



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

**DETERMINAÇÃO DE BISPIRIBAQUE-SÓDICO,
QUINCLORAQUE E TEBUCONAZOLE EM ÁGUA DE
LAVOURA DE ARROZ IRRIGADO EMPREGANDO SPE E
HPLC-DAD**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Michele Câmara De Vicari

Santa Maria - RS, Brasil

2009

**DETERMINAÇÃO DE BISPIRIBAQUE-SÓDICO,
QUINCLORAQUE E TEBUCONAZOLE EM ÁGUA DE
LAVOURA DE ARROZ IRRIGADO EMPREGANDO SPE E
HPLC-DAD**

por

Michele Câmara De Vicari

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química,
Área de Concentração em Química Analítica, da Universidade Federal de
Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do grau de
MESTRE EM QUÍMICA

Orientador: Prof. Dr. Renato Zanella

Santa Maria - RS, Brasil

2009

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

A Comissão Examinadora, abaixo assinada,
aprova a Dissertação de Mestrado

**DETERMINAÇÃO DE BISPIRIBAQUE-SÓDICO, QUINCLORAQUE E
TEBUCONAZOLE EM ÁGUA DE LAVOURA DE ARROZ IRRIGADO
EMPREGANDO SPE E HPLC-DAD**

elaborada por
Michele Câmara De Vicari

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

Comissão Examinadora

Prof. Dr. Renato Zanella (Orientador, UFSM)

Prof^a. Dr^a. Martha Bohrer Adaime (co-orientadora, UFSM)

Prof. Luis Antonio de Avila, Ph.D. (UFSM)

Santa Maria, 4 de março de 2009

Agradeço a Deus pelo dom da vida,
por ter iluminado meu caminho e ter me
concedido mais esta conquista.

Aos meus pais Luiz e Clari,
pelo amor, pelo apoio, pelo incentivo,
pela compreensão e por acreditar em mim, sempre!!!
Obrigada por tudo!!! Eu amo muito vocês!!!

Ao meu amor, Giovanni,
pelo amor, pela compreensão,
pelo apoio e carinho. Muito obrigada.
Eu te amo muito!!!

A vocês dedico esta conquista.

Rir é correr risco de parecer bobo
Chorar é correr risco de parecer sentimental
Expor seus sentimentos é correr o risco de mostrar seu verdadeiro Eu
Defender seus sonhos e idéias diante da multidão
é correr o risco de perder a amizade das pessoas
Amar é correr o risco de não ser correspondido
Viver é correr o risco de morrer
Confiar é correr o risco de se decepcionar
Tentar é correr o risco de fracassar
Porém, os riscos devem ser corridos,
porque o maior perigo é o de não arriscar nada
A pessoa que não corre nenhum risco,
não faz nada, não tem nada, não consegue nada
Ela pode evitar sofrimentos e decepções,
mas não sente, não muda, não cresce, não ama, não vive
Acorrentada por suas atitudes, torna-se escrava e priva-se da liberdade
Por isso, somente a pessoa que corre riscos é totalmente livre.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Renato Zanella pela orientação, pelo seu apoio e compreensão em todos os momentos. Obrigada por acreditar no meu trabalho e pela oportunidade de fazer parte do LARP.

À Prof^a. Dr^a. Martha Bohrer Adaime pela orientação desde a iniciação científica. Obrigada pelas excelentes contribuições na qualificação e no exame final. Obrigada não só pelos ensinamentos analíticos e cromatográficos, mas pela amizade, pelo carinho, pela compreensão e apoio em todos os momentos. Você é um exemplo de profissional e de mulher. Te admiro muito.

Ao Prof. Luis Antonio de Avila, pela sua participação na defesa da dissertação e pelas excelentes contribuições na banca examinadora.

Ao Prof. Dr. Ubiratan Flores da Silva pela sua participação e contribuição no exame de qualificação.

A minha amiga Sandra, a quem não tenho palavras para agradecer tudo o que fez por mim. Muito obrigada pelo carinho, pela amizade, pelo companheirismo, pelo incentivo e por acreditar em mim. Esta conquista também é sua! Serei eternamente grata.

A minha amiga Juliana, muito obrigada pela amizade, pelo carinho, pelo incentivo e palavras de apoio nos momentos mais difíceis, além dos ótimos momentos de trabalho e descontração que compartilhamos.

Aos demais colegas e amigos do LARP, Caroline, Osmar, Gisele, Mateus, Cristieli, Guilherme e Janice, obrigada pelo apoio na realização deste trabalho e pelo convívio e os bons momentos de descontração vividos no LARP.

Ao meu irmão Thiago, obrigada pela paciência, pelo carinho, pelo apoio e pela compreensão. Eu te amo!

Um agradecimento especial a toda a minha família e meus amigos que de alguma forma me apoiaram e torceram por mim. Obrigada de coração.

A minha amiga Dai, muito obrigada pela amizade, pelas palavras de apoio, pelo incentivo, pela torcida e pelas boas energias.

À querida Sandrinha, pela amizade e pela agradável companhia desde a época da minha iniciação científica.

À Márcia pela sua disposição e boa vontade em resolver aqueles “probleminhas” e pelos momentos de descontração e boas risadas compartilhadas.

Ao Grupo de Pesquisa em Arroz Irrigado e Uso Alternativo de Várzeas da UFSM, que conduziu os experimentos a campo e forneceu as amostras necessárias para a execução deste trabalho e, principalmente ao Geovane, Gustavo e Fernando, que sempre se disponibilizaram a ajudar e sanar as dúvidas “agronômicas”.

À UFSM pela oportunidade e principalmente pelo ensino público e de qualidade.

À todos os professores do Departamento de Química da UFSM pela contribuição na minha formação.

Aos funcionários do PPGQ, Ademir e Valéria, pela competência, gentileza e disposição na realização do seu trabalho.

Ao CNPq pelo auxílio financeiro.

RESUMO

Dissertação de Mestrado
Programa de Pós-Graduação em Química
Universidade Federal de Santa Maria

DETERMINAÇÃO DE BISPIRIBAQUE-SÓDICO, QUINCLORAQUE E TEBUCONAZOLE EM ÁGUA DE LAVOURA DE ARROZ IRRIGADO EMPREGANDO SPE E HLPC-DAD

AUTORA: MICHELE CÂMARA DE VICARI
ORIENTADOR: PROF. DR. RENATO ZANELLA
Data e Local da Defesa: Santa Maria, 4 de março de 2009

O arroz é um dos cereais mais produzidos e consumidos no mundo e desempenha papel estratégico tanto no aspecto econômico quanto social. A Região Sul é responsável por cerca de 60% da produção brasileira de arroz, a qual está diretamente associada ao uso intensivo de pesticidas. Com isso, o estudo da persistência destes compostos nas lavouras para avaliar os riscos de contaminação ambiental é de suma importância sócio-econômica. Neste trabalho foi desenvolvido e validado um método analítico para a determinação de resíduos de bispiribaque-sódico, quincloraque e tebuconazole em amostras de água de lavoura de arroz irrigado, utilizando Extração em Fase Sólida (SPE) e Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com Detecção por Arranjo de Diodos (HPLC-DAD). O método consiste na pré-concentração das amostras de água em cartuchos SPE contendo 500 mg de C18, seguida da eluição com metanol e determinação dos pesticidas por HPLC-DAD. Na validação do método avaliou-se curva analítica e linearidade, limite de detecção (LOD), limite de quantificação (LOQ), precisão (repetitividade e precisão intermediária) e exatidão (recuperação). As curvas analíticas apresentaram linearidade entre 0,03 e 10 mg L⁻¹ para quincloraque, 0,1 e 10 mg L⁻¹ para bispiribaque-sódico e entre 0,05 e 10 mg L⁻¹ para tebuconazole, com coeficientes de determinação maiores que 0,9999. Os valores de LOQ para o método, considerando a etapa de pré-concentração de 250 vezes, foram de 1,2 µg L⁻¹ para bispiribaque-sódico, 0,4 µg L⁻¹ para quincloraque e 0,6 µg L⁻¹ para tebuconazole. O método apresentou valores de recuperação entre 76,1 e 116,5% e valores de RSD inferiores a 19,8%. Todos os parâmetros de validação encontram-se dentro dos limites sugeridos para a validação de métodos cromatográficos. O método validado foi aplicado no estudo de dissipação dos pesticidas em água de lavoura de arroz irrigado. Foram encontrados bispiribaque-sódico e quincloraque até 28 e 91 dias após a aplicação dos compostos, respectivamente e de tebuconazole até 21 dias após a aplicação do composto.

Palavras-chave: resíduos de pesticidas; arroz; água; SPE; HPLC-DAD

ABSTRACT

Master's Degree Dissertation
Programa de Pós-Graduação em Química
Universidade Federal de Santa Maria

DETERMINATION OF BISPYRIBAC-SODIUM, QUINCLORAC AND TEBUCONAZOLE IN WATER FROM IRRIGATED RICE CROPS APPLYING SPE AND HPLC-DAD

AUTHOR: MICHELE CÂMARA DE VICARI
ADVISOR: PROF. DR. RENATO ZANELLA
Date and Place: March 4th, 2009, Santa Maria

Rice is one of the most produced and consumed cereal in the world. It plays a strategic role both economically and socially. Southern is responsible for about 60% of Brazilian rice production, which is directly linked to the intensive use of pesticides. Considering it, the study of the remaining of such compounds in crops to assess the risks of environmental contamination is socio-economically very important. Based on that this paper, an analytical approach has been developed and validated in order to determine the residues of bispyribac-sodium, quinclorac, and tebuconazole in water from irrigated rice crops, using Solid Phase Extraction (SPE) and High Performance Liquid Chromatography with Diode Array Detection (HPLC-DAD). The approach consists of preconcentration of water samples in SPE cartridges with 500 mg of C18, followed by elution with methanol and pesticides determination through HPLC-DAD. In the validation of the method, the analytical curve and linearity, limit of detection (LOD), limit of quantification (LOQ), precision (repetitivity and intermediate precision), as well accuracy (recovery) were assessed. The analytical curves displayed linearity between 0.03 and 10 mg L⁻¹ for quinclorac, 0,1 e 10 mg L⁻¹ for bispyribac-sodium and between 0,05 e 10 mg L⁻¹ for tebuconazole, with determination coefficients higher than 0.9999. LOQ values for the approach, considering preconcentration phase of 250 times, were of 1.2 µg L⁻¹ for bispyribac-sodium, 0.4 µg L⁻¹ for quinclorac, and 0.6 µg L⁻¹ for tebuconazole. The method presented recovery values between 76.1 and 116.5% and RSD values smaller than 19.8%. All the validation parameters are within the suggested limits for validation of chromatographic methods. The validated method was applied in the study of pesticides dissipation in water from irrigated rice crops. Bispyribac-sodium and quinclorac were found up to 28 and 91 days after the compounds have been used, respectively and tebuconazole to 21 days after the compound have been used.

Keywords: pesticide residues; rice, water; SPE; HPLC-DAD

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1.	Produção mundial de arroz nos anos de 2005-2007 (FAO, 2008).....	5
FIGURA 2.	Gráfico das exportações e importações brasileiras de arroz (em mil US\$) referente aos anos de 2005 a 2008, adaptado de IRGA, 2008.....	9
FIGURA 3.	Classificação toxicológica das formulações de pesticidas (CIT, 2007).....	24
FIGURA 4.	Representação esquemática dos processos envolvidos no comportamento e no destino ambiental dos pesticidas (VEIGA <i>et al.</i> , 2006).....	26
FIGURA 5.	Fórmula estrutural do bispiribaque-sódico.....	30
FIGURA 6.	Fórmula estrutural do quincloraque.....	31
FIGURA 7.	Fórmula estrutural do tebuconazole.....	32
FIGURA 8.	Modelo ilustrativo de um cartucho SPE.....	34
FIGURA 9.	Etapas envolvidas na SPE (1: condicionamento do cartucho; 2: adição da amostra; 3: remoção dos interferentes; 4: eluição do analito).....	36
FIGURA 10.	Foto ilustrativa do sistema SPE utilizado para a pré-concentração das amostras de água.....	56
FIGURA 11.	Diagrama ilustrativo da forma de estabelecimento dos valores de LOD e LOQ; S = sinal e R = ruído (Adaptado de MISTURA, 2003).....	61

FIGURA 12.	Espectros de absorção molecular, de 190 a 400 nm (A - quincloraque, B - equivalente ácido do bispiribaque-sódico e C - tebuconazole), obtidos por HPLC-DAD, a partir do sinal cromatográfico dos pesticidas na concentração 10 mg L^{-1} , nas condições cromatográficas do item 4.1.....	68
FIGURA 13.	Organograma do procedimento experimental otimizado.....	74
FIGURA 14.	Cromatograma obtido por HPLC-DAD para uma solução analítica contendo $5,0 \text{ mg L}^{-1}$ dos pesticidas quincloraque (t_R : 6,9 min); bispiribaque-sódico (t_R : 8,3 min) e tebuconazole (t_R : 15,3 min), nas condições descritas no item 4.1.....	75
FIGURA 15.	Cromatograma obtido por HPLC-DAD para (A) amostra “branco” de água de superfície e (B) solução analítica com a mistura dos pesticidas na concentração $2,5 \text{ mg L}^{-1}$, obtido nas condições cromatográficas do item 4.1.....	76
FIGURA 16.	Cromatograma da mistura dos pesticidas nas concentrações 0,25; 0,5; 0,75; 1,0; 2,5 e $5,0 \text{ mg L}^{-1}$ obtidos por HPLC-DAD com uma programação de comprimentos de onda, λ (até 7,8 min, $\lambda = 231 \text{ nm}$; de 7,8 a 13 min, $\lambda = 246 \text{ nm}$; de 13 a 17,0 min, $\lambda = 220 \text{ nm}$), obtido nas condições cromatográficas do item 4.1.....	77
FIGURA 17.	Cromatograma: (A) de uma amostra fortificada no nível de $10 \mu\text{g L}^{-1}$ com a mistura dos pesticidas e (B) de uma mistura padrão dos pesticidas em solvente, na concentração $2,5 \text{ mg L}^{-1}$, obtido nas condições cromatográficas citadas no item 4.1.....	83
FIGURA 18.	Perfil de dissipação do pesticida bispiribaque-sódico em água de lavoura de arroz irrigado na safra de 2007-2008.....	86

FIGURA 19.	Cromatograma de uma amostra de água coletada no 3º dia após a aplicação do pesticida bispiribaque-sódico em lavoura de arroz irrigado, obtido nas condições descritas no item 4.1.....	87
FIGURA 20.	Perfil de dissipação do pesticida quincloraque em água de arroz irrigado na safra de 2007-2008.....	89
FIGURA 21.	Cromatograma de uma amostra de água de lavoura de arroz irrigado coletada no 3º dia após a aplicação do pesticida quincloraque, obtido nas condições descritas no item 4.1.....	90
FIGURA 22.	Perfil de dissipação do pesticida tebuconazole em água de arroz irrigado na safra de 2007-2008.....	92
FIGURA 23.	Cromatograma de uma amostra de água de lavoura de arroz irrigado coletada no 3º dia após a aplicação do pesticida tebuconazole, obtido nas condições descritas no item 4.1.....	93

LISTA DE TABELAS

TABELA 1.	Comparativo de área, produtividade e produção de arroz nas safras 2006-2007 e 2007-2008.....	8
TABELA 2.	Pesticidas selecionados para este estudo (AGROFIT, 2008; ANVISA, 2008).....	29
TABELA 3.	Informações dos padrões analíticos sólidos utilizados.....	53
TABELA 4.	Pesticidas aplicados nos experimentos de estudo da dissipação, realizados na safra 2007-2008.....	64
TABELA 5.	Identificação dos diferentes tratamentos realizados na área experimental estudada.....	65
TABELA 6.	Pesticidas analisados com suas respectivas fórmulas moleculares, tempos de retenção e comprimentos de onda de máxima absorção.....	69
TABELA 7.	Condições cromatográficas otimizadas utilizadas na quantificação dos pesticidas estudados.....	70
TABELA 8.	Recuperações obtidas para os pesticidas, utilizando-se diferentes cartuchos de SPE.....	71
TABELA 9.	Recuperações obtidas para os pesticidas utilizando-se diferentes volumes do solvente de eluição.....	72
TABELA 10.	Recuperações obtidas para os pesticidas utilizando diferentes volumes de amostra na etapa de pré-concentração.....	73

TABELA 11.	Parâmetros relativos às curvas analíticas, obtidos para os pesticidas analisados por HPLC-DAD.....	78
TABELA 12.	Valores obtidos no teste de linearidade para os pesticidas....	79
TABELA 13.	Valores de LOD e LOQ do instrumento e do método.....	80
TABELA 14.	Resultados da repetitividade (RSD_r) e precisão intermediária (RSD_{pi}) do instrumento.....	81
TABELA 15.	Recuperações, RSD_r e RSD_{pi} do método para os pesticidas estudados.....	82
TABELA 16.	Concentrações (em $\mu\text{g L}^{-1}$) de bispiribaque-sódico em amostras de água de lavoura de arroz irrigado.....	85
TABELA 17.	Concentrações (em $\mu\text{g L}^{-1}$) de quincloraque em amostras de água de lavoura de arroz irrigado.....	88
TABELA 18.	Concentrações (em $\mu\text{g L}^{-1}$) de tebuconazole em amostras de água de lavoura de arroz irrigado.....	91

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

λ - Comprimento de onda

2,4-D - Ácido diclorofenoxiacético

ACN - Acetonitrila

AGROFIT - Sistema de Agrotóxicos Fitossanitários

ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária

CAS - *Chemical Abstracts Service*

CL₅₀ - Concentração Letal Média

CONAB - Companhia Nacional de Abastecimento

CONAMA - Conselho Nacional do Meio Ambiente

C18 - Sílica modificada com hidrocarboneto linear C18

DAD - Detector por Arranjo de Diodos, do inglês *Diode Array Detection*

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

d.i. - Diâmetro interno

DL₅₀ - Dose letal

EMBRAPA - Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária

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

ESI - Ionização por *electrospray*, do inglês *Electrospray Ionization*

FAO - Organização das Nações Unidas para a Alimentação e Agricultura, do inglês *Food and Agriculture Organization of the United Nations*

FE - Fase estacionária

GARP - Grupos de Analistas de Resíduos de Pesticidas

ha - Hectare

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

HS - *Headspace*

IDA - Ingestão Diária Aceitável

INMETRO - Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial

IRGA - Instituto Riograndense do Arroz

IS - Intervalo de segurança

ISA - Instituto Socioambiental

IUPAC - União Internacional de Química Pura e Aplicada, do inglês *International Union of Pure and Applied Chemistry*

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

K_H - Constante da Lei de Henry

K_{ow} - Coeficiente de partição octanol-água

LARP - Laboratório de Análises de Resíduos de Pesticidas

LC - Cromatografia Líquida, do inglês *Liquid Chromatography*

LMR - Limite Máximo de Resíduos

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

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

MAPA - Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento

MS - Espectrometria de Massas

N - Número de medidas

nm - Nanômetro

pc - Peso corporal

pH - Potencial hidrogeniônico

pKa - Produto da constante de dissociação ácida

PR - Paraná

PTFE - Politetrafluoretileno

PV - Pressão de vapor

OMS - Organização Mundial de Saúde

ONU - Organização das Nações Unidas

r^2 - Coeficiente de determinação

rpm - Rotações por minuto

s - Estimativa do desvio padrão absoluto

SINDAG - Sindicato Nacional da Indústria de Defensivos Agrícolas

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

SPME - Microextração em Fase Sólida, do inglês *Solid Phase Microextraction*

S/R - Relação sinal-ruído

R - Recuperação

RS - Rio Grande do Sul

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

RSD_r - Desvio Padrão Relativo para Repetitividade

RSD_{pi} - Desvio Padrão Relativo para Precisão Intermediária

SC - Santa Catarina

SOSBAI - Sociedade Sul-brasileira de Arroz Irrigado

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

t_{1/2} - Tempo de meia-vida

t_R - Tempo de retenção

UFMS - Universidade Federal de Santa Maria

UV - Ultravioleta

v/v - Volume por volume

x_i - Valores individuais

x_m - Média das medidas em replicatas

LISTA DE ANEXOS

ANEXO A. Herbicidas recomendados para a cultura do arroz irrigado no Brasil.....	111
ANEXO B. Fungicidas recomendados para a cultura do arroz irrigado no Brasil.....	113
ANEXO C. Distribuição <i>t</i>	114

LISTA DE APÊNDICES

APÊNDICE A.	Dados referentes às datas de coleta das amostras de água de lavoura de arroz irrigado no Campus da UFSM.....	115
APÊNDICE B.	Ilustração da dissipação do pesticida bispiribaque-sódico em amostras de água de lavoura de arroz irrigado.....	117
APÊNDICE C.	Ilustração da dissipação do herbicida quincloraque em amostras de água de lavoura de arroz irrigado.....	119
APÊNDICE D.	Ilustração da dissipação do fungicida tebuconazole em amostras de água de lavoura de arroz irrigado.....	121
APÊNDICE E.	Foto da lavoura de arroz irrigado no Campus da UFSM.....	122

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	1
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	3
2.1 Arroz.....	3
2.1.1 Origem e história do arroz.....	3
2.1.2 Características botânicas e morfológicas.....	3
2.1.3 Importância econômica do arroz.....	4
2.1.4 O arroz irrigado na Região Sul do Brasil.....	6
2.2 Água.....	10
2.2.1 O uso da água.....	10
2.2.2 A necessidade de água no cultivo de arroz irrigado.....	11
2.3 Principais pragas do arroz irrigado.....	13
2.3.1 Controle de Plantas daninhas.....	13
2.3.2 Controle das doenças no arroz irrigado.....	14
2.4 Pesticidas.....	16
2.4.1 Pesticidas permitidos para o uso em arroz irrigado.....	16
2.4.2 Histórico dos pesticidas.....	16
2.4.3 Definição.....	17
2.4.4 Caracterização e propriedades físico-químicas dos pesticidas.....	18
2.4.5 Classificação dos pesticidas.....	20
2.4.6 Efeitos e risco ambiental dos pesticidas.....	24
2.4.7 Efeitos ambientais dos pesticidas.....	25

2.4.8 Pesticidas seleccionados para este estudo.....	29
2.4.8.1 Bispiribaque-sódico.....	30
2.4.8.2 Quincloraque.....	31
2.4.8.3 Tebuconazole.....	32
2.5 Preparo de amostra empregando SPE para a determinação de resíduos de pesticidas em água.....	33
2.5.1 Extração em Fase Sólida (SPE).....	34
2.5.2 Etapas envolvidas na SPE.....	35
2.6 Métodos cromatográficos de determinação dos pesticidas.....	38
2.6.1 Determinação analítica dos compostos em estudo.....	41
2.7 Validação de métodos cromatográficos.....	44
2.7.1 Seletividade.....	45
2.7.2 Curva analítica e linearidade.....	45
2.7.3 Sensibilidade.....	47
2.7.4 Limite de Detecção e Limite de Quantificação.....	47
2.7.5 Exatidão.....	48
2.7.5.1 Recuperação.....	48
2.7.6 Precisão.....	49
2.7.6.1 Repetitividade.....	49
2.7.6.2 Precisão intermediária.....	50
2.7.6.3 Reprodutibilidade.....	50
3 MATERIAIS E MÉTODOS.....	51
3.1 Instrumentação.....	51
3.2 Reagentes, solventes e materiais utilizados.....	52
3.3 Padrões analíticos dos pesticidas estudados.....	52
3.4 Otimização do sistema cromatográfico HPLC-DAD.....	53
3.4.1 Preparo e escolha da fase móvel.....	54
3.4.2 Ajuste do pH da fase móvel.....	54
3.4.3 Escolha da vazão da fase móvel.....	54
3.4.4 Escolha do comprimento de onda de máxima absorção.....	55
3.5 Otimização dos parâmetros para a quantificação das amostras.....	55

3.5.1 Amostras de água e amostras “branco”.....	55
3.5.2 Sistema SPE para a pré-concentração dos pesticidas.....	56
3.5.3 Escolha do cartucho para a etapa de pré-concentração.....	57
3.5.4 Volume de amostra.....	57
3.5.5 Escolha do solvente de condicionamento dos cartuchos.....	58
3.5.6 Escolha do solvente e do volume de eluição dos analitos de interesse.....	58
3.6 Validação do método para amostras de água.....	58
3.6.1 Seletividade.....	59
3.6.2 Curva analítica e linearidade.....	59
3.6.3 Limite de detecção e limite de quantificação.....	60
3.6.4 Precisão (repetitividade e precisão intermediária).....	61
3.6.5 Exatidão (recuperação).....	62
3.7 Aplicação do método.....	63
3.7.1 Estudo da degradação dos pesticidas em água de lavoura de arroz irrigado.....	63
4 RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	67
4.1 Otimização das condições cromatográficas para a determinação dos pesticidas por HPLC-DAD.....	67
4.1.1 Espectros de absorção molecular.....	67
4.2 Estudo da Extração em Fase Sólida para os pesticidas em estudo.....	70
4.2.1 Escolha do cartucho para a etapa de pré-concentração.....	70
4.2.2 Escolha do volume de eluição dos analitos de interesse.....	71
4.2.3 Volume de amostra.....	72
4.3 Procedimento experimental otimizado.....	73
4.4 Validação do método analítico.....	74
4.4.1 Seletividade.....	75
4.4.2 Curva analítica e linearidade.....	77
4.4.3 Determinação dos valores de LOD e LOQ, do instrumento e do método.....	80

4.4.4 Precisão (repetitividade e precisão intermediária) do instrumento..	80
4.4.5 Exatidão (recuperação) e precisão do método.....	81
4.5 Aplicação do método.....	83
4.5.1 Dissipação dos pesticidas estudados em amostras de água de lavoura de arroz irrigado.....	84
4.5.1.1 Dissipação do bispiribaque-sódico.....	84
4.5.1.2 Dissipação do quincloraque.....	87
4.5.1.3 Dissipação do tebuconazole.....	90
5 CONCLUSÃO.....	94
TRATAMENTO DOS RESÍDUOS GERADOS.....	97
SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS.....	98
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	99
ANEXOS.....	111
APÊNDICES.....	115

1 INTRODUÇÃO

O arroz é alimento básico para aproximadamente 2,4 bilhões de pessoas. É um dos cereais mais produzidos e consumidos no mundo, caracterizando-se como o principal alimento para mais da metade da população mundial. É uma excelente fonte de energia e é um dos alimentos com melhor balanceamento nutricional devido à alta concentração de amido, fornecendo também proteínas, vitaminas e minerais.

Este cereal destaca-se pela produção e pela área de cultivo, desempenhando papel estratégico tanto no aspecto econômico quanto social. Atualmente, a Região Sul é responsável por 60% da produção brasileira, e esta produção está diretamente associada ao uso de pesticidas a fim de evitar e combater pragas que geram perdas na colheita dos grãos.

Os recursos hídricos são os mais afetados devido à agricultura exigir um suprimento de água, o que conduz o desenvolvimento dessa atividade próximo a rios e lagos. O manejo da água é de fundamental importância para o sucesso na produção de arroz irrigado, uma vez que existe uma interação irrigação/cultivo. A água é um dos fatores mais importantes na produção do arroz, pois influencia nas características da planta, nas condições nutricionais do solo, regula a temperatura e controla as plantas daninhas, minimizando os problemas com doenças e insetos.

O Brasil é um país privilegiado no que diz respeito à quantidade de água. Tem a maior reserva de água doce da Terra, ou seja, 12% do total mundial. Mas uma grande parte da água no Brasil perdeu a característica de recurso natural renovável, principalmente nas áreas densamente povoadas, em razão de processos de urbanização, industrialização e produção agrícola, que são incentivados, mas pouco estruturados em termos de preservação ambiental e da água.

Para prevenir problemas de contaminação da água por pesticidas, os países da Comunidade Européia adotam como concentração máxima admissível $0,1 \mu\text{g L}^{-1}$ por composto na água potável sem, no entanto, ultrapassar $0,5 \mu\text{g L}^{-1}$ ao considerar a soma de todos os compostos, incluindo produtos de transformação tóxicos e para águas de superfície, o limite máximo permitido é da ordem de 1 a $3 \mu\text{g L}^{-1}$.

A intensidade do uso de pesticidas, considerando os efeitos que causam ao ambiente e à saúde humana, requer o conhecimento de suas principais propriedades físicas e químicas para estimar seu comportamento no meio ambiente, desde a aplicação até o destino final, assim como as interações com o solo e o transporte, quando dissolvidos em água ou associados ao sedimento.

Por isso, o desenvolvimento de métodos que possam ser utilizados para o monitoramento destes compostos no meio ambiente é de suma importância. A Cromatografia Gasosa (GC, do inglês *Gas Chromatography*) ou a Cromatografia Líquida (LC, do inglês *Liquid Chromatography*), são métodos de separação dos constituintes de uma matriz, cuja aplicação permite a análise qualitativa e quantitativa de uma amostra.

Considerando o caráter imprescindível da água para a vida na terra, a importância do uso de pesticidas para atender a crescente demanda mundial de alimentos e a conseqüente possibilidade destes compostos contaminarem o meio ambiente e os homens, os objetivos deste trabalho foram: (i) desenvolver e validar um método para a determinação de bispiribaque-sódico, quincloraque e tebuconazole em água de lavoura de arroz irrigado utilizando SPE e HPLC-DAD e (ii) realizar um estudo de acompanhamento da dissipação destes pesticidas em água lavoura de arroz irrigado de um experimento a campo, realizado na várzea experimental do Campus da UFSM, na safra 2007-2008, para avaliar o comportamento destes compostos neste tipo de amostra.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Arroz

2.1.1 Origem e história do arroz

Diversos historiadores e cientistas apontam o sudeste da Ásia como o local de origem do arroz. As referências mais antigas do arroz são encontradas na literatura chinesa, referentes a cerca de 5.000 anos atrás. No Japão, o arroz foi introduzido pelos chineses cerca de 100 anos a.C. e na Europa começou a ser cultivado nos séculos VII e VIII com a entrada dos árabes na Península Ibérica (EMBRAPA, 2008).

O Brasil é apontado como o primeiro país no continente americano a cultivar esse cereal. O arroz era o “milho d’água” (*abati-uaupé*) que os tupis colhiam nos alagados próximos ao litoral muito antes da chegada dos portugueses. Em 1587, lavouras arroteiras já ocupavam terras na Bahia e, por volta de 1745, no Maranhão. A prática da orizicultura no Brasil, de forma organizada e racional, aconteceu em meados do século XVIII. Em 1766, a Coroa Portuguesa autorizou a instalação, na cidade do Rio de Janeiro, da primeira descascadora de arroz no Brasil, e até a metade do século XIX, o país foi um grande exportador de arroz (EMBRAPA, 2008).

O arroz é uma das culturas agrícolas mais fundamentais no mundo. Nos remotos povos do sudoeste asiático, os agricultores comparavam um grão de arroz com uma “grama de ouro”. No Japão, os indivíduos consideram o arroz como um autêntico suporte da sua cultura (EMBRAPA, 2008).

2.1.2 Características botânicas e morfológicas

O arroz (*Oryza sativa* L.), que pertence à família *Poaceae*, é uma planta de cultivo anual adaptada a ambiente aquático. Esta adaptação é devida à presença de aerênquima no colmo e nas raízes da planta, que possibilita a passagem de oxigênio do

ar para a camada da rizosfera. O cultivo da planta requer temperatura entre 24 e 30 °C e radiação solar elevada, uma vez que a disponibilidade hídrica não é fator limitante devido ao fato da cultura ser cultivada em condições de solo inundado. A duração do ciclo está compreendida numa faixa de 100 a 140 dias para a maioria das cultivares.

O arroz é uma excelente fonte de energia e é um dos alimentos com melhor balanceamento nutricional devido à alta concentração de amido, fornecendo também proteínas, vitaminas e minerais, e possui baixo teor de lipídios. Nos países em desenvolvimento, onde o arroz é um dos principais alimentos da dieta, ele é responsável por fornecer 20% da energia e 15% da proteína per capita necessária ao homem (EMBRAPA, 2008). No Brasil, o consumo per capita é de 108 g por dia, fornecendo 14% dos carboidratos, 10% das proteínas e 0,8% dos lipídios da dieta (KENNEDY *et al.*, 2002).

Apenas uma pequena quantidade de arroz é consumida como ingrediente em produtos processados, sendo seu maior consumo na forma de grão. Diversos componentes do arroz têm sido relacionados a diferentes efeitos no organismo. Pesquisadores relatam efeitos benéficos à saúde, como auxílio no controle da glicose sanguínea, redução dos lipídios séricos e da pressão arterial, entre outros, auxiliando na prevenção e no controle de doenças crônicas, como diabetes e doenças cardiovasculares (MARCHESAN, 2008).

2.1.3 Importância econômica do arroz

O arroz é um dos cereais mais produzidos e consumidos no mundo, caracterizando-se como principal alimento para mais da metade da população mundial.

Este cereal destaca-se pela produção e pela área de cultivo, desempenhando papel estratégico tanto no aspecto econômico quanto social. É considerado o cultivo alimentar de maior importância em muitos países em desenvolvimento, principalmente na Ásia e Oceania, onde vivem 70% da população total dos países em desenvolvimento e cerca de dois terços da população subnutrida mundial. É alimento básico para

aproximadamente 2,4 bilhões de pessoas e, segundo estimativas, até 2050, haverá uma demanda para atender ao dobro desta população (EMBRAPA, 2008).

Segundo dados da *Food and Agriculture Organization* (FAO, 2005), os dez maiores produtores mundiais são: China, Índia, Indonésia, Bangladesh, Vietnã, Tailândia, Myanmar, Filipinas, Brasil e Japão (Figura 1). Estes países respondem a mais de 86,2% da produção mundial deste cereal (WANDER, 2006).

Em 2006, a produção anual de arroz foi de aproximadamente 606 milhões de toneladas. Nesse cenário, o Brasil participa com 13.140.900 toneladas (2,17% da produção mundial) e destaca-se como único país não-asiático entre os dez maiores produtores mundiais (FAO, 2006).

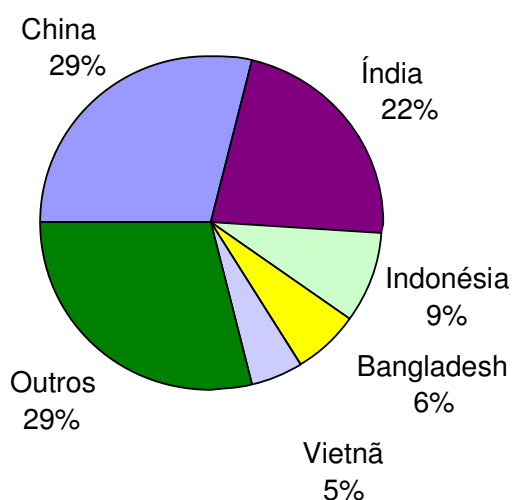


Figura 1. Produção mundial de arroz nos anos de 2005-2007 (FAO, 2008)

Aproximadamente 90% de todo o arroz do mundo é cultivado e consumido na Ásia. A América Latina ocupa o segundo lugar em produção e o terceiro em consumo.

Dentre os maiores consumidores de arroz no mundo, está a China, a Índia e a Indonésia, sendo que na China são colhidos 197 milhões de toneladas por ano

(EMBRAPA, 2008). Além de ser um item básico na dieta da população brasileira, colombiana e peruana, o arroz também é um produto importante no comércio internacional, sendo Uruguai, Argentina e Guiana, exportadores, e Brasil, México e Cuba, entre outros, importadores de arroz (GOMES & MAGALHÃES, 2004).

A cultura do arroz é extremamente versátil, se adapta a diferentes condições de solo e clima e é considerada a espécie que apresenta maior potencial para o combate a fome no mundo. Do total de arroz produzido no Brasil, aproximadamente 70% da produção é de arroz irrigado. O cultivo do arroz irrigado presente em todas as regiões brasileiras, destaca-se na Região Sul que é responsável, atualmente, por 60% da produção total deste cereal (EMBRAPA, 2008).

As várzeas subtropicais estão presentes nos Estados do Rio Grande do Sul (RS), Santa Catarina (SC) e Paraná (PR), totalizando uma área de aproximadamente 6,5 milhões de hectares de várzeas na Região Sul do Brasil. Nestas várzeas, anualmente, são cultivados cerca de 1,1 milhões de hectares de arroz irrigado, cuja produção atende mais de 50% da demanda nacional (EMBRAPA, 2008).

2.1.4 O arroz irrigado na Região Sul do Brasil

No RS, o arroz irrigado é cultivado nas seguintes regiões: Fronteira Oeste, Depressão Central, Campanha, Litoral Sul, Planície Costeira Externa da Lagoa dos Patos e Planície Costeira Interna da Lagoa dos Patos. Todas estas regiões apresentam diferenças quanto a topografia, clima, solo, disponibilidade de água para irrigação, tamanho da lavoura, determinando, assim, variações em termos de produção e produtividade média, com isso, o sistema de arroz irrigado no RS, produz anualmente cerca de 5 milhões de toneladas, sendo considerado estabilizador da safra nacional, responsável por cerca de 50% da produção brasileira (EMBRAPA, 2008).

Os investimentos em pesquisas e tecnologia no RS possibilitaram ampliar a área cultivada de arroz, contribuindo para um crescimento significativo da safra gaúcha no cenário nacional. Segundo dados da Companhia Nacional de Abastecimento (CONAB), a área cultivada nos demais estados brasileiros recuou de pouco mais de 5,426 milhões

de hectares na safra 1977-1978 para cerca de 1,815 milhões de hectares na safra 2007-2008. Porém, no território gaúcho, a área cresceu de 566 mil hectares para cerca de 1,067 milhões de hectares nos últimos 30 anos, o que elevou a participação do Estado na área nacional de 9,6% na safra 1977-1978 para 37% na safra 2006-2007 (IRGA, 2008).

Na safra 2007-2008, por exemplo, segundo levantamento do IRGA, o Estado produziu 7,488 milhões de toneladas de arroz, frente a uma produção total no país de 12,107 milhões de toneladas. Na comparação com a safra 2006-2007 do Estado, que obteve 6,494 milhões de toneladas, o crescimento chegou a mais de 15%. Comparando a rentabilidade média obtida na safra 1993-1994, de 4,4 toneladas por hectare com a atual que apresenta uma produtividade média de 7,022 toneladas por hectare, observa-se um aumento significativo de quase 60%.

Um levantamento realizado pelo CONAB em setembro de 2008 faz uma comparação de área, produtividade e produção de arroz da safra 2006-2007 e 2007-2008 em todas as regiões brasileiras conforme Tabela 1.

Tabela 1 - Comparativo de área, produtividade e produção de arroz nas safras 2006-2007 e 2007-2008

Região	Área (mil ha)		Produtividade (kg ha ⁻¹)		Produção (mil t)	
	Safra	Safra	Safra	Safra	Safra	Safra
	06-07	07-08	06-07	07-08	06-07	07-08
Norte	495,9	434,4	2.250	2.363	1.116,0	1.026,6
Nordeste	746,3	709,6	1.403	1.664	1.047,3	1.180,5
Centro-oeste	442,6	375,5	2.667	2.953	1.180,4	1.109,0
Sudeste	115,0	94,4	2.387	2.534	274,5	239,2
Sul	1.167,6	1.266,9	6.593	6.751	7.697,7	8.552,7
Norte/nordeste	1.242,2	1.143,9	1.741	1.929	2.163,3	2.207,0
Centro-sul	1.725,2	1.736,8	5.305	5.701	9.152,6	9.900,9
Brasil	2.967,4	2.880,7	3.813,4	4.203,1	11.315,9	12.107,9

Fonte: CONAB - Levantamento: set/2008

Os dados demonstram a maior produtividade da região centro-sul, sendo responsável por mais de 80% da produção de arroz no Brasil.

O superávit acumulado, até outubro de 2008, das vendas externas comparado com as importações, alcança o recorde histórico de 208 mil toneladas (importações de apenas 371 mil toneladas) e em relação à balança comercial, o resultado ainda é mais impressionante, com as vendas totalizando US\$ 251,4 milhões (contra US\$ 33,7 milhões em 2007) e as importações US\$ 155,9 milhões, gerando um superávit financeiro de US\$ 95,6 milhões, conforme Figura 2 (IRGA, 2008).

**Exportações e importações de arroz (em mil US\$)
Ano agrícola (março a outubro)**



	2005	2006	2007	2008
Volume de exportações	35.243,00	50.125,00	33.786,00	251.469,00
Volume de importações	81.001,00	93.145,00	172.251,00	155.928,00
Saldo em US\$	-45.758,00	-43.020,00	-138.465,00	95.541,00

Figura 2. Gráfico das exportações e importações brasileiras de arroz (em mil US\$) referente aos anos de 2005 a 2008, adaptado de IRGA, 2008

Embora o Brasil não seja considerado um país exportador, as exportações brasileiras de arroz até dezembro de 2008 atingiram novo recorde de 650 mil toneladas, um crescimento de 183% sobre o volume alcançado em 2007 e 93% da meta prevista pelo setor arrozeiro. Este número, no entanto, deve ser superado no fim do ano agrícola (IRGA, 2008).

O esforço da cadeia produtiva foi fundamental para o setor arrozeiro alcançar, e possivelmente superar a meta prevista, consolidando o país entre os dez maiores

exportadores mundiais e, com isso, projetar novos mercados, escoar excedentes de produção, criar um novo parâmetro de preço para o mercado interno, aumentar a capacidade de beneficiamento das indústrias e manter a rentabilidade da produção (IRGA, 2008).

A valorização dos preços no mercado internacional e a mudança do perfil do produto comercializado se refletiram no valor da tonelada exportada que passou de US\$ 182, em 2007, para US\$ 434 em 2008, agregando valor em torno de 140% ao produto exportado (IRGA, 2008).

2.2 Água

2.2.1 O uso da água

O planeta Terra possui aproximadamente 1,4 bilhões de quilômetros cúbicos de água, mas 97,5% deste total correspondem às águas dos oceanos, ou seja, água salgada, restando apenas 2,5% de água doce. Estes 2,5% de água doce estão distribuídos nos lençóis freáticos e aquíferos, nas calotas polares, geleiras, neve permanente e outros reservatórios. Em todo mundo, 10% da utilização da água é destinada ao abastecimento público, 23% para a indústria e 67% para a agricultura (ISA, 2008).

O Brasil é um país privilegiado no que diz respeito à quantidade de água. Tem a maior reserva de água doce da Terra, ou seja, 12% do total mundial e também abriga o maior rio em extensão e volume do Planeta, o Amazonas.

Uma grande parte da água no Brasil perdeu a característica de recurso natural renovável, principalmente nas áreas densamente povoadas, em razão de processos de urbanização, industrialização e produção agrícola, que são incentivados, mas pouco estruturados em termos de preservação ambiental e da água. Na zona rural, os recursos hídricos também são explorados de forma irregular, além disso, parte da vegetação protetora da bacia (mata ciliar) é destruída para a realização de atividades como, por exemplo, agricultura e pecuária. Deve-se considerar também que os

pesticidas e dejetos utilizados nessas atividades também acabam por poluir a água (ISA, 2008). Os mananciais poluídos, os rios secos, as grandes áreas desertificadas, as pessoas tendo que caminhar longas distâncias para conseguir água, ou adoecendo por consumir água contaminada não é uma previsão trágica de um futuro distante, mas sim uma realidade próxima, e em alguns lugares, atual. A escassez de recursos hídricos é evidenciada em várias regiões do planeta, e este problema tende a se agravar nos próximos anos caso nada seja feito para revertê-lo. Atualmente, mais de um bilhão de pessoas não tem acesso à água limpa em quantidade suficiente, para suprir as necessidades básicas diárias, como por exemplo, tomar banho ou preparar alimentos (ISA, 2008).

De acordo com relatório da Organização das Nações Unidas (ONU), já em 2025, uma proporção de dois terços da população mundial (cerca de 5,5 bilhões de pessoas) deve enfrentar escassez de água. Em 2050, esse número aumentaria para 75% da humanidade. Segundo o mesmo documento, cerca de um bilhão de pessoas em todo o mundo não têm acesso à água potável, e mais de 2,5 bilhões não têm saneamento básico adequado (ISA, 2008). Com a crescente redução na disponibilidade de água potável para as atividades humanas, o monitoramento de pesticidas no solo e na água constitui um indicador importante para garantir que estes estejam sendo utilizados de forma adequada e que não coloquem em risco as águas naturais.

2.2.2 A necessidade de água no cultivo de arroz irrigado

O manejo da água é de fundamental importância para o sucesso na produção de arroz irrigado, uma vez que existe uma interação irrigação/cultivo. A água é um dos fatores mais importantes na produção do arroz, pois influencia nas características da planta, nas condições nutricionais do solo, regula a temperatura e controla as plantas daninhas, minimizando os problemas com doenças e insetos (SOSBAI, 2003).

O cultivo de arroz irrigado necessita de água durante todo o seu ciclo, principalmente no período de estabelecimento do cultivo; no perfilhamento; e no período entre o início da diferenciação da panícula e enchimento de grãos. Portanto, a

falta de água nestes períodos causa danos significativos à cultura, com reflexos na produtividade (SOSBAI, 2005).

A irrigação da lavoura de arroz está intimamente relacionada ao sistema de cultivo adotado. Cada tipo de cultivo irá determinar o preparo do solo, a época de início e fim da irrigação e o manejo e uso de água pela lavoura de arroz (SOSBAI, 2005).

O cultivo do arroz irrigado, por submersão do solo, está entre as culturas mais exigentes em termos de recursos hídricos, com um uso de água de 2.000 L de água para produzir 1 kg de grãos com casca. A manutenção desta lâmina de água uniforme sobre a superfície do solo traz uma série de benefícios para as plantas de arroz, sendo uma estratégia de ordem técnica e econômica para aumentar a produtividade (EMBRAPA, 2008).

Vale salientar que a quantidade de água necessária para o cultivo de arroz irrigado representa o somatório de água necessário para atender às demandas decorrentes da saturação do solo, formação da lâmina de água, evapotranspiração e repor as perdas por infiltração lateral e por percolação. Esta quantidade depende de diversos fatores, tais como: condições climáticas, manejo da cultura, características físicas do solo, duração do ciclo da cultivar, entre outros (SOSBAI, 2005; EMBRAPA, 2008).

No cultivo de arroz irrigado, a altura da lâmina de água varia entre 7,5 e 10,0 cm. Quando se utiliza lâminas de água maiores que 10,0 cm, há um aumento do consumo de água, redução do número de perfilhos e as plantas se tornam mais altas, aumentando as perdas de água por percolação e infiltração lateral. Porém, na fase reprodutiva das plantas de arroz, independente do sistema de cultivo, a altura da lâmina de água pode ser elevada até 15 cm por um período de 15 a 20 dias, em regiões onde possam ocorrer temperaturas abaixo de 15 °C, apresentando a água uma função termoreguladora (EMBRAPA, 2008).

Um levantamento realizado pelo IRGA mostra que nas décadas de 70 e 80 o uso de água por hectare chegava a cerca de 15.000 m³ e atualmente, com técnicas de manejo integrado, o uso fica em torno de 12.000 m³ de água. Dados de pesquisas e de lavouras experimentais mostram que é possível produzir de 8 a 10 toneladas de arroz

usando um volume de 8.000 a 9.000 m³ de água por hectare, dos quais de 40 a 50% desse volume corresponde a água da chuva (EMBRAPA, 2008).

Além do manejo da irrigação ser um fator primordial para aumentar a produtividade da lavoura de arroz irrigado, a adequação da área para que a irrigação seja bem executada é um fator fundamental para um adequado controle das plantas invasoras. Feito isso, o manejo dos herbicidas é facilitado. Existe, no mercado, uma grande quantidade de herbicidas, que quando manejados corretamente são eficientes.

Embora ainda não se disponha de limites máximo de resíduos para a maioria dos pesticidas usados para a lavoura de arroz, recomenda-se evitar a retirada da água da lavoura com resíduos de pesticidas e sólidos totais em suspensão. O Conselho Nacional de Meio Ambiente (CONAMA) define alguns parâmetros sobre a qualidade da água de diversas classes, através da resolução n° 357 de 17 de março de 2005 (SOSBAI, 2005).

Para prevenir problemas de contaminação da água por pesticidas, os países da Comunidade Européia adotam como concentração máxima admissível 0,1 µg L⁻¹ por composto na água potável sem, no entanto, ultrapassar 0,5 µg L⁻¹ ao considerar a soma de todos os compostos, incluindo produtos de transformação tóxicos (EEC DRINKING WATER DIRECTIVE, 1980; CERDEIRA, 2002). Para águas de superfície, o limite máximo permitido é da ordem de 1 a 3 µg L⁻¹ (SLOBODNÍK *et al.*, 1997).

2.3 Principais pragas do arroz irrigado

2.3.1 Controle de plantas daninhas

As plantas daninhas são invasoras que concorrem com o arroz sendo um dos principais limitantes da produtividade das lavouras de arroz irrigado do Rio Grande do Sul e Santa Catarina.

A diversidade de espécies infestantes, aliada ao elevado índice de ocorrência das mesmas, dificulta o controle dos invasores, com conseqüências negativas de suma importância sobre a produtividade e qualidade da produção.

O sistema ideal de manejo das plantas daninhas é a integração da prevenção e com os métodos de controle, associando medidas de controle que sejam eficientes temporariamente, pela supressão da população ativa de plantas, com o uso de métodos mecânicos (capinas) e químicos (herbicidas). Ao mesmo tempo, são adotadas medidas de longo prazo para se reduzir a população passiva com a integração de métodos cultural e biológico como, por exemplo, mudanças nas práticas agronômicas e de manejo das áreas de lavoura.

O controle químico através do emprego de herbicidas tem sido o método mais utilizado na lavoura de arroz, em função da sua grande praticidade, eficiência e rapidez. Por se tratar de um método que envolve o uso de produtos químicos, é necessário que se tenha conhecimentos técnicos sobre a ação dos herbicidas, principalmente para alcançar a máxima eficiência biológica e causar o mínimo impacto ambiental.

O uso de pesticidas tem a possibilidade de aplicação a grandes áreas em pouco tempo, tornando uma tecnologia apropriada para grandes lavouras, mas também é necessário o cuidado na aplicação, de modo que não resulte em controle inadequado de ervas daninhas e em danos à cultura e ao meio ambiente (SOSBAI, 2005).

No Anexo A estão relacionados os herbicidas recomendados para a cultura do arroz irrigado no Brasil.

2.3.2 Controle das doenças no arroz irrigado

As recomendações técnicas para o controle de pragas na cultura do arroz irrigado, visam o emprego de medidas integradas capazes de reduzir os danos à cultura, sem prejudicar a produtividade.

Na região Sul do Brasil, a cultura do arroz irrigado é atacada por várias doenças, as quais podem prejudicar a produtividade e a qualidade dos grãos colhidos. Entre estas doenças destaca-se, como principal, a brusone, cujos danos podem comprometer até 100% da produção de algumas lavouras nos anos de ataques epidêmicos. Nas demais doenças, os efeitos são menores, podendo até passarem despercebidos ao produtor.

A ocorrência e o nível de prejuízo destas doenças variam em função das condições ecológicas, meteorológicas, prevalência de raças dos patógenos, suscetibilidade das cultivares e manejo das práticas culturais. Por isso, o uso de medidas de controle integrado é sempre mais eficiente do que a adoção de um método isolado de controle como, por exemplo, apenas a aplicação de pesticidas.

O método mais prático e econômico para controlar a incidência de patógenos nas plantas, consiste na semeadura de cultivares mais resistentes ou tolerantes. Entretanto, na prática, a resistência em níveis elevados, geralmente não ocorre numa única cultivar para todas as doenças, ou não é durável por vários anos. Por isso, sempre é necessário escolher as cultivares de arroz mais tolerantes às principais doenças ocorrentes na Região e somar, aos efeitos desta resistência, outras medidas preventivas de controle integrado como, por exemplo, o controle químico. Desta forma, os danos serão economicamente menores e o nível de controle obtido mais eficiente e duradouro.

O tratamento do arroz com fungicidas poderá ser um método complementar eficiente no controle de doenças, principalmente naquelas lavouras com histórico de danos freqüentes. Entretanto, esse controle será mais eficiente e econômico, sempre que for precedido pela melhoria no manejo da cultura. A aplicação dos fungicidas durante o estágio de floração possibilita a manutenção dos níveis de produtividade e melhora o rendimento de grãos inteiros, sendo que nas lavouras de produção de sementes, diminui a disseminação dos patógenos através das mesmas e assegura melhorias na germinação e no vigor das plântulas (SOSBAI, 2005). O Anexo B relaciona os fungicidas registrados no Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) para uso em arroz irrigado no Brasil.

2.4 Pesticidas

2.4.1 Pesticidas permitidos para o uso em arroz irrigado

O uso de pesticidas é um dos recursos mais utilizados pelos agricultores para elevar a produtividade agrícola (VEIGA *et al.*, 2006).

Os pesticidas são moléculas sintetizadas para afetar determinadas reações bioquímicas de insetos, microrganismos, animais e plantas que se quer controlar ou eliminar, mas determinados processos bioquímicos são comuns a todos os seres vivos, e assim, o efeito pode então atingir não só o organismo que se espera controlar, como também outros seres que possam afetar a produtividade (SPADOTTO *et al.*, 2004).

Originalmente, os pesticidas eram estáticos, possuíam baixa solubilidade e tinham um forte poder de adesão as partículas do solo. Com a evolução tecnológica, estes compostos passaram a ser mais solúveis em água, possuir baixa capacidade de adesão e ser mais voláteis. Essas inovações tecnológicas, que eram baseadas na manipulação de compostos químicos, criaram pesticidas cada vez mais tóxicos, persistentes e eficazes para combater as pragas da agricultura. Conseqüentemente, estas alterações tecnológicas nas características químicas destes compostos aumentaram e prolongaram ainda mais o potencial nocivo dos pesticidas de causar danos à saúde humana e ao meio ambiente (VEIGA *et al.*, 2006).

No Brasil, a demanda por pesticidas vem se acentuando a cada ano, destacando-se como um dos maiores consumidores mundiais de pesticidas (COUTINHO *et al.*, 2005). O Rio Grande do Sul, em 2006, foi responsável por 10,4% do consumo nacional de pesticidas (SINDAG, 2007), devido à intensa atividade agrícola, com destaque para o cultivo de arroz irrigado (IRGA, 2007).

2.4.2 Histórico dos pesticidas

A utilização de pesticidas é quase tão antiga como a agricultura. As antigas civilizações grega, romana e chinesa já conheciam, há três mil anos atrás, a capacidade

do pó de enxofre controlar insetos e do sal de matar ervas daninhas. Por volta do século XV, elementos químicos tóxicos como o arsênio e o mercúrio começaram a ser utilizados no combate às pragas em lavouras. Já no século XVII, produtos de origem natural como a nicotina (extraída das folhas de tabaco), também foram utilizados como arma contra insetos (JONATAN, 1989; ANVISA, 2006).

Os pesticidas organoclorados foram sintetizados ainda no século XIX, mas suas propriedades inseticidas só foram conhecidas em meados do século XX. Eles foram empregados pela primeira vez durante a Segunda Guerra Mundial para controlar uma epidemia de tifo (OPAS, 1982). Já os pesticidas organofosforados foram primeiramente sintetizados na Alemanha na década de 30 para serem utilizados como arma química. Após a Segunda Guerra Mundial, sobretudo a partir dos anos 50, eles passaram a ser utilizados no combate de pragas nas lavouras (LEVIGARD, 2001; PIMENTEL *et al.*, 2006). Entretanto, os pesticidas mais amplamente utilizados nesta época eram os compostos organoclorados, destacando-se dentre estes o diclorodifenil-tricloroetano, conhecido como DDT. Este composto, sintetizado pela primeira vez em 1874 pelo químico alemão Zeidler, só teve suas propriedades inseticidas conhecidas em 1939. Apesar de ter salvado milhões de italianos da febre tifóide e de ser responsável pela erradicação da malária na Europa e América do Norte, o DDT é proibido em pelo menos 86 países, inclusive no Brasil, tendo em vista os efeitos prejudiciais detectados após a introdução do seu uso (ANVISA, 2006).

2.4.3 Definição

Os termos pesticidas, praguicidas, biocidas, defensivos agrícolas, agrotóxicos e agroquímicos expressam as várias denominações dadas a um mesmo grupo de substâncias químicas destinadas ao controle de pragas (animais e vegetais) e de doenças de plantas. O termo agrotóxico somente foi adotado após a sanção da Lei Federal nº 7.802, de 11 de julho de 1989, atualmente regulamentada pelo Decreto nº 4.074, de 04 de janeiro de 2002. Esta lei define os agrotóxicos e os termos afins como “produtos e agentes de processos físicos, químicos ou biológicos, destinados ao uso

nos setores de produção, no armazenamento e beneficiamento de produtos agrícolas, nas pastagens, na proteção de florestas, nativas ou plantadas, e de outros ecossistemas e de ambientes urbanos, hídricos e industriais, cuja finalidade seja alterar a composição da flora ou da fauna, a fim de preservá-las da ação danosa de seres vivos considerados nocivos, bem como as substâncias e produtos empregados como desfolhantes, dessecantes, estimuladores e inibidores de crescimento”.

A denominação agrotóxico torna claro o caráter danoso destas substâncias capazes de destruir a vida animal e vegetal, características que ficam totalmente mascaradas em uma denominação de caráter positivo como a de “defensivos agrícolas”. Segundo PERES *et al.* (2004), o termo agrotóxico é mais ético, honesto e esclarecedor, tanto para agricultores como para consumidores.

Neste estudo, adotou-se a denominação “pesticida” seguindo a tendência internacional empregada em publicações da área. Segundo o *Codex Alimentarius*, os pesticidas incluem os inseticidas, fungicidas, herbicidas, desinfetantes ou toda e qualquer outra substância que tenha como objetivo prevenir, destruir, atrair, repelir ou controlar qualquer praga, incluindo espécies indesejáveis de plantas, insetos ou animais, durante as etapas de produção, armazenamento, transporte, distribuição e processamento do alimento ou ração animal e que seja fornecido aos animais para controle de ectoparasitas (FAO, 2005).

2.4.4 Caracterização e propriedades físico-químicas dos pesticidas

A intensidade do uso de pesticidas, considerando os efeitos que causam ao ambiente e à saúde humana, requer o conhecimento de suas principais propriedades físicas e químicas para estimar seu comportamento no meio ambiente, desde a aplicação até o destino final, assim como as interações com o solo e o transporte, quando dissolvidos em água ou associados ao sedimento (SILVA & FAY, 2004; BARCELÓ & HENNION, 2003; CARVALHO, 2000).

A estrutura molecular de cada pesticida e as propriedades físico-químicas determinam, pelo menos parcialmente, o grau com que este irá interagir no ambiente, A

presença de grupos funcionais contendo oxigênio, nitrogênio e enxofre tendem a tornar os compostos orgânicos mais reativos, tanto química quanto biologicamente, mais solúveis em água e menos voláteis quando comparados aos hidrocarbonetos com o mesmo número de carbonos. A presença de halogênios também torna o composto menos solúvel em água, mais volátil e normalmente menos reativo tornando-os mais estável ambientalmente (SILVA & FAY, 2004).

As principais propriedades físico-químicas são: solubilidade em água, coeficiente de adsorção normalizado pelo carbono orgânico (K_{oc}), constante de dissociação ácida do composto (pka), pressão de vapor (PV), constante da lei de Henry (K_H), coeficiente de partição octanol-água (K_{ow}), tempo de meia vida ($t_{1/2}$) no solo e na água (CABRERA *et al.*, 2008)

A solubilidade em água é uma propriedade importante para os processos ambientais, pois atua no comportamento, transporte e destino desses compostos, indicando a tendência do pesticida em ser carregado superficialmente no solo atingindo águas superficiais. No entanto, este não é o único parâmetro para prever a percolação, devendo o mesmo ser analisado em conjunto com outras propriedades (SILVA & FAY, 2004).

Os valores da constante de dissociação ácida (pKa) têm efeito sobre a solubilidade do pesticida e, através do pKa do pesticida e do pH do solo, é possível prever a forma predominante (ionizável ou molecular) de um pesticida ácido e a mesma relação pode ser obtida usando pKb para pesticidas alcalinos (BARCELÓ & HENNION, 2003).

Com o coeficiente de adsorção (K_{oc}) é possível prever a tendência do pesticida a ficar adsorvido na matéria orgânica do solo. O valor de K_{oc} mede a tendência que um composto químico tem de sofrer partição entre a fase sólida e a solução do solo no sistema solo-água. Moléculas altamente solúveis tendem a apresentar valores de K_{oc} relativamente baixos (menores que $150 \text{ cm}^3 \text{ g}^{-1}$), podendo ser mais rapidamente biodegradados no solo e na água (BARCELÓ & HENNION, 2003).

A Constante da Lei de Henry (K_H), também chamada de coeficiente de partição ambiental ar-água, juntamente com a pressão de vapor (PV) mostra a tendência do pesticida a volatilizar ou permanecer na fase aquosa. Para algumas moléculas,

dependendo do valor da pressão de vapor e/ou valor da solubilidade em água, o K_H dificilmente pode ser medido (SILVA & FAY, 2004).

O coeficiente de partição octanol-água (K_{ow}) relaciona as propriedades hidrofílicas e lipofílicas, demonstrando a tendência à bioconcentração destes compostos, sendo um fator importante na avaliação de riscos, pois em conjunto com os dados de degradação, o potencial de acumulação pode ser usado na identificação dos pesticidas que podem ser transportados via cadeia alimentar (BARCELÓ & HENNION, 2003).

O tempo de meia vida ($t_{1/2}$) é o tempo no qual determinado princípio ativo atinge 50% de sua concentração original e é um critério usado para determinar os efeitos ambientais relacionados à volatilização, potencial de lixiviação e características de degradação de vários compostos químicos. É útil para a comparação da persistência relativa de diferentes pesticidas no ambiente e é importante para o entendimento do potencial de impacto no solo e na água (CABRERA *et al.*, 2008; PEIXOTO, 2007).

Além da variedade de processos envolvidos na determinação do destino ambiental de pesticidas, diferenças nas estruturas e propriedades das substâncias químicas, e nas características e condições ambientais, podem afetar esses processos. Condições meteorológicas, composição das populações de microrganismos do solo, propriedades físicas e composição química do solo, presença ou ausência de plantas, localização da área na topografia e práticas de manejo do solo podem também afetar o destino de pesticidas no ambiente. Além disso, a taxa e a quantidade de água que se move na superfície e no perfil do solo têm um grande impacto no movimento dos pesticidas (SPADOTTO *et al.*, 2004).

2.4.5 Classificação dos pesticidas

A produção agrícola, principalmente em escala comercial, sempre esteve associada ao uso de pesticidas com a finalidade de evitar e combater pragas que geram perdas na colheita. Os principais produtos usados comercialmente são

compostos orgânicos sintéticos com alta atividade biológica, que em geral são tóxicos, podendo ser cancerígenos e causadores de mutações (SILVA & FAY, 2004).

Os pesticidas podem ser classificados sob diversos aspectos, como por exemplo: quanto ao tipo ou espécie de organismo que se pretende eliminar ou controlar, quanto à estrutura química das substâncias ativas e quanto à toxicidade que estes oferecem a saúde humana.

- **Classificação quanto ao organismo que eliminam ou controlam**

Segundo BARBOSA (2004), os pesticidas podem ser classificados quanto ao organismo que eliminam ou controlam:

Acaricidas: controle de ácaros.

Bactericidas: controle de bactérias.

Fungicidas: controle de fungos.

Herbicidas: controle de ervas daninhas.

Inseticidas: controle de insetos.

Nematicidas: controle de nematóides.

Rodenticidas: controle de roedores.

Vermífugos: controle de vermes.

- **Classificação quanto à estrutura química das substâncias ativas**

Quimicamente, os pesticidas são classificados como compostos inorgânicos e orgânicos.

Inorgânicos: Embora o efeito inseticida do arsênico e do enxofre fosse conhecido pelos povos gregos, romanos e chineses, o uso dos inseticidas inorgânicos data de 1867, quando um produto chamado verde-Paris foi preparado comercialmente e utilizado contra um grande número de pragas. Após o surgimento de compostos orgânicos com a mesma finalidade, sua utilização reduziu-se drasticamente e hoje não totalizam 10% dos produtos em uso.

Orgânicos: Os pesticidas orgânicos estão divididos em naturais e sintéticos. A utilização de compostos orgânicos naturais pelo homem é remota. Os compostos de origem vegetal constituem a maioria deste grupo, mas pode-se citar também os compostos de origem animal e os derivados do petróleo.

O desenvolvimento dos compostos orgânicos sintéticos possibilitou a geração de uma grande diversidade de produtos orgânicos, classificados como organoclorados, organofosforados, clorofosforados, carbamatos, piretróides (SANCHES, 2003; ANVISA, 2005).

Organoclorados: Constituem o grupo pioneiro dos pesticidas sintéticos. De acordo com a estrutura molecular, correspondem a hidrocarbonetos clorados, ainda que, além do cloro, alguns deles possuam oxigênio. São derivados do clorobenzeno, ciclohexano ou ciclodieno. Devido à alta estabilidade de grande parte dos organoclorados à ação da luz solar e temperatura ambiente, não são degradados facilmente, o que leva à contaminação do meio ambiente, causando um desequilíbrio biológico.

Organofosforados: Foram os primeiros compostos a substituírem os representantes do grupo dos organoclorados, aos quais os insetos já apresentavam resistência. Quanto a sua estrutura molecular, são ésteres, amidas ou derivados tiol dos ácidos de fósforo como, por exemplo, o ácido fosfórico, ácido tiofosfórico e ácido ditiofosfórico, contendo várias combinações de carbono, hidrogênio, oxigênio, fósforo, enxofre e nitrogênio. Os organofosforados possuem vários grupos segundo sua estrutura, estando entre os mais numerosos os fosfatos, fosforotioatos e fosforoditioatos. São compostos biodegradáveis e, portanto apresentam curta persistência no solo. A hidrólise sob condições de alcalinidade é o principal meio de degradação no ambiente. Muitos inseticidas organofosforados são instáveis em pH menor que 2, sendo a maioria mais estável na faixa de pH do ambiente, entre 3 e 6.

Carbamatos: Os primeiros carbamatos foram colocados no mercado por volta de 1950 e apresentam um pequeno espectro de atividade inseticida. São pesticidas orgânicos derivados do ácido carbâmico. Geralmente são compostos instáveis e vários fatores influenciam a degradação, como por exemplo, umidade, temperatura, luminosidade e volatilidade. Os carbamatos são metabolizados por microrganismos,

plantas e animais ou degradados na água e no solo, especialmente em meio alcalino. A decomposição ocorre com formação de amônia, amina, dióxido de carbono, fenol e álcoois.

Piretróides: Foram introduzidos no mercado em 1976 e ainda que sejam mais caros em relação a outros pesticidas, os piretróides têm sido bastante empregados na área da saúde e da agricultura. Os piretróides sintéticos têm boa estabilidade sob a luz e a temperatura ambiente. Degradam-se por hidrólise e oxidação, sendo caracterizados também pela rápida degradação por microrganismos do ambiente.

- **Classificação quanto à toxicidade**

As principais exposições aos pesticidas ocorrem nos setores agropecuários, saúde pública, empresas desintetizadoras, produção, comercialização e transporte. O uso descontrolado, o medo da perda da produtividade da safra, a não utilização de equipamentos de proteção, a falta de informação sobre os riscos dos pesticidas são alguns dos responsáveis pela intoxicação dos trabalhadores rurais (CIT, 2007). Além da exposição ocupacional, a contaminação alimentar e ambiental coloca em riscos de intoxicação outros grupos populacionais. Merecem destaques as famílias dos agricultores, a população vizinha a uma unidade produtiva e a população em geral, que se alimenta do que é produzido no campo. Conforme a legislação, os pesticidas estão agrupados em quatro classes toxicológicas, conforme o perigo que eles podem apresentar para os seres humanos. Segundo a legislação brasileira, o produto comercial deve apresentar no rótulo, a cor correspondente à classe de sua toxicidade para alertar o perigo deste produto, conforme demonstrado na Figura 3 (BRASIL, 2002).

Classe I	Rótulo Vermelho – Extremamente tóxico	*DL₅₀ = 0-50 mg kg⁻¹
Classe II	Rótulo Amarelo – Altamente tóxico	*DL₅₀ = 50-500 mg kg⁻¹
Classe III	Rótulo Azul – Medianamente tóxico	*DL₅₀ = 500-5000 mg kg⁻¹
Classe IV	Rótulo Verde – Pouco tóxico	*DL₅₀ > 5000 mg kg⁻¹

*DL₅₀ quantidade de uma determinada substância que é necessária ingerir ou administrar para provocar a morte a pelo menos 50% da população em estudo

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

Esta classificação garante a interpretação direta do grau de perigo dos pesticidas à saúde humana, facilitando ao agricultor, e principalmente ao indivíduo, identificar a dimensão do risco na utilização destes produtos. É importante ressaltar que dentre as substâncias da Classe I encontram-se aquelas comprovadamente carcinogênicas e mutagênicas (LEVIGARD, 2001).

O risco potencial que os pesticidas oferecem aos consumidores e ao meio ambiente, devido a uma exposição crônica diária, determinou a exigência de Limites Máximos de Resíduos (LMR). O LMR é a quantidade máxima de pesticida legalmente aceita no alimento, em decorrência da aplicação adequada numa fase específica, desde sua produção até o consumo, e é expressa em mg kg⁻¹ de alimento (ANVISA, 2006).

Os LMR's são estabelecidos para diferentes combinações de cultura e pesticida. Em função disto, vários países possuem programas de monitoramento dos níveis de resíduos de pesticidas, a fim de garantir a segurança alimentar e ambiental (STEPAN *et al.*, 2005).

2.4.6 Efeitos e risco ambiental dos pesticidas

A utilização de compostos orgânicos como, por exemplo, os pesticidas, teve grande importância tanto no aumento da produtividade agrícola quanto no controle das

doenças. Porém, da mesma forma que algumas características químicas, como a persistência, eram acrescentadas à função biocida dos pesticidas, resultando num fator positivo para a agricultura, pois um mesmo composto eliminaria mais pragas por um período maior de tempo, também representavam maiores riscos à saúde humana e ao meio ambiente (VEIGA *et al.*, 2006).

Os efeitos ambientais de um pesticida dependem intrinsecamente da sua ecotoxicidade a organismos terrestres e aquáticos e, em um sentido mais amplo, também da sua toxicidade ao ser humano. Além disso, dependem diretamente das concentrações atingidas nos diferentes compartimentos ambientais (solo, água, planta e atmosfera) que, por sua vez, dependem do modo e das condições de aplicação, da quantidade ou dose usada e do comportamento e destino do pesticida no meio ambiente (SPADOTTO *et al.*, 2004).

Os pesticidas podem ser agentes mutagênicos, teratogênicos, carcinogênicos, e afetar a reprodução de mamíferos. O descuido com os pesticidas pode ser fatal e causar agravos à saúde, tais como: irritações na pele e nos olhos, problemas respiratórios, câncer em vários órgãos e distúrbios sexuais, como a impotência e a esterilidade (ANVISA, 2008).

No Brasil, ainda não existem dados confiáveis que retratem a realidade das intoxicações e mortes por pesticidas. A Organização Mundial da Saúde (OMS) estima que ocorram cerca de três milhões de intoxicações agudas por pesticidas anualmente no mundo, provocando um total aproximado de 220 mil mortes (VEIGA *et al.*, 2006).

2.4.7 Efeitos ambientais dos pesticidas

Dependendo de suas características, os pesticidas podem permanecer em diferentes compartimentos ambientais, tais como: atmosfera, solo, água superficial e subterrânea. Os recursos hídricos são os mais afetados devido à agricultura exigir um suprimento de água, o que conduz o desenvolvimento dessa atividade próximo a rios e lagos (CARVALHO *et al.*, 2000; LOURENCETTI *et al.*, 2005).

Após a aplicação de um pesticida, vários processos físicos, químicos, físico-químicos e biológicos determinam seu comportamento no ambiente. A Figura 4 ilustra os processos envolvidos no comportamento e no destino ambiental dos pesticidas.

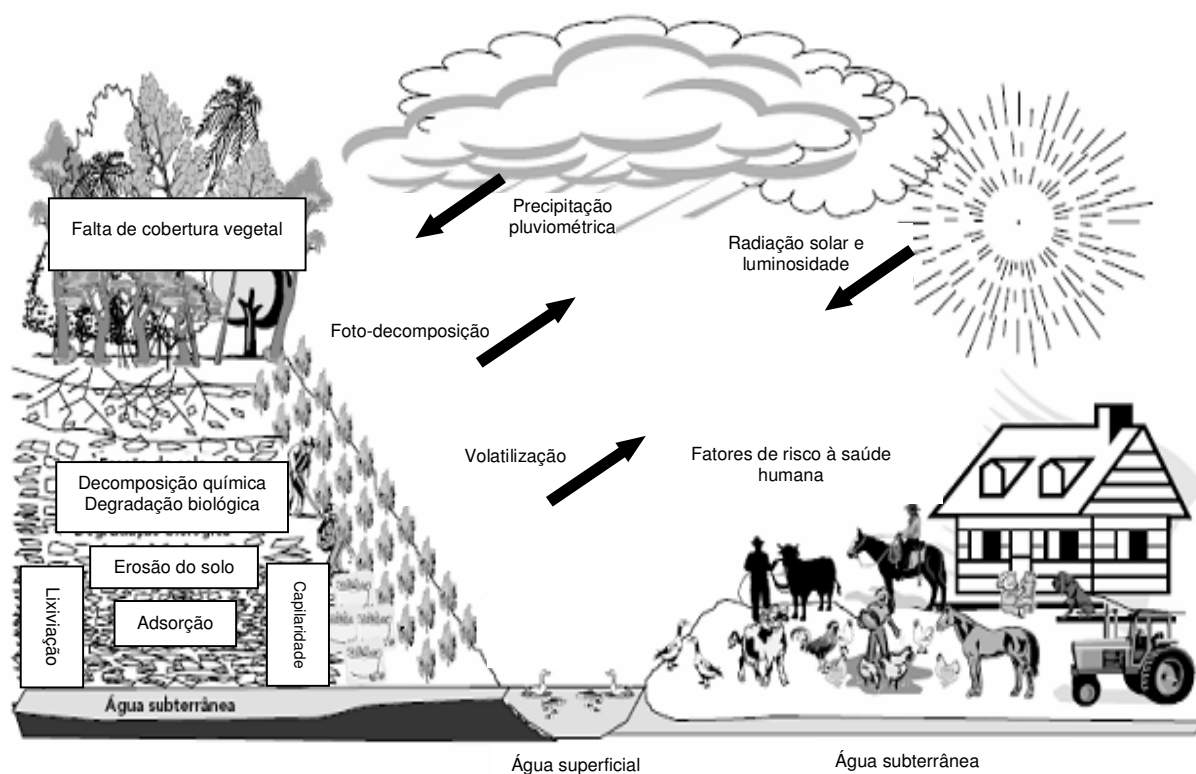


Figura 4. Representação esquemática dos processos envolvidos no comportamento e no destino ambiental dos pesticidas (VEIGA *et al.*, 2006)

O destino dos pesticidas no ambiente é governado por processos de retenção (sorção, absorção), de transformação (degradação química e biológica) e de transporte (deriva, volatilização, lixiviação e carreamento superficial), e por interações desses processos (SPADOTTO *et al.*, 2004).

Quando aplicados diretamente no solo, os pesticidas podem ser degradados por vias químicas, fotólise ou ação de microorganismos. Entretanto, as moléculas com alta persistência (baixa taxa de degradação) podem permanecer no ambiente sem sofrer qualquer alteração. Essas moléculas podem ser adsorvidas nas partículas do solo,

dessorvidas a partir dessas mesmas partículas, sofrer lixiviação (lavagem do solo pela água da chuva) e atingir os lençóis subterrâneos ou, ainda, serem levadas para águas superficiais. Nos ambientes aquáticos, os pesticidas podem sofrer adsorção (ligar-se ao sedimento por interações químicas e físicas) ou dessorção das partículas de sedimentos. No ar, as moléculas na forma de gás ou de vapor podem ser transportadas por muitos quilômetros, atingindo áreas muito distantes da região de aplicação (SANCHES, 2003).

Considerando os processos de transporte entre compartimentos ambientais, com os quais os pesticidas estão relacionados depois de aplicados em áreas agrícolas, a lixiviação e o carreamento superficial merecem destaque. O escoamento superficial favorece a contaminação das águas superficiais, com os pesticidas sendo levados adsorvidos às partículas do solo erodido ou em solução na água. A lixiviação dos pesticidas através do solo tende a resultar em contaminação das águas subterrâneas e neste caso, as substâncias químicas são carreadas juntamente com a água que alimenta os lençóis freáticos, subterrâneos e superficiais (SPADOTTO *et al.*, 2004).

A necessidade da avaliação do risco de contaminação deve-se ao considerável suprimento de água que a agricultura e a pecuária exigem, o que conduz ao desenvolvimento dessas atividades próximo a rios e lagos (CARVALHO *et al.*, 2000).

A permanência dos pesticidas no solo agrícola é inversamente dependente da taxa de ocorrência dos processos de transporte. Além disso, o transporte para a atmosfera por volatilização e a perda para áreas vizinhas por deriva podem ser processos importantes para alguns pesticidas em certas condições (SPADOTTO *et al.*, 2004).

Alguns pesticidas dissipam-se rapidamente no solo e esse processo é denominado mineralização, pois resulta da transformação do produto em composto mais simples, como H_2O , CO_2 e NH_3 . Embora parte desse processo seja ocasionado por reações químicas, como a hidrólise e a fotólise, o catabolismo microbológico e o metabolismo são, geralmente, os principais meios de mineralização. Os microrganismos do solo utilizam o pesticida como fonte de carbono e outros nutrientes. Algumas moléculas são moderadamente persistentes e seus resíduos podem permanecer no

solo durante um ano inteiro, outras podem persistir por mais tempo (SPADOTTO *et al.*, 2004).

Alguns organismos possuem grande capacidade de bioacumular substâncias químicas, caracterizando o processo de bioacumulação ou bioconcentração. Esse fenômeno, no entanto, depende de dois fatores básicos: (a) da presença de um mecanismo de absorção ou “sorvedouro” representado principalmente pelos lipídios do organismo e (b) das propriedades físico-químicas do pesticida que podem favorecer ou não sua entrada no organismo. Se o processo de bioacumulação atingir níveis elevados em uma cadeia trófica, passa a caracterizar então a biomagnificação (VALARINI *et al.*, 2003).

No ambiente aquático, além da hidrólise e da fotólise, os pesticidas podem também sofrer a degradação biológica e, ainda, a bioacumulação e a biomagnificação, diferenciando apenas os microrganismos nesse ambiente em relação àqueles presentes no solo (SPADOTTO *et al.*, 2004).

Um entendimento dos processos do comportamento e destino de pesticidas no ambiente é essencial para direcionar planos de monitoramento dos riscos ambientais. A variedade de pesticidas usados representa muitas classes de substâncias químicas orgânicas e os tipos de interações desses compostos com diferentes componentes do ambiente são enormes (SPADOTTO *et al.*, 2004).

Até o final da década de 70, os sistemas hídricos subterrâneos eram considerados imunes à contaminação por pesticidas, pois se acreditava que estes compostos se degradariam em partículas inofensivas ou ficariam retidos no ambiente natural antes de contaminá-los. Entretanto, já foi comprovado através de diversos estudos que a presença de pesticidas nos sistemas hídricos seria mais comum do que se imaginava, principalmente nos sistemas hídricos próximos de regiões agrícolas intensivas na utilização de pesticidas (VEIGA *et al.*, 2006).

Assim, o uso de pesticidas e seus possíveis efeitos à saúde humana e ambiental tornaram-se uma grande preocupação à comunidade científica, principalmente quando o recurso hídrico potencialmente contaminado seria utilizado para consumo humano.

Algumas das possíveis soluções visando reduzir essa possibilidade de contaminação dos sistemas hídricos seriam: proteção das fontes de água subterrâneas

e superficiais; gestão e manuseio dos pesticidas em áreas de produção rural; regulação estatal; educação ambiental; e adoção de práticas que minimizem os danos ao meio ambiente e a saúde humana.

Além disso, o desenvolvimento de pesticidas deveria ser acompanhado pela evolução do conhecimento dos mecanismos de atuação desses pesticidas no meio ambiente e na saúde humana e deveriam ser estimuladas práticas mais sustentáveis de gestão do uso e do descarte dos pesticidas, o que contribuiria, inclusive, para mitigar possíveis efeitos negativos da presença desses pesticidas no meio ambiente e no corpo humano (VEIGA *et al.*, 2006).

2.4.8 Pesticidas selecionados para este estudo

Os pesticidas selecionados para este estudo foram escolhidos devido ao seu grande emprego no cultivo do arroz irrigado da região central do Rio Grande do Sul. Os compostos selecionados e recomendados para uso em arroz irrigado estão listados na Tabela 2.

Tabela 2. Pesticidas selecionados para este estudo (AGROFIT, 2008; ANVISA, 2008)

Pesticida	IDA (mg kg ⁻¹ pc)	LMR (mg kg ⁻¹)	IS (dias)
Bispiribaque-sódico	0,01	0,01	118
Quincloraque	0,38	0,05	90
Tebuconazole	0,03	0,1	35

pc = peso corporal; IDA = Ingestão diária aceitável; LMR = Limite máximo de resíduos; IS = intervalo de segurança para a cultura do arroz

A seguir, serão definidas algumas características físico-químicas dos compostos selecionados.

2.4.8.1 Bispiribaque-sódico

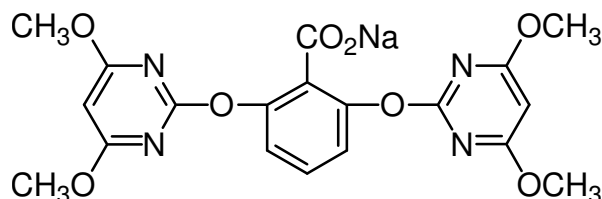


Figura 5. Fórmula estrutural do bispiribaque-sódico

Classe: herbicida

Grupo químico: ácido pirimidiniloxibenzóico

Nome químico (IUPAC): 2,6-bis (4,6-dimetoxipirimidin-2-loxi) benzoato de sódio

Número no *Chemical Abstracts Service* (CAS): 125401-92-5

Fórmula molecular: C₁₉H₁₇N₄NaO₈

Massa molar: 452,4 g mol⁻¹

pKa: 3,05

K_{ow} log P = -1,03 (23 °C)

Solubilidade em água: 73,3 g L⁻¹ (25 °C)

Classe toxicológica: III (medianamente tóxico)

DL₅₀ oral - ratos machos: 4111 mg kg⁻¹

Intervalo de segurança para a cultura do arroz: 118 dias

Nome comercial: Nominee®

O herbicida bispiribaque-sódico é registrado no Brasil para a cultura do arroz irrigado. É indicado para o controle em pós-emergência de gramíneas, ciperáceas e algumas dicotiledôneas. É seletivo, de absorção foliar, de translocação sistêmica e atua por inibir a enzima acetolactato sintetase, chave no processo de biossíntese dos aminoácidos valina, leucina e isoleucina (RODRIGUES & ALMEIDA, 1998).

2.4.8.2 Quincloraque

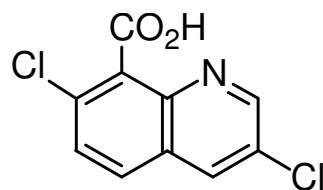


Figura 6. Fórmula estrutural do quincloraque

Classe: herbicida

Grupo químico: quinolinas

Nome químico (IUPAC): ácido 3,7-dicloroquinolina-8-carboxílico

Número no CAS: 84087-01-4

Fórmula molecular: $C_{10}H_5Cl_2NO_2$

Massa molar: $242,1 \text{ g mol}^{-1}$

pKa: 4,34 (20 °C)

$K_{ow} \log P$: -1,15 (pH = 7,0)

Solubilidade em água: $0,065 \text{ mg kg}^{-1}$ (pH = 7, 20 °C)

Classe toxicológica: classe III (medianamente tóxico)

DL₅₀ oral - ratos: 2680 mg kg^{-1}

Intervalo de segurança para a cultura do arroz: 90 dias

Nome comercial: Facet[®]

O quincloraque é compatível com outros herbicidas usados na cultura do arroz, como propanil, tiobencarbe e bentazona. É registrado, no Brasil, para a cultura do arroz e para o controle de plantas daninhas em pós-emergência.

2.4.8.3 Tebuconazole

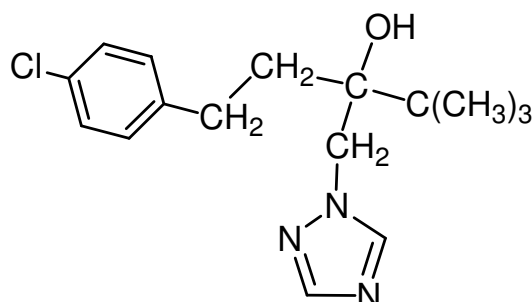


Figura 7. Fórmula estrutural do tebuconazole

Classe: fungicida

Grupo químico: triazol

Nome químico (IUPAC): (RS)-1-p-clorofenil-4,4-dimetil-3-(1H-1,2,4-triazol-1-ilmetil)pentan-3-ol

Número no CAS: 107534-96-3

Fórmula molecular: $C_{16}H_{22}ClN_3O$

Massa molar: $307,8 \text{ g mol}^{-1}$

pKa: nenhum

K_{ow} log P: 3,7 (20 °C)

Solubilidade em água: 36 mg L^{-1} (pH 5-9, 20 °C)

Classe toxicológica: III (medianamente tóxico)

DL₅₀ oral - ratos machos: 4000 mg kg^{-1}

Intervalo de segurança para a cultura do arroz: 35 dias

Nomes comerciais: Folicur[®]

O tebuconazole é um fungicida sistêmico do grupo dos triazóis que tem ação preventiva e curativa e é rapidamente absorvido pelas partes vegetativas da planta. De aplicação foliar, o fungicida é utilizado no Brasil para as culturas de arroz, café, cevada, soja, citrus, trigo, entre outros.

2.5 Preparo de amostra empregando SPE para a determinação de resíduos de pesticidas em água

A maioria das análises que envolvem amostras ambientais, como por exemplo, água e solo, requer etapas de preparo de amostra, antes da medida da concentração do analito de interesse em um instrumento. Isto acontece porque as matrizes geralmente são complexas e o analito está presente na amostra em concentrações muito baixas. Dentre as várias etapas envolvidas no preparo de amostras complexas, pode-se destacar a extração dos analitos da matriz, o *clean up* (eliminação de impurezas) e a concentração dos analitos de interesse (MAJORS, 2001; LANÇAS, 2004).

As técnicas de extração e/ou pré-concentração permitem que a análise dos componentes de interesse se torne possível. O objetivo principal é a obtenção de uma subfração da amostra original enriquecida com os analitos de interesse, de forma que se obtenha uma separação cromatográfica livre de interferentes, com detecção adequada e um tempo razoável de análise (QUEIROZ, 2001; LANÇAS, 2004).

Até pouco tempo, a técnica analítica mais utilizada no preparo de amostras complexas era a extração líquido-líquido, que é um procedimento trabalhoso, requer grandes quantidades de solventes orgânicos, apresenta grande custo e é de difícil automação, além de apresentar pequena repetibilidade/reprodutibilidade em função das várias etapas envolvidas no processo. Em meados da década de 1970, com o objetivo de eliminar esses problemas, foi introduzida uma técnica muito eficiente para a concentração dos analitos em amostras aquosas, a qual foi denominada Extração em Fase Sólida (SPE). Atualmente, a Extração em Fase Sólida é uma das ferramentas mais poderosas e mais empregadas para a extração e/ou pré-concentração de analitos presentes em matrizes complexas (QUEIROZ, 2001; LANÇAS, 2004).

2.5.1 Extração em Fase Sólida (SPE)

A SPE é uma técnica de separação líquido-sólido baseada nos mecanismos de separação da cromatografia líquida clássica e em sua forma mais simples e conhecida, emprega cartuchos preenchidos com sorventes, que tem seus sítios ativados pela passagem de solventes adequados, tornando-os disponíveis para interagirem com a amostra, e desta forma os analitos de interesse são retidos e posteriormente eluídos utilizando-se um pequeno volume de solvente, de forma a coletar o analito em concentração já apropriada para a análise (LANÇAS, 2004; SANTOS, 2007).

Este procedimento apresenta várias vantagens, tais como: menor tempo comparado com a extração líquido-líquido; utilização de um menor volume de solventes tóxicos; não há formação de emulsões e existe uma grande possibilidade de automação (CAPELÓ, 2007).

Normalmente, a SPE é realizada em cartuchos de polipropileno, contendo cerca de 50 a 500 mg de material sorvente, com tamanho de partícula de 40 a 60 μm , fixado no tubo através de dois discos de polietileno, conforme mostrado na Figura 8 (QUEIROZ, 2001; LANÇAS, 2004).

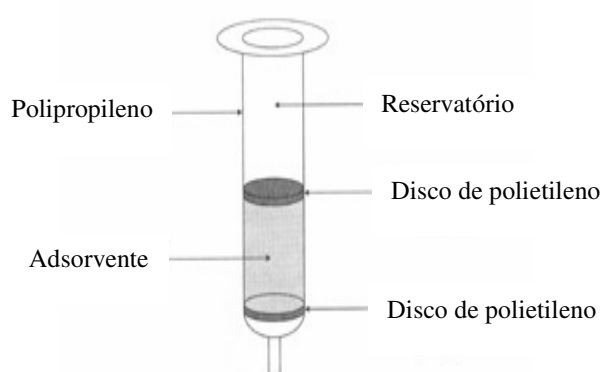


Figura 8. Modelo ilustrativo de um cartucho SPE

Os principais modos de operação na SPE são a concentração dos analitos, também chamado de enriquecimento, o isolamento dos analitos ou *clean up*, o isolamento da matriz e ainda a estocagem da amostra.

A passagem de um grande volume de amostra através do cartucho SPE tem como objetivo reter preferencialmente os analitos. Em seguida, é realizada a eluição destes analitos com uma pequena quantidade de solvente de modo que os analitos coletados estejam bem mais concentrados que na amostra original. O *clean up* tem como objetivo isolar o analito de interesse dos interferentes da matriz. Normalmente é utilizado em matrizes complexas, como por exemplo, alimentos, para separar o analito dos outros componentes presentes no extrato. O isolamento da matriz não deixa de ser um *clean up*, mas neste caso o objetivo é reter na fase sólida os interferentes da matriz, em vez de o analito de interesse. A estocagem da amostra é empregada para a análise de amostras que se encontram em local distante do laboratório analítico. Neste caso é evitado o transporte de grandes quantidades de amostras, quando várias forem analisadas, além de tornar possível a análise de compostos lábeis e/ou voláteis (LANÇAS, 2004).

2.5.2 Etapas envolvidas na SPE

Basicamente, a SPE está dividida em 4 etapas principais, podendo sofrer pequenas adaptações ou modificações dependendo do interesse do experimento (LANÇAS, 2004).

- 1ª etapa: Condicionamento do cartucho

Nesta etapa ocorre a ativação do material existente dentro do cartucho para deixar os sítios ativos disponíveis, e ocorre também o condicionamento do adsorvente com um solvente adequado a fim de ajustar as forças do solvente de eluição com o solvente da amostra. A escolha do solvente de condicionamento dependerá principalmente do material a ser ativado dentro do cartucho.

- 2º etapa: Adição da amostra

A introdução da amostra no cartucho é realizada por meio de vácuo, de maneira lenta e com vazão inferior a 5 mL min^{-1} . A transferência da amostra para o cartucho deve ser quantitativa, a fim de permitir resultados reprodutíveis.

- 3º etapa: Remoção dos interferentes

Esta etapa consiste na limpeza do cartucho para retirar os interferentes menos retidos no adsorvente do que os analitos de interesse. O solvente ideal para esta etapa é o próprio solvente da amostra, caso ele não remova também o analito de interesse.

- 4º etapa: Eluição do analito

Os analitos de interesse são eluídos com uma pequena quantidade de solvente, de forma que a solução coletada já se encontre em concentração apropriada para a análise. O solvente de eluição deve eluir os analitos de interesse, mas não permitir a eluição de interferentes que não tenham sido eliminados na etapa anterior.

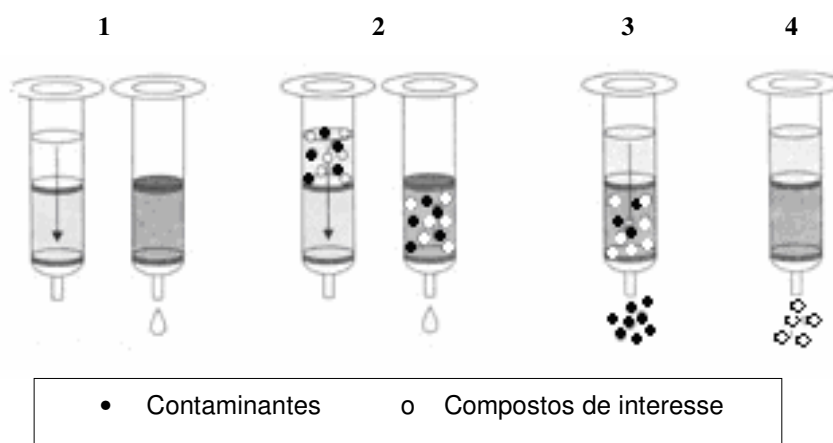


Figura 9. Etapas envolvidas na SPE (1: condicionamento do cartucho; 2: adição da amostra; 3: remoção dos interferentes; 4: eluição do analito)

A crescente popularidade da SPE está ligada ao uso de uma variedade de adsorventes sólidos, como por exemplo: os que contêm grupos octilsilano (C8), octadecilsilano (C18), resinas poliméricas, amino ou ciano ligados ao suporte de sílica ou ao carbono grafitizado ou alumina (BARCELÓ, 1991).

O adsorvente mais popular utilizado na SPE, para a extração de pesticidas em amostras de água, é o C18 ligado ao suporte de sílica. O principal mecanismo de retenção é a partição, devido às interações apolares entre as ligações C-H do grupo C18 e C-H do analito (JUNKER-BUCHHEIT & WITZENBACHER, 1996). Estas fases são muito resistentes à pressão e têm boa reprodutibilidade na retenção. Sua principal desvantagem é a sua pobre estabilidade em meios muito ácidos ou básicos, o que limita seu uso nas condições de pH entre 2 e 8 (BARCELÓ & HENNION, 1997).

Copolímeros de estireno-divinilbenzeno têm sido utilizados em métodos *screening* para a determinação de uma ampla variedade de poluentes prioritários (LISKA, 2000). A extração utilizando resinas poliméricas ocorre devido à adsorção dos analitos por meio de forças de *Van der Waals*, que permitem uma fácil dessorção dos analitos.

Os adsorventes para SPE mais recentemente utilizados são os materiais poliméricos mistos, tais como os cartuchos Oasis[®] e Strata-X[®]. Os cartuchos Oasis HLB, por exemplo, são adsorventes de fase reversa possuindo balanço hidrofílico-lipofílico, proporcionado pela presença de dois monômeros, divinilbenzeno que é lipofílico e N-vinilpirrolidona que é hidrofílico. Possui maior retenção para analitos polares, maior resistência a valores extremos de pH e uma capacidade de retenção relativa 3 vezes maior que os adsorventes tradicionais à base de sílica, como por exemplo o C18, (CARABIAS-MARTINEZ *et al.*, 2002; HUG *et al.*, 2003; WATERS, 2006). Já os cartuchos Strata-X[®] são polímeros de estireno-divinilbenzeno com a superfície modificada. As propriedades deste polímero permitem vários mecanismos de retenção, incluindo interações hidrofóbicas, ligações hidrogênio e ligações pi-pi (π - π), proporcionando boa seletividade para compostos com características ácidas, neutras e básicas.

2.6 Métodos cromatográficos de determinação dos pesticidas

A utilização dos pesticidas em escala mundial possibilita sua detecção em vários compartimentos ambientais. Como consequência, muitos destes pesticidas podem ser encontrados em baixas concentrações necessitando de métodos analíticos com alta sensibilidade e confiabilidade, capazes de serem aplicados nas mais diversas matrizes. Com isso, os baixos níveis de resíduos permitidos, impostos pelas agências regulamentadoras, requerem o desenvolvimento de métodos analíticos que apresentem exatidão e precisão elevadas para as determinações quantitativas de pesticidas (BALINOVA, 1996; KUSTER *et al.*, 2006). As análises de resíduos de pesticidas em amostras biológicas e ambientais, desde meados de 1950, basearam-se, primeiramente, na determinação por meio da Cromatografia Gasosa (GC, do inglês *Gas Chromatography*) e a partir do início dos anos 70, começou a ser publicado o uso da Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC, do inglês *High Performance Liquid Chromatography*) para a determinação destes compostos nos diferentes tipos de amostras.

Entre os métodos modernos de análise, a cromatografia ocupa um lugar de destaque devido à facilidade com que efetua separação, identificação e quantificação das espécies químicas, por si mesma ou em conjunto com outras técnicas instrumentais de análise, como a espectrofotometria ou a espectrometria de massas (COLLINS, 2006).

Publicações mostram que há uma tendência em se utilizar, na determinação de resíduos de pesticidas em águas, técnicas sofisticadas como Cromatografia Gasosa e Cromatografia Líquida acoplada à Espectrometria de Massas (GC-MS e LC-MS) (PLANAS *et al.*, 2006; RICHARDSON, 2006; BECEIRO-GONZÁLEZ *et al.*, 2007; BARCELÓ & PETROVIC, 2007; ALDA, 2009), no entanto, os fatores mais importantes na escolha da técnica para a análise de pesticidas são o comportamento do analito no sistema cromatográfico, a necessidade de derivatização do analito e o trabalho necessário para isso, a disponibilidade da técnica no laboratório e o propósito geral da análise (LISKA & SLOBODNÍK, 1996).

JEANNOT *et al.* (2000) aplicaram a técnica de Cromatografia Líquida com Detector de Arranjo de Diodos (HPLC-DAD), Cromatografia Líquida Acoplada à Espectrometria de Massas (LC-MS) e Espectrometria de Massas *tandem* (LC-MS/MS) para o monitoramento de pesticidas em águas de superfície coletadas em regiões da França e em um rio no Canadá. Foram monitorados 48 pesticidas divididos em 8 classes diferentes com alguns de seus produtos de degradação. Diferentes técnicas de extração foram empregadas, incluindo Extração Líquido-Líquido e SPE. Obteve-se uma boa correlação entre as técnicas de HPLC-DAD e LC-MS para as 60 amostras. A inclinação das curvas expressou a relação entre os resultados obtidos com HPLC-DAD versus aqueles obtidos por LC-MS perto de 1, com um coeficiente de correlação r maior que 0,93. No entanto, a identificação dos compostos foi melhor usando a técnica de LC-MS que HPLC-DAD, devido a riqueza de informações fornecidas pelo espectro de massas. A técnica de LC-MS/MS com detector *ion trap*, testada contra o LC-MS em 10 amostras de água de superfície apresentou resultados que correlacionaram bem com os resultados do LC-MS, mas gerando espectros de massas com mais informações sobre a estrutura de substâncias desconhecidas.

ALDA *et al.* (2009) apresentaram uma revisão com questões regulamentares e análises de pesticidas polares em águas naturais e águas tratadas utilizando LC-MS. Apresentaram uma visão geral dos métodos recentemente publicados na literatura com as principais condições experimentais descritas para a determinação de pesticidas em amostras reais usando LC-MS. Dentre estas amostras reais, destaca-se a análise de águas subterrâneas e de superfície, embora também tenha sido investigada água potável, águas pluviais, águas residuais, de drenagem e águas do mar.

MARÍN *et al.* (2006) desenvolveram dois métodos *on-line* utilizando SPE-LC-ESI-MS/MS (do inglês, *Solid Phase Extraction-Liquid Chromatography-ElectroSpray Ionization-Mass Spectrometry/Mass Spectrometry*) para a determinação rápida e confirmação de 18 pesticidas polares e 9 produtos de transformação em 147 amostras de água (61 de superfície e 86 de profundidade). A maioria dos compostos analisados foi detectada pelo menos uma vez e alguns deles, foram detectados em mais de 60% das amostras. Os autores concluem que, por isso, é interessante o estudo dos produtos

de transformação/degradação dos pesticidas e a conseqüente inclusão destes compostos em programas de monitoramento.

SILVA *et al.* (2005) avaliaram o impacto de pesticidas utilizados no cultivo de arroz, no ambiente aquático em uma região da Argentina, através de modelos integrados e de trabalho de campo e de laboratório. O modelo usado avalia a distribuição dos pesticidas entre os vários compartimentos ambientais (ar, água, solo, sedimentos, sólidos em suspensão e peixes). Segundo os autores, a produção de arroz pode afetar as comunidades aquáticas e, indiretamente, a população local, uma vez que as águas contendo os pesticidas são descartadas através dos canais de drenagem ou diretamente nos corpos d'água.

HERNANDEZ *et al.* (2001) desenvolveram um método multirresíduo, sensível e específico para determinar 29 pesticidas em amostras de solo e água de superfície. O método foi baseado no uso da SPE *on-line* com LC-MS/MS. O método apresentou bons resultados para todos os compostos, sendo que a maioria poderia ser quantificada em concentrações abaixo de 25 ng L⁻¹. A eficiência e a aplicabilidade deste método foram avaliadas pela análise de várias amostras incluídas em um programa de monitoramento dos resíduos de pesticidas.

CARABIAS-MARTÍNEZ *et al.* (2002) desenvolveram um método, utilizando SPE e HPLC-DAD, para a determinação simultânea de 3 herbicidas amplamente utilizados e 7 de seus mais comuns produtos de degradação em águas de rios e poços. As recuperações variaram de 69 a 109% e os limites de detecção de 0,01 a 0,1 µg L⁻¹. Nas amostras analisadas foi detectada a presença de 3 dos compostos analisados.

AYANO *et al.* (2004) estudaram a determinação de 5 sulfoniluréias e 3 uréias em amostras de água pura, água potável e água de rio. Para a extração utilizaram SPE com 3 tipos de cartuchos: polímero de poliestireno (PS), C18 e polímero de N-vinilpirrolidona (Oasis[®]) e o sistema de detecção utilizado foi LC-ESI-MS. De maneira geral, as melhores recuperações foram obtidas com cartuchos Oasis[®] como, por exemplo, para pirazossulfuron, que ficaram entre 86,4 e 112,9% nos 3 tipos de águas analisadas e os valores de LOQ variaram de 0,6 a 65,9 ng L⁻¹.

CARABIAS-MARTINEZ *et al.* (2004) estudaram dois métodos, empregando HPLC-DAD ou LC-MS para a detecção simultânea de fenil e sulfoniluréias em amostras

de água natural. A extração foi realizada por SPE testando diferentes adsorventes: poliméricos (Oasis[®] HLB ou Lichrolut[®] EM) ou C18. Dentre os cartuchos testados, foi escolhido o Oasis[®] como melhor adsorvente. As recuperações ficaram entre 70 e 95%. Os métodos foram aplicados para a análise de amostras de água de rio e os limites de detecção obtidos ficaram abaixo de 50 ng L⁻¹ para ambos os métodos.

VEIGA *et al.* (2005) desenvolveram um método analítico para determinar 32 pesticidas aplicados em áreas agrícolas do sul da Espanha, utilizando SPE e LC-MS com ionização *electrospray* (ESI). Os LOD variaram entre 10 e 50 ng L⁻¹ e os LOQ entre 25 a 50 ng L⁻¹. As recuperações variaram entre 60 e 110%.

TRAN *et al.* (2007) descreveram a aplicação de diferentes técnicas de extração para a pré-concentração de 10 herbicidas polares ácidos e não-ácidos em amostras de água de rio. A eficiência da extração foi verificada através da comparação entre Extração Líquido-Líquido com diclorometano e SPE. Os herbicidas foram detectados por HPLC-UV e a extração destes pesticidas das amostras de água de rio foi realizada utilizando SPE, já que esta técnica apresentou melhores resultados de recuperação.

2.6.1 Determinação analítica dos compostos em estudo

OCHIAI *et al.* (2006) desenvolveram um método para análise multirresíduo de pesticidas em amostras aquosas usando extração com duas barras de agitação, dessorção térmica e cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas. Foram determinados 82 pesticidas de diferentes classes (organoclorados, organofosforados, carbamatos, piretróides, entre outros) destacando, dentre eles, o fungicida tebuconazole. O método apresentou boa linearidade com valores de $r^2 > 0,99$ e alta sensibilidade com limites de detecção menores que 10 ng L⁻¹ para a maioria dos pesticidas estudados. O método foi aplicado na determinação de pesticidas em níveis de ng L⁻¹ em águas de rio.

KURZ (2007) desenvolveu e validou um método para a determinação de resíduos dos herbicidas imazetapir, bispiribaque-sódico e pirazossulfurom etílico e do inseticida fipronil incluindo seus metabólitos em águas. Os herbicidas foram

determinados por HPLC-DAD e o fipronil e seus metabólitos foram determinados por GC-ECD. Os LOQs para o método foram de $0,5 \mu\text{g L}^{-1}$ para os herbicidas, de $0,0125 \mu\text{g L}^{-1}$ para fipronil e de $0,005 \mu\text{g L}^{-1}$ para seus metabólitos. As recuperações ficaram entre 90,8 e 114,2%, com RSD menores que 13,4% para os herbicidas e recuperações entre 81,3 e 112,3%, com RSD menores que 14,2% para fipronil e seus metabólitos. Este método foi aplicado em um estudo de monitoramento da dissipação de pesticidas em amostras de água de lavoura de arroz irrigado.

GONÇALVES (2007) realizou um estudo de métodos cromatográficos empregando Extração em Fase Sólida e HPLC-DAD e LC-MS/MS para a determinação de resíduos dos herbicidas imazetapir, imazapique e clomazona em água e solo do cultivo de arroz irrigado. O método foi aplicado no acompanhamento da dissipação destes herbicidas em lavoura de arroz irrigado para avaliar o seu comportamento neste tipo de amostra. Os LODs para os herbicidas determinados por HPLC-DAD em amostras de água foram de $0,12 \mu\text{g L}^{-1}$ para imazetapir e imazapique e $0,25 \mu\text{g L}^{-1}$ para o clomazona. As recuperações ficaram entre 80,9 e 106,7% para as amostras de água, com RSD menores que 9,0%. O método foi aplicado em estudos de dissipação na lavoura de arroz irrigado e foram encontrados resíduos de imazetapir até 28 dias e do imazapique até 21 dias após a aplicação e o clomazona até 42 dias após a aplicação dos produtos em amostras de água.

PRIMEL *et al.* (2009) validaram um método para a determinação dos pesticidas carbofurano, clomazona, 2,4-D e tebuconazole em águas subterrâneas. O método utilizou extração por SPE com cartuchos C18 e quantificação por HPLC-DAD, apresentando recuperações médias de 87,9 e 96,9% para a repetibilidade e a precisão intermediária, respectivamente, com RSD de 0,8 a 20,7% para todos os compostos. O método foi aplicado na determinação de resíduos de pesticidas em águas subterrâneas com um LOQ de $0,2 \mu\text{g L}^{-1}$.

ZHOU *et al.* (2007) desenvolveu e otimizou um método para determinação de metalaxil, dietofencarbe, miclobutanil, prometim e tebuconazole utilizando SPE com cartuchos contendo nanotubos de carbono como adsorvente e determinação dos pesticidas por HPLC-UV. Os LODs para os compostos ficaram na faixa de 2,99 a $6,94 \text{ ng L}^{-1}$. A faixa linear de trabalho foi de 0,2 a $80 \mu\text{g L}^{-1}$, exceto para prometim que foi na

faixa de 0,05 a 20 $\mu\text{g L}^{-1}$. O método apresentou excelente precisão, com valores na faixa de 1,43 a 5,86%. O método foi aplicado em análises de águas ambientais e os resultados apontam que este poderia ser utilizado como uma alternativa para análises de rotina.

CABRERA *et al.* (2008) realizaram um estudo na Região Sul do Estado do RS, onde foram aplicados critérios para avaliar a possibilidade de contaminação dos recursos hídricos, utilizando as propriedades físico-químicas dos compostos. A avaliação do potencial de contaminação foi realizada utilizando o critério de *Screening* da Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (US-EPA), a medida do índice de vulnerabilidade de águas subterrâneas (GUS) e a aplicação do método de GOSS. Tais análises possibilitaram indicar quais os compostos apresentam risco de contaminar os recursos hídricos contribuindo, assim, na elaboração de um planejamento de monitoramento de pesticidas em água na região, minimizando custo e tempo para seu desenvolvimento.

PEIXOTO (2007) realizou um estudo da estabilidade a campo dos pesticidas carbofurano e quincloraque em água de lavoura de arroz irrigado empregando SPE e HPLC-DAD. Todos os valores obtidos nos ensaios de fortificação apresentaram valores entre 82 e 112%, com valores de RSD menores que 14,5%. O LOQ para o carbofurano foi de 2,0 $\mu\text{g L}^{-1}$ e para o quincloraque foi de 0,6 $\mu\text{g L}^{-1}$. No estudo a campo, o carbofurano dissipa-se facilmente e, a partir do 5º dia após a aplicação não se encontrou mais resíduos deste composto na lâmina de água. Já o herbicida quincloraque permanece um tempo maior retido na água, sendo que foram encontrados resíduos deste composto até 42 dias após a aplicação.

PRIMEL (2003) desenvolveu e validou um método analítico para a determinação dos herbicidas quincloraque, clomazona, bentazona, 2,4-D e propanil em águas de superfície empregando SPE e HPLC-UV. As recuperações variaram de 85,7 a 109,8% com RSD de 1,8 a 13,4%. O método foi aplicado para as análises de água de irrigação de lavoura de arroz, que contém resíduos de pesticidas, na Região Central Estado do RS. Os LOD e LOQ permitiram analisar amostras de água com concentrações de até 0,5 $\mu\text{g L}^{-1}$ de quincloraque e bentazona e de até 0,1 $\mu\text{g L}^{-1}$ de 2,4-D, clomazona e propanil.

RODRIGUES *et al.* (2007) desenvolveram e validaram um método analítico baseado na combinação de SPE e LC-MS para a determinação de 14 pesticidas, incluindo o fungicida tebuconazole, em amostras de água. O método apresentou excelentes faixas de linearidade para todos os pesticidas, com coeficiente de correlação maiores que 0,998. Os LOD ficaram entre 0,21 e 2,8 $\mu\text{g L}^{-1}$. O método foi aplicado na análise de água potável, água subterrânea e água de superfície.

SAKAMOTO & TSUTSUMI (2004) demonstraram a aplicabilidade da microextração em fase sólida com *headspace* (HS-SPME) para a determinação de multiclases de resíduos de pesticidas em amostras de água, avaliando os efeitos da temperatura na extração dos pesticidas. Foi obtida uma resposta linear para 40 dos 45 compostos estudados na faixa de concentração de 5,0 $\mu\text{g L}^{-1}$ com coeficiente de correlação entre 0,979 e 0,999. Os resultados de recuperação e RSD obtidos com a técnica proposta foram comparados aos valores obtidos utilizando a técnica de SPE pela análise de amostras de água pura e água de superfície, todas fortificadas com os pesticidas estudados. Os resultados apresentaram uma boa concordância com os valores obtidos por SPE.

2.7 Validação de métodos cromatográficos

Para garantir que um novo método analítico gere informações confiáveis e interpretáveis com relação a uma amostra, este deve ser submetido a uma avaliação analítica denominada validação. A necessidade de se mostrar a qualidade de medições químicas, através de sua comparabilidade, rastreabilidade e confiabilidade, está sendo cada vez mais reconhecida e exigida. Dados analíticos não confiáveis podem conduzir a decisões desastrosas e a prejuízos financeiros irreparáveis (RIBANI *et al.*, 2004).

A validação de um método analítico que emprega técnicas cromatográficas pode ser considerada como o somatório de diferentes etapas a serem incluídas no processo analítico. Geralmente, a validação do método envolve a execução e a interpretação de uma série de experimentos planejados a fim de avaliar as características do método. Desta forma, todas as variáveis de um método devem ser consideradas, tais como:

procedimento de amostragem, preparo da amostra, separação cromatográfica, detecção e avaliação dos dados (LANÇAS, 2004; RIBANI *et al.*, 2004; SANCO, 2007).

Os parâmetros geralmente investigados no processo de validação são: curva analítica e linearidade, limite de detecção, limite de quantificação, precisão (repetitividade e precisão intermediária) e exatidão (LANÇAS, 2004; RIBANI *et al.*, 2004; SANCO, 2007).

2.7.1 Seletividade

A seletividade de um método analítico corresponde à capacidade de um método em determinar o analito de maneira inequívoca na presença de outras substâncias susceptíveis de interferirem na determinação analítica, tais como impurezas, produtos de degradação e componentes da matriz (LANÇAS, 2004; ANVISA, 2003, Resolução nº 899).

O primeiro passo no desenvolvimento e validação de um método instrumental de separação é a seletividade. Esta deve ser reavaliada continuamente durante a validação e no uso do método (RIBANI *et al.*, 2004).

A seletividade garante que a resposta seja exclusivamente do composto de interesse. Se a seletividade não for assegurada, a linearidade, a exatidão e a precisão estarão comprometidas.

2.7.2 Curva analítica e linearidade

A curva analítica é o método de quantificação mais frequentemente utilizado e consiste na determinação da resposta de determinado instrumento frente a diferentes concentrações das substâncias em estudo (PRIMEL, 2003). A curva analítica pode ser construída preparando-se soluções analíticas padrões dos pesticidas em solvente e no extrato da matriz. A curva analítica construída a partir das soluções padrão preparadas

em solvente relaciona a resposta do instrumento com a concentração do analito, sem considerar as interferências da matriz em estudo.

Na maioria das técnicas cromatográficas, a relação matemática entre o sinal e a concentração da espécie deve ser determinada empiricamente, a partir do sinal medido para as diferentes massas ou concentrações conhecidas dessa espécie (AUGUSTO *et al.*, 2003). É observada uma relação linear (de primeira ordem) entre a resposta do detector (y) e a concentração (x) do composto em estudo (INMETRO, 2003). A equação da reta que relaciona as duas variáveis pode ser descrita pela regressão linear conforme a Equação 1.

$$y = ax + b$$

Equação 1

Onde:

y = resposta medida (área do pico);

x = concentração do analito;

a = inclinação da curva analítica, coeficiente angular;

b = intersecção com o eixo y , coeficiente linear.

A linearidade é a habilidade de um método analítico em produzir respostas que sejam diretamente proporcionais à concentração do analito nas amostras. Além dos coeficientes de regressão a e b , também é possível calcular, a partir dos pontos experimentais, o coeficiente de correlação, denominado r . Este parâmetro permite uma estimativa da qualidade da curva obtida, pois quanto mais próximo o coeficiente de correlação de 1,0, menor a dispersão do conjunto de pontos experimentais e menor a incerteza dos coeficientes de regressão estimados. Um coeficiente de correlação maior que 0,999 é considerado como evidência de um ajuste ideal dos dados para a linha de regressão. A ANVISA recomenda um coeficiente de correlação igual ou superior a 0,99 e o INMETRO um valor acima de 0,90 (RIBANI *et al.*, 2004).

2.7.3 Sensibilidade

A sensibilidade é um parâmetro que demonstra a variação da resposta em função da concentração do analito. Pode ser expressa pela inclinação da curva de calibração, e é determinada simultaneamente aos testes de linearidade. No caso de uma reta, quanto maior for o ângulo de inclinação da reta, mais sensível será o método. A sensibilidade depende da natureza do analito e da técnica de detecção utilizada (INMETRO, 2007).

2.7.4 Limite de Detecção e Limite de Quantificação

Quando são realizadas medidas em amostras com baixos níveis do analito ou de uma propriedade, como por exemplo, análise de traços, é importante saber qual o menor valor de concentração do analito ou da propriedade pode ser determinado pelo método (INMETRO, 2007).

O Limite de Detecção (LOD, do inglês *Limit of Detection*) é a menor concentração do analito presente em uma amostra que pode ser detectada, porém não necessariamente, quantificada, sob as condições experimentais estabelecidas (RIBANI, 2004). Na prática, o LOD é determinado pela menor concentração do analito que gera um sinal três vezes maior que o sinal do ruído.

O Limite de Quantificação (LOQ, do inglês *Limit of Quantification*) representa a menor concentração de uma substância que pode ser medida com confiabilidade, utilizando um determinado procedimento experimental (RIBANI *et al.*, 2004). O LOQ também pode ser definido em relação ao ruído, sendo dez vezes maior que o sinal do ruído.

2.7.5 Exatidão

A exatidão é definida como sendo a concordância entre o resultado de um ensaio e o valor de referência aceito como valor verdadeiro (INMETRO, 2007).

A exatidão é sempre considerada dentro de uma faixa de valores, a um dado nível de confiança, ou seja, aparece sempre associada a valores de precisão. O número de ensaios varia segundo a legislação ou diretriz adotada e também com as características da pesquisa. A ANVISA, por exemplo, através da Portaria nº 724 de maio de 2003, recomenda no mínimo nove determinações contemplando o limite de detecção do método, ou seja, ensaios em triplicata para três níveis de concentração.

A exatidão pode ser calculada pela Equação 2:

$$\text{Exatidão (\%)} = \frac{\text{valor real} - \text{valor obtido}}{\text{valor real}} \times 100 \quad \text{Equação 2}$$

2.7.5.1 Recuperação

Segundo LANÇAS (2004), a recuperação é a medida da eficiência do processo de isolamento do analito de interesse da matriz na qual se encontra presente. É o método mais utilizado para a validação de métodos cromatográficos.

As amostras “branco” são fortificadas (ou seja, adicionadas com o analito) em diferentes concentrações, seguida pela determinação da concentração do analito adicionado. É importante considerar como a eficiência do método varia em função das concentrações da substância. Na maioria dos casos, a dispersão dos resultados aumenta com a diminuição da concentração e a recuperação pode diferir substancialmente a altas e baixas concentrações. Por esse motivo, a recuperação deve ser avaliada na faixa de concentração esperada para o composto de interesse. Isto é realizado através da adição de uma substância em pelo menos três diferentes concentrações. O GARP (Grupos de Analistas de Resíduos de Pesticidas) recomenda a

fortificação da amostra branco nos níveis de adição de 1, 2 e 10 vezes o valor do limite de quantificação (RIBANI, 2004; GARP, 1999).

A recuperação (R) é calculada segundo a Equação 3:

$$R (\%) = \frac{\text{concentração obtida}}{\text{concentração real}} \times 100 \quad \text{Equação 3}$$

Os intervalos aceitáveis de recuperação para a análise de resíduos geralmente são entre 70 e 120%, com precisão de até 20%. Porém, dependendo da complexidade analítica e da amostra, este valor pode ser de 50 a 120%, com precisão de até 15% (GARP, 1999).

2.7.6 Precisão

A precisão é um termo geral para avaliar a dispersão de resultados entre ensaios independentes, repetidos em uma mesma amostra, em amostras semelhantes ou em soluções padrões em solvente, nas mesmas condições definidas no método de ensaio. É normalmente determinada para circunstâncias específicas de medição e as formas mais comuns de expressá-la são por meio da repetitividade, da precisão intermediária e da reprodutibilidade, sendo que a precisão avalia a proximidade entre várias medidas efetuadas em uma mesma amostra (INMETRO, 2007; PEIXOTO, 2007).

2.7.6.1 Repetitividade

É o grau de concordância entre os resultados de medições sucessivas de um mesmo mensurando, efetuadas sob as mesmas condições de medição, ou seja, mesmo procedimento de medição, mesmo analista, mesmo equipamento utilizado sob as mesmas condições de análise, mesmo local e repetições do ensaio em curto espaço de tempo.

Através da Portaria nº 724 de maio de 2003, a ANVISA sugere que a repetitividade seja verificada através de um mínimo de nove determinações considerando o limite especificado do método (ex: três níveis de fortificação, nas concentrações baixa, média e alta, e três repetições de cada um dos níveis), ou a partir de um mínimo de seis determinações a uma concentração similar ao valor esperado (RIBANI *et al.*, 2004).

2.7.6.2 Precisão intermediária

A precisão intermediária refere-se à concordância dos resultados de testes obtidos sobre a mesma amostra ou soluções padrão, utilizando o mesmo método, o mesmo laboratório, mas definindo exatamente quais as condições podem variar, como por exemplo: diferentes analistas, diferentes equipamentos, diferentes dias de análise. Esta medida de precisão é reconhecida como a mais representativa da variabilidade dos resultados em um laboratório e, como tal, mais aconselhável para utilizar (INMETRO, 2007).

2.7.6.3 Reprodutibilidade

É o grau de concordância entre os resultados das medidas de uma mesma amostra, efetuadas sob condições variadas de análise. Geralmente é obtida através de estudo de colaboração entre laboratórios (INMETRO, 2007; RIBANI *et al.*, 2004).

3 MATERIAIS E MÉTODOS

O desenvolvimento experimental consistiu na utilização do método de Extração em Fase Sólida (SPE) para o preparo das amostras de água de lavoura de arroz irrigado e quantificação por HPLC-DAD e foi realizado no Laboratório de Análises de Resíduos de Pesticidas (LARP) do Departamento de Química da Universidade Federal de Santa Maria.

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

3.1 Instrumentação

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

- Balança analítica de precisão modelo APX 200 (Denver Instrument, Thorium Unitech, USA);
- Banho de Ultra-som Bandelin Sonorex RK 510 (Mörfelden-Walldorf, Alemanha);
- Bomba à vácuo Tecnal TE-058 (Piracicaba, SP, Brasil);
- Cromatógrafo a Líquido Varian (Palo Alto, CA, USA), equipado com bomba modelo 210, detector por arranjo de diodos (DAD) Pro Star 335, sistema de aquisição de dados Star Workstation 6.0, coluna analítica Gemini 5 μ C18 (250 \times 4,6 mm de d.i.; 4 μ m) e pré-coluna do mesmo material (4 \times 3 mm), ambas contendo sílica modificada com octadecilsilano (Phenomenex, Torrance, CA, USA);
- Micropipetadores automáticos com capacidade variável (Brand, Alemanha e Eppendorf, Canadá);

- pHmetro modelo pH 500 Series Cole Palmer equipado com eletrodo de vidro combinado (Vernon Hills Illinois, USA);
- Sistema de filtração em membrana Advantec com membranas em ésteres de celulose de 0,45 µm de porosidade e 47 mm de diâmetro;
- Sistema de purificação de água Milli-Q Direct UV3 (Millipore, Bedford, MA, USA);
- Sistema *manifold* para SPE Varian (Palo Alto, CA, USA) para a pré-concentração simultânea de 12 amostras;

3.2 Reagentes, solventes e materiais utilizados

- Acetona grau HPLC (Mallinckrodt, NJ, USA);
- Acetonitrila grau HPLC (Mallinckrodt, NJ, USA);
- Ácido fosfórico p.a. 85% (Merck, Brasil);
- Álcool etílico hidratado 92,8 °GL;
- Água destilada e água deionizada;
- Água purificada em sistema Milli-Q Direct UV3 (resistividade de 18,2 MΩ cm);
- Cartuchos para SPE AccuBOND II ODS-C18, 500 mg / 3,0 mL; Strata™ SDB-L (Estireno Divinilbenzeno), 500 mg / 3,0 mL; Strata™ – X 33 µm, (Sorvente polimérico), 200 mg / 6 mL; Oasis® HLB;
- Extran neutro e alcalino (Merck, Brasil);
- Hexano grau HPLC (Mallinckrodt, NJ, USA);
- Membranas em ésteres de celulose 0,45 µm e 47 mm (Millipore, Brasil);
- Metanol grau HPLC (Mallinckrodt, NJ, USA);
- Padrões sólidos dos pesticidas, conforme Tabela 3.

3.3 Padrões analíticos dos pesticidas estudados

A Tabela 3 apresenta os fornecedores e o grau de pureza dos padrões analíticos sólidos utilizados para o desenvolvimento deste estudo.

Tabela 3. Informações dos padrões analíticos sólidos utilizados

Pesticida	Grau de pureza (%)	Fornecedor	Classe
Bispiribaque-sódico	99,0	Dr. Ehrenstorfer	Herbicida
Quincloraque	97,6	Dr. Ehrenstorfer	Herbicida
Tebuconazole	98,0	Dr. Ehrenstorfer	Fungicida

Preparou-se, individualmente, 10 mL da solução estoque 1000 mg L⁻¹ de cada pesticida considerando a pureza dos padrões sólidos, conforme recomendado na literatura (GARP, 1999). A massa do padrão sólido pesada foi dissolvida em metanol grau HPLC. As soluções estoque foram armazenadas em frascos âmbar e estocadas à temperatura de -18 °C.

A partir das soluções estoque 1000 mg L⁻¹, foram preparadas soluções analíticas na concentração 100 e 10 mg L⁻¹, em metanol grau HPLC, de cada um dos pesticidas em estudo. As soluções 10 mg L⁻¹ foram injetadas individualmente a fim de se obter o tempo de retenção de cada composto. A partir das mesmas soluções estoque 1000 mg L⁻¹, preparou-se 10 mL de uma mistura na concentração 100 e 10 mg L⁻¹ contendo todos os pesticidas a serem estudados. A partir destas soluções, foram preparadas as soluções de trabalho nas concentrações de 0,03; 0,05; 0,1; 0,25; 0,5; 0,75; 1,0; 2,5; 5,0; 7,5 e 10 mg L⁻¹. Estas soluções foram utilizadas para o estudo da linearidade do método e para os ensaios de fortificação. Todas as soluções analíticas foram preparadas em metanol grau HPLC, armazenadas em frascos âmbar e estocadas à temperatura de -18 °C.

3.4 Otimização do sistema cromatográfico: HPLC-DAD

Para a otimização das condições cromatográficas foram injetadas, separadamente, as soluções analíticas dos pesticidas selecionados para este estudo na concentração 10 mg L⁻¹, observando-se o tempo de retenção e o espectro de absorção

molecular de cada composto fornecido pelo detector DAD. Após, foi preparada uma solução contendo todos os pesticidas em estudo, na concentração de 10 mg L^{-1} , para verificar a separação cromatográfica dos mesmos.

Além disso, foram avaliadas algumas variáveis experimentais, tais como: composição e vazão da fase móvel e comprimento de onda.

3.4.1 Preparo e escolha da fase móvel

O preparo da fase móvel foi realizado medindo-se separadamente volumes de metanol grau HPLC e água purificada em sistema Milli-Q. Em seguida, esta mistura foi acidificada a pH 3,0 com solução aquosa de ácido fosfórico (1:2, v/v) e desaerada em banho de ultra-som durante 15 minutos à temperatura ambiente.

Para a análise dos pesticidas por HPLC-DAD, testou-se diferentes proporções de fase móvel: metanol/água (65:35, v/v), metanol/água (70:30, v/v), metanol/água (75:25, v/v) e metanol/água (80:20, v/v), todas acidificadas a pH 3,0 com solução aquosa de ácido fosfórico (1:2, v/v).

3.4.2 Ajuste do pH da fase móvel

A fim de garantir uma maior interação dos pesticidas com a fase estacionária utilizada, é necessária a acidificação da fase móvel. Esta acidificação a pH 3,0 foi realizada com uma solução aquosa de ácido fosfórico (1:2; v/v), pelo fato deste ácido apresentar uma baixa absorção na região do ultravioleta (UV).

3.4.3 Escolha da vazão da fase móvel

A vazão de fase móvel no sistema cromatográfico deve ser contínua e com alta reprodutibilidade, possibilitando a eluição adequada dos compostos. A escolha da

vazão de fase móvel foi baseada na separação cromatográfica dos compostos das soluções padrões, testando-se as vazões de 0,8; 0,9; 1,0; 1,1 e 1,2 mL min⁻¹.

3.4.4 Escolha do comprimento de onda de máxima absorção

Os espectros de absorção molecular foram obtidos através da injeção individual das soluções padrões de cada pesticida no sistema cromatográfico, HPLC-DAD, na concentração 10 mg L⁻¹. A partir do espectro de absorção molecular, determinou-se o comprimento de onda de máxima absorção para cada um dos pesticidas. Os espectros de absorção molecular das soluções padrão foram utilizados para a confirmação da identidade dos picos cromatográficos nas amostras analisadas.

3.5 Otimização dos parâmetros para a quantificação das amostras

3.5.1 Amostras de água e amostras “branco”

Amostras de água de superfície, coletadas de um açude localizado no Campus da UFSM foram utilizadas como amostras “branco” para a etapa de validação do método, uma vez que, as amostras provenientes do experimento de dissipação em lavoura de arroz são caracterizadas pela alta quantidade de sólidos em suspensão e matéria orgânica dissolvida, tais como ácidos húmicos e fúlvicos, podendo apresentar interferências na análise cromatográfica. Foram realizadas extrações das amostras de água de superfície a fim de avaliar a presença de interferentes.

Todas as amostras foram recebidas no laboratório, filtradas em membranas de ésteres de celulose de 47 mm de diâmetro e 0,45 µm e extraídas em cartuchos SPE. Estes cartuchos foram armazenados a -18 °C, envoltos em papel alumínio até o momento da quantificação. Este armazenamento foi necessário devido ao grande número de amostras coletadas por dia.

3.5.2 Sistema SPE para a pré-concentração dos pesticidas

O sistema SPE utilizado para a pré-concentração dos pesticidas em amostras de água é extremamente simples (Figura 10) e dependendo do problema a ser resolvido e do grau de automação desejado, torna-se o sistema ideal.

O sistema *manifold* empregado é composto por uma caixa de vácuo com espaço para a utilização de 12 cartuchos SPE simultaneamente. Este sistema é recomendado para análises de rotina quando há a necessidade de pré-concentrar um grande número de amostras.

As amostras de água, depois de filtradas em membrana 0,45 μm , são colocadas em balões volumétricos e em seguida, transferidas para os cartuchos por meio de tubulações de politetrafluoretileno (PTFE).

É utilizada uma bomba de vácuo para fazer a sucção das amostras dos balões volumétricos para os cartuchos e esta transferência é controlada individualmente para cada cartucho através de válvulas e torneiras. A pré-concentração das amostras foi realizada a uma vazão da ordem de 5 mL min^{-1} .



Figura 10. Foto ilustrativa do sistema SPE utilizado para a pré-concentração das amostras de água

3.5.3 Escolha do cartucho para a etapa de pré-concentração

Os cartuchos de SPE são comercializados em diversos volumes, sendo os mais comuns 1, 3 e 6 mL. Estes cartuchos são empacotados com diferentes tipos e quantidades de adsorventes. A escolha do volume, da massa, e do tipo de fase estacionária depende de vários fatores, entre os quais o volume de amostra a ser extraída, a massa do composto de interesse presente na amostra, o grau de contaminação (interferentes) e a complexidade da matriz.

A pré-concentração dos pesticidas foi testada em 4 diferentes adsorventes, sendo eles:

- AccuBOND II ODS-C18, contendo 500 mg do adsorvente, tamanho médio das partículas de 47 μm e tamanho médio dos poros de 70 \AA , em tubos de 3,0 mL;
- Strata™ SDB-L (polímero de estireno divinilbenzeno), contendo 500 mg de material adsorvente em tubos de 3,0 mL e tamanho médio das partículas de 100 μm e tamanho médio dos poros de 260 \AA ;
- Strata™ – X 33 μm , (adsorvente polimérico), contendo 200 mg do adsorvente em tubos de 6 mL e tamanho médio das partículas de 33 μm ;
- Oasis® HLB, fase reversa, contendo 30 mg de adsorvente em tubos de 1 mL e tamanho médio das partículas de 30 μm e diâmetro médio dos poros de 80 \AA .

3.5.4 Volume de amostra

Por se tratar de um estudo de dissipação dos pesticidas em água de lavoura de arroz irrigado, sabe-se que as concentrações dos compostos diminuem com o passar do tempo e então, existe a necessidade de uma etapa de pré-concentração de um certo volume de amostra, para que seja possível fazer a quantificação destes compostos.

Os volumes de amostra estudados foram de 100, 200 e 250 mL, contendo uma mistura dos três analitos estudados.

3.5.5 Escolha do solvente de condicionamento dos cartuchos

A etapa de condicionamento dos cartuchos tem por objetivo fazer a ativação do material adsorvente pela adição de um solvente, que dependerá do material contido no cartucho. Neste estudo, o condicionamento dos cartuchos SPE foi realizado com metanol.

Para se obter uma boa reprodutibilidade na extração, um dos fatores mais importantes nesta etapa é evitar que o solvente seja totalmente eliminado do cartucho. A secagem dos cartuchos pode levar a diversos problemas como a formação de caminhos preferenciais, comprometendo a etapa de concentração dos analitos de interesse.

3.5.6 Escolha do solvente e do volume de eluição dos analitos de interesse

A eluição dos analitos de interesse deve ser realizada com um solvente que tenha a capacidade de remover de forma eficiente e que permita que os interferentes contidos na amostra permaneçam retidos no cartucho. O solvente de eluição é escolhido dependendo da sua polaridade e da capacidade de remover os analitos do material adsorvente. O ideal é eluir os analitos em um pequeno volume de eluente, de forma que estes estejam em uma concentração adequada para ser injetada no HPLC. Para a eluição dos analitos dos cartuchos SPE foi utilizado metanol nos volumes de 1 e 2 mL.

3.6 Validação do método para amostras de água

Após definidas as melhores condições de separação para os pesticidas estudados, foi realizada a validação do método analítico.

A validação do método desenvolvido foi realizada seguindo principalmente os procedimentos recomendados no Brasil que envolvem os parâmetros descritos a seguir (INMETRO, 2007; BRASIL, 2003; RIBANI *et al.*, 2004).

3.6.1 Seletividade

Para avaliar e comprovar a seletividade na separação cromatográfica para cada um dos pesticidas estudados, foi preparada uma solução analítica contendo bispiribaque-sódico, quincloraque e tebuconazole na concentração de 2,5 mg L⁻¹, em metanol. O extrato da amostra “branco” foi fortificado com a solução na concentração 2,5 mg L⁻¹. Os cromatogramas obtidos dos padrões em metanol e da amostra fortificada foram comparados pelo tempo de retenção de cada composto em estudo. Os espectros de absorção molecular também foram monitorados na faixa de 190 a 400 nm, tanto para os padrões quanto para as amostras, para avaliar a pureza espectral de todos os compostos a fim de confirmar a seletividade do método na separação dos pesticidas frente aos interferentes da matriz.

3.6.2 Curva analítica e linearidade

A curva analítica para os pesticidas foi construída na faixa de concentração de 0,03 a 10 mg L⁻¹ para quincloraque, de 0,1 a 10 mg L⁻¹ para bispiribaque-sódico e de 0,05 a 10 mg L⁻¹ para tebuconazole. Todas as soluções foram preparadas em metanol grau HPLC, na faixa de concentração de 0,03, 0,05, 0,1, 0,25, 0,5, 0,75, 1,0, 2,5, 5,0, 7,5 e 10 mg L⁻¹. Cada solução foi injetada em triplicata e o gráfico de regressão linear, considerando a área versus concentração, foi obtido com o auxílio do programa Microsoft Office® Excel 2003.

A linearidade foi confirmada através do cálculo dos resíduos (Equação 4) entre os valores medidos e os valores calculados a partir da equação de regressão linear

(INMETRO, 2007). A partir deste cálculo, faz-se a verificação se um ponto encontra-se ou não dentro da faixa linear.

$$t_{\text{calculado}} = \frac{\text{resíduo}}{s_r/\sqrt{n}} \quad \text{Equação 4}$$

onde:

resíduo = $[x_{\text{medido}} - x_{\text{calculado}}]$

s_r = desvio padrão dos resíduos

n = número de pontos

Se o valor de $t_{\text{calculado}}$ para um ponto duvidoso for menor ou igual ao valor de t unilateral tabelado (Anexo C), para a confiança desejada e $(n-1)$ graus de liberdade, considera-se que o ponto pertence à curva e a faixa até este ponto é linear (INMETRO, 2007).

3.6.3 Limite de detecção e limite de quantificação

Os LOD e LOQ foram estabelecidos com base na Figura 11, sendo que o LOD é definido como a concentração do analito que resulta um sinal três vezes maior que o ruído da linha base, nas proximidades do sinal do analito ($\text{LOD} = 3 \text{ S/R}$) e o LOQ como a concentração do analito que resulta um sinal dez vezes maior que o ruído da linha base ($\text{LOQ} = 10 \text{ S/R}$). Mediu-se a altura do ruído próximo ao tempo de retenção dos analitos e a partir desta medida, determinou-se a concentração correspondente a 3 e a 10 vezes esta altura, considerando a média da oscilação do sinal do ruído.

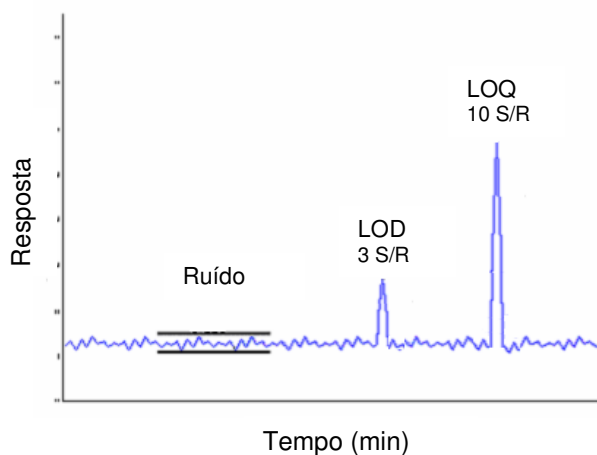


Figura 11. Diagrama ilustrativo da forma de estabelecimento dos valores de LOD e LOQ; S = sinal e R = ruído (Adaptado de MISTURA, 2003)

Os valores de LOD e LOQ do instrumento são obtidos a partir da injeção das soluções de trabalho no equipamento, considerando a concentração do analito que resulta um sinal 3 e 10 vezes maior que o ruído da linha base. Já os valores de LOD e LOQ do método são obtidos a partir dos valores de LOD e LOQ do instrumento, considerando o fator de concentração do método, necessário para preparar a amostra a fim de torná-la detectável no equipamento.

3.6.4 Precisão (repetitividade e precisão intermediária)

Para avaliar a precisão do instrumento (repetitividade ou desvio padrão relativo) foram efetuadas seis injeções de cada concentração das soluções analíticas no sistema HPLC-DAD. Em termos de repetitividade (RSD_r), a precisão do método foi avaliada através da extração e análise no HPLC-DAD das amostras “branco” fortificadas conforme item 3.6.5. Foram realizadas seis extrações de cada nível de fortificação e cada um dos extratos foi injetado duas vezes.

A precisão intermediária (RSD_{pi}) do método foi avaliada utilizando dias diferentes para a injeção dos padrões dos pesticidas e das amostras fortificadas.

A precisão pode ser avaliada através de um valor numérico (RSD) que é calculado através da Equação 5 (GARP, 1999).

$$\text{RSD (\%)} = \frac{s}{x_m} \times 100 \quad \text{Equação 5}$$

onde:

s = estimativa de desvio padrão absoluto

$$s = \{\sum(x_i - x_m)^2 / N - 1\}^{1/2}$$

x_i = valores individuais

x_m = média das medidas em replicatas

N = número de medidas

3.6.5 Exatidão (recuperação)

Os ensaios de recuperação foram realizados utilizando amostras “branco” de água de superfície, supostamente livre da contaminação por pesticidas, coletadas em um açude no Campus da UFSM, conforme descrito no item 3.5.1. Para os testes de recuperação, são adicionadas quantidades conhecidas do analito de interesse à matriz e em seguida, faz-se a execução do método de ensaio que está sendo avaliado.

Foram realizadas seis fortificações das amostras branco em três níveis diferentes de concentração, totalizando 18 análises de recuperação para os pesticidas. A recuperação dos compostos foi avaliada nas concentrações de 1,0; 2,0 e 10 $\mu\text{g L}^{-1}$. A exatidão é expressa em porcentagem e foi calculada conforme a Equação 6 (INMETRO, 2007).

$$R (\%) = \frac{C1}{C2} \times 100 \quad \text{Equação 6}$$

onde:

C_1 = concentração determinada na amostra fortificada

C_2 = concentração fortificada

3.7 Aplicação do método

3.7.1 Estudo da dissipação dos pesticidas em água de lavoura de arroz irrigado

O método desenvolvido e validado foi aplicado no estudo da dissipação dos pesticidas quincloraque, bispiribaque-sódico, e tebuconazole em água de lavoura de arroz irrigado de um experimento a campo, realizado na várzea experimental do Departamento de Fitotecnia da UFSM, pelo Grupo de Pesquisa em arroz irrigado e uso alternativo de várzeas da UFSM. O estudo de campo foi conduzido na safra de 2007-2008.

O experimento foi constituído pela análise de três compostos, sendo dois herbicidas e um fungicida que foram aplicados em unidades experimentais de 56 m² (8 m x 7 m) com três repetições de cada pesticida.

A cultivar utilizada, IRGA 422 CL[®], foi semeada no dia 27/11/2007, em parcelas isoladas através de taipas e irrigadas individualmente para não haver contaminação entre os produtos. A semeadura, na densidade de 130 kg ha⁻¹, foi realizada no sistema de semeadura direta, utilizando-se uma semeadora com linhas espaçadas a 0,17 metros. A adubação foi realizada de acordo com a análise de solo e a recomendação da Sociedade Sul-Brasileira de Arroz Irrigado (SOSBAI, 2007) com fertilizante formulado na quantidade de 10 kg N ha⁻¹, 40 kg P₂O₅ ha⁻¹ e 40 kg K₂O ha⁻¹. O nitrogênio foi aplicado manualmente, na forma de uréia, na quantidade de 50 kg ha⁻¹, sendo metade desta quantidade aplicado no início do perfilhamento, em torno de 20 dias após a emergência das plântulas e o restante na iniciação do primórdio da panícula.

Os herbicidas foram aplicados em solo superficialmente seco, com o arroz no estágio de três a quatro folhas.

Para a aspersão dos herbicidas, foi utilizado um pulverizador costal de precisão, pressurizado com CO₂, contendo na barra quatro bicos Teejet XR110.02, de jato em forma de leque espaçados de 0,50 m um do outro, operando a 275 kPa (40 lb/pol²) de pressão e consumo de calda correspondente a 150 L ha⁻¹.

A irrigação da área foi realizada um dia após a aplicação dos herbicidas, sendo que a lâmina de água nas parcelas foi monitorada diariamente, mantendo-se a altura ao redor de 0,10 m, conforme o desenvolvimento da cultura, a lâmina de água foi aumentada e estabilizada quando alcançou cerca de 0,15 m de altura, permanecendo constante durante o ciclo restante da cultura.

Os pesticidas foram aplicados, na dose recomendada para a cultura de arroz irrigado, seguindo as recomendações das Boas Práticas Agrícolas (RODRIGUES e ALMEIDA, 1998) para reduzir o risco do pesticida ser transportado pela água e atingir o lençol freático. A aplicação dos pesticidas foi realizada em parcelas isoladas, a fim de avaliar o efeito e a concentração residual de cada um, sem qualquer interação entre eles. Doses diferenciadas de cada composto foram aplicadas em cada parcela, como mostrado na Tabela 4.

Tabela 4. Pesticidas aplicados nos experimentos de estudo da dissipação realizados na safra 2007-2008

Pesticidas	Marca Comercial	Concentração (g L ⁻¹ ou g kg ⁻¹)	Formulação Comercial	Doses ha ⁻¹	
				g (i.a.)	PC (kg ou L)
Bispiribaque-sódico	Nominee [®]	400	CS	50	0,125
Quincloraque	Facet [®]	375	PM	375	0,75
Tebuconazole	Folicur [®]	200	CE	150	0,750

i.a. = ingrediente ativo; CS = suspensão concentrada; CE = emulsão concentrada; PM = pó molhável; PC = produto comercial

A área experimental estudada foi dividida em sete canteiros, sendo estes constituídos de três tratamentos (T1, T2 e T3) com três repetições (R1, R2 e R3) para

os herbicidas bispiribaque-sódico e quincloraque e uma repetição para o fungicida tebuconazole, conforme está demonstrado na Tabela 5.

Tabela 5. Identificação dos diferentes tratamentos realizados na área experimental estudada

Tratamento	Repetições
T1 - Bispiribaque-sódico	T1R1
	T1R2
	T1R3
T2 - Quincloraque	T2R1
	T2R2
	T2R3
T3 - Tebuconazole	T3R1

A aplicação dos herbicidas foi realizada no dia 07/01/2008 e a aplicação do fungicida foi realizada no dia 08/03/2008.

As coletas foram realizadas na superfície da camada de água a fim de evitar a amostragem excessiva de material sólido presente no fundo da lâmina de água. As amostras de água foram coletadas nos 1º, 2º, 3º, 5º, 7º, 10º, 14º, 21º, 28º, 35º e 42º, 49º, 56º, 63º, 70º, 77º, 84º, 91º dias após a aplicação dos pesticidas, conforme Apêndice A e acondicionadas em frascos de vidro âmbar com capacidade de um litro. Os frascos de vidro foram previamente lavados com solução aquosa de Extran® neutro 5%, seguido de lavagem com água corrente, água deslilada e álcool etílico comum antes de serem utilizados na coleta das amostras de água. As datas de coletas foram determinadas com base em estudos anteriores, desenvolvidos na UFSM, de dissipação destes e de outros pesticidas. Logo após a coleta das amostras, pelo laboratório do

Departamento de Fitotecnia, estas foram transportadas para o Laboratório de Análises de Resíduos de Pesticidas (LARP), onde foram realizadas as análises.

4 RESULTADOS E DISCUSSÕES

4.1 Otimização das condições cromatográficas para a determinação dos pesticidas por HPLC-DAD

A otimização das condições cromatográficas utilizadas na separação dos pesticidas selecionados neste estudo, foi realizada através do preparo das soluções analíticas contendo uma mistura dos princípios ativos dos pesticidas em estudo, e da injeção destas soluções no HPLC-DAD, observando o tempo de retenção, o espectro de absorção molecular e o perfil de separação destes pesticidas.

Conforme revisão bibliográfica, o metanol é um solvente com características polares, muito utilizado na extração e separação dos pesticidas. Por isto, este foi utilizado em mistura com água como fase móvel. Dentre as composições de fase móvel apresentadas no item 3.4.1, a que forneceu melhor separação dos pesticidas e menos interferências foi a mistura metanol:água (70:30, v/v), acidificada a pH 3,0 com ácido fosfórico (1:2, v/v), já que este não interfere na detecção analítica, pois apresenta uma baixa absorção na região do ultravioleta. A melhor vazão de fase móvel, dentre as descritas no item 3.4.3, foi 1,0 mL min⁻¹, pois permite separações com pressões de cerca de 150 bar e tempo de análise de 17 min. As vazões mais baixas tornam o tempo de análise excessivo e nas vazões maiores, a pressão do sistema torna-se grande e os compostos começam a eluir mais rapidamente, coelindo com as interferências iniciais.

4.1.1 Espectros de absorção molecular

Os espectros de absorção molecular obtidos no sistema HPLC-DAD para as soluções individuais dos pesticidas na concentração 10 mg L⁻¹ foram utilizados para se obter o comprimento de onda de máxima absorção de cada pesticida, além de confirmar a identidade dos analitos, através da comparação do espectro obtido das soluções padrões com os espectros obtidos das amostras.

Com base nos espectros de absorção molecular (Figura 12), foram escolhidos os comprimentos de onda de máxima absorção para cada pesticida, os quais foram monitorados em cada análise.

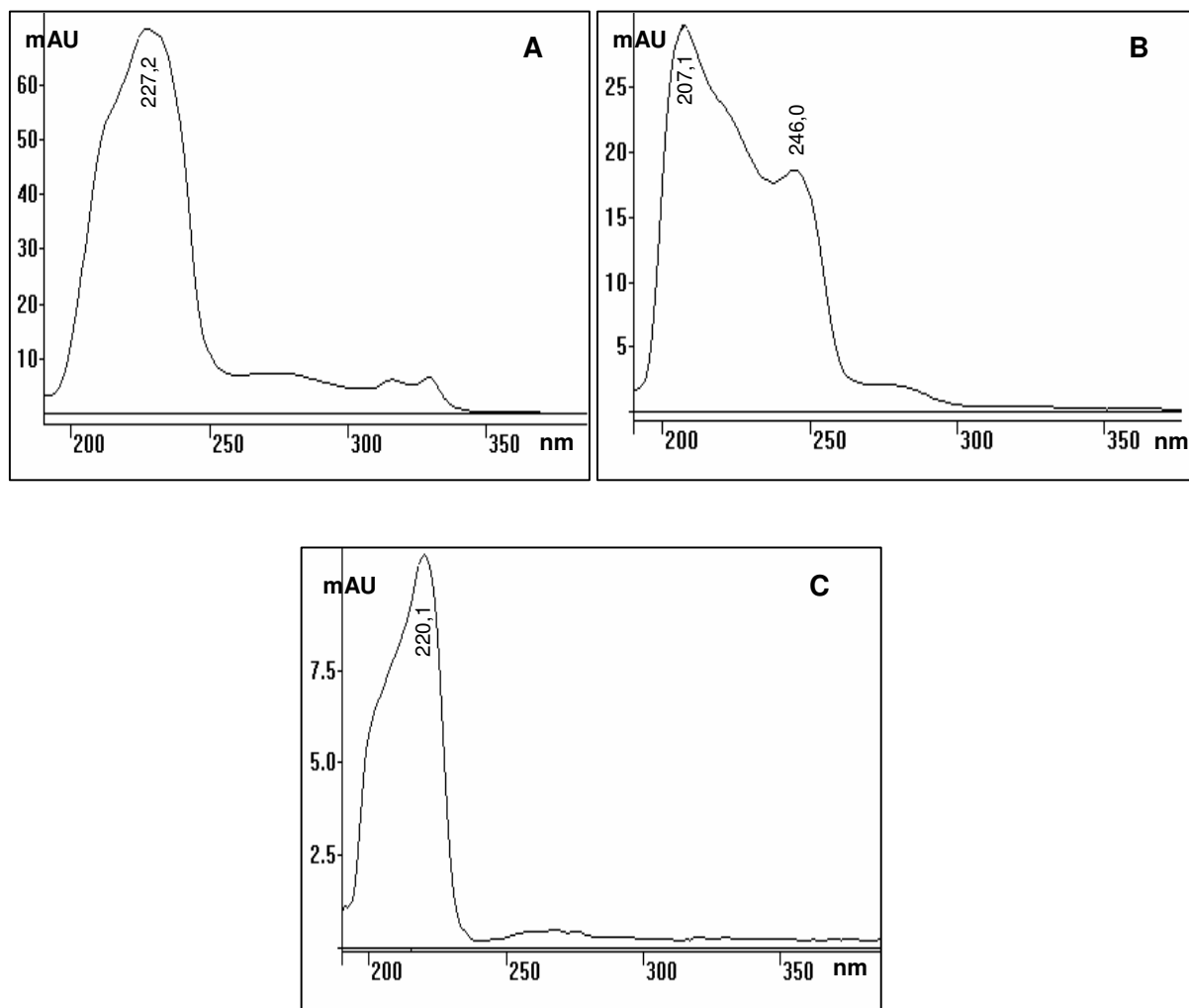


Figura 12. Espectros de absorção molecular, de 190 a 400 nm (A – quincloraque, B – equivalente ácido do bispiribaque-sódico e C – tebuconazole), obtidos por HPLC-DAD, a partir do sinal cromatográfico dos pesticidas na concentração 10 mg L⁻¹, obtido nas condições cromatográficas do item 4.1

Os comprimentos de onda de máxima absorção para os compostos estudados estão descritos na Tabela 6, assim como suas fórmulas moleculares e os tempos de retenção.

Tabela 6. Pesticidas analisados com suas respectivas fórmulas moleculares, tempos de retenção e comprimentos de onda de máxima absorção

Pesticidas	Fórmula molecular	Tempo de retenção (min)	Comprimento de onda de máxima absorção (nm)
Quincloraque	$C_{10}H_5Cl_2NO_2$	6,9	231
Bispiribaque-sódico	$C_{19}H_{17}N_4NaO_8$	8,3	246
Tebuconazole	$C_{16}H_{22}ClN_3O$	15,3	220

Considerando o tempo de retenção e o comprimento de onda de máxima absorção de cada pesticida estudado, foi realizada uma programação dos comprimentos de onda selecionados ao longo da análise cromatográfica, a fim de aumentar a sensibilidade na detecção de cada pesticida estudado. Esta programação foi realizada da seguinte maneira: até 7,8 min de análise, o comprimento de onda, λ , foi mantido em 231 nm, de 7,8 a 13 min, o comprimento de onda foi de 246 nm, em seguida, foi alterado para 220 nm e mantido até o final da análise cromatográfica. A fase móvel utilizada é uma mistura que contém água, e por isso o composto determinado é o equivalente ácido do bispiribaque-sódico, mas para facilitar o entendimento, o composto será tratado como sendo o sal bispiribaque-sódico.

As condições cromatográficas otimizadas utilizadas na quantificação dos pesticidas quincloraque, bispiribaque-sódico e tebuconazole estão resumidas na Tabela 7.

Tabela 7. Condições cromatográficas otimizadas utilizadas na quantificação dos pesticidas estudados

Coluna analítica	Gemini 5 μ C18 (250 x 4 mm, 5 μ m, Phenomenex)
Fase móvel	Metanol / água (70:30, v/v) ajustado a pH 3,0 com solução aquosa de H ₃ PO ₄ (1:2, v/v)
Vazão da fase móvel	1,0 mL min ⁻¹
Volume da alça de injeção	20 μ L
Detector	DAD
Comprimentos de onda	até 7,8 min, λ = 231 nm; de 7,8 a 13 min, λ = 246 nm; de 13 a 17 min, λ = 220 nm

4.2 Estudo da Extração em Fase Sólida para os pesticidas em estudo

Para testar a eficiência da etapa de extração e definir o melhor método para separar os pesticidas da matriz, foram testados diferentes procedimentos, conforme descritos a seguir.

4.2.1 Escolha do cartucho para a etapa de pré-concentração

A pré-concentração dos pesticidas foi testada utilizando quatro diferentes tipos de adsorventes nos cartuchos SPE. Os resultados estão demonstrados na Tabela 8.

Tabela 8. Recuperações obtidas para os pesticidas, utilizando-se diferentes cartuchos de SPE

Pesticida	Quincloraque	Bispiribaque-sódico	Tebuconazole
C18¹	119,0 ± 3,1	119,5 ± 6,3	95,7 ± 12,1
StrataTM SDB-L²	5,4 ± 34,2	0	0
StrataTM – X³	102,5 ± 4,2	90,5 ± 2,6	4,7 ± 42,9
Oasis[®] HLB⁴	101,1 ± 12,3	43,0 ± 14,3	79,1 ± 7,6

*Nível de fortificação: 10 µg L⁻¹; amostra: 250 mL de água de superfície livre de contaminação por pesticidas; pH ajustado em 3,0; solvente de eluição: 1 mL de metanol; n = 3

¹ octadecilsilano

² polímero de estireno-divinilbenzeno

³ polímero de estireno-divinilbenzeno com a superfície modificada

⁴ balanço lipofílico (divinilbenzeno)-hidrofílico (N-vinilpirrolidona)

Observando a Tabela 8, pode-se perceber que não se obteve boas recuperações para nenhum dos compostos utilizando o cartucho StrataTM – SDB-L. Utilizando o cartucho StrataTM – X, não se obteve bons resultados de recuperação para o fungicida tebuconazole e utilizando o cartucho Oasis[®] HLB não se obteve boas recuperações para o herbicida bispiribaque-sódico.

O cartucho C18 apresentou bons resultados de recuperação para os três compostos estudados e, por isso, foi o escolhido para a pré-concentração dos pesticidas em água.

4.2.2 Escolha do volume de eluição dos analitos de interesse

O metanol foi o solvente utilizado na etapa de eluição dos pesticidas do cartucho. Foram testados diferentes volumes de metanol a fim de garantir quantitativamente a eluição dos pesticidas. Os resultados estão demonstrados na Tabela 9.

Tabela 9. Recuperações obtidas para os pesticidas utilizando-se diferentes volumes do solvente de eluição

Volume de eluente	Recuperação (%)*	
	1 mL	2 mL
Quincloraque	115,7 ± 5,9	88,8 ± 19,7
Bispiribaque-sódico	118,4 ± 3,3	95,6 ± 3,7
Tebuconazole	88,3 ± 11,6	90,2 ± 5,7

*Nível de fortificação: 10 µg L⁻¹; amostra: 250 mL de água de superfície; pH ajustado em 3,0; eluição com metanol; n = 3

Apesar de se obter melhores resultados de recuperação com o volume de 2 mL de metanol, optou-se pela eluição dos compostos com o volume de 1 mL de metanol, que também apresentou bons resultados de recuperação, com menor quantidade de interferentes. Vale salientar que os compostos estão presentes em concentrações muito baixas nas amostras, gerando a necessidade de fatores mais elevados de concentração.

4.2.3 Volume de amostra

Também foram testados os volumes de 100, 200 e 250 mL de amostra na etapa de pré-concentração. Os resultados estão demonstrados na Tabela 10.

Tabela 10. Recuperações obtidas para os pesticidas utilizando diferentes volumes de amostra na etapa de pré-concentração

Volume de amostra	Recuperação (%)*		
	100 mL	200 mL	250 mL
Quincloraque	137,4 ± 3,0	87,9 ± 1,1	119,5 ± 1,5
Bispiribaque-sódico	128,5 ± 4,8	119 ± 1,4	117,9 ± 1,3
Tebuconazole	92,9 ± 3,7	88,5 ± 0,1	83,0 ± 5,1

*Nível de fortificação: 10 µg L⁻¹; amostra: água de açude; pH ajustado em 3,0; eluição com 1 mL metanol; n = 3

Observando a Tabela 10, percebe-se que o volume de 100 mL de amostra não apresentou bons resultados de recuperação para os compostos bispiribaque-sódico e quincloraque. Os volumes de 200 e 250 mL de amostra apresentaram valores de recuperação entre 70 e 120% para os três pesticidas estudados, mas devido à baixa concentração dos analitos presentes nas amostras, há a necessidade de um fator de concentração maior e, sendo assim, o volume escolhido foi de 250 mL de amostra.

4.3 Procedimento experimental otimizado

A partir dos resultados dos testes apresentados anteriormente, tem-se o procedimento de extração otimizado, que foi utilizado posteriormente na validação do método e na pré-concentração das amostras de água do experimento de dissipação a campo.

Para a etapa de concentração das amostras, utilizou-se a extração em fase sólida. No sistema SPE, primeiramente os cartuchos são condicionados com 3 mL de metanol grau HPLC, 3 mL de água purificada em sistema Milli-Q para retirar o excesso de metanol e 3 mL de água purificada pH 3,0. Um volume de 250 mL de amostra, após filtração em membrana de 0,45 µm e acidificação a pH 3,0 com solução aquosa de ácido fosfórico 1:2, v/v é percolada através do cartucho SPE à uma vazão de cerca de 5

mL min⁻¹ sob vácuo. Após a etapa de pré-concentração, percola-se 3 mL de água purificada em sistema Milli-Q para minimizar as substâncias interferentes solúveis na mesma, seguida de vácuo por 20 min. Em seguida, faz-se a eluição dos analitos retidos no material adsorvente C18 utilizando 1 mL de metanol. Recolhe-se o extrato eluído em frasco âmbar. O fator de concentração resultante é de 250 vezes. O organograma do procedimento experimental otimizado é demonstrado na Figura 13.

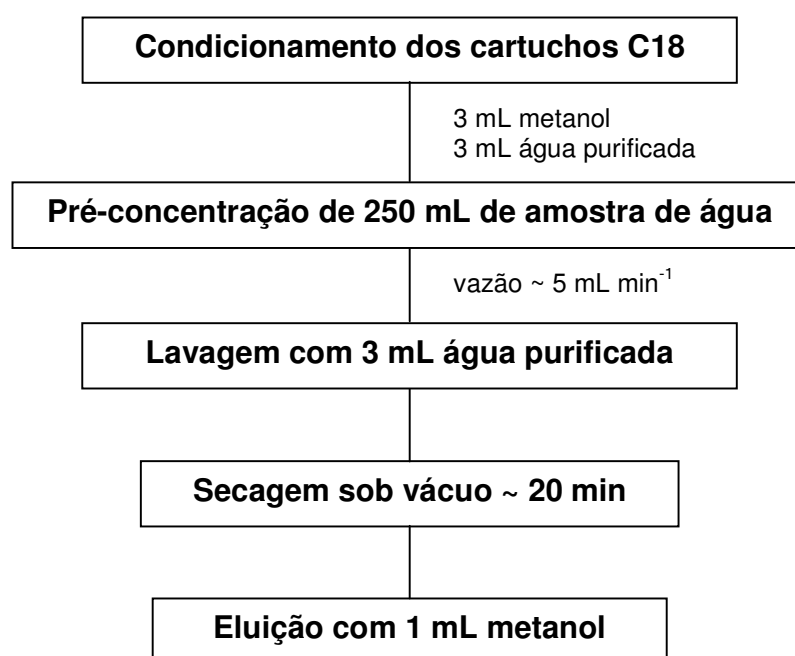


Figura 13. Organograma do procedimento experimental otimizado

4.4 Validação do método analítico

A partir do procedimento experimental otimizado, é necessário que as informações contidas nos dados analíticos sejam exatas, específicas, reproduzíveis e de qualidade, comprovando a confiabilidade do método. Sendo assim, foi realizada a

validação do método para a análise dos pesticidas, segundo os parâmetros descritos a seguir.

4.4.1 Seletividade

A Figura 14 apresenta o perfil de um cromatograma obtido com a injeção de 20 μL de uma solução analítica contendo bispiribaque-sódico, quincloraque e tebuconazole na concentração 5,0 mg L^{-1} .

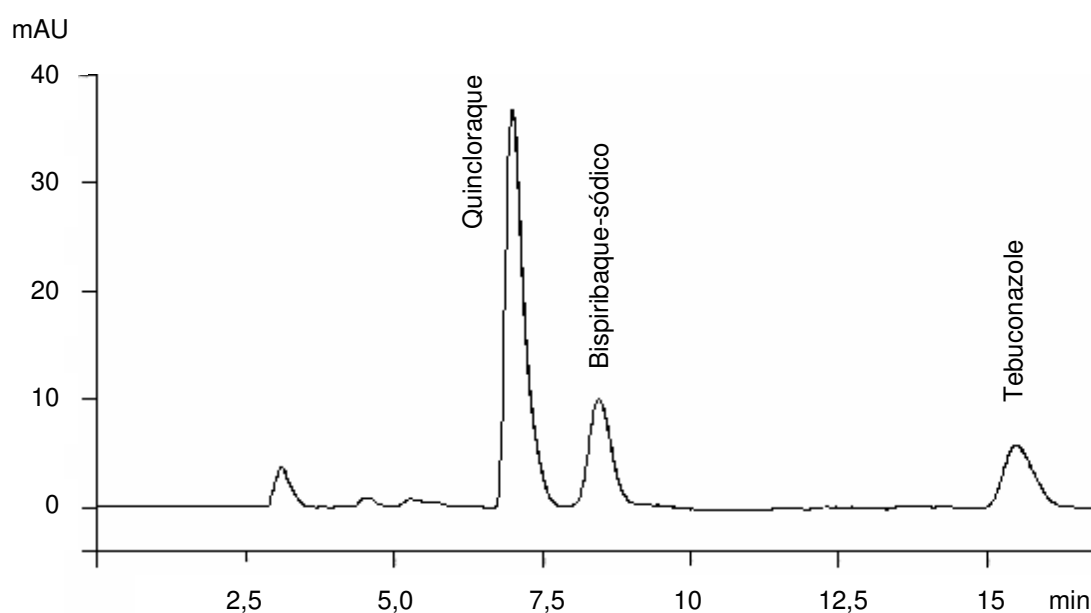


Figura 14. Cromatograma obtido por HPLC-DAD para uma solução analítica contendo 5,0 mg L^{-1} dos pesticidas quincloraque (t_R : 6,9 min); bispiribaque-sódico (t_R : 8,3 min) e tebuconazole (t_R : 15,3 min), nas condições descritas no item 4.1

A Figura 15 apresenta o perfil de um cromatograma obtido para uma amostra “branco” de água comparado com uma solução analítica contendo a mistura dos pesticidas na concentração $2,5 \text{ mg L}^{-1}$.

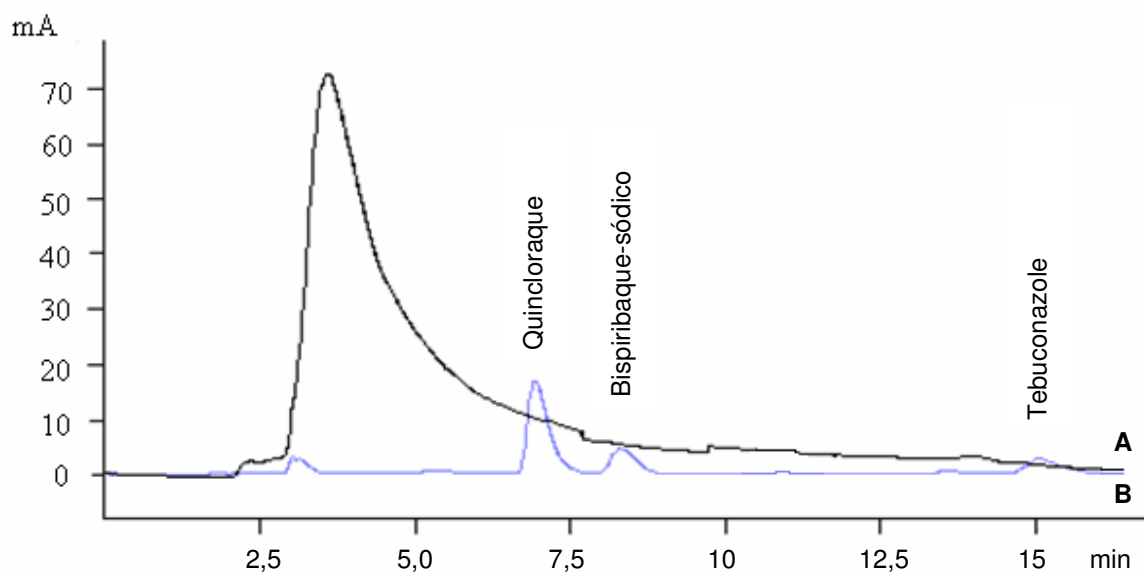


Figura 15. Cromatograma obtido por HPLC-DAD para (A) amostra “branco” de água de superfície e (B) solução analítica com a mistura dos pesticidas na concentração $2,5 \text{ mg L}^{-1}$, obtido nas condições cromatográficas do item 4.1

A identificação dos picos e princípios ativos foi realizada de duas maneiras: injetando cada princípio ativo dos pesticidas estudados, separadamente, no sistema HPLC-DAD sob as mesmas condições cromatográficas observando o tempo de retenção e o espectro de absorção molecular de cada composto, e fazendo a adição de um padrão em uma mistura dos três compostos e observando o aumento de sinal do respectivo pesticida.

4.4.2 Curva analítica e linearidade

A Figura 16 ilustra um cromatograma obtido pela injeção da mistura dos pesticidas em estudo em algumas concentrações no sistema HPLC-DAD.

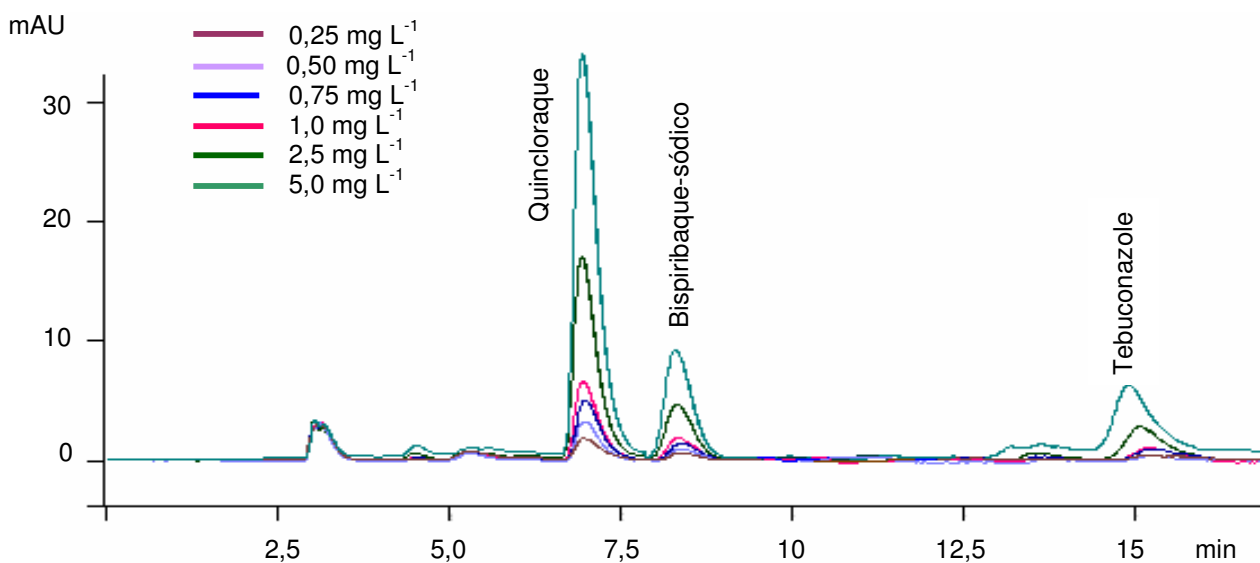


Figura 16. Cromatograma da mistura dos pesticidas nas concentrações 0,25; 0,5; 0,75; 1,0; 2,5 e 5,0 mg L⁻¹ obtidos por HPLC-DAD com uma programação de comprimentos de onda, λ (até 7,8 min, $\lambda = 231$ nm; de 7,8 a 13 min, $\lambda = 246$ nm; de 13 a 17,0 min, $\lambda = 220$ nm), obtido nas condições cromatográficas do item 4.1

A Tabela 11 apresenta as equações das curvas analíticas para os pesticidas estudados.

Tabela 11 - Parâmetros relativos às curvas analíticas, obtidos para os pesticidas analisados por HPLC-DAD

Pesticida	Intervalo linear (mg L⁻¹)	Equação da reta (y = ax + b)	r²
Quincloraque	0,03 - 10	y = 134,28x - 0,1483	1,0000
Bispiribaque-sódico	0,1 - 10	y = 50,366x + 0,1391	0,9999
Tebuconazole	0,05 - 10	y = 42,407x - 0,7268	0,9999

Considerando o intervalo linear de cada pesticida, o primeiro ponto da curva corresponde ao limite de detecção do instrumento.

Observando os coeficientes angulares (termo a) das equações das retas pode-se perceber que o quincloraque apresenta maior sensibilidade dentre os pesticidas analisados por HPLC-DAD. A partir dos resultados das equações das curvas analíticas obtidas, pode-se concluir que o modelo linear é bastante adequado já que os coeficientes de determinação (r²) foram todos maiores que 0,999, o que é satisfatório segundo a literatura (INMETRO, 2007).

A Tabela 12 apresenta os resultados obtidos para o teste da linearidade. As concentrações medidas correspondem às concentrações utilizadas na construção das curvas analíticas; as concentrações calculadas correspondem aos respectivos valores de concentração obtidos através da curva analítica; o resíduo é a diferença entre a concentração medida e a concentração calculada; o desvio e o valor de t são obtidos conforme descrito no item 3.6.2. O valor de n, correspondente ao número de pontos da curva, é igual a 9 para bispiribaque-sódico; igual a 10 para quincloraque e igual a 9 para tebuconazole.

Tabela 12. Valores obtidos no teste de linearidade para os pesticidas

Quincloraque											
C medida (mg L⁻¹)	0,0300	0,0500	0,1000	0,2500	0,5000	0,7500	1,0000	2,5000	5,0000	7,5000	10,0000
C calculada (mg L⁻¹)	0,0319	0,0553	0,0911	0,2448	0,4794	0,7400	0,9819	2,5488	5,0019	7,4967	9,9751
Resíduo	0,0181	-0,0053	0,0089	0,0052	0,0206	0,0100	0,0181	-0,0488	-0,0019	0,0033	0,0249
Desvio	1,4173	17,8641	9,7166	4,3276	6,0241	3,1314	1,4173	1,1424	0,7619	0,6017	1,3287
T	0,0286	-0,0007	0,0021	0,0027	0,0077	0,0071	0,0285	-0,0955	-0,0055	0,0124	0,0420

Bispiribaque-sódico											
C medida (mg L⁻¹)	0,1000	0,2500	0,5000	0,7500	1,0000	2,5000	5,0000	7,5000	10,0000		
C calculada (mg L⁻¹)	0,1000	0,2589	0,5051	0,7259	0,9765	2,5625	4,9728	7,4864	10,0119		
Resíduo	0,0000	-0,0089	-0,0051	0,0241	0,0235	-0,0625	0,0272	0,0136	-0,0119		
Desvio	14,4446	4,9579	4,0287	3,4033	2,3091	1,4888	1,5351	0,9068	1,5138		
t	0,0000	-0,0054	-0,0038	0,0212	0,0306	-0,1259	0,0531	0,0449	-0,0236		

Tebuconazole											
C medida (mg L⁻¹)	0,0500	0,1000	0,2500	0,5000	0,7500	1,0000	2,5000	5,0000	7,5000	10,0000	
C calculada (mg L⁻¹)	0,0532	0,1413	0,2215	0,4394	0,7030	0,9266	2,4758	4,9207	7,4911	9,9718	
Resíduo	0,0032	-0,0413	0,0285	0,0606	0,0470	0,0734	0,0242	0,0793	0,0089	0,0282	
Desvio	0,7619	19,4608	15,3789	13,2679	16,1902	3,2790	5,5310	2,4021	0,8190	1,7235	
t	0,0124	-0,0064	0,0056	0,0137	0,0087	0,0672	0,0131	0,0990	0,0328	0,0491	

Considerando-se um intervalo de confiança de 95% e n-1 graus de liberdade, o valor de t teórico para n = 9 é de 2,31 e para n = 10 é de 2,26. Então, como todos os valores de t obtidos são menores do que o respectivo t tabelado considera-se que todos os pontos das curvas analíticas estão dentro da linearidade.

4.4.3 Determinação dos valores de LOD e LOQ, do instrumento e do método

Os valores de limites de detecção e de quantificação foram obtidos através da relação sinal/ruído como apresentados no item 3.6.3. Na Tabela 13 estão listados os valores de LOD e LOQ do instrumento e do método para os pesticidas estudados.

Tabela 13. Valores de LOD e LOQ do instrumento e do método

Pesticida	Limites do instrumento (mg L ⁻¹)		Limites do método (µg L ⁻¹)	
	LOD _i	LOQ _i	LOD _m	LOQ _m
Quincloraque	0,03	0,09	0,12	0,36
Bispiribaque-sódico	0,1	0,3	0,4	1,2
Tebuconazole	0,05	0,15	0,2	0,6

4.4.4 Precisão (repetitividade e precisão intermediária) do instrumento

A repetitividade (RSD_r) e a precisão intermediária (RSD_{pi}) do instrumento (n = 6), para os níveis de concentração utilizados na elaboração das curvas analíticas dos pesticidas, estão demonstradas na Tabela 14. O teste de precisão intermediária foi realizado empregando dias diferentes dos utilizados para os estudos de repetitividade.

Tabela 14. Resultados da repetitividade (RSD_r) e precisão intermediária (RSD_{pi}) do instrumento

Pesticida	Repetitividade (RSD%)		Precisão intermediária (RSD%)	
	Faixa de variação	média	Faixa de variação	média
	Bispiribaque-sódico	0,9 - 14,4	3,8	2,0 - 11,3
Quincloraque	0,6 - 17,8	4,6	1,6 - 5,9	3,9
Tebuconazole	0,8 - 19,4	8,6	1,1 - 16,9	9,0

Para a validação de métodos cromatográficos, considerando a faixa de concentração avaliada neste trabalho, recomenda-se que a precisão deve apresentar $RSD \leq 20\%$ (RIBANI *et al.*, 2004). Portanto, conforme os dados apresentados na Tabela 14, todos os resultados obtidos estão dentro dos limites aceitáveis.

4.4.5 Exatidão (recuperação) e precisão do método

A Tabela 15 apresenta os valores de recuperação e RSD (em termos de repetitividade e precisão intermediária) obtidos para as fortificações das amostras “branco”, em diferentes níveis de concentração dos pesticidas em estudo, conforme o procedimento descrito no item 3.6.5.

Tabela 15. Recuperações, RSD_r e RSD_{pi} do método para os pesticidas estudados

Pesticida	Nível de fortificação* ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Repetitividade		Precisão Intermediária	
		Recuperação (%)	RSD_r (%)	Recuperação (%)	RSD_{pi} (%)
Quincloraque	1,0	88,5	5,9	95,7	6,4
	2,0	102,7	14,3	93,7	2,8
	10	115,7	6,0	110,9	10,5
Bispiribaque-sódico	1,0	95,5	11,2	92,2	8,4
	2,0	107,3	16,5	101,7	4,5
	10	116,5	6,6	111,7	10,1
Tebuconazole	1,0	85,4	18,7	76,1	19,8
	2,0	81,5	11,6	76,6	15,5
	10	87,9	11,7	96,9	10,1

*6 extrações \times 2 injeções de cada extrato

Os valores de recuperação dependem do procedimento de extração e da concentração do analito, considerando o tipo de matriz. De acordo com a validação de métodos cromatográficos descrita na literatura, as recuperações devem estar entre 70 e 120% e o RSD deve ser menor que 20% (RIBANI *et al.*, 2004). Observando a Tabela 15, percebe-se que as recuperações para os pesticidas estudados ficaram entre 76,1 e 116,5% para todos os níveis de fortificação, com valores de RSD menores que 19,8% e, portanto, o método desenvolvido está de acordo com os parâmetros exigidos pela legislação.

A Figura 17 ilustra os cromatogramas obtidos por HPLC-DAD, seguindo a programação de comprimentos de onda descritos no item 4.1, no nível de fortificação $10 \mu\text{g L}^{-1}$ das amostras de água livre de interferentes (“branco”).

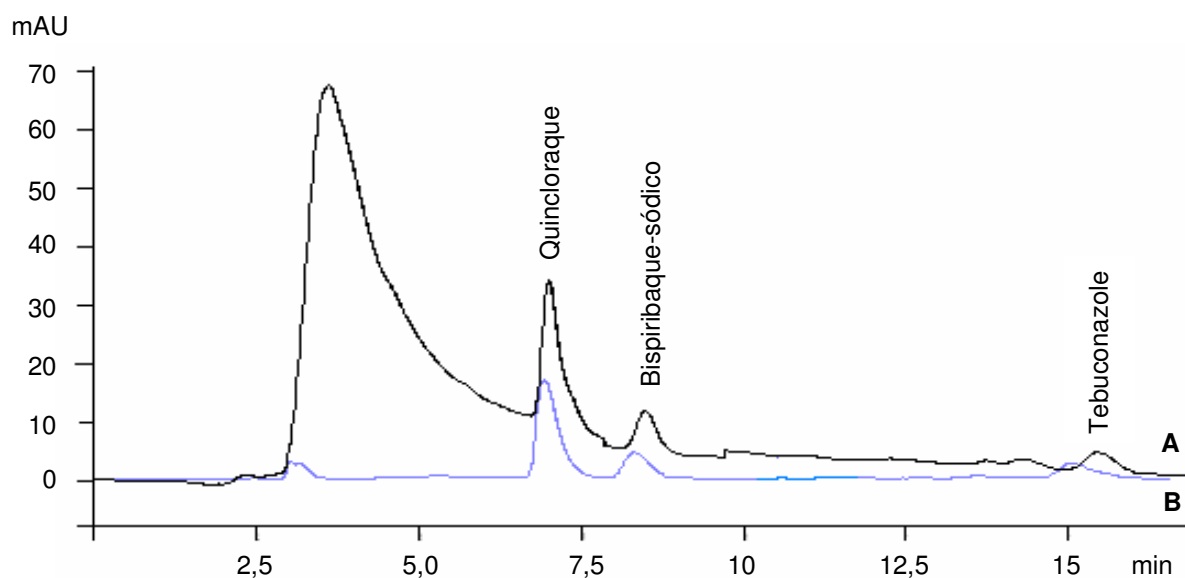


Figura 17. Cromatograma: (A) de uma amostra fortificada no nível de $10 \mu\text{g L}^{-1}$ com a mistura dos pesticidas e (B) de uma mistura padrão dos pesticidas em solvente, na concentração $2,5 \text{ mg L}^{-1}$, obtido nas condições cromatográficas citadas no item 4.1

4.5 Aplicação do método

O método desenvolvido foi aplicado no estudo de dissipação dos pesticidas quincloraque, bispiribaque-sódico e tebuconazole em água de lavoura de arroz irrigado de um experimento conduzido na várzea experimental do Departamento de Fitotecnia da Universidade Federal de Santa Maria, durante o ano agrícola de 2007-2008.

A presença de substâncias orgânicas, principalmente, ácidos húmicos e fúlvicos, é a maior dificuldade na análise de amostras de água. Estes compostos normalmente apresentam sinal com tempo de retenção pequeno, mas com grande intensidade. Nos cromatogramas das amostras de água analisadas, a presença deste sinal não interfere na análise qualitativa e quantitativa dos pesticidas estudados, uma vez que os compostos estudados apresentam tempos de retenção maiores.

4.5.1 Dissipação dos pesticidas estudados em amostras de água de lavoura de arroz irrigado

Todas as amostras foram analisadas conforme o método validado e os resultados obtidos para a dissipação dos compostos estudados estão demonstrados a seguir.

4.5.1.1 Dissipação do bispiribaque-sódico

Os resultados das concentrações do pesticida bispiribaque-sódico nas amostras de água de lavoura de arroz irrigado, coletadas nos canteiros denominados T1R1, T1R2 e T1R3, estão apresentados na Tabela 16.

Tabela 16. Concentrações (em $\mu\text{g L}^{-1}$) de bispiribaque-sódico em amostras de água de lavoura de arroz irrigado

Dias após aplicação	Concentração ($\mu\text{g L}^{-1}$)			
	T1R1	T1R2	T1R3	T1Rmédio
0	10,44	15,82	13,45	13,13
1	20,75	19,64	22,23	20,87
2	13,59	12,98	12,15	12,91
3	8,55	11,90	11,01	10,49
5	10,08	10,82	11,26	10,72
7	8,45	10,67	7,66	8,93
10	6,33	6,42	5,88	6,21
14	4,44	4,03	4,54	4,34
21	2,05	2,15	1,08	1,76
28	1,11	1,01	1,54	1,22
35	nd	nd	nd	nd
42	nd	nd	nd	nd

T1R1 = repetição 1; T1R2 = repetição 2; T1R3 = repetição 3

Observando a tabela referente às concentrações do pesticida bispiribaque-sódico nos diferentes canteiros é possível perceber a maior quantidade deste herbicida encontrada no primeiro dia após a aplicação do pesticida com relação ao mesmo dia de aplicação do composto. Isto pode ser explicado pela solubilização do produto aplicado no sistema aquoso e pelas interações do pesticida com a matéria orgânica contida no sedimento e na água (MOREIRA, 2004).

O perfil de dissipação do herbicida bispiribaque-sódico está demonstrado na Figura 18.

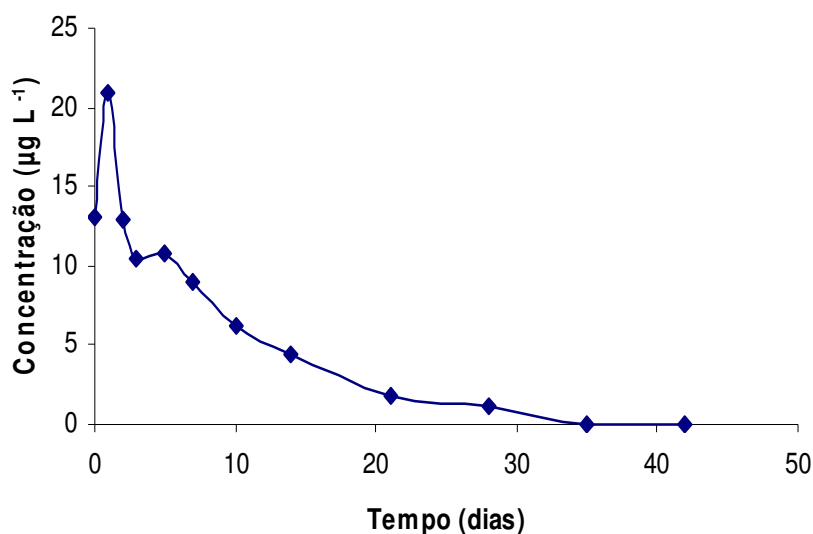


Figura 18. Perfil de dissipação do pesticida bispiribaque-sódico em água de lavoura de arroz irrigado na safra de 2007-2008

Conforme a Tabela 16 e a Figura 18 foi encontrado bispiribaque-sódico até 28 dias após a aplicação deste herbicida na lavoura de arroz e a respectiva concentração média encontrada foi de $1,22 \mu\text{g L}^{-1}$.

KURZ (2007) avaliou a persistência deste herbicida em lavoura de arroz irrigado nas safras 2003-2004 e 2004-2005 e encontrou resíduos até 35 dias após aplicação na primeira safra e 21 dias após aplicação na segunda safra estudada.

A Figura 19 ilustra um cromatograma de uma amostra de água de lavoura de arroz irrigado coletada no 3º dia após a aplicação do pesticida bispiribaque-sódico na várzea experimental da UFSM onde o estudo foi desenvolvido.

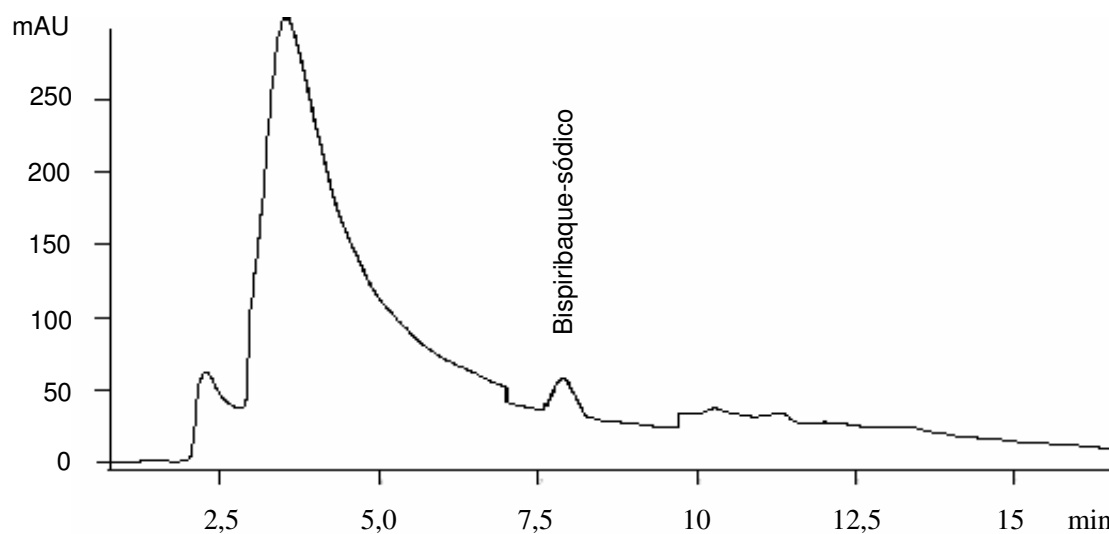


Figura 19. Cromatograma de uma amostra de água coletada no 3º dia após a aplicação do pesticida bispiribaque-sódico em lavoura de arroz irrigado, obtido nas condições descritas no item 4.1

4.5.1.2 Dissipação do quincloraque

Os valores de concentração para o herbicida quincloraque nos diferentes dias após a aplicação, de amostras coletadas nos canteiros denominados T2R1, T2R2 e T2R3, estão demonstrados na Tabela 17.

Tabela 17. Concentrações (em $\mu\text{g L}^{-1}$) de quincloraque em amostras de água de arroz irrigado

Dias após aplicação	Concentração $\mu\text{g L}^{-1}$			
	T2R1	T2R2	T2R3	T2Rmédio
0	207,91	208,52	7,37	141,27
1	286,56	276,11	327,27	296,65
2	190,69	194,26	134,97	173,31
3	162,52	99,47	60,70	107,57
5	70,54	55,51	54,28	60,11
7	48,12	48,31	44,67	47,03
10	102,58	49,29	57,53	69,80
14	40,41	32,10	45,23	39,25
21	50,56	50,46	25,50	37,98
28	65,16	9,32	10,08	28,18
35	38,09	2,18	3,68	14,65
42	11,16	23,14	27,57	20,62
49	41,12	39,92	60,58	47,21
56	6,27	7,10	16,08	9,82
63	11,31	7,35	21,81	13,49
70	4,91	2,58	7,28	4,92
77	4,03	4,18	6,38	4,86
84	3,00	2,90	5,60	3,83
91	1,32	2,47	1,44	1,74

T2R1 = repetição 1; T2R2 = repetição 2; T2R3 = repetição 3

O perfil de dissipação do herbicida quincloraque em amostras de água de lavoura de arroz irrigado, nos diferentes dias de coleta, pode ser observado na Figura 20.

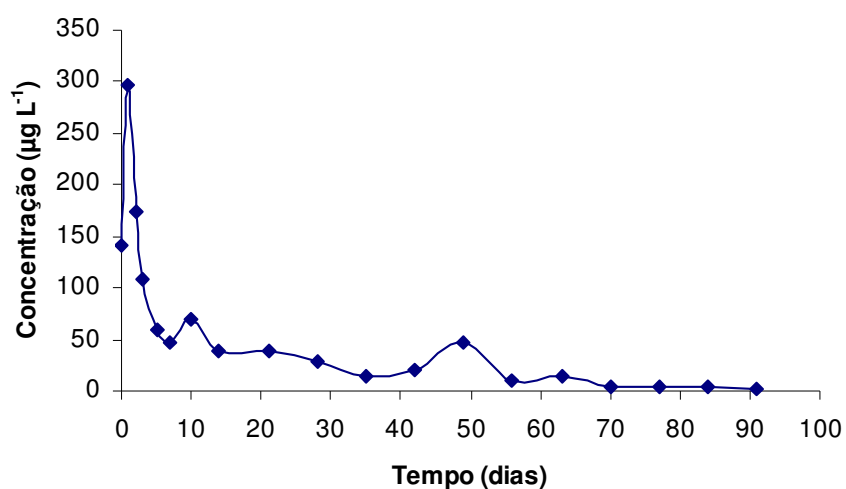


Figura 20. Perfil de dissipação do pesticida quincloraque em água de arroz irrigado na safra de 2007-2008

Observando a Tabela 17 e a Figura 20, referente às concentrações e à dissipação do quincloraque nas amostras de água de lavoura de arroz irrigado, pode-se perceber que o composto foi encontrado até 91 dias após a aplicação. A concentração encontrada na lâmina de água foi de $1,74 \mu\text{g L}^{-1}$.

PEIXOTO (2007) realizou um estudo semelhante a este, na safra 2006-2007, para a determinação de quincloraque em amostras de água de lavoura de arroz e encontrou resíduos de quincloraque até 42 dias após a aplicação do herbicida.

Como os experimentos são conduzidos a campo, diversos fatores ambientais como, por exemplo, temperatura, luminosidade, vento, chuva, além da presença de compostos orgânicos na água e no solo, podem alterar a dissipação destes compostos.

A Figura 21 apresenta um cromatograma de uma amostra de água de lavoura de arroz irrigado coletada no 3º dia após a aplicação do pesticida quincloraque.

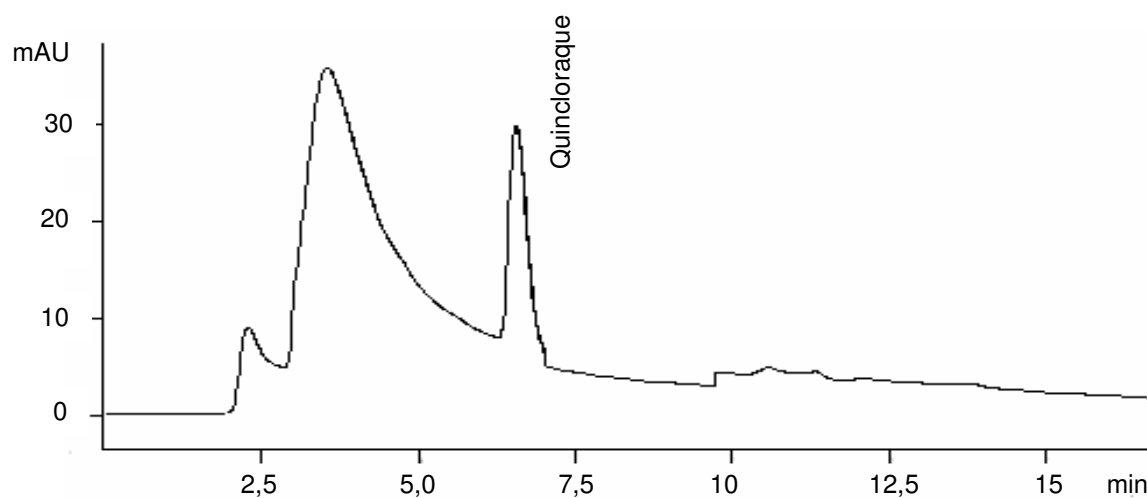


Figura 21. Cromatograma de uma amostra de água de lavoura de arroz irrigado coletada no 3º dia após a aplicação do pesticida quinclorac, obtido nas condições descritas no item 4.1

4.5.1.3 Dissipação do tebuconazole

O fungicida tebuconazole foi aplicado em apenas um canteiro denominado T3R1 e os valores de concentração nos diferentes dias após a aplicação deste pesticida estão demonstrados na Tabela 18.

Tabela 18. Concentrações (em $\mu\text{g L}^{-1}$) de tebuconazole em amostras de água de arroz irrigado

Dias após aplicação	T3R1 (Concentração, $\mu\text{g L}^{-1}$)
1	1,03
2	0,88
3	0,79
5	1,06
7	0,95
10	0,68
14	0,59
21	0,75
28	nd
35	nd

Conforme a Tabela 18, até os 21 dias após a aplicação, o fungicida tebuconazole foi encontrado nas amostras de água analisadas, sendo que a concentração deste composto foi de $0,75 \mu\text{g L}^{-1}$.

A Figura 22 ilustra o perfil de dissipação do fungicida tebuconazole em amostras de água de lavoura de arroz irrigado nos diferentes dias de coleta das amostras.

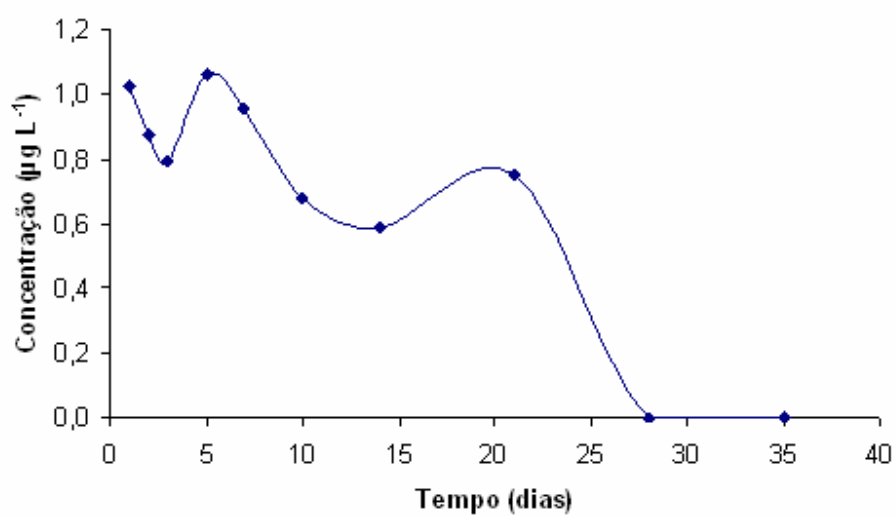


Figura 22. Perfil de dissipação do pesticida tebuconazole em água de arroz irrigado na safra de 2007-2008

A Figura 23 apresenta um cromatograma de amostra de água coletada no 3º dia após a aplicação do pesticida tebuconazole.

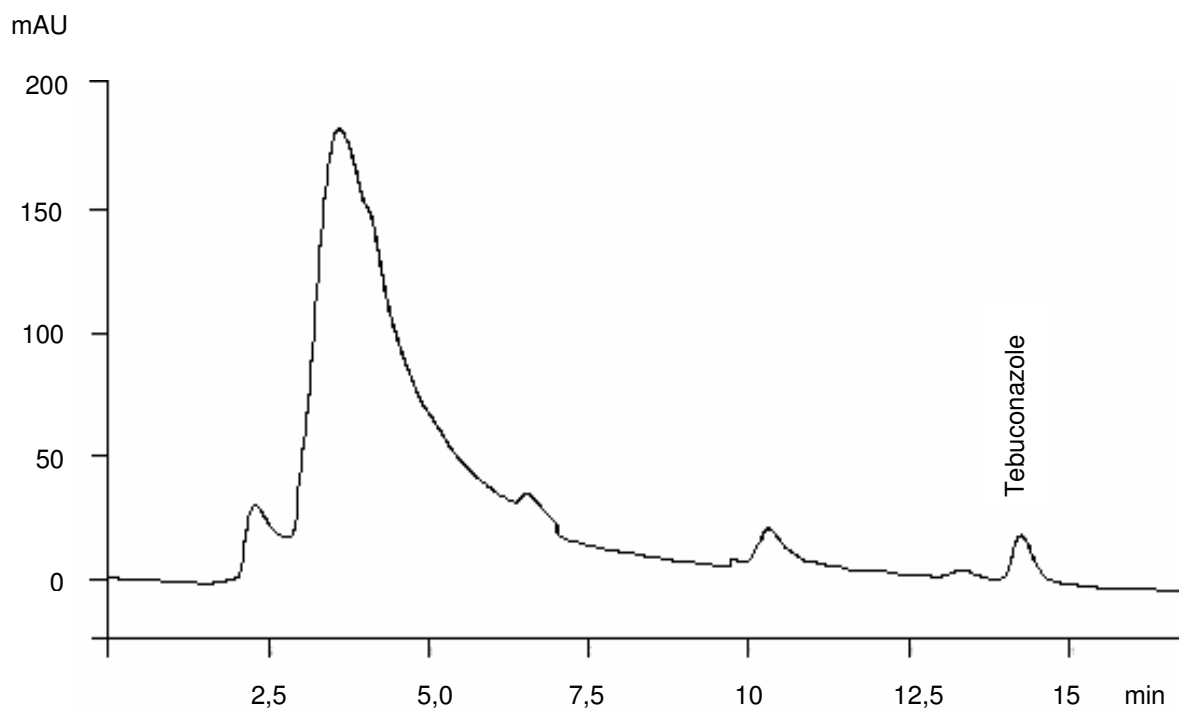


Figura 23. Cromatograma de uma amostra de água de lavoura de arroz irrigado coletada no 3º dia após a aplicação do pesticida tebuconazole, obtido nas condições descritas no item 4.1

5 CONCLUSÃO

A utilização dos pesticidas em escala mundial aumenta os níveis de concentrações residuais dos mesmos ou de seus metabólitos em vários compartimentos ambientais, sendo que vale salientar que estes podem comprometer a qualidade das águas superficiais e subterrâneas.

Muitos destes compostos são encontrados na água em baixas concentrações, aumentando o interesse em desenvolver técnicas de preparo de amostra que possibilitem pré-concentrar os analitos presentes na matriz para adequação ao sistema de detecção.

A Extração em Fase Sólida é uma das ferramentas mais poderosas e mais empregadas para a extração e/ou pré-concentração de analitos presente em amostras aquosas. A SPE é uma técnica de extração rápida, que utiliza um menor volume de solventes tóxicos, de fácil automação, com boa seletividade e que apresenta boas recuperações. Neste estudo, a SPE mostrou-se adequada para a pré-concentração das amostras de água utilizando cartucho contendo 500 mg do adsorvente C18 e realizando a eluição dos analitos com metanol.

O método por HPLC-DAD mostrou-se adequado para a determinação dos pesticidas, permitindo a análise em um tempo de 17 min. As condições cromatográficas, com fase móvel metanol/água (70:30, v/v) acidificada a pH 3,0 com solução aquosa de ácido fosfórico (1:2, v/v) a uma vazão de $1,0 \text{ mL min}^{-1}$, coluna Gemini $5 \mu\text{m}$ C18 (250 x 4,6 mm) e pré-coluna com o mesmo recheio da coluna, comprimento de onda de 231, 246 e 220 nm (quincloraque, bispiribaque-sódico e tebuconazole, respectivamente), permitiram a separação e quantificação satisfatória dos compostos em estudo.

A detecção por DAD foi adequada, uma vez que permitiu monitorar simultaneamente diferentes comprimentos de onda, fornecendo o espectro de absorção molecular de cada pesticida e possibilitando assim, a confirmação da identidade dos compostos.

A validação do método analítico foi realizada a fim de se avaliar a confiabilidade das informações geradas e para os diversos parâmetros avaliados obtiveram-se resultados satisfatórios.

As curvas analíticas apresentaram linearidade entre 0,03 a 10 mg L⁻¹ para quincloraque, 0,1 a 10 mg L⁻¹ para bispiribaque-sódico e entre 0,05 a 10 mg L⁻¹ para tebuconazole, com coeficientes de determinação maiores que 0,9999.

Os valores de limite de detecção e quantificação permitem que sejam determinados resíduos de pesticidas em águas de superfície, as quais apresentam elevado conteúdo de compostos interferentes. Os resultados de LOQ obtidos foram 1,2 µg L⁻¹ para bispiribaque-sódico, 0,4 µg L⁻¹ para quincloraque e 0,6 µg L⁻¹ para tebuconazole.

O método apresentou valores de recuperação entre 76,1 e 116,5%, comprovando a confiabilidade do método desenvolvido, uma vez que, de acordo com a literatura para a validação de métodos cromatográficos, as recuperações precisam estar entre 70 e 120%.

Os valores de precisão obtidos foram inferiores a 19,8%, encontrando-se dentro dos limites aceitáveis (RSD < 20%).

O método validado foi aplicado em um experimento a campo conduzido na várzea experimental da UFSM, a fim de estudar a dissipação dos pesticidas em água de lavoura de arroz irrigado, mostrando-se bastante eficiente.

Analisando os resultados obtidos, no estudo de dissipação dos pesticidas, para as amostras de água de lavoura de arroz irrigado, na safra em estudo, o herbicida bispiribaque-sódico foi encontrado até 28 dias após a aplicação e a concentração encontrada foi de 1,22 µg L⁻¹. Dentro das primeiras 24 h após a aplicação do herbicida, o bispiribaque-sódico apresentou baixa disponibilidade, sendo detectado em concentração menor comparado com o primeiro dia após a aplicação do composto. Isso pode ser explicado pelas interações do pesticida com a matéria orgânica presente no sedimento e na água e pela solubilização do produto aplicado no sistema aquoso.

Observando os resultados de concentração e a dissipação do quincloraque em amostras de água de lavoura de arroz irrigado foi encontrada uma concentração de 1,74 µg L⁻¹ na lâmina de água 91 dias após a aplicação deste composto.

Já o fungicida tebuconazole apresentou resíduos nas amostras de água analisadas até 21 dias após a aplicação, sendo que a concentração encontrada foi de $0,75 \mu\text{g L}^{-1}$.

Vale salientar que, além das propriedades físico-químicas dos compostos estudados, os experimentos são realizados a campo, e diversos fatores ambientais como, por exemplo, temperatura, vento, luminosidade, chuva, presença de matéria orgânica na água e no solo, podem alterar a dissipação destes compostos.

Segundo o estudo de dissipação realizado, devido ao grande período de tempo que os pesticidas foram encontrados nas amostras, existe a necessidade da implantação de planos de gerenciamento, de manejo da cultura de arroz irrigado e de desempenho para proteger o ambiente e a vida aquática, uma vez que a drenagem da água da lavoura das culturas de arroz coincide com a época de reprodução dos peixes.

TRATAMENTO DOS RESÍDUOS GERADOS

Os reagentes e solventes utilizados no desenvolvimento deste estudo foram recolhidos, colocados em recipientes separados e rotulados como halogenados e não-halogenados e logo após, encaminhados para o Almoxarifado, responsável pelo tratamento final dos resíduos gerados, no Departamento de Química da UFSM.

Os resíduos sólidos foram colocados em sacos plásticos de cor preta, devidamente rotulados e logo em seguida, também encaminhados ao Almoxarifado do Departamento de Química da UFSM.

SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

- Determinação, na água de lavoura de arroz irrigado, de outros pesticidas também utilizados na cultura arrozeira;
- Estudo em campo e no laboratório, da estabilidade dos pesticidas em amostras de água de lavoura de arroz irrigado e em amostras de grãos de arroz, com o objetivo de traçar o perfil de persistência destes pesticidas no sistema de cultivo de arroz irrigado.
- Estudo em campo e no laboratório da estabilidade herbicidas em amostras de grãos de arroz, com o objetivo de traçar o perfil de persistência destes pesticidas no sistema de cultivo de arroz irrigado.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGROFIT. Sistema de Agrotóxicos Fitossanitários; Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Disponível em: <http://extranet.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons> Acesso em 21 dez. 2008.

ALDA, M. L.; KUSTER, M.; BARCELÓ, D. Liquid chromatography-tandem mass spectrometric analysis and regulatory issues of polar pesticides in natural and treated waters. **Journal of Chromatography A**, v. 1216, p. 520-529, 2009.

ANA; AGÊNCIA NACIONAL DAS ÁGUAS, Brasília, www.ana.gov.br. Acesso em: 21 dez. 2008.

ANVISA. AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Brasília, 2008. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/AGROSIA/asp/frm_pesquisa_ingrediente.asp>. Acesso em: 02 jan. 2009.

ANVISA (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA). Resíduos de agrotóxicos em alimentos. **Revista Saúde Pública**, v. 40, n. 2, p. 361-363, 2006.

AUGUSTO, F.; VALENTE, A. L. P.; RIEDO, C. R. F. Análise quantitativa por cromatografia. Campinas, 2003. Disponível em: <www.chemkeys.com>. Acesso em: 20 abr. 2006.

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

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

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

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

BARCELÓ, D.; HENNION, M. C. **International Journal Environment Analytical Chemistry**, v. 701, p. 1191, 1998.

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

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

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

BRASIL. Resolução nº 899, de 29 de maio de 2003. Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 02 junho 2003. Disponível em: <www.anvisa.gov.br/legis/resol/2003/re/899_03re.htm>. Acesso em: 26 dez. 2008.

BRASIL Decreto nº 4.074, de 4 de janeiro de 2002, que regulamenta a Lei nº 7802/1989, que dispõe sobre a pesquisa, a experimentação, a produção, a embalagem e rotulagem, o transporte, o armazenamento, controle, a inspeção e a fiscalização de agrotóxicos, e dá outras providências. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 08 jan 2002. Disponível em: www.planalto.gov.br/ccivil_03/Decreto/2002/D4074.htm. Acesso em 26 dez. 2008.

BRASIL. Portaria nº 518, de 25 de março de 2004. Estabelece os procedimentos e responsabilidades relativos ao controle e vigilância da qualidade da água para consumo humano e seu padrão de potabilidade, e dá outras providências. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 26 março 2004. Disponível em: <dtr2004.saude.gov.br/dab/saudebucal/legislacao/portaria518_25_03_04.pdf>. Acesso em 26 dez. 2008.

BRASIL. Resolução nº 357, de 17 de março de 2005. Dispõe sobre a classificação dos corpos de água e diretrizes ambientais para o seu enquadramento, bem como estabelece as condições e padrões de lançamento de efluentes, e dá outras providências. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 18 março

2005. Disponível em: <www.mma.gov.br/conama/res/res05/res35705.pdf>. Acesso em: 21 dez. 2008.

BRITO, N. M. *et al.* Validação de métodos analíticos: estratégia e discussão. *Pesticidas: R. Ecotoxicologia e Meio Ambiente*, v. 13, p. 129-146, jan./dez. 2003.

CABRERA, L.; COSTA, F. P.; PRIMEL, E. G. Estimativa de risco de contaminação das águas por pesticidas na região sul do Estado do RS. *Química Nova*, v. 31(8), p. 1982-1986, 2008.

CAPELÓ, J. L. *et al.* Chromatographic-based methods for pesticides determination in honey: an overview. *Talanta*, v. 71, p. 503-514, 2007.

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

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

CARVALHO, A. R.; SCHLITTLER, F. H. M.; TORNISIELO, V. L. Relações da atividade agropecuária com parâmetros físico-químicos da água. *Química Nova*, v.23, n. 5, p. 529-537, 2000.

CERDERIA, A. L. *et al.* Metodologia analítica de resíduos do herbicida 2,4-D (ácido 2,4-diclorofenoxiacético) em amostras de água em área de cultivo de cana-de-açúcar. **Pesticidas: Revista de Ecotoxicologia e Meio Ambiente**, v. 12, p. 99-110, 2002.

CIT, CENTRO DE INFORMAÇÕES TOXICOLÓGICAS;
http://www.cit.rs.gov.br/v2/nova/?p=p_109&sName=ano-2007; Acesso em: 26 dez. 2008.

COLLINS, C. H.; BRAGA, G. L.; BONATO, P. S. **Fundamentos de Cromatografia**. Campinas: Editora Unicamp, 2006, 453 p.

CONAB (COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO). Indicadores da Agropecuária – Agosto/Setembro de 2008. Disponível em: <<http://www.conab.gov.br>> Acesso em 21 dez. 2008.

CONAMA (CONSELHO NACIONAL DO MEIO AMBIENTE). Legislação Ambiental. Disponível em: <<http://www.nma.gov.br>>. Acesso em: 09 jan. 2009.

COUTINHO, C. F. B. *et al.* Pesticidas: mecanismos de ação, degradação e toxidez. **Pesticidas: Revista de Ecotoxicologia e Meio Ambiente**, v. 15, p. 65-72, 2005.

DIRECTIVE 86/363/EEC; it contains MRLs already established by Directive 86/362/EEC (MRLs on cereals), Directive 86/363/EEC (MRLs for foodstuffs of animal origin) and Directive 90/642/EEC MRLs for foodstuffs of plant origin).

Disponível em:

http://ec.europa.eu/food/plant/protection/pesticides/pesticides_res_annex_ii.xls. Acesso em 08 jan. 2008. EEC Drinking Water Directive (80/778/EEC), EEC No. L229/11-29, European Union, Brussels, 1980.

EMBRAPA (EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA). **A cultura do Arroz no Brasil**. Embrapa Arroz e Feijão, 2006. Disponível em: <<http://www.cnpaf.embrapa.br/arroz/historia.htm>>. Acesso em: 21 dez. 2008.

FAO (FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS), Rice is life. Italy, 2004 Disponível em: <<http://www.fao.org/rice2004/en/aboutrice.htm>>. Acesso em: 21 dez. 2008.

FAO (FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS), 2005. Disponível em: <<http://faostat.fao.org/site/375/default.aspx>>. Acesso em 22 dez. 2008.

FAO. **FAOSTAT**. Disponível em:<<http://apps.fao.org>>. Acesso em: 15 nov. 2006.

FAO (FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS), Rice is life - International Rice Commission meets in Peru Italy/Peru, 2006a. Disponível em:<<http://www.fao.org/newsroom/en/news/2006/1000267/index.htm>>. Acesso em: 21 dez. 2008.

FAO (FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS). Statistical databases, FAO 2006b. Disponível em: <<http://www.fao.org>>. Acesso em: 21 dez. 2008.

FAO (FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS) Disponível em: < <http://www.fao.org>>. Acesso em: 22 dez. 2008.

GARP. ASSOCIAÇÃO GRUPO DE ANALISTAS DE RESÍDUOS DE PESTICIDAS. **Manual de Resíduos de Pesticidas em Alimentos**. 1999.

GOMES, A. S.; MAGALHÃES, A. M. J. **Arroz irrigado no Sul do Brasil**. Pelotas: Editora Embrapa Clima Temperado, 2004, 900 p.

GONÇALVES, F. F. **Estudo de métodos empregando HPLC-DAD e LC-MS/MS para a determinação de resíduos de herbicidas em água e solo do cultivo de arroz irrigado**. 2007. Tese (Doutorado em Química) – UFSM, Santa Maria, RS.

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

HUG, S.; DIXON, A.; TEUSCHER, J. Simplified Method Development for the Extraction of Acidic, Basic and Neutral Drugs with a Single SPE Sorbent - strata™ X. In: Application Note Phenomenex, Inc. Torrance, CA USA: 2003. Disponível em: <<http://www.phenomenex.com>>. Acesso em: 09 jan. 2009.

INMETRO (INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA, NORMALIZAÇÃO E QUALIDADE INDUSTRIAL) **DOQ-CGCRE-008**, Revisão 02 – Junho/2007: Orientação sobre validação de métodos de ensaios químicos.

IRGA (Instituto Riograndense do Arroz). Disponível em: <<http://www.irga.rs.gov.br>>. Acesso em: 29 dez. 2008.

ISA (Instituto socioambiental), **Almanaque Brasil Socioambiental**, 2008. Disponível em: <http://www.socioambiental.gov>. Acesso em: 02 jan. 2009

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

JONATAN, T. **Introduction of environmental studies**. 3rd ed. New York: Saunders College, 1989, 304 p.

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

KENNEDY, G. *et al.* Nutrient impact assessment of rice in major rice-consuming countries. **International Rice Commission Newsletter**, v.51, p.33-42, 2002.

KOIDE, T. *et al.* Antitumor effect of hydrolyzed anthocyanin from grape rinds and red rice. **Cancer Biotherapy and Radiopharmacology**, v.11, n.4, p.273-277, 1996.

KURZ, M. H. S. **Estudo de métodos empregando Extração em Fase Sólida e análise por HPLC-DAD e GC-ECD para a determinação de resíduos de pesticidas em águas e da degradação a campo**. 2007. 150p. Tese (Doutorado em Química) – UFSM, Santa Maria, RS.

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

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

LARINI, L. **Toxicologia dos praguicidas**. 1ª ed. São Paulo: Editora Manole Ltda, 1999. 230p.

LEE, G. *et al.* A multi-residue method for the determination of 203 pesticides in rice paddies using gas chromatography/mass spectrometry. **Analytica Chimica Acta**, v.619, p.67-74, 2008.

LEVIGARD, Y. **A interpretação dos profissionais de saúde acerca das queixas do nervo no meio rural: uma aproximação ao problema das intoxicações por agrotóxicos**, 2001. Dissertação (Mestrado em Saúde Pública), ENSP/FIOCRUZ, Rio de Janeiro, RJ.

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

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

LOURENCETTI, C. *et al.* Avaliação do potencial de contaminação de águas subterrâneas por pesticidas: comparação entre métodos de previsão de lixiviação. **Pesticidas: Revista de Ecotoxicologia e Meio Ambiente**, v. 15, p. 1-14, 2005.

MAPA (MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO). Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br>>. Acesso em: 22 jan. 2009.

MAJORS, R. E. A review of EPA sample preparation techniques for organic compound analysis of liquid and solid samples. **LCGC**, v. 19, p. 1120-1130, 2001. Disponível em: <<http://www.chromatographyonline.com>>. Acesso em: 21 dez. 2008.

MARCHESAN, E.; WALTER, M.; AVILA, L. A. Arroz: composição e características nutricionais. **Ciência rural**, v. 38, p. 1184-1192, 2008

MARÍN, J. M. *et al.* Quantification and confirmation of anionic, cationic and neutral pesticides and transformation products in water by on-line solid phase extraction–liquid chromatography–tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1133, p. 204-214, 2006.

MILLER, J.B. *et al.* Rice: a high or low glycemic index food? **American Journal of Clinical Nutrition**, v.56, p.1034-1036, 1992

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

MIYAUCHI, T.; MORI, M.; ITO, K. Application of solid-phase extraction to quantitative determine cyproconazole and tebuconazole in treated wood using liquid chromatography with UV detection. **Journal of Chromatography A**, v. 1063, p. 137-141, 2005.

MOREIRA, M. R. S.; MUCCI, J. L. N.; ABAKERLY, R. B. Monitoramento dos resíduos de carbofurano em área de produção de arroz irrigado – Taubaté, São Paulo. Arquivo do Instituto Biológico, v. 71, p. 221-226, 2004.

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

OCHIAI, N. *et al.* Fast screening of pesticide multiresidues in aqueous samples by dual stir bar sorptive extraction-thermal desorption-low thermal mass gas chromatography-mass spectrometry, **Journal of chromatography A**, v. 1130, p.83-90, 2006.

OPAS/OMS. Manual de Vigilância da Saúde de Populações Expostas a Agrotóxicos. Brasília. Representação do Brasil, 1996.

PEIXOTO, S. C. **Estudo da estabilidade a campo dos pesticidas Carbofurano e Quincloraque em água de lavoura de arroz irrigado empregando SPE e HPLC-DAD.** 2007. Dissertação (Mestrado em Química) – Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2007.

PERES, F *et al.* Percepção das condições de trabalho em uma tradicional comunidade agrícola em Boa Esperança, Nova Friburgo, Rio de Janeiro, Brasil. **Cad. Saúde Pública**, Rio de Janeiro. V.20(4), jul-ago, 2004.

PIMENTEL, L. C. F. *et al.* O inacreditável emprego de produtos químicos perigosos no passado. **Química Nova**, v. 29(5), 1138-1149, 2006.

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

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

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

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

PRIMEL, E. G. **Desenvolvimento e Validação de Metodologia Analítica para a Determinação do Herbicida Clomazone em Águas de Superfície utilizando SPE e HPLC-DAD**, 2000. 86p. Dissertação (Mestrado em Química) – UFSM, Santa Maria, RS.

PRIMEL, E G.; CALDAS, S. S.; DEMOLINER, A. Validation of a Method using Solid Phase Extraction and Liquid Chromatography for the Determination of Pesticide Residue in Groundwaters. **J. Braz. Chem. Soc.**, v. 20, p. 125-132, 2009.

QUEIROZ, S. C. N.; COLLINS, C. H.; JARDIM, I. C. S. F. Métodos de extração e/ou concentração de compostos encontrados em fluidos biológicos para posterior determinação cromatográfica. **Química Nova**, v. 24, p. 68-76, 2001.

QURESHI, A.A. *et al*. Novel tocotrienols of rice bran modulate cardiovascular disease risk parameters of hypercholesterolemic humans. **Nutritional Biochemistry**, v.8, p.290-298, 1997.

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

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

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

RODRIGUES, A.M., *et al*. Determination of several pesticides in water by solid-phase extraction, liquid chromatography and electrospray tandem mass spectrometry, **Journal of Chromatography A**, v. 1150, p. 267–278, 2007.

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

RONG, N. et al. Oryzanol decreases cholesterol absorption and aortic fatty streaks in hamsters. **Lipids**, v.32, n.3, p.303-309, 1997.

SAKAMOTO, M.; TSUTSUMI, T.; Applicability of headspace solid-phase microextraction to the determination of multi-class pesticides in waters. **Journal of Chromatography A**, v. 1028, p. 63-74, 2004.

SANCHES, S.M., SILVA, C. H. T. P. ; CAMPOS, S. X. ; et al., Pesticidas e seus respectivos riscos associados à contaminação da água. Pesticidas: **R. Ecotoxicol. e Meio Ambiente**, Curitiba, v. 13, p. 53-58, jan./dez. 2003.

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

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

SILVA, C. *et al.* Pesticides in Esteros del Ibera (AR): evaluation of impacts and proposal of guidelines for water quality protection. **Ecological Modelling**, v. 186, p. 85-97, 2005.

SILVA, J. M. *et al.* Agrotóxico e trabalho: uma combinação perigosa para a saúde do trabalhador rural. **Ciência e saúde coletiva**, v. 10(4), p. 891-903, 2005.

SILVA, C. M. M. S.; FAY, E. F.; *Agrotóxicos Aspectos Gerais: Agrotóxicos e Ambiente*, Embrapa: Brasília, 2004.

SINDAG; SINDICATO NACIONAL DA INDUSTRIA DE PRODUTOS PARA DEFESA AGRÍCOLA Vendas – Culturas – 2007 – US\$. Disponível em: <http://www.sindag.com.br/dados_mercado.php> Acesso em: 28 dez. 2008.

SLOBODNÍK, J. *et al.* Monitoring of organic micropollutants in surface water by automated on-line trace-enrichment liquid and gas chromatographic systems with ultraviolet diode-array and mass spectrometric detection. **Journal of Chromatography A**, v. 768, p. 239-258, 1997.

SPADOTTO, *et al.* Monitoramento do risco ambiental de agrotóxicos: princípios e recomendações. Jaguariúna: **Embrapa Meio Ambiente**, 2004, 29p. (Embrapa Meio Ambiente Documentos, 42).

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

SOSBAI; SOCIEDADE SUL-BRASILEIRA DE ARROZ IRRIGADO; **Arroz irrigado: Recomendações técnicas da pesquisa para o sul do Brasil**. Balneário Camboriú: Elf Editora e Indústria Gráfica Ltda. 2005.

STEPAN, R., TICHA, J., HAJŠLOVA, J. Baby food production chain: Pesticide residues in fresh apples and products. **Food Additives and Contaminants**, v.22, n.12, p. 1231-1242, 2005.

STORCK, C.R. **Variação na composição química em grãos de arroz submetidos a diferentes beneficiamentos**. 2004. 108f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - UFSM, Santa Maria, RS.

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

VEIGA, M. M., *et al.* Análise da contaminação dos sistemas hídricos por agrotóxicos numa pequena comunidade rural do Sudeste do Brasil., **Cad. Saúde Pública**, Rio de Janeiro. v. 22; p. 2391-2399; 2006.

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

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

WANDER, A. E., **Custos e @gronegocio on line**, v.2, p.1-14, 2006.

WATERS CORPORATION, OASIS® Sample Preparation Products, 2006. Disponível em: <<http://waters.com>>. Acesso em: 09 de jan. 2009.

XIA, M. et al. Supplementation of diets with the black rice pigment fraction attenuates atherosclerotic plaque formation in apolipoprotein E deficient mice. **Journal of Nutrition**, v.133, n.3, p.744-751, 2003.

ZANELLA, R. *et al.* Development and validation of a high-performance liquid chromatographic procedures for the determination of herbicides in surface and agricultural water. **Journal of Separation Science**, v. 26, p. 935-938, 2003.

ZHOU, Z. et al. Composition and functional properties of rice. **International Journal of Food Science and Technology**, v.37, p.849-868, 2002.

ZHOU, Z. et al. Sensitive determination of fungicides and prometryn in environmental water samples using multiwalled carbon nanotubes solid-phase extraction cartridge. **Analytica Chimica Acta**, v.602, p.223-228, 2007.

ANEXOS

ANEXO A – Herbicidas recomendados para a cultura do arroz irrigado no Brasil

Nome Comum	Nº CAS	Grupo Químico	IDA (mg kg ⁻¹ pc)	LMR (mg kg ⁻¹)	IS (dias)
2,4-D	94-75-7	ácido ariloxialcanóico	1	0,2	-
Azinsulfurom	120162-55-2	sulfoniluréia	0,1	-	-
Bentazona	25057-89-0	benzotiadiazinona	0,1	0,02	60
Bispiribaque-sódico	125401-92-5	ácido pirimidiniloxibenzóico	0,01	0,01	118
Carfentrazone-etílica	128639-02-1	triazolona	0,03	0,02	66
Cialofope-butílico	122008-85-9	ácido ariloxifenoxipropiônico	0,003	0,01	77
Ciclossulfamurom	136849-15-5	sulfoniluréia	0,03	0,1	111
Clomazone	81777-89-1	isoxazolidinona	0,04	0,1	-
Dibrometo de diquate	85-00-7	bipiridílio	0,002	0,2	7
Dicloreto de paraquate	1910-42-5	bipiridílio	0,004	0,5	7
Etoxissulfurom	126801-58-9	sulfoniluréia	0,04	0,05	50
Glifosato	1071-83-6	glicina substituída	0,042	0,2	-
Imazapique	104098-48-8	imidazolinona	0,5	0,05	60
Imazetapir	81335-77-5	imidazolinona	0,25	0,05	60
Metsulfurom-metílico	74223-64-6	sulfoniluréia	0,01	0,02	30
Molinato	2212-67-1	tiocarbamato	0,02	0,1	-

Oxadiazona	19666-30-9	oxadiazolona	0,005	0,05	-
Oxifluorfem	42874-03-3	éter difenílico	0,003	0,05	-
Pendimetalina	40487-42-1	dinitroanilina	0,1	0,05	-
Penoxsulam	219714-96-2	sulfonilida triazolopirimidina	0,05	0,01	98
Picloram	1918-02-1	ácido piridinocarboxílico	0,07	0,1	90
Pirazossulfurom-etílico	93697-74-6	sulfoniluréia	0,006	0,01	30
Propanil	709-98-8	anilida	0,005	2	80
Quincloraque	84087-01-4	ácido quinolinocarboxílico	0,38	0,05	90
Sulfosato	81591-81-3	glicina substituída	0,03	0,05	-
Tiobencarbe	28249-77-6	tiocarbamato	0,01	0,05	-
Triclopir-butotílico	64700-56-7	ácido piridiniloxialcanóico	0,05	0,05	-
Trifluralina	1582-09-8	dinitroanilina	0,02	0,05	-

pc = peso corporal; IDA = Ingestão diária aceitável; LMR = Limite máximo de resíduos; IS = intervalo de segurança para a cultura do arroz

Fonte: AGROFIT, 2008

ANEXO B – Fungicidas recomendados para a cultura do arroz irrigado no Brasil

Nome comum	Nº CAS	Grupo químico	IDA (mg kg ⁻¹ pc*)	LMR (mg kg ⁻¹)	IS (dias)
Clorotalonil	1897-45-6	ftalamidas	0,03	2	15
Edifenfós	17109-49-8	organofosforados	0,003	0,2	14
Mancozebe	8018-01-7	ditiocarbamatos	0,03	5	32
Tebuconazole	107534-96-3	triazóis	0,03	0,1	35
Triciclazole	41814-78-2	benzotiazóis	-	0,05	30
Acetato de fentin	900-95-8	organoestâmicos	0,0005	0,1	21
Hidróxido de fentin	76-87-9	organoestâmicos	0,0005	0,1	21
Trifloxistrobina	141517-21-7	estrubirulina	0,03	0,2	15
Difeconazole	119446-68-3	triazóis	0,6	1,0	45
Casugamicina	6980-18-3	antibiótico	-	0,04	21

pc = peso corporal; IDA = Ingestão diária aceitável; LMR = Limite máximo de resíduos; IS = intervalo de segurança para a cultura do arroz

Fonte: AGROFIT, 2008

ANEXO C – Distribuição *t*

Valor de <i>t</i> para um intervalo de confiança de Valor crítico de <i>t</i> para P valores de número de graus de liberdade	90% 0,10	95% 0,05	98% 0,02	99% 0,01
1	6,31	12,71	31,82	63,66
2	2,92	4,30	6,96	9,92
3	2,35	3,18	4,54	5,84
4	2,13	2,78	3,75	4,60
5	2,02	2,57	3,36	4,03
6	1,94	2,45	3,14	3,71
7	1,89	2,36	3,00	3,50
8	1,86	2,31	2,90	3,36
9	1,83	2,26	2,82	3,25
10	1,81	2,23	2,76	3,17
12	1,78	2,18	2,68	3,05
14	1,76	2,14	2,62	2,98
16	1,75	2,12	2,58	2,92
18	1,73	2,10	2,55	2,88
20	1,72	2,09	2,53	2,85
30	1,70	2,04	2,46	2,75
50	1,68	2,01	2,40	2,68
∞	1,64	1,96	2,33	2,58

Os valores críticos de *t* são apropriados para um teste bilateral. Para um teste unilateral o valor é tomado a partir da coluna para 2 vezes o valor de P desejado, por exemplo, para um P=0,05 e 5 graus de liberdade, o valor crítico é lido a partir da coluna de P=0,10 e é igual 0,02.

APÊNDICES

APÊNDICE A – Dados referentes às datas de coleta das amostras de água de lavoura de arroz irrigado do Campus da UFSM

Tabela 1. Datas das coletas de água dos experimentos com a aplicação dos herbicidas bispiribaque-sódico e quincloraque

Dias após a aplicação dos herbicidas	Data
0	07.01.2008
1 ^o	08.01.2008
2 ^o	09.01.2008
3 ^o	10.01.2008
5 ^o	12.01.2008
7 ^o	14.01.2008
10 ^o	17.01.2008
14 ^o	21.01.2008
21 ^o	28.01.2008
28 ^o	04.02.2008
35 ^o	11.02.2008
42 ^o	18.02.2008
49 ^o	25.02.2008
56 ^o	03.03.2008
63 ^o	10.03.2008
70 ^o	17.03.2008
77 ^o	24.03.2008
84 ^o	31.03.2008
91 ^o	07.04.2008

A aplicação dos herbicidas foi realizada dia 07.01.2008

Tabela 2. Datas das coletas de água dos experimentos com a aplicação do fungicida tebuconazole

Dias após a aplicação dos herbicidas	Data
1 ^o	08.03.2008
2 ^o	09.03.2008
3 ^o	10.03.2008
5 ^o	12.03.2008
7 ^o	14.03.2008
10 ^o	17.03.2008
14 ^o	21.03.2008
21 ^o	28.03.2008
28 ^o	04.04.2008
35 ^o	11.04.2008

A aplicação do fungicida foi realizada dia 08.03.2008

APÊNDICE B – Figuras ilustrando a dissipação do pesticida bispiribaque-sódico em amostras de água de lavoura de arroz irrigado

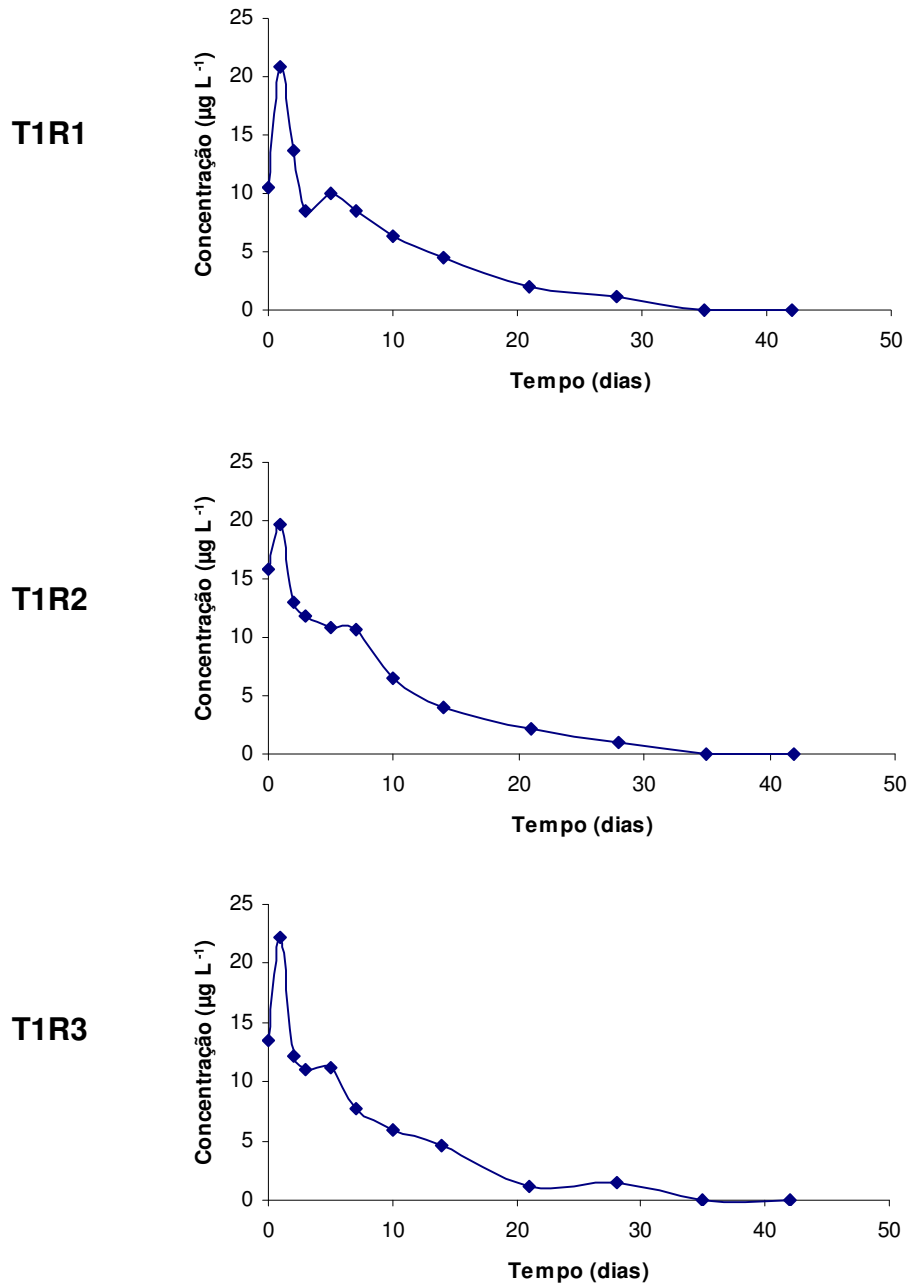


Figura 1. Perfil de dissipação do herbicida bispiribaque-sódico em amostras de água de lavoura de arroz irrigado, nas três repetições estudadas (T1R1, T1R2 e T1R3)

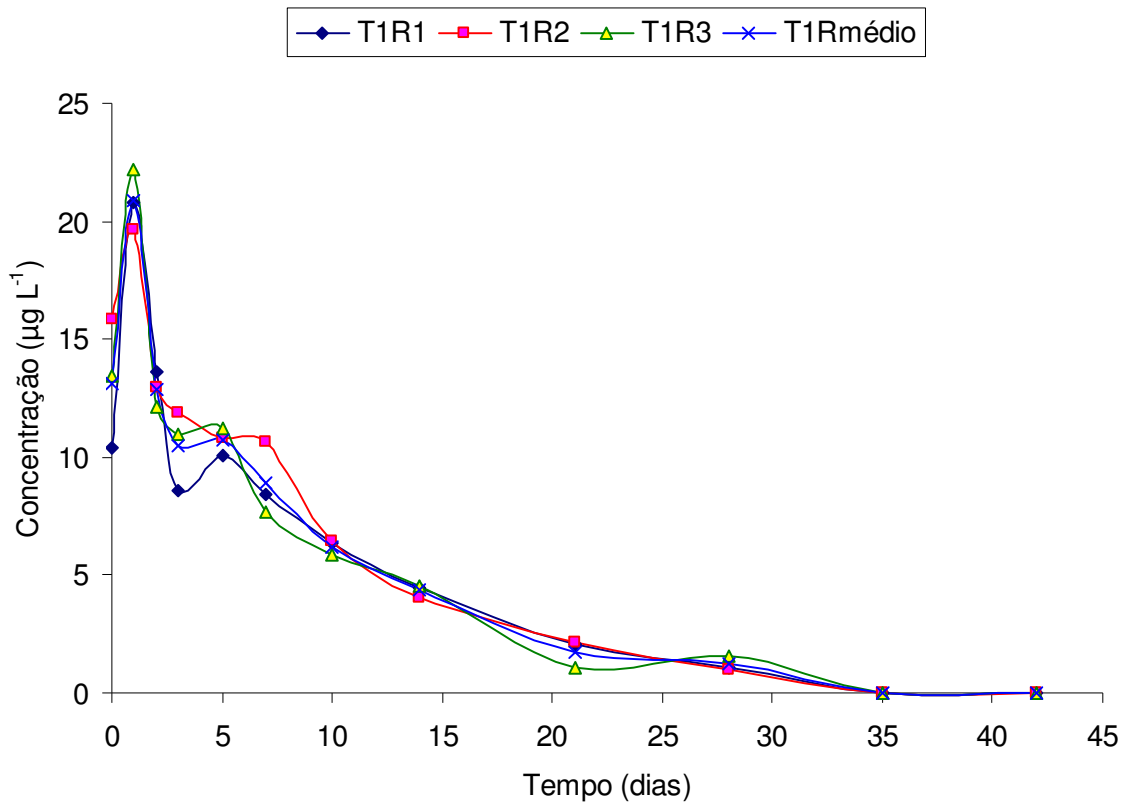


Figura 2. Gráfico contendo a dissipação do bispiribaque-sódico nas amostras de água, nas três repetições estudadas (T1R1, T1R2 e T1R3) e fazendo uma média destas três repetições (T1Rmédio)

APÊNDICE C – Ilustração da dissipação do herbicida quincloraque em amostras de água de lavoura de arroz irrigado

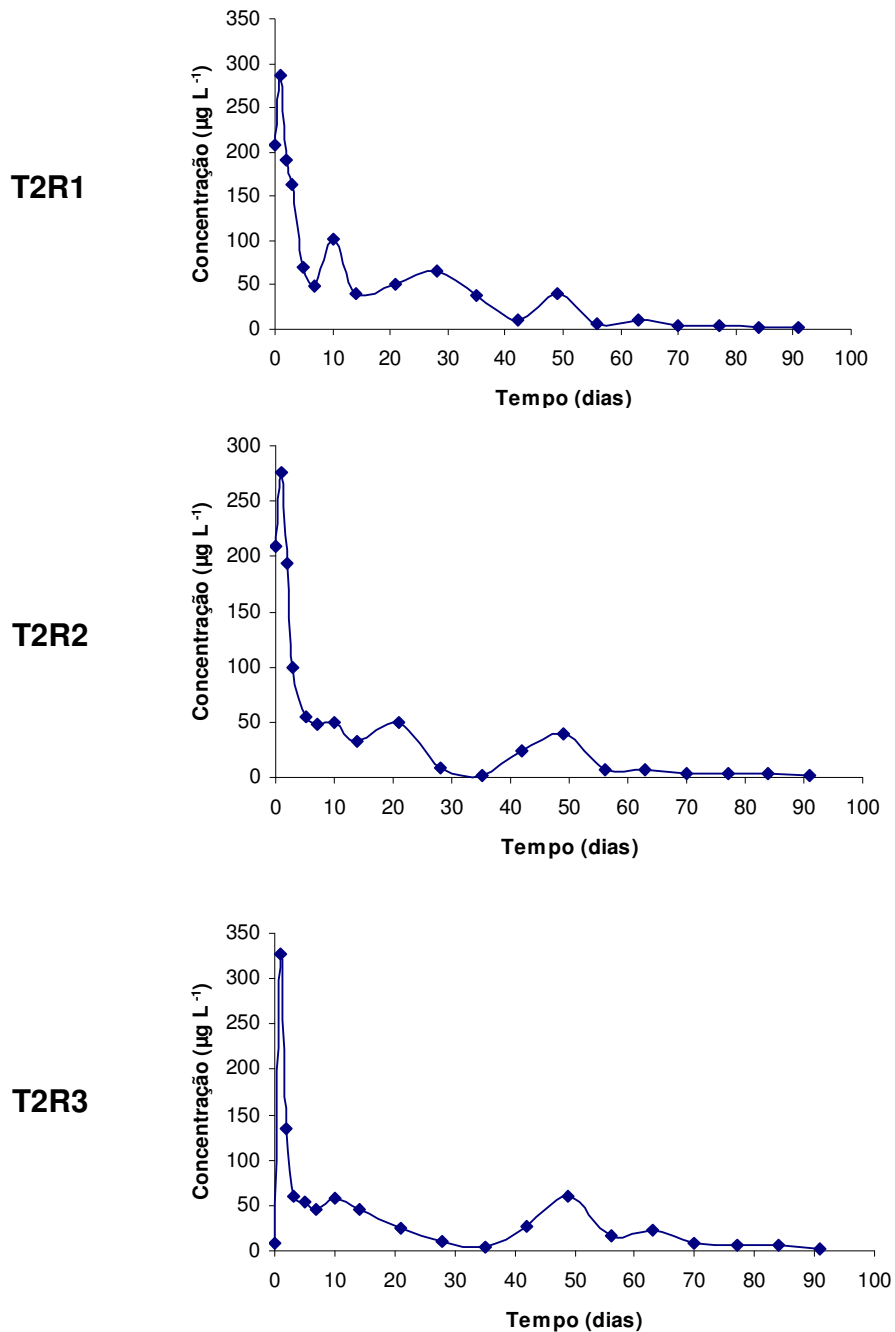


Figura 1. Perfil de dissipação do herbicida quincloraque em amostras de água de lavoura de arroz irrigado, nas três repetições estudadas (T2R1, T2R2 e T2R3)

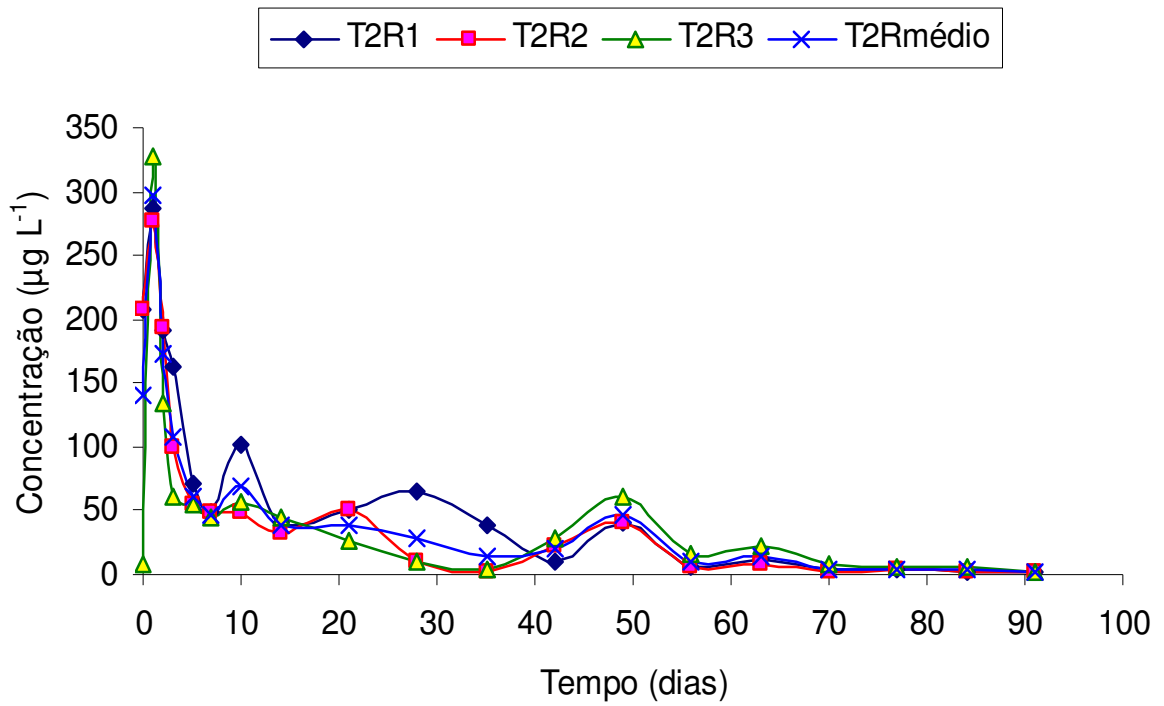


Figura 2. Gráfico contendo a dissipação do quincloraque nas amostras de água, nas três repetições estudadas (T2R1, T2R2 e T2R3) e fazendo uma média destas três repetições (T2Rmédio)

APÊNDICE D – Ilustração da dissipação do fungicida tebuconazole em amostras de água de lavoura de arroz irrigado

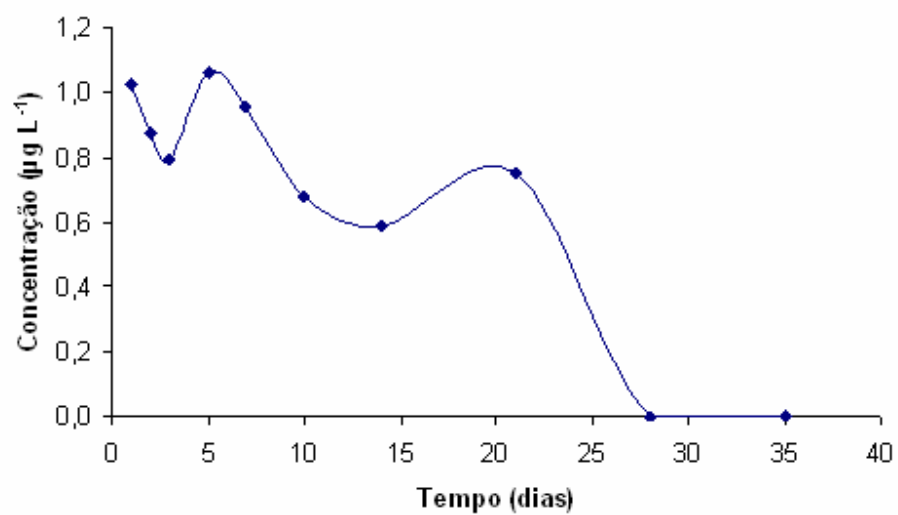


Figura 1. Perfil de dissipação do tebuconazole em amostras de água de lavoura de arroz irrigado (T3R1)

APÊNDICE E – Foto da lavoura de arroz irrigado no Campus da UFSM



Figura 1. Lavoura de arroz irrigado localizada no Campus da UFSM onde foram realizados os experimentos de campo deste estudo