível mais baixo de fortificação que atende aos critérios de recuperação, entre 70 e 120% e precisão RSD $\leq 20\%$ aceitáveis. Assim, o LQ para o método em estudo foi de $20 \mu\text{g kg}^{-1}$.

O LQ para a metidationa foi satisfatório em comparação a outro trabalho já existente deste agrotóxico, na matriz em questão, no caso a biomistura de *biobed*, onde VARELI et al., (2019) conseguiram um LQ de $50 \mu\text{g kg}^{-1}$ quando analisado por cromatografia gasosa, valor acima do encontrado para este método.

DELGADO-MORENO e colaboradores (2017) estudaram a substituição da palha e turfa por resíduos agroindustriais de azeite de oliva, em modelo de *biobeds* em escala piloto. Dentre os agrotóxicos utilizados no estudo, inclui-se o Diurom, onde foi alcançado um LOQ de $100 \mu\text{g kg}^{-1}$, valor maior que o encontrado neste trabalho, provavelmente pelo fato de o detector utilizado para identificação ser diferente, no caso HPLC-DAD.

Já para os demais agrotóxicos estudados no método multirresidual, não foram encontrados trabalhos específicos para *biobeds*, mas para fim de comparação, existem trabalhos com alguns desses agrotóxicos na matriz solo, onde os limites alcançados de quantificação, expressos em $\mu\text{g kg}^{-1}$ de peso seco, foram inferiores aos deste trabalho, sendo de $14,9 \mu\text{g kg}^{-1}$ para o 2,4-D; $0,04 \mu\text{g kg}^{-1}$ para a Atrazina e $0,49 \mu\text{g kg}^{-1}$ para o Acetoclor. Isto se deve pelo fato da análise ser necessária em nível de resíduos e não para concentrações maiores como é o caso deste estudo (BERNASCONI et al., 2021).

4.2.4 Exatidão

Os resultados de recuperação média (Rec%) e desvio padrão relativo (RSD%) obtidos a partir dos ensaios de fortificação/recuperação para os quatro níveis de fortificação, 20, 50, 100 e 150 $\mu\text{g kg}^{-1}$, sendo que para cada nível foram realizadas sete replicatas (n=7) onde foi então calculado os valores recuperados frente ao valor da respectiva fortificação, estão apresentados na tabela 13.

Tabela 13 - Valores médios (n=7) de recuperação e RSD%, nos estudos de fortificação/recuperação em quatro diferentes níveis de fortificação, sendo 20, 50, 100 e 150 $\mu\text{g kg}^{-1}$

Agrotóxico	Nível de fortificação 20 $\mu\text{g kg}^{-1}$		Nível de fortificação 50 $\mu\text{g kg}^{-1}$		Nível de fortificação 100 $\mu\text{g kg}^{-1}$		Nível de fortificação 150 $\mu\text{g kg}^{-1}$	
	Recuperação média %	RSD %	Recuperação média %	RSD %	Recuperação média %	RSD %	Recuperação média %	RSD %
2,4-D	79	10	78	8	80	2	80	7
Acetocloro	90	16	86	9	90	12	95	2
Atrazina	84	5	86	6	85	2	83	2
Dicamba	70	6	70	7	70	4	70	2
Diurom	85	6	85	5	83	1	80	2
Metidationa	84	14	92	9	89	4	87	6

As recuperações médias % variaram de 70 a 95% e os valores de desvio padrão relativo foram todos inferiores a 16%, estando em concordância com os valores estipulados pelo DG-SANTE/2019.

4.2.5 Precisão e Precisão Intermediária

Para o estudo de precisão e precisão intermediária, o mesmo procedimento realizado no estudo de firtificação/recuperação foi realizado duas vezes, porém variando alguns parâmetros, neste caso o analista e o dia da realização da extração e análise. Os valores das recuperações médias e RSD% encontradas pelos dois diferentes analistas, descritos como “Analista A” e “Analista B” estão descritos na tabela 14.

Tabela 14 - Valores médios (n=7) de recuperação e RSD%, nos estudos de fortificação/recuperação em três diferentes níveis de fortificação, com dois diferentes analistas, para os níveis de concentração 20, 50, 100 e 150 $\mu\text{g kg}^{-1}$

Agrotóxico	Nível de fortificação 20 $\mu\text{g kg}^{-1}$				Nível de fortificação 50 $\mu\text{g kg}^{-1}$				Nível de fortificação 100 $\mu\text{g kg}^{-1}$				Nível de fortificação 150 $\mu\text{g kg}^{-1}$			
	Analista A		Analista B		Analista A		Analista B		Analista A		Analista B		Analista A		Analista B	
	Rec. média %	RSD %	Rec. média %	RSD %	Rec. média %	RSD %	Rec. média %	RSD %	Rec. média %	RSD %	Rec. média %	RSD %	Rec. média %	RSD %	Rec. média %	RSD %
2,4 - D	79	10	82	5	78	8	78	6	80	2	78	2	80	7	79	5
Acetocloro	90	16	84	17	86	9	86	8	90	12	90	3	95	2	86	4
Atrazina	84	5	85	3	86	6	85	5	85	2	84	2	83	2	83	2
Dicamba	70	6	71	8	70	7	70	6	70	4	71	3	70	2	70	6
Diurom	85	6	87	4	85	5	86	3	83	1	82	2	80	2	79	2
Metidationa	84	14	98	19	92	9	89	10	89	4	86	4	87	6	83	6

Pode se observar que todos os valores encontrados pelos dois analistas, sejam eles de recuperação média % e desvio padrão relativo %, encontram - se nos limites aceitáveis descritos no DG-SANTE/2019.

4.3 ANÁLISE DE AMOSTRAS DE BIOMISTURA

Após a contaminação dos reatores, foram realizadas coletas de amostras em diferentes períodos de tempo a fim de avaliar a degradação dos agrotóxicos. Sendo a primeira coleta realizada logo após a contaminação e as demais em aproximadamente a cada dois meses. As amostras foram coletadas, embaladas em papel alumínio e congeladas para posterior análise.

Realizadas todas as coletas, as amostras passaram pelo processo de extração dos agrotóxicos de acordo com os procedimentos descritos nas figuras 20 e 21 e por fim analisadas pela técnica de cromatografia líquida acoplada ao detector por espectrometria de massas triploquadrupolo, HLPC-MS/MS. Devido à alta concentração dos agrotóxicos encontrado nas amostras, foram necessárias diluições extras de 10 e 100 vezes a citada no procedimento de extração.

Os agrotóxicos, quando em contato com o solo podem se comportar de diferentes maneiras, dependendo das características tanto do ambiente local, como tipo de solo, o teor de matéria orgânica ali presente, temperatura, umidade, pH, como também as características físico-químicas de cada substância e sua interação com o meio (GEBLER; SPADOTTO, 2008).

Já no solo, a molécula do agrotóxico pode ser adsorvida pelos colóides minerais e orgânicos ou desorvido para a solução do solo e neste caso podendo ser absorvido pelas raízes das plantas ou ainda lixiviada para camadas inferiores do solo (SILVA, 2008). Desta forma, pode se considerar que a biomistura analisada compreende de um solo rico em matéria orgânica, e que devido ao clima, sofreu variações de temperatura ao longo das coletas, onde inicialmente o clima era mais quente e nas últimas coletas predominava o frio, características que podem influenciar na degradação dos agrotóxicos.

Na tabela 15 são apresentados os resultados da análise das amostras de biomistura contaminadas, coletadas em diferentes períodos após sua contaminação. O reator que não sofreu a contaminação, denominado de “branco” também foi analisado bem como realizadas as coletas nos mesmos períodos dos reatores contaminados, sendo que as concentrações de agrotóxicos nestas amostras foram todas bem abaixo do LD, demonstrando assim que eram realmente não havia contaminação dos agrotóxicos em estudo no reator.

Tabela 15 - Resultados da análise das amostras de biomistura coletada em diferentes períodos.

Data da coleta	Tempo - Reator	Atrazina	Diurom	Metidationa	2,4-D	Dicamba	Imazetapir
		Concentração encontrada de cada agrotóxico(ug kg ⁻¹)					
18/11/2021	T1	48335	1560	6030	1946	13566	17858
22/01/2021	T2 - R1	1559	769	316	434	1601	20787
	T2 - R2	1796	526	345	443	587	19963
	T2 - R3	14240	449	377	1264	3821	11351
01/03/2021	T3 - R1	1500	123	297	271	741	17246
	T3 - R2	13958	877	348	362	3863	14969
	T3 - R3	2005	105	299	264	963	14370
10/05/2021	T4 - R1	331	445	280	235	808	15149
	T4 - R2	583	100	293	223	3143	21781
	T4 - R3	7567	469	306	285	5378	21316
12/07/2021	T5 - R1	433	466	296	229	718	15929
	T5 - R2	665	552	301	256	4575	22177
	T5 - R3	771	270	295	215	2212	18039

Para a atrazina, diurom, metidationa e 2,4-D, é possível observar a diminuição da concentração destes agrotóxicos ao longo das coletas, apesar de em alguns casos, de uma coleta para outra, a concentração acabar aumentando. Fato este que se deve possivelmente pela falta de homogeneidade dos componentes do reator, a presença de torrões, tanto de terra como de turfa, onde os agrotóxicos podem ter ficado mais concentrados, modo como foi realizada a contaminação, a diferença na composição biológica, mas mais especificamente a formação do fungo da podridão branca, que é considerado o mais seletivo para a degradação de agrotóxicos, ou ainda a maneira da realização das coletas que pode ter sido em pontos com maior ou menor contaminação.

Para o dicamba é possível observar um declínio na concentração até a terceira coleta, realizada num período onde o clima ainda apresentava altas temperaturas, o que pode ter influência na degradação deste agrotóxico. Já para o imazetapir, a concentração ao longo das coletas se manteve constante, isto pode ter ocorrido possivelmente a sua baixa taxa de degradação, condições que não favoreceram a sua degradação, a preferência dos fungos de utilizarem os demais agrotóxicos presentes no meio como fonte de energia, ou ainda a sua concentração ou características físico-químicas, possam ter inibido o crescimento de cepas de espécies de fungos mais específicas para a degradação desta classe de agrotóxico (SERBENT, 2019).

Os agrotóxicos podem sofrer diferentes processos de degradação no meio ambiente, isso irá depender do seu destino após a aplicação. Exemplos desses processos são os processos físico-químicos, como a fotólise, volatilização, hidrólise entre outros, e os processos de biodegradação, considerados os mais eficientes, que são os exercido por diferentes microorganismos presentes no solo, sejam eles fungos ou bactérias (GEBLER; SPADOTTO, 2008).

As características físico-químicas da atrazina, a tornam um herbicida persistente no ambiente, devido sua baixa capacidade de biodegradabilidade, pode ser comumente detectada em água tanto superficial e de profundidade. O tempo de meia vida deste varia conforme o meio em que se encontra principalmente tipo de solo e condição climática, onde em baixas temperaturas (20 °C), a atrazina pode persistir por um tempo maior (COLLA et al., 2008) (CARMO et al., 2013) (ROSTAMI et al., 2021).

Além disso, o pH e a umidade do solo interferem no modo de ligação do herbicida com o solo, visto que a atrazina não estará disponível para os microorganismos se esta estiver adsorvida na fase sólida ao invés de estar presente na solução do solo. Desta forma tornando o tempo de meia vida do herbicida variável entre dois meses até seis anos (MATIAS et al., 2021). Um consórcio de microorganismos, aeróbios e anaeróbios, presentes naturalmente no solo podem ser capazes de degradar este herbicida, o utilizando como fonte de carbono e nitrogênio (SENE et al., 2010).

A degradação da atrazina também é realizada através de fungos, como por exemplo, o fungo da podridão branca, conhecido por sua capacidade de degradar diferentes xenobióticos, SENE et al., 2010, demonstraram que o fungo *Phanerochaete chrysosporium* foi capaz de reduzir em 48% a concentração inicial do herbicida em um meio de crescimento nos primeiros dias.

O diurom possui uma tendência em se acumular no meio ambiente devido a sua baixa solubilidade e estabilidade química, podendo permanecer no solo de um mês a até um ano. A degradação deste herbicida por fungos, como o da podridão branca, vem se mostrando eficiente, porém, a sua degradação pode acarretar na geração de espécies mais tóxicas e persistentes no solo (DA SILVA COELHO et al., 2010).

Os organofosforados, como a metidationa, possuem relativamente baixa persistência no ambiente, porém sua alta solubilidade em água os torna vulneráveis ao consumo humano, representando um risco à saúde (DAR; KAUSHIK; VILLAREAL CHIU, 2019). Há estudos sobre degradação fúngica desta classe de agrotóxicos, onde foi demonstrada uma completa degradação de determinado princípio ativo pertencente a esta classe por diferentes cepas do fungo de podridão branca, e algumas linhagens foram capazes de degradar inclusive substâncias resistentes a degradação bacteriana (SILVA, 2013).

Estudos demonstram a capacidade de espécies de fungo da podridão branca, como o *Phanaerochaete chrysosporium* em mineralizar, ou seja, de degradar totalmente, o 2,4-D obtendo como produto final apenas CO₂ e H₂O, e a taxa de mineralização aumenta conforme os níveis de nitrogênio ou carbono disponíveis no meio (SERBENT, 2019).

O pH do solo é um fator que pode aumentar ou retardar a persistência de alguns agrotóxicos no solo. Por exemplo, o 2,4-D e o dicamba em solo com pH 5,3, estimula a desativação destes, porém em pH 7,5 já são mais persistentes. Isto pode ocorrer devido à alcalinidade sobre as espécies bem como a população de microrganismos presentes no solo. E estes por sua vez são influenciados pelo teor de matéria orgânica presente no solo (GILREATH et al., 2006).

O dicamba é um herbicida considerado não persistente no solo, sendo totalmente mineralizado ou biodegradado (BROCHADO et al., 2021). Porém não foi o fato observado neste trabalho, que visa sua mais rápida degradação. Isto pode ter ocorrido por distintos motivos, como a interação química com outra classe de herbicida presente na mistura, que pode levar a formação de complexos biologicamente inativos, ou ainda a efeito antagônico, que acontece quando a associação de diferentes substâncias tem um menor efeito do que quando estas são aplicadas individualmente (SILVA, 2019).

Dicamba e imazetapir, considerados herbicidas ácidos fracos, possuem uma fraca força de adsorção tanto no solo quanto em matéria orgânica, devido a seus baixos coeficientes de distribuição do soluto nesses meios. A quantidade de herbicida sorvido depende de diferentes fatores como as propriedades físico-químicas, composição do solo como também a dose aplicada do produto (GEBLER; SPADOTTO, 2008) (CHRISTOFFOLETI et al., 2008).

A biodegradação para os herbicidas do grupo das imidazolinonas, como o imazetapir, é bastante variável dependendo das condições do solo, visto que em altas temperaturas (35°C) solo mais úmido, a biodegradação é favorecida. A sorção aos colóides do solo é um fator que aumenta a persistência das imidazolinonas, evitando assim os processos de biodegradação. Além disso, a variação de pH está correlacionado com a variação de sua biodisponibilidade, onde quanto menor o pH, maior a sorção e menor sua biodisponibilidade para os organismos biodegradadores presentes no meio (KRAEMER et al., 2009).

Estudos demonstram que o pH é um fator quemais tem influencia na biodisponibilidade das imidazolinonas, sendo que solos com pH abaixo de 7 há uma maior sorção destes herbicidas visto que há um incremento em diversos mecanismos de sorção, como forças físicas fracas ou pontes de hidrogênio, através de grupos carboxila associados. Fato este que condiz com o presente estudo, onde o pH da biomistura era 6 e não houve biodegradação do Imazetapir devido a sua

alta sorção ao solo (KRAEMER et al., 2009). A sorção das imidazolinonas é reduzida quando em meio com pH acima de 7, onde predominam as formas dissociadas de caráter aniônico, sendo então repelidas pelas cargas negativas do solo estando então biodisponíveis (OUFQIR et al., 2017).

5. CONCLUSÃO

Tendo em vista o baixo número de estudos na determinação de resíduos de agrotóxicos em camas biológicas no Brasil, visto que este é um país com uma considerável variação climática, seja de temperatura como períodos de chuva e seca, onde em cada um desses períodos a biodegradação pode ser variável. Como também pelo fato de as camas biológicas ainda não serem um método oficializado pelo país, não existindo legislação específica que determine os níveis aceitáveis de resíduos em sua composição final, se faz necessário este tipo de trabalho, tanto para demonstração de eficácia como para futuramente auxiliar na determinação dos limites máximos aceitáveis de resíduos.

Desta forma, o trabalho teve por objetivo obter informações sobre a biodegradação de diferentes classes de herbicidas e um inseticida, estes em conjunto, em uma mesma cama biológica. Assim a primeira parte deste trabalho foi de desenvolvimento e validação de um método analítico de extração e análise. Através de diferentes testes e levando em consideração as características e peculiaridades dos herbicidas da classe das imidazolinonas citadas ao longo do trabalho, foi verificada a necessidade do desenvolvimento de um método de extração específico para esta classe.

Por outro lado, foi necessário o desenvolvimento de um método cromatográfico específico para os herbicidas que tem seu modo de ionização negativo, no caso o 2,4-D e dicamba.

Sendo assim, após definidos os melhores métodos de extração e cromatográficos a próxima etapa foi a validação dos métodos, onde ambos demonstraram ser eficientes para o fim proposto e seus resultados estavam de acordo com o documento tomado como base, o DOQ-CGCRE-008.

Após a validação, os métodos foram empregado na análise de amostras de camas biológicas provenientes da Estação Experimental Uva e Vinho na cidade de Vacaria/RS. Visto as baixas concentrações trabalhadas nos métodos validados e os

resultados obtidos, as camas biológicas foram eficientes na degradação da maior parte dos agrotóxicos aplicados, exceto para o Imazetapir e em partes para o Dicamba. O imazetapir, já possui especificidades conhecidas citadas ao longo da dissertação, sendo suas reações em grande parte dependente das características do meio em que se encontra, como pH. Já o dicamba possivelmente sofreu alguma reação durante a interação com os demais agrotóxicos que pode ter o tornado menos biodisponível para sua degradação. A partir das informações obtidas, fica demonstrado que ainda há muito a ser estudado sobre o assunto, visto as diversas especificidades e características de cada agrotóxico.

Desta forma, para próximos estudos se torna interessante fazer um comparativo da degradação dos agrotóxicos nas camas biológicas com um reator contendo apenas o mesmo tipo de solo utilizado para o preparo da biomistura. Como também fazer um comparativo com reatores contaminados com agrotóxicos de diferentes classes em conjunto e estes individuais, a fim de averiguar os possíveis efeitos de uma classe frente à outra como ficou demonstrado acontecer neste estudo. Principalmente para a classe das imidazolinonas, que merece uma atenção especial frente aos resultados obtidos, onde se mostra interessante também fazer um comparativo em diferentes características, como principalmente o pH do meio, seguido de variantes como umidade e temperatura. Além de avaliar diferentes condições, tanto dos reatores quanto ambientais, no momento de cada coleta, como pH, temperatura, umidade a fim de possibilitar uma avaliação mais ampla dos resultados.

6. REFERÊNCIAS

ADAMA. **O que são Herbicidas?** Disponível em: <<http://www.adama.com/brasil/pt/espaco-do-agricultor/o-que-sao-herbicidas.html>>. Acesso em: 20 jul. 2020a.

ADAMA. **O que são Inseticidas?** Disponível em: <<http://www.adama.com/brasil/pt/espaco-do-agricultor/o-que-sao-inseticidas.html>>. Acesso em: 20 jul. 2020b.

AGRO, C. **4 impactos dos agrotóxicos no meio ambiente.** Disponível em: <<https://summitagro.estadao.com.br/saude-no-campo/agrotoxicos-da-agricultura-moderna-e-seus-impactos-no-meio-ambiente/>>. Acesso em: 8 mar. 2022.

ALVES, E. R. DE A.; CONTINI, E.; GASQUES, J. G. Evolução da produção e produtividade da agricultura brasileira. **Agricultura Tropical: Quatro décadas de inovações tecnológicas, institucionais e políticas**, p. 67–99, 2008.

ANASTASSIADES, M. et al. Fast and easy multiresidue method employing acetonitrile extraction/partitioning and. **Journal of AOAC International**, v. 86, p. 412–431, 2003.

ANVISA. Índice monográfico - Acetocloro A24. [s.d.].

ANVISA. **Índice monográfico - Imazetapir I10.** [s.l.: s.n.]. Disponível em: <<http://portal.anvisa.gov.br/documents/111215/117782/I10%2B%2BImazetapir.pdf/937172bb-286d-4d57-8152-dc9bb524fa73>>.

ANVISA. **Anvisa aprova novo marco regulatório para agrotóxicos.** Disponível em: <<https://www.gov.br/anvisa/pt-br/assuntos/noticias-anvisa/2019/anvisa-aprova-novo-marco-regulatorio-para-agrotoxicos>>. Acesso em: 17 jul. 2020.

ANVISA. Índice monográfico - Metidationa M14. 2020.

BARRIGOSI, J. A. F. **Uso de agrotóxicos.** Disponível em: <<https://www.agencia.cnptia.embrapa.br/gestor/arroz/arvore/CONT000fohgb6co02w yiv8065610dc2ls9ti.html>>.

BERNASCONI, C. et al. Evidence for soil pesticide contamination of an agroecological farm from a neighboring chemical-based production system. **Agriculture, Ecosystems and Environment**, v. 313, n. January, 2021.

BOSCOLO, C. N. P. et al. Diuron metabolites act as endocrine disruptors and alter aggressive behavior in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). **Chemosphere**, v. 191, p. 832–838, 2017.

BRAIBANTE, M. E. F.; ZAPPE, J. A. A Química dos Agrotóxicos. **Química Nova na Escola**, v. 34, n. 1, p. 10–15, 2012.

BRASIL, C. **LEI Nº 7.802, DE 11 DE JULHO DE 1989.** Disponível em: <http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/leis/l7802.htm#:~:text=Dispõe sobre a>

pesquisa%2C a,inspeção e a fiscalização de>. Acesso em: 11 jul. 2021.

BROCHADO, M. G. DA S. et al. NOVAS PERSPECTIVAS PARA UTILIZAÇÃO DO DICAMBA NA AGRICULTURA BRASILEIRA. In: **Sistemas de Produção nas Ciências Agrárias**. Viçosa/MG: [s.n.].

CALISTO, J. DE S. **Adsorção dos herbicidas 2,4-diclorofenoxiacetato de sódio (2,4 - D) e 6-cloro, 4-N-etila-2-N-propan-2-ila-1-1,3,5-triazina-2,4-diamina de sódio (atrazina) em Hidróxidos Duplos Lamelares [Co-Al-CI]**. [s.l.] Universidade Federal de Uberlândia, 2020.

CARMO, D. A. DO et al. Comportamento ambiental e toxicidade dos herbicidas atrazina e simazine. **Revista Ambiente e Água**, v. 8, n. 1, p. 133–143, 2013.

CARVALHO, L. B. D. E. **Herbicidas**. [s.l: s.n.].

CASTILLO, M. D. P. .; TORSTENSSON, L.; STENSTRÖM, J. Biobeds- A Swedish contribution to environmental protection from pesticide pollution. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 2008a.

CASTILLO, M. D. P.; TORSTENSSON, L. Effect of biobed composition, moisture, and temperature on the degradation of pesticides. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 55, n. 14, p. 5725–5733, 2007.

CASTILLO, M. D. P.; TORSTENSSON, L.; STENSTRÖM, J. Biobeds for environmental protection from pesticide use - A review. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 56, n. 15, p. 6206–6219, 2008b.

CHIARADIA, M. C.; COLLINS, C. H.; JARDIM, I. C. S. F. O estado da arte da cromatografia associada à espectrometria de massas acoplada à espectrometria de massas na análise de compostos tóxicos em alimentos. **Química Nova**, 2008.

CHRISTOFFOLETI, P. J. et al. **Comportamento dos herbicidas aplicados ao solo na cultura da cana-de-açúcar**. 1. ed. Piracicaba - SP: [s.n.].

COLLA, L. M. et al. Isolation and screening of fungi to bioremediation from triazine herbicide contaminated soil. **Ciencia e Agrotecnologia**, v. 32, n. 3, p. 809–813, 2008.

COLLINS, C. H.; BRAGA, G. L.; BONATO, P. S. **Fundamentos de cromatografia**. [s.l.] Editora UNICAMP, 2006.

CONAB. **Falta de chuva no Sul reduz a estimativa de produção, mas novo recorde é esperado**. Disponível em: <<https://www.conab.gov.br/ultimas-noticias/3733-falta-de-chuva-no-sul-reduz-a-estimativa-de-producao-mas-novo-recorde-e-esperado>>. Acesso em: 31 maio. 2021.

CONAB. **Estimativa indica aumento na produção de grãos na safra 2021/22, com previsão em 288,61 milhões de toneladas**. Disponível em: <<https://www.conab.gov.br/ultimas-noticias/4316-estimativa-indica-aumento-na-producao-de-graos-na-safra-2021-22-com-previsao-em-288-61-milhoes-de-toneladas>>. Acesso em: 1 nov. 2021.

CRIADO, M. Á. 50 anos depois, agente laranja continua contaminando o solo do Vietnã. **El País**, 2019.

DA COSTA MARINHO, M. I. et al. Validation and application of a QuEChERS based method for estimation of half-life of imidazolinone herbicides in soils by LC-ESI-MS/MS. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 167, n. September 2018, p. 212–217, 2019.

DA SILVA COELHO, J. et al. Effect of the herbicides bentazon and diuron on the production of ligninolytic enzymes by *Ganoderma lucidum*. **International Biodeterioration and Biodegradation**, v. 64, n. 2, p. 156–161, 2010.

DAR, M. A.; KAUSHIK, G.; VILLAREAL CHIU, J. F. **Pollution status and biodegradation of organophosphate pesticides in the environment**. [s.l.] Elsevier Inc., 2019.

DELGADO-MORENO, L. et al. Innovative application of biobed bioremediation systems to remove emerging contaminants: Adsorption, degradation and bioaccessibility. **Science of the Total Environment**, v. 651, p. 990–997, 2019.

DELGADO-MORENO, L.; NOGALES, R.; ROMERO, E. Biodegradation of high doses of commercial pesticide products in pilot-scale biobeds using olive-oil agroindustry wastes. **Journal of Environmental Management**, v. 204, p. 160–169, 2017.

DI BENEDETTO, A. H.; KLASMAN, R.; BOSCHI, C. Use of river waste in growing media for ornamental herbaceous perennials. **Journal of Horticultural Science and Biotechnology**, v. 79, n. 1, p. 119–124, 2004.

DIAS, J. V. **Determinação de resíduos de agrotóxicos em tomate para fins de acreditação**. [s.l.] UFSM, 2014.

DIAS, L. DE A. et al. Destination of pesticide residues on biobeds: State of the art and future perspectives in Latin America. **Chemosphere**, v. 248, p. 126038, 2020.

DIAS, L. DE A. et al. Pine Litter and Vermicompost as Alternative Substrates for Biobeds: Efficiency in Pesticide Degradation. **Water Air and Soil Pollution**, p. 232–283, 2021.

DIEZ JEREZ, M. C. et al. **Manual de Construcción y Operación de Lechos Biológicos**. 1ª ed. Chile: [s.n.].

DIEZ, M. C. et al. Biochar as a partial replacement of peat in pesticide-degrading biomixtures formulated with different soil types. **Journal of Biobased Materials and Bioenergy**, v. 7, n. 6, p. 741–747, 2013.

EMBRAPA. **VISAO 2030: o futuro da agricultura brasileira**. Brasília, DF: , 2018. (Nota técnica).

FAO. Biobed Un lecho biológico para minimizar la contaminación puntual por plaguicidas. n. 15888s/1/07.16, 2016.

FERNÁNDEZ-ALBA, A. R.; GARCÍA-REYES, J. F. Large-scale multi-residue methods for pesticides and their degradation products in food by advanced LC-MS. **TrAC - Trends in Analytical Chemistry**, v. 27, n. 11, p. 973–990, 2008.

FERRI, M. V. W.; VIDAL, R. A. Persistência do acetochlor em solo sob semeadura direta e convencional. **Planta Daninha**, v. 20, n. 1, p. 133–139, 2002.

FRANCISCATTO COVATTI, L. A. **Diário Oficial SECRETARIA DA AGRICULTURA , PECUÁRIA E DESENVOLVIMENTO RURAL Porto Alegre , Sexta-feira , 5 de Julho de 2019 Diário Oficial.** Disponível em: <<https://www.agricultura.rs.gov.br/upload/arquivos/201907/05160456-instrucao-normativa-seapdr.pdf>>. Acesso em: 23 jul. 2020.

GAO, W. et al. Evaluation of spent mushroom substrate as substitute of peat in Chinese biobeds. **International Biodeterioration and Biodegradation**, v. 98, p. 107–112, 2015.

GASQUES, J. G.; BACCHI, M. R. P.; BASTOS, E. T. Crescimento e Produtividade da Agricultura Brasileira de 1975 a 2016. **Carta de Conjuntura**, v. 38, n. 1º trimestre, p. 1–9, 2018.

GAÚCHA ZH. **Maior produtor de oliveiras no país tem pomares afetados por resíduos de agroquímicos.** Disponível em: <<https://gauchazh.clicrbs.com.br/economia/campo-e-lavoura/noticia/2018/12/maior-produtor-de-oliveiras-no-pais-tem-pomares-afetados-por-residuos-de-agroquimicos-cjpnxyz4n0lbu01rxprcag6t1.html>>. Acesso em: 23 jul. 2020.

GEBLER, J.; SPADOTTO, C. A. Comportamento ambiental dos herbicidas. In: VARGAS, L.; ROMAN, E. S. (Eds.). **Manual de manejo e controle de plantas daninhas**. Passo Fundo/RS: [s.n.]. p. 39–70.

GEBLER, L. et al. Sistema Biobed Brasil: tecnologia para disposição final de efluentes contaminados com agrotóxicos originados a produção de frutas de clima temperado. 2015.

GEBLER, L.; BRUNCH, K.; LISBÔA, J. B. Orientação comentada para instalação de depósitos de agrotóxicos em propriedades rurais no Rio Grande do Sul segundo a ABNT BNBR 9843-3. In: **Instituto Brasileiro do Vinho - IBRAVIN**. Bento Gonçalves, RS: [s.n.]. p. 1–54.

GIACOMAZZI, S.; COCHET, N. Environmental impact of diuron transformation: a review. **Chemosphere**, v. 56, n. 11, p. 1021–1032, 2004.

GILREATH, J. P. et al. Influence of soil fumigation on 2,4-D and dicamba carryover in fresh market tomato. **Crop Protection**, v. 25, n. 10, p. 1095–1100, 2006.

HARRIS, D. C.; LUCY, C. A. **Análise Química Quantitativa**. 9ª ed. Rio de Janeiro, RJ: W. H. FREEMAN AND COMPANY, New York, 2017.

HOSHI IGLESIAS, A. **Introdução ao acoplamento Cromatografia líquida - Espectrometria de massas.** Disponível em: <<http://www.cnpsa.embrapa.br/met/images/arquivos/17MET/minicursos/introducao>>

ao acoplamento cromatografia líquida - espectrometria de massas.pdf>. Acesso em: 28 jul. 2020.

HUMAN RIGHTS WATCH. “ **Você não quer mais respirar veneno** ”. [s.l.: s.n.]. Disponível em: <hrw.org>.

IBAMA. **Relatórios de comercialização de agrotóxicos**. Disponível em: <<http://ibama.gov.br/agrotoxicos/relatorios-de-comercializacao-de-agrotoxicos#boletinsanuais>>. Acesso em: 1 nov. 2021.

INMETRO. **Orientação sobre validação de métodos analíticos - Documento de caráter orientativo DOQ-CGCRE-008INMETRO- Coordenação Geral de Acreditação**. [s.l.: s.n.]. Disponível em: <http://www.inmetro.gov.br/credenciamento/organismos/doc_organismos.asp?torganismo=calibensaios>.

INMETRO, I. N. D. M. T. E. Q. **Orientação sobre validação de métodos analíticos.Inmetro**. [s.l.: s.n.]. Disponível em: <http://www.inmetro.gov.br/Sidoq/pesquisa_link.asp?seq_tipo_documento=5&cod_uo_numeracao=00774&num_documento=008>.

JÚNIOR, J. A. DE V. **Desenvolvimento De Novas Fases Estacionárias Para Cromatografia Líquida**. [s.l.] Universidade Federal do Alagoas - UFAL, 2019.

KARANASIOS, E. et al. Novel biomixtures based on local Mediterranean lignocellulosic materials: Evaluation for use in biobed systems. **Chemosphere**, v. 80, n. 8, p. 914–921, 2010.

KEMMERICH, M. et al. A simple and efficient method for imidazolinone herbicides determination in soil by ultra-high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1412, p. 82–89, 2015.

KRAEMER, A. F. et al. Destino ambiental dos herbicidas do grupo das imidazolinonas - revisão. **Planta Daninha**, v. 27, n. 3, p. 629–639, 2009.

LANÇAS, F. M. A cromatografia líquida moderna e a espectrometria de massas: Finalmente “compatíveis”? **Scientia Chromatographica**, 2009.

LEHOTAY, S. J.; MAŠTOVSKÁ, K.; LIGHTFIELD, A. R. Use of buffering and other means to improve results of problematic pesticides in a fast and easy method for residue analysis of fruits and vegetables. **Journal of AOAC International**, v. 88, n. 2, p. 615–629, 2005.

LESCANO, M. R. et al. Glyphosate and aminomethylphosphonic acid degradation in biomixtures based on alfalfa straw, wheat stubble and river waste. **Journal of Environmental Management**, v. 228, n. September, p. 451–457, 2018.

LESCANO, M. R. et al. Earthworms to improve glyphosate degradation in biobeds. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 27, n. 21, p. 27023–27031, 2020.

LOPES, C. V. A.; ALBUQUERQUE, G. S. C. DE. Agrotóxicos e seus impactos na

saúde humana e ambiental: uma revisão sistemática. **Saúde em Debate**, v. 42, n. 117, p. 518–534, 2018.

MALDANER, L.; COLLINS, C. H.; JARDIM, I. C. S. F. Fases estacionárias modernas para cromatografia líquida de alta eficiência. **Química Nova**, v. 33, n. 7, p. 1559–1569, 2010.

MALDANER, L.; JARDIM, I. C. S. F. O estado da arte da cromatografia líquida de ultra eficiência. **Química Nova**, v. 32, n. 1, p. 214–222, 2009.

MARTINS, G. L. et al. Simultaneous LC-MS/MS determination of imidazolinone herbicides together with other multiclass pesticide residues in soil. **Clean - Soil, Air, Water**, v. 42, n. 10, p. 1441–1449, 2014.

MAŠTOVSKÁ, K.; LEHOTAY, S. J. Evaluation of common organic solvents for gas chromatographic analysis and stability of multiclass pesticide residues. **Journal of Chromatography A**, v. 1040, n. 2, p. 259–272, 2004.

MATIAS, T. P. et al. Aspectos envolvidos na biodegradação da atrazina sob diferentes condições de oxirredução. **Research, Society and Development**, v. 10, n. 8, p. e59910817689, 2021.

MATTE, W. et al. 2,4-D: polêmico desde sempre, imprescindível como nunca. **Revista Cultivar**, 2017.

MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE. **Comitê Técnico de Assessoramento para Agrotóxicos**. Disponível em: <<https://antigo.mma.gov.br/acesso-a-informacao/itemlist/category/110-agrotoxicos.html>>.

MORAES, R. F. DE. **Agrotóxicos no Brasil: padrões de uso, política da regulação e prevenção da captura regulatória**. Brasília, DF: [s.n.]. Disponível em: <<http://www.ipea.gov.br>>.

NASCIMENTO, L. **Balança comercial do agronegócio soma US\$ 100,81 bilhões em 2020**. Disponível em: <<https://agenciabrasil.ebc.com.br/economia/noticia/2021-01/balanca-comercial-do-agronegocio-soma-us-10081-bilhoes-em-2020>>.

NASCIMENTO, L.; MELNYK, A. A química dos pesticidas no meio ambiente e na saúde The chemistry of pesticides in the environment and health. **Artigo Revista Mangaio Acadêmico**, v. 1, n. 1, p. 54–61, 2016.

OLIVEIRA, M. F. DE; BRIGHENTI, A. M. **Comportamento dos Herbicidas no Ambiente**. [s.l.: s.n.].

OLIVEIRA JR., R. S. **Mecanismos de Ação de Herbicidas**. [s.l.: s.n.].

OMIROU, M. et al. Exploring the potential of biobeds for the depuration of pesticide-contaminated wastewaters from the citrus production chain: Laboratory, column and field studies. **Environmental Pollution**, v. 166, p. 31–39, 2012.

OSHITA, D.; JARDIM, I. C. S. F. Comparison of Methods By Liquid Chromatography for the Determination of Pesticide Multiresidues in Strawberries. **Química Nova**, v.

38, n. 10, p. 1273–1281, 2015.

OUFQIR, S. et al. Adsorption of imazethapyr on six agricultural soils of Morocco: evaluation of the impact of soil properties. **Arabian Journal of Chemistry**, v. 10, p. S2944–S2949, 2017.

PERES, F.; MOREIRA, J. C.; DUBOIS, G. S. Agrotóxicos, saúde e ambiente: uma introdução ao tema. In: **É Veneno Ou É Remédio?: Agrotóxicos, Saúde E Ambiente: uma introdução ao tema**. [s.l.: s.n.]. v. 5p. 21–41.

PEREZ, M. ã. F. Validação De Métodos Analíticos: Como Fazer? Por Que Ela É Importante? **Boletim de Tecnologia e Desenvolvimento de Embalagens**, v. 22, n. 3, p. 1–9, 2010.

PIGNATI, W. **Avaliação integrada dos impactos dos agrotóxicos na saúde e ambiente em Lucas do Rio Verde – MT, com ênfase na contaminação do leite materno**. Disponível em: <<https://www2.camara.leg.br/atividade-legislativa/comissoes/comissoes-permanentes/cmads/apresentacoes-em-eventos/eventos-2012/3-07-2012-presenca-de-residuos-de-agrotoxicos-em-leite-materno/heloisa-rey-farza-anvisa/professor-dr.wanderlei-pignati-ufmt>>.

PIHLSTRÖM, T. et al. **Analytical quality control and method validation procedures for pesticides residues analysis in food and feed**. Document No. SANTE/2017/11813 implemented by 01/01/2020. **Anais...2019**

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**. [s.l.] UFSM, 2006.

PSZCZOLINSKA, K.; MICHEL, M. The QuEChERS approach for the determination of pesticide residues in soil samples: An overview. **Journal of AOAC International**, v. 99, n. 6, p. 1403–1414, 2016.

RAMEZANI, M. et al. Improved extraction and clean-up of imidazolinone herbicides from soil solutions using different solid-phase sorbents. **Journal of Chromatography A**, v. 1216, n. 26, p. 5092–5100, 2009.

REDAÇÃO BOAS. **Defensivos agrícolas: fundamentais para agricultura sustentável**. Disponível em: <<https://boaspraticasagronicas.com.br/boas-praticas/defensivos-agricolas/>>.

RIBANI, M. et al. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Química Nova**, v. 27, n. 5, p. 771–780, 2004.

RIBEIRO, D. H. B.; VIEIRA, E. **Avaliação do potencial de impactos dos agrotóxicos no meio ambiente**. Disponível em: <http://www.infobibos.com/Artigos/2010_2/agrotoxicos/index.htm>.

ROSTAMI, S. et al. Current methods and technologies for degradation of atrazine in contaminated soil and water: A review. **Environmental Technology & Innovation**, v. 24, p. 102019, 2021.

SANCHES, S. M. et al. Pesticidas E Seus Respectivos Riscos Associados À Contaminação Da Água. **Pesticidas: Revista de Ecotoxicologia e Meio Ambiente**, v. 13, p. 53–58, 2003.

SECRETARIA DA AGRICULTURA, P. E D. R. **Canais para denúncia de deriva do 2,4-D**. Disponível em: <<https://www.agricultura.rs.gov.br/canais-para-denuncia-de-deriva-do-2-4-d>>. Acesso em: 23 jul. 2020.

SENE, L. et al. New aspects on atrazine biodegradation. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 53, n. 2, p. 487–496, 2010.

SERBENT, M. P. **POTENCIAL DE DEGRADAÇÃO DO HERBICIDA 2,4 POR FUNGOS BASIDIOMICETOS**. [s.l.] Fundação Universidade Regional de Blumenau - FURB, 2019.

SHANER, D. L.; HORNFORN, R. Soil interactions of imidazolinone herbicides used in Canada. **Canadian Weed Science Society**, v. 3, n. January 2005, p. 22–30, 2005.

SILVA, K. S. DA. **Misturas de herbicidas em tanque: entenda as possíveis interações**. Disponível em: <<https://weedout.com.br/misturas-de-herbicidas/>>. Acesso em: 19 dez. 2021.

SILVA, N. A. DA. **Biodegradação dos pesticidas clorpirifós , metil paration e profenofós por fungos de origem marinha**. [s.l.] Instituto de Química de São Carlos, 2013.

SILVA, S. R. C. M. DA. **EFEITO DOS INSETICIDAS ORGANOFOSFORADOS EM LATOSSOLO VERMELHO ESCURO DE CAMPO NOVO DO PARECIS – MT E A DEGRADAÇÃO DOS ORGANOFOSFORADOS POR PROCESSO OXIDATIVO AVANÇADO**. [s.l.] Instituto de Química, 2008.

SILVA, F. M. L. et al. Atividade residual de 2,4-D sobre a emergência de soja em solos com texturas distintas. **Revista Brasileira de Herbicidas**, p. 29–36, 2011.

STIVAKTAKIS, P. D. et al. Determination of genotoxic effects of methidathion alkaline hydrolysis in human lymphocytes using the micronucleus assay and square-wave voltammetry. **Bioelectrochemistry**, v. 113, p. 9–14, 2017.

SU, W. et al. Adsorption and degradation of imazapic in soils under different environmental conditions. **PLoS ONE**, v. 14, n. 7, 2019.

TOOGE, R.; MANZANO, F. **Entenda o que muda na classificação dos agrotóxicos pela Anvisa**. Disponível em: <<https://g1.globo.com/economia/agronegocios/noticia/2019/07/24/entenda-o-que-muda-na-classificacao-dos-agrotoxicos-pela-anvisa.ghtml>>.

VALADARES, A.; ALVES, F.; GALIZA, M. O crescimento do uso de agrotóxicos: uma análise descritiva dos resultados do censo agropecuário 2017. **Ipea**, p. 42, 2020.

VARELI, C. S. et al. Evaluation of two extraction approaches for pesticide residue determination in biobeds using GC-MS/MS. **Analytical Methods**, v. 11, n. 42, p.

5455–5463, 2019.

VASCONCELO, S. M. A. et al. Seleção de espécies tolerantes para a fitorremediação de solo contaminado com imazapic. **Revista de Ciências Agroveterinárias**, v. 19, n. 2, p. 149–158, 2020.

VERA, J. et al. QuEChERS and soil analysis. An Overview. **Sample Preparation**, v. 1, p. 54–77, 2013.

VIERO, C. M. et al. Risk society: the use of pesticides and implications for the health of rural workers. **Escola Anna Nery - Revista de Enfermagem**, v. 20, n. 1, p. 99–105, 2016.

WHO, W. H. O. **The WHO recommended classification of pesticides by hazard and guidelines to classification**. [s.l: s.n.].

YADAV, I. C.; DEVI, N. L. Pesticides Classification and its Impact on Environment. **International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences**, p. 14–158, 2017.