

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

Catiucia Souza Vareli

**MÉTODOS INDIVIDUAL E MULTIRRESIDUAL PARA DETERMINAÇÃO DE
AGROTÓXICOS EM CAMAS BIOLÓGICAS POR CROMATOGRÁFIA
GASOSA ACOPLADA À ESPECTROMETRIA DE MASSAS**

**Santa Maria – RS
2018**

Catiucia Souza Vareli

**MÉTODOS INDIVIDUAL E MULTIRRESIDUAL PARA DETERMINAÇÃO DE
AGROTÓXICOS EM CAMAS BIOLÓGICAS POR CROMATOGRÁFIA
GASOSA ACOPLADA À ESPECTROMETRIA DE MASSAS**

Tese apresentada ao Curso de Pós-graduação em Química, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do título de **Doutora em Química**

Orientadora: Prof. Dra. Ionara Regina Pizzutti

Santa Maria, RS

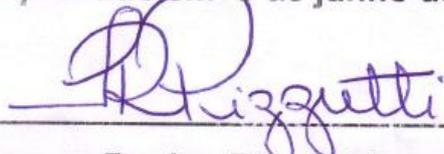
2018

Catiucia Souza vareli

**MÉTODOS INDIVIDUAL E MULTIRRESIDUAL PARA DETERMINAÇÃO DE
AGROTÓXICOS EM CAMAS BIOLÓGICAS POR CROMATOGRAFIA
GASOSA ACOPLADA À ESPECTROMETRIA DE MASSAS**

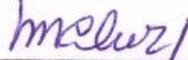
Tese apresentada ao Curso de Pós-graduação em Química, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do título de **Doutora em Química**

Aprovado em 8 de junho de 2018:

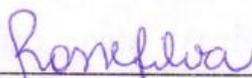


Ionara Regina Pizzutti, Dra. (UFSM)

(Presidente/Orientador)



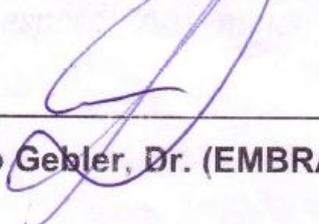
Maria Cristina Diez Jerez, Dra. (UFRO)



Rosselei Caiél da Silva, Dra. (URI)



Maria Veronica Cesio Cesconi, Dra (Udelar)



Luciano Gebler, Dr. (EMBRAPA)

Santa Maria, RS

2018

Dedico este trabalho ao meu Grandioso e Maravilhoso Deus que em sua insondável misericórdia nos concede a cada dia o milagre da vida e nos permite alcançar nossos sonhos e objetivos. Aos meus pais. Ao meu amado esposo. Aos meus queridos filhos Davi e Sara.

AGRADECIMENTOS

A Deus, pelo dom da vida, por Seu inexplicável e maravilhoso amor. Porque nos ama independente de quem somos.

A minha querida família. Meus pais que embora tão longe, no coração e nas orações estamos sempre perto e desejando o amparo de Deus. Obrigada por sempre desejarem o melhor para mim e me apoiarem em cada decisão. Aos meus irmãos e cunhados por sempre me desejarem o melhor.

Ao meu amado e querido esposo. Por ser um apoio constante, nos momentos bons e nos ruins, nas alegrias e nas tristezas. Nunca poderia deixar de te agradecer por tão grande amor, que se transforma em apoio, cuidado e atos pequenos e contínuos de afeto.

Aos meus amados filhos. Davi que já compreendia que mamãe precisava estudar e na sua alegria infantil, mostrava tanto orgulho pela mamãe que ia ser doutora. Minha querida Sara, que muitas e muitas vezes chorou pelo colinho da mamãe, mas não podia porque mamãe “precisa tuda”. Amo vocês meus amores.

A Bárbara Reichert que nos ajudou com o artigo e também na correção desta tese. As professoras e amigas, Carmem Dickow e Ionara Pizzutti por abrirem as portas do laboratório CEPARC e nos receber de forma carinhosa e prestativa, nos oferecendo um ambiente de extrema qualidade para a realização deste trabalho. A professora, orientadora e amiga Ionara Pizzutti, por todos estes anos de carinho e amizade, pelos momentos de ouvir e apoiar, discutir e aconselhar, por seres acima de tudo minha amiga querida.

A todos os membros da banca, prof. Dra Rosselei Caiél da Silva, prof. Dra Maria Verônica Cesio, prof. Dra Maria Cristina Diez Jerez e Dr Luciano Gebler por aceitarem contribuir com este trabalho, com todas as sugestões que com certeza enriqueceram este trabalho. Muito obrigada pela atenção e pelo tempo dedicado. Muito obrigada Dr Luciano por nos permitir fazer parte de um trabalho pioneiro no nosso país de extrema importância e relevância.

A todos os colegas do CEPARC que nos ajudaram direta ou indiretamente para a realização deste trabalho. Meus ajudantes diretos no trabalho experimental, Marlos que muito me ajudou no desenvolvimento do método multirresidual e individual, e a Dani no método individual e na extração das amostras, obrigada a

vocês dois pela alegria contagiante e pelo bom humor de sempre. Aos demais colegas, Jonatan, Ingrid, Maria, Bárbara, Vanessa, Aliar, Matheus que conviveram conosco durante estes anos, obrigada pelos momentos de descontração, das rodadas de chima e também por terem palavras de apoio nos momentos oportunos.

Ao Ademir e a Valeria, pelos esforços em sempre nos atender e ajudar, muitíssimo obrigada Ademir, você é muito especial para cada aluno da pós-graduação da química, é um anjo que cuida de todos nós.

Aos colegas do HUSM, LAC, os quais foram favoráveis ao afastamento mesmo que parcial para a realização do curso de doutorado.

RESUMO

MÉTODOS INDIVIDUAL E MULTIRRESIDUAL PARA DETERMINAÇÃO DE AGROTÓXICOS EM CAMAS BIOLÓGICAS POR CROMATOGRAFIA GASOSA ACOPLADA À ESPECTROMETRIA DE MASSAS

AUTORA: Catiucia Souza Vareli
ORIENTADORA: Ionara Regina Pizzutti

Embora o emprego dos métodos multirresiduais possibilite a determinação de um grande número de agrotóxicos em uma única análise cromatográfica, para agrotóxicos da classe dos ditiocarbamatos (DTC), ainda é necessário o desenvolvimento de métodos individuais. Dessa forma, na primeira parte deste trabalho, otimizou-se e validou-se um método individual para determinação de DTC (mancozebe) em camas biológicas utilizando GC-MS. Foram avaliados os parâmetros de linearidade da curva analítica (r^2), limites de detecção e de quantificação, exatidão, precisão e efeito matriz. Os estudos de recuperação foram realizados empregando o agrotóxico tiram como solução padrão de fortificação. As amostras “branco” de biomistura foram fortificadas em três concentrações, 1; 3 e 5 mg CS₂ kg⁻¹, em sete replicatas (n = 7). O método apresentou recuperações na faixa de 89-96% e RSD ≤ 11%, com linearidade na faixa de concentração de 0,05 a 10 µg CS₂ mL⁻¹ ($r^2 > 0,9946$). LOD_m e LOQ_m foram 0,2 e 1,0 mg CS₂ kg⁻¹, respectivamente, e o efeito matriz calculado não foi significativo (≤ 20%). O método validado foi aplicado para análise de 80 amostras (biomistura), de dezesseis reatores diferentes (coletadas em cinco tempos de amostragem) durante quatorze meses. Dez por cento das amostras apresentaram concentração de CS₂ abaixo do LOD_m (0,2 mg CS₂ kg⁻¹) e 70% apresentaram resultados abaixo do LOQ (1,0 mg CS₂ kg⁻¹), o que confirma a eficiência das camas biológicas para degradar DTC. Na segunda etapa deste trabalho otimizou-se e validou-se um método multirresidual para a determinação de captana e seu produto de degradação (tetrahidroftalimida), clorotalonil, clorpirifós, fenitrotiona, metidationa, fosmete e tebuconazol em camas biológicas, utilizando GC-MS/MS. A otimização do método “ND” mini-Luke foi efetuada em nosso grupo de pesquisa realizando-se a troca de solventes para eliminar o uso de diclorometano e também evitar o passo de evaporação, permitindo a injeção direta do extrato final no GC-MS/MS, o que reduz tempo de análise e o uso de reagentes. Após otimização do método, a validação do mesmo para determinação multirresidual de agrotóxicos em camas biológicas foi realizada com base nas diretrizes do Documento Guia SANTE/11813/2017 avaliando-se a linearidade (r^2), os limites de detecção e de quantificação (LOD e LOQ), o efeito matriz, a exatidão e a precisão. Dois padrões internos foram empregados para controle de qualidade, o PCB-153 foi usado como padrão interno do procedimento e o HCB-C13 como padrão interno do instrumento. No estudo de fortificação e recuperação, as amostras “branco” de biomistura foram fortificadas à 50, 100 e 200 µg kg⁻¹ (n = 7) e todos os agrotóxicos, exceto captana a qual foi determinada indiretamente através do seu produto de degradação tetrahidroftalimida, apresentaram recuperações entre 74 e 117%, com valores de RSD% entre 2 e 14%. Os resíduos foram inferiores a 20% para todos os agrotóxicos avaliados. O método foi linear de 1 a 300 ng mL⁻¹ para 3 agrotóxicos e 5 a 300 ng mL⁻¹ para outros 4 agrotóxicos, com coeficientes de determinação maiores do que 0,99 para quase todos os agrotóxicos, exceto para clorpirifós ($r^2 > 0,98$). Todos os agrotóxicos apresentaram LOD_m de 10 ou 20 µg kg⁻¹ e LOQ_m de 50 µg kg⁻¹. Os valores calculados de efeito matriz ficaram acima de 25% para todos os agrotóxicos estudados, exceto para clorpirifós que foi de -20%.

Palavras-chave: camas biológicas; agrotóxicos; cromatografia gasosa; espectrometria de massas; ditiocarbamatos.

ABSTRACT

MULTIRESIDUE AND SINGLE RESIDUE METHOD TO DETERMINE PESTICIDES IN BIOBEDS BY GAS CHROMATOGRAPHY TANDEM MASS SPECTROMETRY

AUTHOR: Catiucia Souza Vareli
ADVISOR: Ionara Regina Pizzutti

Besides the possibility to perform determination of a large number of pesticides in only a single chromatographic analysis using multiresidual methods, sometimes, due to diversity in pesticides chemical composition and particular characteristics, it is still required develop single-residue method, such as for dithiocarbamates (DTC). Therefore, in this study, firstly, was optimized and validated a single method to determine DTC (mancozeb) in biobeds using GC-MS to evaluate biobeds efficiency on DTC degradation. Validation study was performed and assessed the analytical curve linearity (r^2), detection and quantification limits (LOD and LOQ), accuracy (recovery%), precision (RSD%) and matrix effect. Recovery experiments were carried out with a standard spiking solution of the DTC pesticide thiram. Blank biomixture samples were spiked at the three levels corresponding to the CS_2 concentrations of 1, 3 and 5 mg kg^{-1} , with seven replicates each ($n = 7$). The method presented recoveries within the range of 89-96% and $\text{RSD} \leq 11\%$. The analytical curves were linear in the concentration range of 0.05 to 10 $\mu\text{g CS}_2 \text{ mL}^{-1}$ ($r^2 > 0.9946$). LOD and LOQ were 0.2 and 1.0 $\text{mg CS}_2 \text{ kg}^{-1}$, respectively, and the calculated matrix effects were not significant ($\leq 20\%$). The validated method was applied to 80 samples (biomixture), from sixteen different biobeds. Ten percent of samples presented CS_2 concentration below the LOD (0.2 $\text{mg CS}_2 \text{ kg}^{-1}$) and 70% of them showed results below the LOQ (1.0 $\text{mg CS}_2 \text{ kg}^{-1}$), which demonstrates the biobeds capability to degrade DTC. The second step was to develop and validated a method (modification of the New Dutch mini-Luke method) for multiresidue determination of captan and its degradation product (tetrahydrophytalimide), chlorothalonil, chlorpyrifos-ethyl, fenitrothion, methidathion, phosmet and tebuconazole in biobed, using GC-MS/MS. The dichloromethane use and the evaporation step were eliminated. This improvement avoids chlorinated solvents use and allows final extract direct injection into the GC-MS/MS system. After method optimization, validation study was performed based on SANTE Guidance Document. Linearity of analytical curves (r^2), residuals, limits of detection (LOD) and quantification (LOQ) and matrix effects (%), were assessed by the analysis of standards solutions prepared in organic solvent and in blank biobed extract at eight concentrations, with seven replicate injections of each standard solution. Accuracy (as recoveries %) precision (as repeatability of recoveries experiments-RSD% and as intermediate precision) were also determinate. Two labeled internal standards were used for quality control. PCB-153 was used as procedure internal standard (P.I.S.), and HCB-C13 was used as instrument internal standard (I.I.S.). Recovery study was performed by the analysis of blank biobed samples spiked at 50, 100 and 200 $\mu\text{g kg}^{-1}$ ($n=7$). All pesticides presented average recoveries within the range of 74 and 117%, except captan which was indirectly detected via tetrahydrophytalimide, its degradation product, and also had acceptable recoveries. The RSD values calculated from the 7 replicated recovery samples at 3 concentration levels were below 20% (2 to 14%). The residuals was lower than 20% for all pesticides. The method was linear within the range of 1 to 300 ng mL^{-1} for 2 pesticides and of 5 to 300 ng mL^{-1} for 4 pesticides and for tetrahydrophytalimide (the degradation product of captan). The r^2 of the analytical curves calculated from matrix-matched standards were > 0.99 for all pesticides except for chlorpyrifos-ethyl, that had an $r^2 > 0.98$. All studied pesticides presented the LODs of 10 or 20 $\mu\text{g kg}^{-1}$ and LOQs of 50 $\mu\text{g kg}^{-1}$. The calculated matrix effects were higher than 25% for all pesticides, excepted for chlorpyrifos-ethyl, that was -20%.

Key words: biobeds; multiresidue; chromatography; pesticides; dithiocarbamates.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Rota dos agrotóxicos após aplicação no solo.....	43
Figura 2 – Diagrama de componentes que estão presentes em uma cama biológica clássica, representando o modelo original, desenvolvido na Suécia.....	46
Figura 3 – Modelo de cama biológica permeável com (a) uma camada adicionada ou (b) uma camada natural de argila.....	47
Figura 4 – A cama biológica impermeável quando isolada com uma camada impermeabilizante que permite a coleta da água drenada em poços.....	47
Figura 5 – Sistemas de camas biológicas em alguns países: (a) o <i>Biobed</i> original desenvolvido na Suécia, onde o resíduo é colocado para degradação e sofre lixiviação gradual; (b) <i>Phytobac</i> , que inclui um sistema de mais de um ciclo acrescido no mesmo <i>Biomix</i> , que sofre evaporação; (c) sistema de <i>Biobed</i> fechado, onde o resíduo é adicionado e a seguir transferido para área com cobertura vegetal; (d) sistema com biofiltros.....	48
Figura 6 – Componentes de uma cama biológica: biomistura (A), cobertura vegetal (B), camada de cascalho (C), sistema de impermeabilização (D), sistema de recirculação (E), teto de proteção (F), sistema de suporte para a máquina ou implemento agrícola (G).....	51
Figura 7 – Imagem do fungo da podridão branca.....	53
Figura 8 – Hidrólise ácida de tiram formando amina e CS ₂	64
Figura 9 - Esquema das principais partes de um espectrômetro de massas, ilustrando a fonte de íons dentro de um sistema de baixa pressão (vácuo). Ionização por impacto de elétrons.....	75
Figura 10 - Esquema de um espectrômetro de massas típico, evidenciando as quatro barras que constituem um analisador do tipo quadrupolo.....	79
Figura 11 - Esquema de um triplo quadrupolo, evidenciando os três quadrupolos que formam este tipo de analisador de massas.....	80

Figura 12 - Esquema de um equipamento do tipo triplo-quadrupolo, onde dois analisadores estão separados por uma câmara de colisão.....	80
Figura 13 - Diagrama demonstrando o ruído da linha base, e o sinal para LOD e LOQ, para o método cromatográfico.....	88
Figura 14 - Esquema do fluxo para o aprimoramento do efeito matriz em GC...	90
Figura 15 - Montagem dos reatores pilotos. No fundo o reator possui um cano (A) para a drenagem do lixiviado e sobre este cano uma camada de pedras britadas (B) para auxiliar na filtração do lixiviado. A biomistura (C) é colocada acima da camada de pedra e por fim o reator recebe uma camada de grama (D).....	100
Figura 16 - Mapa dos reatores que sofreram contaminação com ditiocarbamatos. Reatores 2, 3, 4, 5 utilizaram biomistura. Reatores 6 e 7 utilizaram latossolo e reatores 8 e 9 empregaram nitossolo para a construção das camas biológicas.....	101
Figura 17 - Representação esquemática do método de extração para a determinação de resíduos de ditiocarbamatos em camas biológicas.....	105
Figura 18 - Esquema do procedimento de extração do método multirresidual 2, utilizado nos ensaios de fortificação e recuperação de agrotóxicos em camas biológicas.....	114
Figura 19 - Cromatograma total de íons obtido por GC-MS (modo SIM), através da injeção de uma solução analítica de CS ₂ (3 mg L ⁻¹), sob as condições cromatográficas otimizadas, demonstrando o tempo de retenção para o CS ₂	117
Figura 20 - Cromatograma total de íons obtido por GC-MS (modo SIM), (A) através da análise da biomistura “branco” e (B) dos solventes e reagentes, empregados na determinação de ditiocarbamatos.....	118
Figura 21- Resíduos da curva analítica obtida a partir de soluções analíticas preparadas em extrato “branco” de biomistura e analisadas por GC-MS.....	120
Figura 22- Comparação entre as curvas analíticas obtidas a partir de soluções analíticas de CS ₂ , preparadas em isoctano:tolueno (9:1) e em extrato “branco” de biomistura.....	121

Figura 23-	Comparação entre as curvas analíticas obtidas a partir das soluções analíticas de CS ₂ de menor concentração (0,05 - 1,0 mg CS ₂ L ⁻¹), preparadas em isoctano:tolueno (9:1) e em extrato “branco” de biomistura.....	122
Figura 24-	Cromatogramas totais de íons obtidos por GC-MS (modo SIM), através da injeção das soluções analíticas de CS ₂ nas concentrações de 0,1 e 0,5 mg L ⁻¹ , correspondentes ao LOD _i (1) e ao LOQ _i (2) do instrumento, respectivamente.....	124
Figura 25 -	Cromatogramas de CS ₂ , obtido por GC-MS (modo SIM), através da análise de amostras de biomistura do reator 2A, coletadas (A) dois meses e (B) quatorze meses após contaminação do reator com uma dose concentrada de mancozebe (4 g L ⁻¹), simulando um derrame acidental.....	128
Figura 26 -	Concentrações de mancozebe, em termos de CS ₂ , obtidas por GC-MS (modo SIM), através da análise de amostras de biomisturas dos reatores 4 e 5, os quais receberam soluções diluídas de efluentes de tanque pulverizador e caldas de lavagem de máquinas agrícolas, contendo Dithane NT [®] (4 g L ⁻¹), em cinco tempos de coleta (T1 a T5) por um período de 14 meses.....	130
Figura 27-	Concentrações de mancozebe, em termos de CS ₂ , obtidas por GC-MS (modo SIM), através da análise de amostras de solos, dos reatores compostos por Latossolo (reatores 6 e 7) e Nitossolo (reatores 8 e 9), os quais receberam soluções diluídas de efluentes de tanque pulverizador e caldas de lavagem de máquinas agrícolas contendo Dithane NT [®] (4 g L ⁻¹), em cinco tempos de coleta (T1 a T5), durante 14 meses.....	131
Figura 28-	Cromatogramas de CS ₂ obtidos por GC-MS (modo SIM), através da análise do reator 6B (composto por latossolo) em três tempos de coleta (A) dois meses, (B) sete meses e (C) quatorze meses após contaminação deste reator com efluentes do pulverizador e com caldas de lavagem contendo Dithane NT [®] (4 g L ⁻¹).....	132
Figura 29-	Cromatogramas totais obtidos por GC-MS/MS (modo MRM), através da análise do (A) extrato branco dos solventes e	

	reagentes e (B) do “branco” da biomistura empregando o procedimento de extração validado para determinação multirresidual de agrotóxicos em camas biológicas.....	134
Figura 30-	Resíduos da curvas analíticas obtidas a partir de soluções analíticas preparadas em extrato “branco” de biomistura e analisadas por GC-MS/MS (modo MRM), para os agrotóxicos (A) tetrahydroftalimida, (B) tebuconazol, (C) fosmete, (D) metidationa, (E) clorpirifós, (F) clorotalonil e (G) fenitrotiona.....	138
Figura 31-	Cromatograma total obtido a partir de uma solução analítica preparada em extrato “branco” de biomistura, na concentração de 50 ng mL ⁻¹ , representando os 6 agrotóxicos avaliados e o produto de degração tetrahydroftalimida, obtido por GC-MS/MS (modo MRM). Os picos foram numerados de acordo com o tempo de retenção de agrotóxico: 1-Tetradifrofitalimida, 2-clorotalonil, 3-fenitrotiona, 4-clorpirifós, 5-metidationa, 6-tebuconazol e 7-fosmete.....	143
Figura 32 -	Cromatograma total obtido por GC-MS/MS (modo MRM), através da análise de biomistura “branco” fortificada na concentração de 100 µg kg ⁻¹ , apresentando os 6 agrotóxicos estudados e o produto de degradação tetrahydroftalimida, numerados de acordo com o tempo de retenção: 1-Tetradifrofitalimida, 2-clorotalonil, 3-fenitrotiona, 4-clorpirifós, 5-metidationa, 6-tebuconazol e 7-fosmete.....	146

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 –	Etileno-bis-ditiocarbamatos registrados no Brasil, permitidos para diversas culturas, e suas respectivas estruturas químicas.....	36
Tabela 2 –	Classificação toxicológica, cor da faixa presente nos rótulos dos frascos de agrotóxicos e a Dose Letal (DL ₅₀), segundo a classificação toxicológica.	38
Tabela 3 –	Agrotóxicos estudados nos métodos individual e multirresidual, com suas respectivas classes, grupo químico, classificação toxicológica e fórmula molecular.....	95
Tabela 4 –	Características químicas e físicas dos solos empregados como “branco”.....	99
Tabela 5 -	Data de aplicação e volume do agrotóxico (efluentes provenientes dos pulverizadores) aplicados nos reatores contaminados com Dithane NT [®] (4 g L ⁻¹) em cada etapa de contaminação.....	103
Tabela 6 -	Esquema de amostragem, em número de meses, após a contaminação dos reatores com Dithane NT [®] (mancozebe)....	103
Tabela 7 –	Agrotóxicos estudados, tempos de retenção e parâmetros de análise do espectrômetro de massas para determinação dos agrotóxicos analisados por GC-MS/MS.....	109
Tabela 8 –	Condições cromatográficas otimizadas para a separação e quantificação de CS ₂ em camas biológicas.....	116
Tabela 9 -	Parâmetros das curvas analíticas obtidas nos estudos de linearidade, nas concentrações de 0,05 a 10 mg CS ₂ L ⁻¹	119
Tabela 10 –	Média das áreas (n=7) obtidas através de injeções das soluções das curvas analíticas, nas concentrações de 0,05 a 10 mg CS ₂ L ⁻¹ , preparadas no extrato “branco” de biomistura e em isoctano/tolueno (9:1), com seus respectivos RSD%.....	120
Tabela 11 –	Valores de efeito matriz calculado para tiram (em termos de CS ₂), para cada concentração estudada das soluções	

	analíticas empregadas para a confecção das curvas analíticas.....	123
Tabela 12 –	Valores de LOD e LOQ, do instrumento e do método, obtidos para o CS ₂ , no sistema cromatográfico GC-MS (modo SIM)...	123
Tabela 13 –	Valores médios (n=7) de recuperação e RSD%, obtidos por GC-MS (modo SIM) nos estudos de fortificação, através da análise de “branco” de biomistura fortificada), nas concentrações de 1, 3 e 5 mg CS ₂ kg ⁻¹	125
Tabela 14 -	Valores médios (n=7) de recuperação e RSD%, obtidos por GC-MS (modo SIM) nos estudos de fortificação para a determinação da precisão intermediária do método, através da análise de “branco” de biomistura fortificada nas concentrações de 1, 3 e 5 mg CS ₂ kg ⁻¹	126
Tabela 15 -	Comparação entre os valores médios de recuperação, obtidos por GC-MS (modo SIM) através da análise de biomisturas “branco” fortificadas nas concentrações de 1, 3 e 5 mg CS ₂ kg ⁻¹ (n=7), realizadas por dois analistas, no intervalo de 3 dias, no estudo da precisão intermediária.....	126
Tabela 16 –	Concentrações de mancozebe, em termos de CS ₂ , obtidas por GC-MS (modo SIM), através da análise de amostras dos reatores compostos por biomistura (reatores 4 e 5), latossolo (reatores 6 e 7) e nitossolo (reatores 8 e 9), os quais receberam soluções diluídas de efluentes de tanque pulverizador e caldas de lavagem de máquinas agrícolas contendo Dithane NT [®] (4 g L ⁻¹), em cinco tempos de coleta (T1 a T5) por um período de 14 meses.....	129
Tabela 17 -	Valores médios de recuperação e RSD%, obtidos por GC-MS/MS (modo MRM), através da análise de biomisturas “branco” fortificadas com os agrotóxicos avaliados no método multirresidual, nas concentrações de 100 e 200 µg kg ⁻¹ e extraídas empregando o método 1 (acetona:água:ácido fosfórico, 98:1:1, v/v/v) (n=3).....	135

Tabela 18 -	Valores médios de recuperação e RSD%, obtidos por GC-MS/MS (modo MRM), através da análise de biomistura “branco” fortificada com os agrotóxicos avaliados no método multirresidual, nas concentrações de 20, 50, 100 e 200 $\mu\text{g kg}^{-1}$ e extraídas empregando o método 2 (acetona:isooctano:tolueno, 2:2:1, v/v/v) (n=3).....	136
Tabela 19-	Parâmetros das curvas analíticas obtidas através de soluções analíticas preparadas em solvente orgânico (acetona:isooctano:tolueno, 2:21, v/v/v) e em extrato “branco” de biomistura, para os agrotóxicos estudados e analisados por GC-MS/MS (modo MRM).....	137
Tabela 20 -	Faixa linear, limites de detecção (LOD) e de quantificação (LOQ) do método, para os agrotóxicos estudados e analisados por GC-MS/MS (modo MRM).....	142
Tabela 21 -	Efeito matriz calculado através da diferença da inclinação das curvas analíticas obtidas através de soluções analíticas preparadas em solvente orgânico e em extrato “branco” de biomistura, em oito concentrações, injetadas sete vezes cada concentração (n=7), para os agrotóxicos analisados por GC-MS/MS (modo MRM).....	144
Tabela 22 -	Valores médios (n=7) de recuperação e RSD%, obtidos por GC-MS/MS (modo MRM), através da análise de biomistura “branco” fortificadas nas concentrações de 50, 100 e 200 $\mu\text{g kg}^{-1}$, no estudo da exatidão e precisão do método multirresidual.....	145
Tabela 23 –	Valores médios de recuperação e RSD%, obtidos por GC-MS/MS (modo MRM), através da análise de biomisturas “branco” fortificada nas concentrações de 50, 100 e 200 $\mu\text{g kg}^{-1}$, no estudo da precisão intermediária do método multirresidual (n=7).....	148
Tabela 24 –	Comparação entre os valores médios de recuperação e RSD% (n=7) obtidos por GC-MS/MS (modo MRM), através da análise de biomistura “branco”fortificada nas	

concentrações de 50, 100 e 200 $\mu\text{g kg}^{-1}$, realizadas por dois analistas, no intervalo de 3 dias, no estudo da precisão intermediária..... 148

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

- a – Coeficiente angular
- a.C. – Antes de Cristo
- AChE – Enzima Acetilcolinesterase
- Ach – Neurotransmissor Acetilcolina
- ACN – Acetonitrila
- ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária
- b – Coeficiente linear
- BPA – Boas Práticas Agrícolas
- CI – Ionização química, do inglês *Chemical Ionization*
- CID – Dissociação Induzida por colisão, do inglês, *Collision-Induced Dissociation*
- Cm - Centímetros
- CS₂ – Dissulfeto de carbono
- CTC – Capacidade de troca de cátions
- C18 – Sílica modificada com hidrocarboneto linear octadecilsilano
- Cu-DEDTC – Dietilditiocarbamato ligado ao cobre
- d.i. – Diâmetro interno da coluna cromatográfica
- DAD – Detector por Arranjo de Diodos, do inglês *Diode Array Detector*
- DC – Corrente Contínua
- DDT – Dicloro-difenil-tricloroetano, do inglês *Dichlorodiphenyltrichloroethane*
- DEDTC - Dietilditiocarbamato
- DL₅₀ – Dose letal para 50% do grupo em estudo
- DTC – Ditiocarbamato
- DRf – Dose de Referência
- EBDC – Etileno-bis-ditiocarbamato
- ECD – Detecção por Captura de Elétrons, do inglês *Electron Capture Detection*
- EI – Ionização por Impacto de elétrons, do inglês *Electron Ionization*
- EM – Multiplicadora de elétrons, do inglês *Electron Multiplier*
- EMBRAPA – Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
- EPA–Agência Americana de Proteção Ambiental, do inglês *Environmental Protection Agency*
- EPI – Equipamentos de Proteção Individual

ETU – Etilenotioréia

EU – União Européia, do inglês *European Union*

EUA – Estados Unidos da América

FAO – Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação, do inglês *Food and Agriculture Organization*

FD – Detector por Fluorescência, do inglês *Fluorescence Detector*

FID – Detector por ionização em chama, do inglês *Flame Ionization Detector*

FIOCRUZ – Fundação Oswaldo Cruz

FPD – Detecção Fotométrica de Chama, do inglês *Flame Photometric Detection*

FT-ICR - Analisador de ressonância íon-ciclotônica com transformador de Fourier, do inglês *Fourier Transform Ion-Cyclotron Resonance Mass spectrometry*

GC – Cromatografia Gasosa, do inglês *Gas Chromatography*

GC-ECD – Cromatografia Gasosa com Detecção por Captura de Elétrons

GC-FPD – Cromatografia Gasosa com Detecção Fotométrica de Chama

GC-MS (MS/MS) – Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrometria de Massas

GC-NPD – Cromatografia Gasosa com Detecção por Nitrogênio e Fósforo

ha – hectare

HCl – Ácido Clorídrico

HAc – Ácido acético

HETP – Hexa-etil-tetra-fosfato

HIV – Vírus da Imunodeficiência Humana, do inglês *Human Immunodeficiency Vírus*

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

HPLC-PDA – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com detecção por arranjo de fotodiodos, do inglês *Photo Diode Array Detector*

HPLC-UV – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com detecção por Espectrofotometria no Ultravioleta

IARC – Agência Internacional para Pesquisa sobre Câncer, do inglês *The International Agency for Research on Cancer*

IDA – Ingestão Diária Aceitável

IBAMA – Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos naturais renováveis

ICH - Conferência Internacional em Harmonização, do inglês *International Conference on Harmonization*

INMETRO – Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia

ITD – Detector por armadilha de íons, do inglês *Ion trap Detector*

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

L - Litro

KOH – Hidróxido de potássio

Kt - tonelada

LC-MS – Cromatografia Líquida acoplada à Espectrometria de Massas

LMR – Limite Máximo de Resíduos

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

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

ME – Efeito Matriz, do inglês *Matrix Effect*

MMR - Métodos multirresíduos

MRSA – *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina, do inglês *Methicillin-resistant staphylococcus aureus*

MRM – monitoramento de reações múltiplas, do inglês *Multiple reaction monitoring*

M³ – Metros cúbicos

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

m/z – Razão entre a massa e a carga de um elemento

N – Número de medidas nas análises cromatográficas

N.a. – Não autorizados

N.d. – Não detectado

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

OMS – Organização Mundial de Saúde

OP – Organofosforado, do inglês *Organophosphorous*

OPAS – Organização Pan-Americana de Saúde

PARA – Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos

PFPD - Detector por Fotometria de chama pulsada, do inglês *Pulsed Flame Photometric Detection*

pH – Potencial Hidrogeniônico

PIB – Produto Interno Bruto

P.I.I. – Padrão interno do instrumento

P.I.P – Padrão interno do procedimento

pK – Constante de ionização

PTFE - Politetrafluoretileno

PMOS – Poli(metiloctilsiloxano)

PTV – Injetor com vaporização com temperatura programada, do inglês *Programed Temperature Vaporizing*

QqQ – Analisador de massas Triplo Quadrupolo

r^2 – Coeficiente de determinação

REACH – Diretório Geral da Comissão Europeia do Meio Ambiente, do inglês *European Commission, Environment Directorate General*

Rf – Rádio Frequência

RPM – Rotações por minuto

RS – Estado do Rio Grande do Sul

RSD – Desvio padrão relativo, do inglês *Relative Standard Deviation*

RSD_{pi} – Desvio padrão relativo para precisão intermediária

RSD_{pii} – Desvio padrão relativo para precisão intermediária do instrumento

RSD_r – Desvio padrão relativo para repetitividade

RSD_{ri} – Desvio padrão relativo para repetitividade do instrumento

RSD_{rm} – Desvio padrão relativo para repetitividade do método

s – Estimativa do desvio padrão absoluto

S – Sinal

SANTE - Saúde e Proteção do Consumidor, do francês *Sante et protection des consommateurs*

SD – Desvio padrão, do inglês *Standard Deviation*

SMP – Acidez potencial estimada pelo método SMP (Shomaker, Mclean e Pratt)

SNC – Sistema Nervoso Central

SNP – Sistema Nervoso Periférico

SIM – Monitoramento de íon selecionado, do inglês *Selected Ion Monitoring*

S/N – Relação sinal x ruído em um cromatograma

TCP - 3,5,6-tricloro-2-piridinol

TIC – Cromatograma de íons total, do inglês *Total Ions Chromatogram*

t_R – Tempo de retenção de um analito

TOF – Detector por tempo de Vôo, do inglês *Time of Fly Detector*

TQ – Triplo quadrupolo

UV – Ultravioleta

WHO – Organização Mundial de Saúde, do inglês *World and Health Organization*

WHC – Capacidade total de água, do inglês *Water Holding Capacity*

v/v – volume por volume

VWA – Autoridade de Segurança Alimentar e do Consumidor, do holandês *Voedse/
en Waren Autoriteit*

x – Concentração do composto em estudo

y – Resposta do detector (área do pico ou valor de absorbância)

λ - comprimento de onda

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	26
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	29
2.1	AGROTÓXICOS.....	29
2.1.1	História dos agrotóxicos.....	30
2.1.2	Classificação dos agrotóxicos.....	32
2.1.2.1	<i>Os fungicidas</i>	33
2.1.2.1.1	Ditiocarbamatos.....	34
2.1.2.1.2	Triazóis.....	36
2.1.2.2	<i>Inseticidas.....</i>	37
2.1.2.2.1	Organofosforados.....	37
2.1.3	Aspectos toxicológicos dos agrotóxicos.....	37
2.2	CONTAMINAÇÃO AMBIENTAL E HUMANA.....	40
2.3	SISTEMA DE CAMAS BIOLÓGICAS (BIOBED).....	45
2.3.1	Elementos que compõem uma cama biológica.....	49
2.3.2	Componentes da Biomistura.....	51
2.3.3	Fatores que afetam o desempenho das camas biológicas.....	53
2.3.3.1	<i>Efeitos da composição da biomistura na degradação dos agrotóxicos.....</i>	54
2.3.4	Manutenção das camas biológicas.....	57
2.3.5	Perspectivas futuras – camas biológicas como uma alternativa para o tratamento de efluentes agroindustriais.....	59
2.4	LIMITES MÁXIMOS RESIDUAIS (LMR).....	60
2.5	MÉTODOS CROMATOGRÁFICOS PARA DETERMINAÇÃO DE AGROTÓXICOS.....	62
2.5.1	Métodos individuais.....	62
2.5.2	Métodos multirresiduais.....	65
2.5.2.1	<i>Método de extração de Luke e mini-Luke.....</i>	68
2.5.3	Métodos cromatográficos para a determinação de agrotóxicos em camas biológicas.....	70
2.6	TÉCNICAS ANALÍTICAS.....	71
2.6.1	Cromatografia Gasosa.....	71

2.6.2	Espectrometria de Massas (MS)	73
2.6.2.1	<i>Ionização em cromatografia gasosa</i>	75
2.6.2.2	<i>Analisadores de Massas</i>	77
2.6.2.2.1	Quadrupolo e Triplo Quadrupolo.....	78
2.6.2.3	<i>Detectores</i>	81
2.6.2.3.1	Detector baseado na multiplicação de elétrons.....	81
2.6.2.3.2	Detector baseado em fotomultiplicador dinolítico.....	82
2.7	VALIDAÇÃO DE MÉTODOS CROMATOGRÁFICOS	82
2.7.1	Curva analítica e linearidade	83
2.7.2	Especificidade	84
2.7.3	Exatidão	85
2.7.4	Precisão	85
2.7.5	Limites de detecção e de quantificação	87
2.7.6	Efeito Matriz	89
3	MATERIAIS E MÉTODOS	93
3.1	INSTRUMENTAÇÃO	93
3.2	GASES	94
3.3	REAGENTES E SOLVENTES	94
3.4	AGROTÓXICOS SELECIONADAS PARA ESTUDO	95
3.5	PREPARO DE SOLUÇÕES ANALÍTICAS	96
3.5.1	Soluções utilizadas no método individual	96
3.5.2	Soluções utilizadas no método multirresidual	96
3.6	DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DO MÉTODO INDIVIDUAL	97
3.6.1	Otimização das condições Cromatográficas	97
3.6.1.1	<i>Condições cromatográficas do sistema GC-MS</i>	97
3.6.2	Análise dos solventes e reagentes e da biomistura “branco”	98
3.6.3	Construção das Camas Biológicas	100
3.6.4	Contaminação dos reatores	102
3.6.5	Procedimento de extração dos ditio-carbamatos	104
3.6.5.1	<i>Procedimento de fortificação e extração das biomisturas</i>	104
3.6.6	Validação do método individual para determinação de	

	ditiocarbamatos em camas biológicas.....	105
3.6.6.1	<i>Curva analítica e linearidade.....</i>	105
3.6.6.2	<i>Limites de detecção e de quantificação.....</i>	106
3.6.6.3	<i>Precisão e Precisão intermediária.....</i>	106
3.6.6.4	<i>Exatidão (Estudo de fortificação e recuperação).....</i>	107
3.6.6.5	<i>Efeito Matriz.....</i>	107
3.6.6.6	<i>Análise de biomisturas contaminadas.....</i>	108
3.7	VALIDAÇÃO DE MÉTODO MULTIRRESIDUAL PARA DETERMINAÇÃO DE AGROTÓXICOS EM CAMAS BIOLÓGICAS.....	108
3.7.1	Condições cromatográficas.....	108
3.7.2	Controle de qualidade.....	109
3.7.3	Análise dos solventes, reagentes e do “branco” da biomistura	109
3.7.4	Otimização do método de extração multirresidual.....	110
3.7.4.1	<i>Otimização dos parâmetros de extração.....</i>	110
3.7.4.2	<i>Procedimento de extração do método 1.....</i>	110
3.7.4.3	<i>Procedimento de extração do método 2.....</i>	111
3.7.5	Validação do método multirresidual.....	112
3.7.5.1	<i>Curva analítica e linearidade.....</i>	112
3.7.5.2	<i>Limites de detecção e de quantificação.....</i>	113
3.7.5.3	<i>Exatidão (Estudo de fortificação e recuperação).....</i>	113
3.7.5.4	<i>Precisão intermediária.....</i>	114
3.7.5.5	<i>Efeito Matriz.....</i>	115
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	116
4.1	METÓDO INDIVIDUAL PARA DETERMINAÇÃO DE DITIOCARBAMATOS EM CAMAS BIOLÓGICAS.....	116
4.1.1	Condições cromatográficas otimizadas.....	116
4.1.2	Análise dos solventes, reagentes e da biomistura “branco”	117
4.1.3	Validação do método individual.....	118
4.1.3.1	<i>Curva analítica e linearidade.....</i>	119
4.1.3.2	<i>Avaliação do efeito matriz.....</i>	121
4.1.3.3	<i>Limite de detecção e limite de quantificação.....</i>	123

4.1.3.4	<i>Exatidão e precisão (estudo de fortificação e recuperação).....</i>	124
4.1.3.5	<i>Precisão intermediária.....</i>	125
4.1.3.6	<i>Análise de amostras de biomistura.....</i>	126
4.2	MÉTODO MULTIRRESIDUAL.....	133
4.2.1	Análise dos solventes, reagentes e do “branco” da biomistura.....	133
4.2.2	Otimização do método cromatográfico.....	135
4.2.2.1	<i>Seleção do método de extração.....</i>	135
4.2.3	Validação do método multirresidual.....	136
4.2.3.1	<i>Curva analítica e linearidade.....</i>	136
4.2.3.2	<i>Limites de detecção e de quantificação.....</i>	141
4.2.3.3	<i>Efeito Matriz.....</i>	143
4.2.3.4	<i>Exatidão e precisão (Estudo de fortificação e recuperação).....</i>	144
4.2.3.5	<i>Precisão intermediária.....</i>	147
4.2.3.6	<i>Controle de qualidade.....</i>	149
5	CONCLUSÕES.....	150
6	REFERÊNCIAS.....	152
7	APÊNDICE 1.....	168
8	APÊNDICE 2.....	169

1 INTRODUÇÃO

Devido às inúmeras atividades agrícolas exercidas no Brasil, o emprego dos agrotóxicos torna-se muito relevante no país. A intensa prática da agricultura eleva o Brasil para uma categoria de grande produtor agrícola, proporcionando um crescimento econômico anual responsável por aproximadamente 21% do Produto Interno Bruto (PIB) através do agronegócio (NOBREGA, 2014).

Apesar do benefício inquestionável dos agrotóxicos na agricultura pelo aumento da produção agrícola, os agrotóxicos podem se difundir no ambiente, podendo atingir a água e o solo, através de processos como lixiviação, escoamento superficial, volatilização entre outros. Dessa forma, a contaminação ambiental pode ocorrer não somente pela aplicação de agrotóxicos, mas também por resíduos de agrotóxicos provenientes dos efluentes de lavagem dos maquinários, muitas vezes não mensurados como tóxicos e/ou perigosos (GEBLER, 2011).

Os tanques pulverizadores contêm os mesmos produtos químicos das embalagens que recebem atenção da legislação, embora já parcialmente diluídos. Sobre esses resíduos, ainda há muita carência de informações acerca dos efeitos do descarte final desses efluentes no solo, embora alguns estudos indiquem que os efluentes da lavagem dos equipamentos agrícolas podem vir a ser tão ou mais danosos que a contaminação difusa da área pela aplicação do agrotóxico.

Devido à preocupação com a contaminação ambiental, a decomposição biológica dos agrotóxicos tem sido cada vez mais aceita, porque os microorganismos possuem a capacidade de interagir química ou fisicamente com os agrotóxicos, causando desde mudanças estruturais até sua completa degradação (DIEZ, 2010). Essa alternativa tem sido viável do ponto de vista ambiental e econômico, reduzindo custos e/ou eliminando o uso de processos industriais para a resolução da contaminação ambiental por agrotóxicos (FOGG et al., 2003; SPLIID, HELWEG, HENRICHSON, 2006).

Um sistema de decomposição biológica de agrotóxicos, conhecido como camas biológicas ou leitos biológicos (*biobed*, na Europa), tem como característica atenuar a contaminação causada por procedimentos inadequados realizados em locais de mistura e manuseio quando se enche o tanque

pulverizador, bem como pelo descarte inadequado das caldas de enxágue dos pulverizadores de agrotóxicos (CASTILHO, TORSTENSSON, STRENTOM, 2008; COPPOLA, 2008b, 2011). O sistema de camas biológicas originalmente foi desenvolvido na Suécia durante a década de 90 e desde então começou a ser implementado em muitos países da Europa (CASTILHO, 2008b), América Latina (CASTILLO, TORSTENSSON, STENSTRÖM, 2008) e Ásia (GAO et al., 2015).

Uma cama biológica possui uma construção simples, com materiais relativamente de baixo custo. Sua principal função é reter e degradar os agrotóxicos provenientes de possíveis derramamentos, evitando que eles cheguem ao solo e, posteriormente, aos cursos de águas subterrâneas e superficiais (KARANASIOS, TSIROPOULAS, KARPOUZAS, 2013; SPLIID, HELWEG, HENRICHSON, 2006; TORSTENSSON e CASTILLO, 1997; VISCHETTI et al., 2008).

Os resíduos de águas contaminadas de manejo agrícola são descarregados na cama biológica, onde, por lixiviação através da camada de biomistura são descontaminadas, devido a processos de adsorção e ação microbiana (cultivada e selecionada dentro da biomistura) capaz de degradar e/ou metabolizar resíduos de agrotóxicos. A água contendo os contaminantes é lixiviada através da biomistura mantida com um nível elevado de umidade que permite a sobrevivência e o desenvolvimento dos microorganismos. A eficiência do sistema é alta e já demonstrou que pode diminuir alguns resíduos na água em mais de 90% (COPPOLA, et al, 2011).

No Brasil, estudos sobre o emprego de camas biológicas para o manejo de resíduos de agrotóxicos são relativamente recentes e ainda estão em seus estágios iniciais. Os primeiros resultados indicam que sob as condições ambientais brasileiras, são necessárias algumas mudanças estruturais no sistema de camas biológicas visando atender às Normas Européias em termos de eficiência do sistema. Experimentos desenvolvidos na Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA) mostraram que o processo de degradação nas camas biológicas é mais eficiente em climas quentes, como climas tropicais e subtropicais, já que o calor favorece o crescimento de microorganismos (GEBLER et al., 2015).

Os dados disponíveis na literatura sobre estudos do sistema de camas biológicas, em sua grande maioria, avaliam os efeitos da composição, temperatura, pH e umidade da biomistura, na degradação de agrotóxicos, e também avaliam principalmente a atividade microbiológica, através de estudos de respiração e de

conteúdo de fenoxilase (CASTILHO, TORSTENSSON, 2007). Há poucos relatos envolvendo a determinação da concentração de agrotóxicos após o tempo considerado ideal para a degradação dos mesmos. Os métodos desenvolvidos e aplicados nestes estudos publicados, em sua grande maioria fazem uso de grandes quantidades de amostras e de solventes, bem como o uso de solventes clorados. Além disso, costumam serem métodos trabalhosos e que consomem muito tempo para serem executados.

Apesar da grande diversidade de agrotóxicos empregados na agricultura, os ditiocarbamatos continuam sendo empregados como fungicidas, pois além da baixa toxicidade, baixo custo e curta permanência ambiental, agem de forma efetiva contra um largo espectro de doenças causadas por fungos, em grande parte das culturas agrícolas, abrangendo desde frutas e hortaliças até cereais de grande importância econômica.

Os métodos utilizados para a determinação de ditiocarbamatos são diferentes da maioria dos métodos de análise de resíduos de agrotóxicos devido à elevada instabilidade desses compostos na presença de umidade e oxigênio, o que dificulta sua análise. A maioria dos métodos analíticos empregados para determinação de ditiocarbamatos está baseada na quantificação do dissulfeto de carbono (CS_2) após digestão ácida das matrizes.

Para a determinação da maioria dos agrotóxicos, os métodos mais utilizados são os métodos multirresiduais, que permitem a determinação de um grande número de substâncias em apenas uma análise. Nesse contexto, os métodos multirresiduais de extração, combinados com a cromatografia acoplada à espectrometria de massas aparecem como ferramentas poderosas utilizadas há muitos anos, e continuamente empregadas, na detecção e quantificação de resíduos de agrotóxicos.

Com base nessas informações, este trabalho objetivou primeiramente desenvolver e validar um método analítico individual de baixo custo, rápido e prático para a determinação de ditiocarbamatos em camas biológicas e aplicá-lo para avaliar a eficiência das camas biológicas quanto à capacidade de degradação de ditiocarbamatos. Além disso, objetivou-se a validação de um método analítico multirresidual eficiente, prático, robusto e ambientalmente amigável para a determinação de agrotóxicos em camas biológicas.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 AGROTÓXICOS

A expansão da população mundial, estimada para o ano 2050 em nove bilhões de habitantes, aumentará a demanda por alimentos e matérias-primas. Isso tem impulsionado o desenvolvimento de tecnologias inovadoras no segmento do agronegócio, como biotecnologia, nanotecnologia, manejo adequado dos recursos naturais, entre outras, de forma a se utilizar esses recursos de forma econômica, tornando as variedades mais produtivas e resistentes às pragas e doenças. Embora este avanço seja notório, ainda não tem sido suficiente para erradicar as pragas e combater às doenças do componente produtivo agropecuário, e a cada dia aumenta-se o uso de agroquímicos, entre eles os agrotóxicos (ONU, 2008).

O *Codex Alimentarius* define agrotóxico como sendo toda e qualquer substância utilizada com o propósito de prevenir, destruir, atrair, repelir ou controlar qualquer praga, incluindo espécies indesejadas de plantas, insetos ou animais, durante as etapas de produção, armazenamento, transporte, distribuição e processamento do alimento ou ração animal. O termo inclui substâncias utilizadas como reguladoras do crescimento de plantas, desfolhantes, dessecantes, ou inibidores de brotos e substâncias aplicadas tanto antes quanto após a colheita, para proteger a mesma da deterioração durante o armazenamento e transporte (FAO, 2017).

Já o resíduo de agrotóxico é definido como sendo qualquer substância específica presente no alimento, “in natura” ou não, ou ainda em ração animal proveniente do uso de agrotóxicos, como produtos de conversão, metabólitos, produtos de reações e impurezas consideradas com alguma significância toxicológica. Este termo inclui resíduos de substâncias desconhecidas ou de fontes inevitáveis (como o meio ambiente), bem como o uso de produtos químicos conhecidos (FAO, 2005).

Os agrotóxicos englobam uma grande variedade de compostos pertencentes a diferentes classes químicas incluindo inseticidas, herbicidas, fungicidas, rodenticidas, moluscocidas, nematocidas entre outros (HIEMSTRA, KOK, 2007). Este grupo inclui mais de 1000 substâncias ativas contra pragas e apresentam diferentes propriedades e estruturas químicas (PICÓ, 2016) podendo ser aplicados

em vários estágios do cultivo desde o plantio, durante o crescimento e na etapa de estoque após a colheita (HIEMSTRA, KOK, 2007; PICÓ, 2016). Essa prática é essencial para prevenir perdas na agricultura, melhorando a produtividade, garantindo a produção de produtos com qualidade, satisfazendo os consumidores e garantindo sua comercialização (AKTAR, SENGUPTA, CHOWDHURY, 2009).

Apesar do benefício inquestionável dos agrotóxicos na agricultura, pela ação do aumento da produção agrícola, a cada ano 140.000 toneladas de agrotóxicos são aplicadas na agricultura apenas na União Europeia (EU) e embora os agrotóxicos sejam degradados e dissipados, muitos deles podem permanecer nos alimentos cultivados, tornando-o uma fonte primária de exposição para os humanos, enquanto as matérias primas são diretamente contaminadas através da aplicação e transmissão do agrotóxico e seus resíduos através da cadeia alimentar (PICÓ, 2016).

O Brasil é o segundo maior produtor de alimentos do mundo, atrás apenas dos Estados Unidos, mas no que diz respeito ao consumo de agrotóxicos ocupa o primeiro lugar. Em 2014, o setor de agrotóxicos movimentou aproximadamente US\$ 12 bilhões, o equivalente a cerca de R\$ 39 bilhões (EBC, 2015). Esses dados confirmam a relevância do uso dos agrotóxicos no Brasil, devido às inúmeras atividades agrícolas exercidas em várias regiões do país, fatos estes que elevam o país para uma categoria de grande produtor agrícola, proporcionando o crescimento anual econômico responsável por aproximadamente 21% do Produto Interno Bruto (PIB), através do agronegócio (NOBREGA, 2014).

2.1.1 História dos Agrotóxicos

Ao longo dos séculos, o homem sempre buscou meios de combater as adversidades naturais. Em 2500 a.C., os sumérios já utilizavam o enxofre no combate aos insetos e desde 400 a.C. o piretro, proveniente de flores secas de plantas do gênero *Chrysanthemum cinerariaefolium*, era utilizado para controlar piolhos. No século XIV, os chineses começaram a utilizar compostos de arsênio para controlar insetos, assim como ervas, óleos e cinzas para tratar sementes e grãos armazenados.

No século XVII, a nicotina das folhas de tabaco foi empregada pela primeira vez para controlar os insetos das árvores e a partir de 1804, os compostos

inorgânicos no estado natural como o arsênio, chumbo e cobre, foram empregados primeiramente como veneno para as unhas. No final do século XIX e XX, os inseticidas orgânicos e sintéticos começaram a ser estudados, mas o marco para o desenvolvimento foi a transformação do composto inorgânico cianato de amônio em ureia, composto nitrogenado presente na urina, cuja síntese foi efetuada pelo químico alemão Friedrich Wohler em 1828 (BRAIBANTE, ZAPPE, 2012).

Com o desenvolvimento da agricultura no século XVIII, novas práticas agrícolas foram introduzidas, como o emprego de fertilizantes em larga escala na colheita e no processamento de alimentos e de máquinas para plantar sementes (DIEZ, 2010). Em decorrência dessas mudanças, os problemas com as pragas se agravaram já na metade do século XIX, surgindo os primeiros estudos científicos sobre o uso dos agrotóxicos, visando o controle das pragas agrícolas.

Diversos compostos para o controle das pragas foram sintetizados no final do século XIX, como misturas de enxofre e cal (empregada no controle da sarna da maçã, causada por um fungo); mistura de sulfato de cobre e cal (conhecida hoje como calda bordalesa, empregada no combate do mídio, doença causada por fungos na uva); o arseniato de cobre, também conhecido como “verde Paris”, para controlar o besouro da batata nos Estados Unidos; o sulfato ferroso como herbicida seletivo; derivados de fluoretos inorgânicos, como fluoreto de sódio no controle de insetos como formigas (BRAIBANTE, ZAPPE, 2012).

Em 1892, os arseniatos de chumbo foram introduzidos como inseticidas inorgânicos, mas a era moderna dos agrotóxicos sintéticos começou na década de 1930 quando as propriedades inseticidas do dicloro-difenil-tricloroetano (DDT) foram descobertas por Muller, revolucionando o controle dos insetos no mundo. Esse inseticida foi utilizado pela primeira vez em 1943, durante a Segunda Guerra Mundial, para combater piolhos que infestavam as tropas norte-americanas na Europa e que transmitiam uma doença chamada tifo exantemático (KAUSHIK, KAUSHIK, 2007).

Também neste período desenvolveram-se os organofosforados para serem utilizados como armas químicas enquanto que metade do século XIX foi isolado um composto da planta *Physostigma venenosum*, natural do oeste da Ásia, com efeitos medicinais e tóxicos, que representa o grupo dos carbamatos sendo alguns ainda empregados como carbaril, carbofuran e aldicarb.

No Brasil, os agrotóxicos foram primeiramente utilizados em programas de saúde pública, no combate a vetores e controle de parasitas, sendo empregados mais intensivamente na agricultura a partir de 1960 (OPAS, 1997; WAICHMAN, EVE, NINA, 2007). Em 1975, o Governo Federal Brasileiro através do Plano Nacional de Desenvolvimento, investiu mais de 200 milhões de dólares para implementar a indústria dos agrotóxicos, abrindo o comércio destes agentes no país, condicionando o agricultor a comprá-los com recursos do crédito rural, instituindo a inclusão de uma cota definida para cada financiamento requerido.

Para tentar restringir os riscos associados com os agrotóxicos, em 1989, o Governo Federal Brasileiro promulgou a lei 7.802, instituindo várias condições e critérios para uso, venda, transporte, importação, propaganda e rotulagem destes compostos. Além disso, os agricultores foram levados a obter a prescrição para adquirirem legalmente os agrotóxicos. Embora fosse um passo positivo, esta ferramenta foi ineficaz por causa da fraca aplicação e monitoramento, especialmente nas áreas mais remotas do país, onde muitos agricultores dependiam principalmente do rótulo dos produtos para obter informações sobre dosagens, danos, toxicidade e cuidados na manipulação (WAICHMAN, EVE, NINA, 2007).

Apesar de existir no mercado um grande número de compostos para controlar as mais diversas pragas daninhas, insetos, fungos e outros organismos, existe a necessidade do estudo de novos produtos para controlar tais organismos, uma vez que eles podem desenvolver resistência a tais compostos após um curto período de contato, diminuindo a efetividade e muitas vezes, perdendo totalmente a atividade, além do surgimento frequente de novos insetos-pragas, plantas daninhas e fungos (BRAIBANTE, ZAPPE, 2012).

2.1.2 Classificação dos agrotóxicos

Os agrotóxicos podem ser classificados de acordo com o tipo de organismo que se deseja controlar, quanto ao grupo químico e quanto à estrutura. Eles podem ser inorgânicos ou sintéticos sendo classificados como agrotóxicos químicos. Os agrotóxicos químicos são basicamente materiais sintéticos que matam ou inativam diretamente as pragas e são classificados como inseticidas, herbicidas, fungicidas, rodenticidas e nematicidas.

Do ponto de vista da composição química, os agrotóxicos possuem uma enorme diversidade estrutural, mas muitos apresentam características em comum, sendo assim, classificados dentro de um mesmo grupo. Os grupos mais conhecidos são representados pelos piretróides, organofosforados, organoclorados e carbamatos (SAMSIDAR et al., 2018). Estes nomes estão relacionados com as características presentes na estrutura do agrotóxico, além da forma como tais elementos estão ligados entre si (BARBOSA, 2004).

2.1.2.1 Os Fungicidas

Os fungicidas são compostos químicos empregados no controle de doenças de plantas causadas por fungos, bactérias ou algas durante o crescimento ou no tratamento pós-colheita, podendo causar contaminação dos alimentos durante o estoque ou o transporte (REGUEIRO et al., 2015). Também são empregados em algumas culturas como soja e milho, visando reduzir o progresso de manchas foliares (JULIATTI, 2011), tornando-se essenciais para a proteção dos alimentos assim como na manutenção de culturas saudáveis e na produção de alta qualidade.

Originalmente desenvolvidos para controlar doenças em uma grande variedade de culturas (HANO et al., 2015), os fungicidas já foram empregados na indústria como aceleradores e como anti-oxidante na produção da borracha, na produção de açúcar, em tratamentos de resíduos de água e como antifúngicos nos sistemas de refrigeração de águas.

Os fungicidas foram responsáveis por mais de 52% de todos os produtos de proteção de plantas usados na União Européia (EU) em 2003, com um consumo estimado em mais de 100 mil toneladas (kt). Como qualquer outro agrotóxico, os fungicidas podem difundir-se para além do campo após a aplicação, tornando-se um potencial risco à saúde não apenas para os trabalhadores através da exposição direta, mas também para as demais pessoas pela exposição indireta. Além disso, os resíduos desses compostos podem permanecer nas culturas pós-colheita e inclusive após algumas etapas de processamento dos alimentos (REGUEIRO et al., 2015).

Em 2009, 35,7 toneladas de fungicidas, de 87 ingredientes ativos, distribuídos em 325 marcas comerciais, foram comercializados no Brasil. Em 2009, encontravam-se na primeira colocação dos fungicidas orgânicos mais vendidos o

carbendazin, seguido do tiofanato metílico, mancozebe, tebuconazol, clorotalonil, piraclostrobina e metiram (IBAMA, 2010).

2.1.2.1.1 Ditiocarbamatos

Os ditiocarbamatos (DTC) são a classe de derivados dos tiocarbamatos, estruturalmente formados por dimetilditiocarbamatos (DMDC) (HANO et al., 2015). São compostos orgânicos sulfurados derivados do ácido bisditiocarbâmico desenvolvidos no início das décadas de 1930 e 1940 (mancozebe, tiram, manebe, ferbam, ziram e zinebe) (HANO et al., 2015; SZOLAR et al., 2007). Seus sais vêm a ser o 1,2-bisditiocarbamatos, dependendo do nome químico comum do fungicida, do grupo químico (metil, etil, etc.) e do metal envolvido (FERNÁNDEZ-NORTHCOTE, 2001).

Os DTC são os fungicidas mais amplamente empregados na agricultura em todo o mundo (HOFFMAN, TROMBETTA, HARDY, 2016) devido ao seu amplo espectro de atividade biológica, baixo custo de produção e perfil seguro de toxicidade biológica e humana (BOXTEL et al., 2010; CRNOGORAC, SCHWACK, 2009; MUJAWAR et al., 2014). Possuem ação contra aproximadamente 400 patógenos e são os fungicidas mais frequentemente detectados em programas de monitoramento mundial (BLASCO et al., 2002).

Apesar dos efeitos tóxicos quando empregados na área agrícola, os DTCs estão sendo muito aplicados na medicina devido às suas propriedades de ação antibacteriana, antituberculosa, antifúngica e antioxidante (KANCHI, SINGH, BISETTY, 2014), sendo efetivos no tratamento contra o alcoolismo (dissulfiram), e no tratamento do câncer (Li et al., 2015a) e HIV (SZOLAR et al., 2007). Também apresentaram ter atividade específica contra bactérias Gram positivas *Staphylococcus aureus* resistentes à meticilina (MRSA) (TAN et al., 2015), como protetores do sistema neural, pela redução do estresse oxidativo e da inflamação, evitando asfixia e danos cerebrais em neo-natos (WANG et al., 2013).

Apresentam ação na inibição de α -carbonicas em mamíferos, que são drogas alvos para agentes anti-glaucoma ou antitumorais (BOZDAG et al., 2015) e na profilaxia para conter o *Trichomonas vaginalis*, em infecções vaginais (BALA et al., 2015). Devido à forte habilidade de quelar íons metálicos, estão envolvidos na terapia de quelação de metais em casos de intoxicação (MATIAS et al., 2011) e na

remoção de metais pesados (Pb, Cd, Cu e Zn) de águas poluídas (ABUL-EL-HALAYA, ZABIN, 2015; Li et al., 2015b).

O principal subgrupo dos DTC são os etileno-bis-ditiocarbamatos (EBDCs), que podem formar quelatos poliméricos e são insolúveis tanto em água como em solvente orgânico (ABARKELI, 2015; BONNECHERE et al, 2011). São empregados na agricultura há mais de quarenta anos como fungicidas não-sistêmicos, controlando um grande espectro de fungos, principalmente em regiões quentes e úmidas, sendo indicados para uso em ampla variedade de cereais, frutas, verduras e legumes (CORSINI et al., 2005; GARCINUNO, FERNÁNDEZ-HERNANDEZ, CÁMARA, 2004a).

Todos os EBDCs possuem um esqueleto orgânico comum: $C_4H_6N_2S_4$, o que diferencia os compostos do grupo é a adição de um íon metálico. Além das estruturas químicas semelhantes, apresentam as seguintes características: capacidade de liberar CS_2 durante a degradação, biotransformar-se em etilenotiouréia (ETU), capacidade de complexar íons metálicos fisiológicos, como o cobre (EPA, 2001), alta instabilidade no meio ambiente, sendo geralmente instáveis na presença de umidade, oxigênio e nos sistemas biológicos (GARCINUNO, FERNÁNDEZ-HERNANDEZ, CÁMARA, 2004a).

Manebe, mancozebe, zinebe e metiram pertencem ao grupo dos EBDC (CALDAS, TRESSOU, BOON, 2006; CORSINI et al., 2005; WHITE, OPPIN, 2004). O mancozebe é um composto orgânico que contém ambos os íons Zn e Mn e é rapidamente degradado a ETU na presença de água e oxigênio (ABARKELI, 2015). Entre os fungicidas o mancozebe é o mais amplamente empregado, detém registro para praticamente todas as frutas e hortaliças, sendo empregado para proteger frutas, vegetais e árvores ornamentais contra doenças fúngicas (CERNOHLÁVKOVÁ, JARKOVSKÝ, HOFMAN, 2009). As estruturas químicas dos etileno-bis-ditiocarbamatos registrados no Brasil, permitidos para diversas culturas, estão representadas na Tabela 1.

Tabela 1 – Etileno-bis-ditiocarbamatos registrados no Brasil, permitidos para diversas culturas, e suas respectivas estruturas químicas.

Etileno-bis-ditiocarbamatos	Fórmula Estrutural
Mancozebe	$\left[\begin{array}{c} \text{H} \quad \quad \quad \text{S} \\ \quad \quad \quad \\ -\text{S}-\text{C}-\text{N}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{N}-\text{C}-\text{S}^- \\ \quad \quad \quad \\ \text{S} \quad \quad \quad \text{H} \end{array} \text{Mn}^{++} \quad (\text{Zn})_y \right]_x$
Manebe	$\left[\begin{array}{c} \text{H} \quad \quad \quad \text{S} \\ \quad \quad \quad \\ -\text{S}-\text{C}-\text{N}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{N}-\text{C}-\text{S}^- \\ \quad \quad \quad \\ \text{S} \quad \quad \quad \text{H} \end{array} \text{Mn}^{++} \right]_x$
Metiram	$\left[\left[\begin{array}{c} \text{S} \quad \quad \quad \text{S} \\ \quad \quad \quad \\ \text{CH}_2-\text{NH}-\text{C}-\text{S}^- \\ \\ \text{CH}_2-\text{NH}-\text{C}-\text{S}^- \\ \quad \quad \quad \\ \text{S} \quad \quad \quad \text{Zn} \\ \quad \quad \quad \uparrow \\ \quad \quad \quad \text{NH}_3 \end{array} \right]_3 \quad \left[\begin{array}{c} \text{S} \quad \quad \quad \text{S} \\ \quad \quad \quad \\ \text{CH}_2-\text{NH}-\text{C}-\text{S}^- \\ \\ \text{CH}_2-\text{NH}-\text{C}-\text{S}^- \\ \quad \quad \quad \\ \text{S} \quad \quad \quad \text{S} \end{array} \right] \right]_x$

Fonte: CALDAS et al., 2004; HOFFMAN, TROMBETA, HARDY, 2016.

2.1.2.1.2 Triazóis

Os triazóis são compostos orgânicos de ação sistêmica que apresentam elevada fungitoxicidade a inúmeros patógenos, pois conseguem acessar as partes não expostas dos patógenos (SILVA, 2011). Dentre os modernos fungicidas triazóis tem-se desde compostos extremamente seletivos e de alta translocação na planta até mesmo os menos seletivos e de baixa translocação. A relação entre rápida translocação e a ação fungicida na planta depende da sua lipossolubilidade e da sua hidrossolubilidade (JULIATTI, 2011).

2.1.2.2 Inseticidas

2.1.2.2.1 Organofosforados

Os organofosforados (OPs, do inglês *organophosphorus*) são largamente aplicados na agricultura e são classificados entre os agrotóxicos de maior toxicidade. Em 1942, o exa-etil-tetra fosfato (HETP) foi o primeiro organofosforado empregado como inseticida na agricultura, desde então, numerosos OPs são empregados como inseticidas, fungicidas e herbicidas. Os organofosforados podem ser degradados de forma simples, são pouco solúveis em água, mas possuem boa solubilidade em solventes orgânicos (SAMSIDAR et al., 2018).

São ésteres derivados do ácido fosfórico, com distintas formas de substituição, gerando uma grande variedade de compostos (BELDOMENICO et al., 2005). Comparados com agrotóxicos organoclorados, OPs e os carbamatos são a melhor escolha uma vez que possuem um preço mais acessível, facilidade de obtenção, baixa persistência no ambiente e largo espectro de aplicação e também são capazes de destruir um grande número de pragas (SAMSIDAR et al., 2018)

2.1.3 Aspectos toxicológicos dos agrotóxicos

A classificação toxicológica dos agrotóxicos é fundamental para o conhecimento da toxicidade aguda ou crônica desses compostos, os quais, por sua própria natureza, são potencialmente perigosos para a saúde humana e para o ambiente quando manipulados de forma inadequada (BARBOSA, 2004). A toxicidade pode ser classificada de acordo com seu poder agudo de causar danos em relação à Dose Letal (DL_{50}), que é a dose necessária para matar 50% de uma população de estudo em um período de 14 dias (PROYECTO D09R1006, 2013).

Geralmente, os produtos de degradação dos agrotóxicos possuem uma toxicidade menor do que os seus produtos de origem. Entretanto, em alguns casos, estes produtos são mais tóxicos, como é o caso dos ditiocarbamatos, o que representa um grande risco para o homem e para o ambiente, devendo-se considerá-los durante o processo de avaliação dos riscos ambientais (ANDREU, PICÓ, 2004).

Enquanto os dados de toxicidade aguda de muitos desses produtos químicos são abundantes, sabe-se que os resultados do efeito tardio são mais limitados. A Organização Mundial de saúde (WHO, do inglês *World and Health Organization*) estima que haja 50 casos de intoxicações para cada caso relatado e publicado, ou que entre um a cinco milhões de trabalhadores na agricultura sofrem algum tipo de intoxicação por ano (DASGUPTA et al., 2007).

No Brasil, a classificação toxicológica dos agrotóxicos está a cargo do Ministério da Saúde e da Legislação Federal que regulamenta que os rótulos dos agrotóxicos devem possuir uma faixa colorida indicativa de seu grupo. Esta classificação é fundamental para o conhecimento da toxicidade do produto e instituição do tratamento específico (ARAUJO, 2001), além de trazer informações em relação aos dados de dose letal de cada classe, conforme demonstrado na Tabela 2 (CAMAROTTO, CORDEBELLO, BRASIL, 2004).

Tabela 2 – Classificação toxicológica, cor da faixa presente nos rótulos dos frascos de agrotóxicos e a Dose Letal (DL_{50}), segundo a classificação toxicológica.

Toxicidade	Classificação	DL_{50} ($mg\ kg^{-1}$)	Dose capaz de matar uma pessoa adulta
Extremamente tóxicos	Classe I – Faixa vermelha	< 5	1 pitada a algumas gotas
Altamente tóxicos	Classe II – Faixa amarela	5 - 50	Algumas gotas a 1 colher de chá
Mediamente tóxicos	Classe III – faixa azul	50 - 500	1 colher de chá a 2 colheres de sopa
Pouco tóxicos	Classe IV – Faixa verde	500 - 5000	2 colheres de sopa a um copo
Muito pouco tóxicos		> 5000	1 copo a 1 litro

Os etilenobisditiocarbamatos ligados a metais exercem sua ação tóxica através de diferentes mecanismos. Relativo ao mecanismo envolvido na toxicidade crônica destes compostos, a maioria dos estudos estão focados nos efeitos adversos à saúde, causados pela ETU, responsável por efeitos teratogênicos, carcinogênicos e goitrogênicos (WHO, 1988). A ETU pode ocorrer como contaminante do produto formulado, ou ser formada durante o armazenamento

desses produtos em função de condições de temperatura e umidade, representando de 15-48% dos metabólitos totais excretados na urina (COLOSIO et al., 2002).

Os EBDC reagem com enzimas sulfidrílicas e outros compostos sulfidrílicos (-SH) envolvidos na respiração, e como estes radicais estão presentes em muitas estruturas dos fungos, estes fungicidas podem inibir um grande número de enzimas e, portanto, interferir em muitos processos metabólicos além dos específicos (CARNIEL, 2015). Estes fungicidas são classificados pela Agência Americana de Proteção Ambiental (EPA, do inglês *Environmental Protection Agency*) como carcinogênicos do tipo B2, isto é, comprovadamente carcinogênicos para animais de laboratório e suspeitos para o homem (FUSTIONE, CAMPO, COLOSIO, 2005).

Devido à crescente preocupação em relação à saúde pela exposição aos fungicidas EBDCs, especialmente manebe e mancozebe, novos fungicidas vem sendo descobertos recentemente. Estes fungicidas apresentam novos mecanismos de ação, incluindo compostos que afetam a biossíntese da parede celular em fungos (dimetomorfe), a biossíntese do esteroide em membranas (fenexamide), a respiração fúngica (ametocrabina, boscalida, ciazofamida, crezoxim-metilico e piraclosrobina) ou ainda modo de ação desconhecido (metrafenona).

Alguns destes compostos foram incluídos na lista da EU de produtos autorizados para proteção de plantas, de acordo com a Comissão de Regulação (EC) N° 1107/2009. As principais propriedades destes novos fungicidas são seu largo espectro de ação, sua especial propriedade de penetração e redistribuição e sua longa estabilidade, o que resulta em melhor eficácia, permitindo o uso em baixas concentrações das substâncias ativas.

Segundo estudo da agência de Proteção Ambiental Americana (EPA-EUA), animais de laboratório expostos a DTC apresentam neuropatologias, tireoidismo e distúrbios no sistema nervoso central. Esses estudos sugerem que esses efeitos podem estar associados à formação de um metabólito em comum: o CS₂, que pode induzir à neuropatias (EPA, 2001), causar decréscimo no nível de testosterona sérica, mudanças degenerativas no tecido testicular, afetar a espermatogênese e provocar alterações epidídimas (KSHEERASAGAR, KALIWAL, 2003).

A ação tóxica do mancozebe e manebe é avaliada pela porção orgânica e pelo metal componente. As intoxicações por esses compostos frequentemente ocorrem pelas vias oral e respiratória, podendo também ser absorvidos por via

cutânea. Nos casos de exposição intensa provocam dermatite, faringite, bronquite e conjuntivite (ECKERMAN, GIMENES, SOUZA, 2007).

Em relação aos triazóis, a presença do anel triazol nas moléculas desta classe é responsável por seu mecanismo de ação fungicida. A atividade fungicida é desempenhada pela inibição direta da enzima lanosterol 14-alfa-desmetilase (CYP51), responsável por uma das etapas de biossíntese do ergosterol, derivado do colesterol, e cuja ausência prejudica a fluidez e integridade das células dos fungos (ZAM et al., 2003). Em seres humanos a enzima esterol 14-alfa-desmetilase está presente em diferentes tecidos e, por isso, há a probabilidade que o mesmo mecanismo de ação fungicida seja também responsável por efeitos tóxicos observados em mamíferos. Em estudos realizados com animais de laboratório foram observados efeitos adversos no desenvolvimento reprodutivo, efeitos de hepatotoxicidade, hepatocarcinogenicidade e produção de tumores na tireóide e testículos por via não-genotípica (ESFA, 2009).

No caso dos organofosforados, o mecanismo de ação responsável pela ação tóxica, é a habilidade de bloquear a acetilcolinesterase (AChE), uma enzima chave no sistema nervoso central (SNC) de humanos e insetos. A inibição da AChE impossibilita de exercer sua função de hidrolisar o neurotransmissor acetilcolina (ACh) em colina mais ácido acético, o que leva ao acúmulo do neurotransmissor acetilcolina, podendo causar danos ao SNC (SAMSIDAR et al., 2018). A AChE está presente no SNC, no sistema nervoso periférico (SNP) e também nos eritrócitos (BELDOMENICO, et al., 2005). Entre os efeitos de intoxicação aguda mais frequentemente associados à exposição a esses compostos estão disfunções neurocomportamentais, cognitivas e neuromusculares (SILVA, 2011), sendo a inibição causada pelos OP praticamente irreversível.

2.2 CONTAMINAÇÃO AMBIENTAL E HUMANA

Apesar da poderosa ação no controle de pragas e doenças, o amplo emprego dos agrotóxicos na agricultura apresenta muitos impactos negativos, pois eles são nocivos à saúde humana e ao ambiente devido a suas propriedades de bioacumulação (SAMSIDAR et al., 2018). Uma vez que os agrotóxicos atingem o solo, eles podem afetar as suas propriedades físico-químicas, tornando-o infértil através da contaminação. Uma vez que o solo esteja contaminado, o agrotóxico

pode permanecer retido por muito tempo, sendo absorvido pelas raízes das plantas, podendo inclusive causar a morte de microorganismos que interagem com as raízes e colaboram com o crescimento das mesmas (NOBREGA, 2014).

O ambiente aquático é o mais atingido, para onde grande parte dos agrotóxicos é destinada, aumentando a preocupação com a contaminação, principalmente, quando a água é destinada para o consumo humano. Os principais problemas causados pelos agrotóxicos no ambiente aquático estão diretamente ligados ao escoamento superficial ou enxurrada, uma vez que ao atravessar o solo, a água dissolve e transporta uma série de substâncias nele presente, incluindo os agrotóxicos, movimentando o produto químico pelo solo, podendo contaminar lençóis freáticos, rios e lagos (NOBREGA, 2014).

A contaminação de corpos de água com agrotóxicos provenientes da agricultura pode representar uma ameaça significativa para os organismos do ecossistema aquático e as fontes de água potáveis, entretanto, o risco para a comunidade aquática e para a saúde humana podem ser reduzidos substancialmente com o uso de medidas apropriadas, pois se tem o conhecimento prévio de que uma parte dos agrotóxicos acaba no solo e acaba por contaminar as águas adjacentes (CARNIEL, 2015; REICHENBERGER et al., 2007)

A contaminação do ambiente por agrotóxicos pode se originar por fontes pontuais ou difusas, as quais muitas vezes não estão bem diferenciadas. A contaminação difusa se origina durante a aplicação dos agrotóxicos no campo, com as perdas por deriva, enquanto que a contaminação pontual se origina no local de preparação dos agrotóxicos, anterior à sua aplicação (CASTILLO, TORSTENSSON, STRENGTHON, 2008b). A fim de proteger o ambiente e a saúde humana, é importante desenvolver metodologias para prevenir a contaminação por agrotóxicos a partir de fontes pontuais (VISCHETTI et al., 2004).

Existem três etapas críticas que geralmente estão envolvidas na contaminação ambiental. A primeira etapa consiste no derramamento dos agrotóxicos concentrados ou suas diluições fora do tanque pulverizador; a segunda etapa ocorre durante a pulverização dos agrotóxicos no campo e a terceira etapa está relacionada à administração dos resíduos dos agrotóxicos provenientes dos tanques de pulverização. Se os agrotóxicos fossem utilizados nas doses recomendadas e aplicados usando técnicas modernas de acordo com as boas

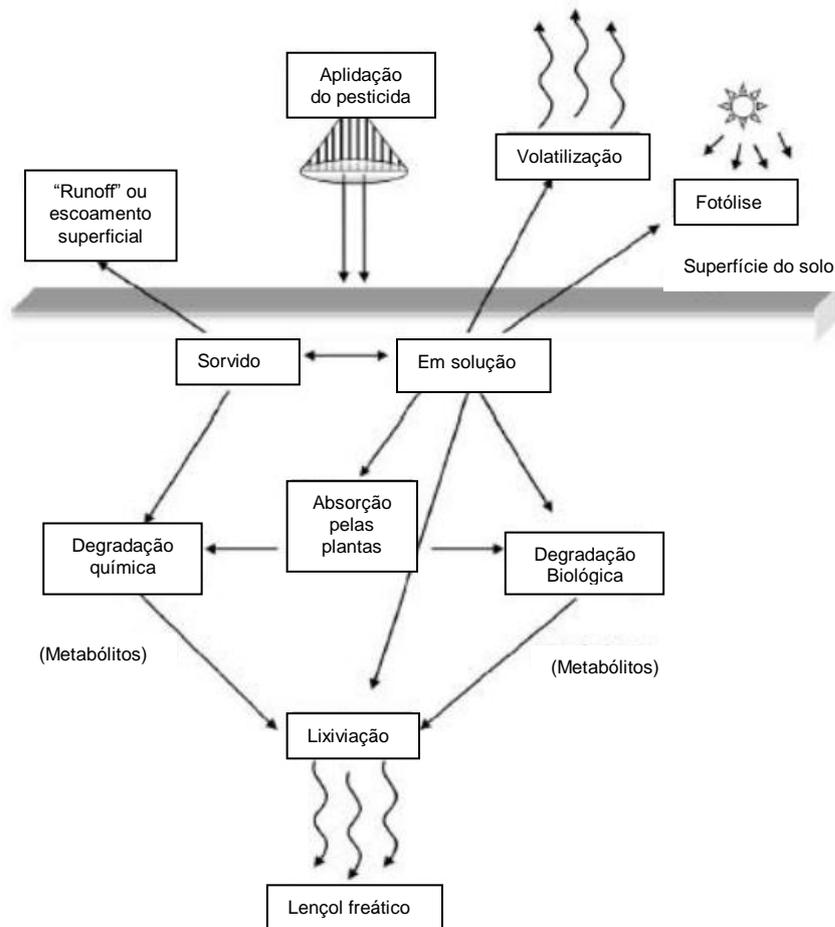
práticas agrícolas, o risco de contaminação do ambiente pela pulverização no campo (etapa 2) seria pequeno.

No entanto, o risco é maior na primeira e na terceira etapa, as quais podem originar contaminação pontual. A primeira etapa contribui com pequenos derrames, mas em concentrações elevadas dos agrotóxicos, uma vez são manuseadas soluções concentradas. A terceira etapa contribui com maior volume, mas os agrotóxicos estão menos concentrados, pois estão diluídos no tanque de lavagem ou ficam retidos nas paredes externas do tanque também em soluções diluídas (CASTILLO, TORSTENSSON, STRENSTRON, 2008b).

Para o emprego correto dos agrotóxicos é essencial conhecer suas características, o que permitirá compreender os princípios ativos e sua ação, prever seus efeitos nos organismos e os diferentes processos que podem ocorrer no ambiente. A adsorção e a mobilidade dos agrotóxicos nos solos dependem das características iônicas ou neutras da molécula, da sua solubilidade em água e da sua polaridade, assim como da natureza coloidal na fração dos solos, da argila e da matéria orgânica. Adsorção e dessorção dos agrotóxicos nos solos é o principal fenômeno de retenção que determina seu transporte, transformação e efeitos biológicos em solos ambientais (DIEZ, 2010).

Quando aplicados no campo, os agrotóxicos acabam sendo difundidos para o ambiente, por processos de retenção (sorção), de transformação (degradação biológica e decomposição química), de transporte (deriva, volatilização, lixiviação e carreamento superficial), e por interações desses processos (CARNIEL, 2015) conforme ilustrado na figura 1.

Figura 1 – Rota dos agrotóxicos após aplicação no solo.



Fonte: OLIVEIRA Jr., REGITANO, 2009.

É importante compreender o processo de lixiviação, ocasionado por água infiltrada, o que depende da quantidade de água que contém um determinado solo, assim como o processo de volatilização, onde os agrotóxicos suscetíveis são perdidos mais rapidamente, diminuindo sua ação e aumentando o grau de contaminação. Também os processos de absorção, dependente dos ventos e chuvas após aplicação bem como o processo de degradação, quer seja pela luz solar, microorganismos ou reações químicas (PROYECTO D09R1006, 2013).

O tempo de permanência dos agrotóxicos nos solos depende de quão fortemente eles estejam ligados aos componentes do solo e quão rapidamente ele é degradado, e isto depende das condições ambientais no tempo da aplicação, como por exemplo, a quantidade de água no solo. Ainda há que se considerar a influência das características físicas e químicas do solo, como o conteúdo da mistura,

conteúdo e classe da matéria orgânica e do pH na sorção/dessorção e degradação dos agrotóxicos e seu acesso às águas superficiais e subterrâneas.

A temperatura é outro fator que pode afetar o comportamento dos agrotóxicos no solo e alguns investigadores têm notado que o pH ocupa um papel importante na adsorção dos compostos com grupo funcional ácido no carbono ativado em solos uma vez que sua forma neutra e iônica apresenta diferentes propriedades de adsorção (DIEZ, 2010)

A exposição aos agrotóxicos afeta não apenas pessoas expostas ocupacionalmente (exposição direta), mas também a população em geral (exposição indireta), que entra em contato com estes compostos através do uso doméstico, consumo de águas e alimentos contaminados. A exposição ocupacional pode ocorrer na indústria (durante as etapas de produção e formulação dos agrotóxicos), na agricultura (aplicação no campo, manutenção) e saúde pública (desinfestação, exterminação de vermes, etc.) (APREA, 2012). A forma de exposição ocorre de modo variado nestes diferentes setores, os agricultores envolvidos com o próprio ingrediente ativo são os mais expostos, devido à alta concentração dos agrotóxicos, especialmente quando se trabalha com tanques de pulverização e não são empregados os equipamentos adequados de proteção individual (APREA, 2012).

Em vista desses problemas, a utilização de agrotóxicos é alvo de inúmeras críticas direcionadas à política adotada pelos países que mantêm a liberação dos mesmos, sem um controle rígido, que não investem em pesquisas ou não implementam técnicas alternativas voltadas para a agricultura, que sejam menos danosas à saúde e ao meio ambiente (CAMAROTTO, CORDEBELLO, BRASIL, 2004). Devido às preocupações ambientais relativas a este problema, há uma grande necessidade de se desenvolver métodos para a remediação de agrotóxicos (COPPOLA et al., 2011).

Por esta razão, a biorremediação, que utiliza microorganismos para degradar poluentes em compartimentos ambientais, tem ganhado aceitação como uma alternativa para a remoção destes poluentes, sendo uma alternativa ambiental e economicamente viável, reduzindo custos e diminuindo ou eliminando a utilização de processos industriais para resolução destes problemas (COPPOLA, CASTILLO, VISCHETTI, 2011; FOGG et. al, 2003; SPLIID, HELWEG, HENRICHSON, 2006).

Muitas obras de biorremediação tem se concentrado em microorganismos que realizam a degradação de diferentes compostos, o que demonstra que os

tratamentos biológicos são econômicos e eficientes como instrumentos ecológicos para controlar e prevenir contaminantes orgânicos (COPPOLA et al., 2011).

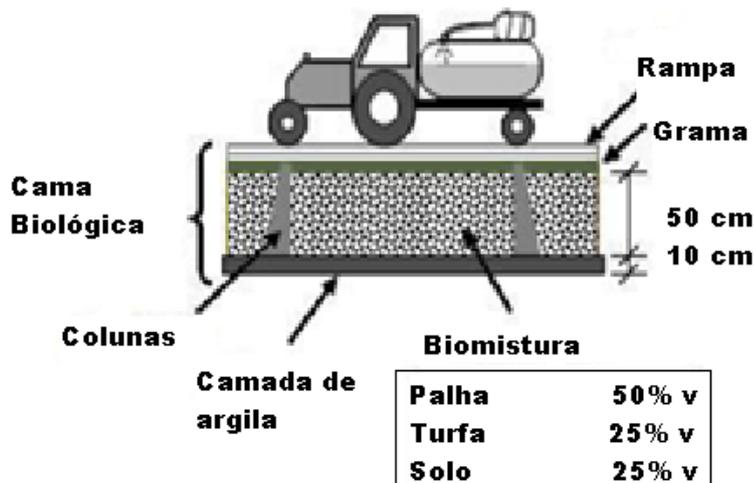
2.3 SISTEMAS DE CAMAS BIOLÓGICAS (BIOBEDS)

Até o presente momento, a legislação brasileira não orienta por meio de decretos, leis, ou regulamentos, como efetuar corretamente o descarte de efluentes com resíduos de agrotóxicos provenientes dos equipamentos de aplicação agrícola. Entretanto, em alguns países, os sistemas de camas biológicas já estão incluídos nas Boas Práticas Agrícolas, para a completa degradação destes resíduos (KARANASIOS, TSIROPOULAS, KARPOUZAS, 2013; SPLIID, HELWEG, HENRICHSON, 2006; VISCHETTI et al., 2008). No Brasil, ainda não existem estudos que indiquem a eficiência deste sistema, os primeiros estudos neste sentido estão sendo realizado na Embrapa Uva e Vinho em Vacaria no RS (CARNIEL, 2015).

O sistema de cama biológica (*biobed*) foi desenvolvido na Suécia na década de 1990, e desde então começou a ser implementado em vários países da Europa (CASTILLO, TORSTENSSON, STENSTRÖM, 2008a), América Latina (RIVERO et al., 2016) e Ásia (GAO et al., 2015). Esse sistema possui uma construção simples, a partir de materiais de baixo custo, o que a torna ambiental e economicamente viável. Sua função principal é reter e degradar os agrotóxicos de possíveis derrames, evitando que estes cheguem aos solos e posteriormente aos cursos de águas subterrâneas e superficiais (DIEZ, 2010; TORSTENSSON, CASTILLO, 1997; TORSTENSSON, 2000; VISCHETTI et al., 2007).

O projeto inicial da cama biológica consistia basicamente em um fosso, impermeabilizado ou não, preenchido com uma mistura denominada de biomistura (*biomix*), composta de palha, turfa e solo agrícola na proporção de 2:1:1 (50:25:25 % de volume) revestida por uma cobertura vegetal. O resíduo é depositado no sistema pelo enchimento dos tanques pulverizadores e pela lavagem dos equipamentos em rampas construídas sobre o fosso, ou então derivados de um local com piso impermeável feito de concreto, onde são executadas as atividades com o agrotóxico e o manejo do pulverizador (CASTILLO et al., 2008; CASTILLO, TORSTENSSON, STENSTRÖM, 2008; FAIT et al., 2007; FOGG et al., 2003; ROFFIGNAC et al., 2008), conforme demonstrado na Figura 2.

Figura 2 – Diagrama dos componentes que estão presentes em um sistema de cama biológica clássica, representando o modelo original desenvolvido na Suécia.

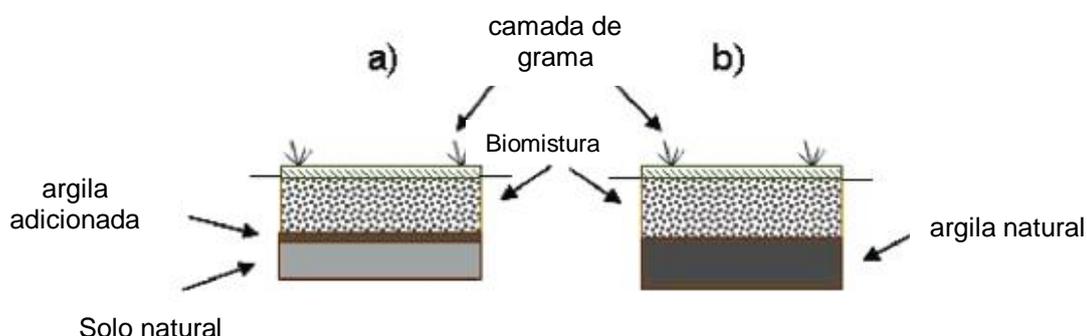


Fonte: CASTILLO, TORSTENSSON, STENSTRÖM, 2008).

Os resíduos de águas contaminadas de manejo agrícola são descarregados na cama biológica, onde, por lixiviação através da camada de biomistura são descontaminadas, devido a processos de adsorção e ação microbiana (cultivada e selecionada dentro da biomistura) capaz de degradar e/ou metabolizar resíduos de agrotóxicos. A água contendo os contaminantes é lixiviada através da biomistura mantida com um nível elevado de umidade que permite a sobrevivência e o desenvolvimento dos microorganismos. A eficiência do sistema é alta e já demonstrou que pode diminuir alguns resíduos na água em mais de 90% (COPPOLA, et al, 2011).

Existem dois modelos de sistemas de camas biológicas: o sistema impermeável e o sistema permeável. O modelo permeável não está isolado do solo por uma camada sintética impermeabilizante, o modelo original da Suécia pertence a este grupo. Em muitos casos, uma camada natural de argila pode estar presente no fundo do poço do sistema de cama biológica, ou esta camada pode ser adicionada. Não há coleta de água ou drenagem neste sistema, conforme pode ser visto na Figura 3 (CASTILLHO, TORSTENSSON, STRENSTRON, 2008).

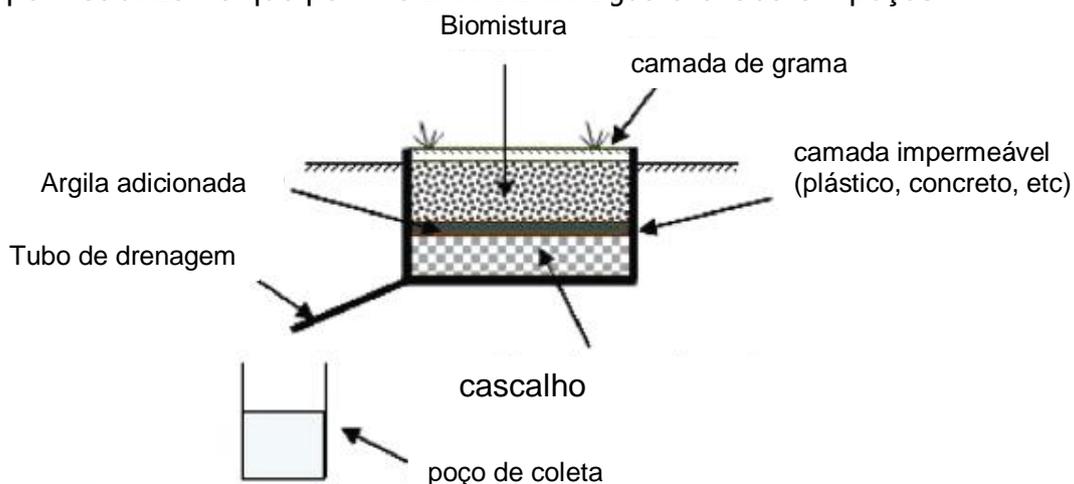
Figura 3 – Modelo de sistema de cama biológica permeável com (a) uma camada adicionada ou (b) uma camada natural de argila.



Fonte: CASTILLHO, TORSTENSSON, STRENSTRON, 2008.

O modelo impermeável é semelhante ao original desenvolvido na Suécia, mas é revestido por uma camada impermeável sintética (plástico, lona, concreto, etc.), que o isola do solo. Este modelo permite a coleta de água e uma etapa de drenagem especial, em poços que são construídos lateralmente à cama biológica (Figura 4). A camada de drenagem (camada de cascalho, pedra britada ou areia) é normalmente localizada abaixo da camada de argila, modelo que está em uso no Reino Unido (CASTILLHO, TORSTENSSON, STRENSTRON, 2008).

Figura 4 – Modelo de cama biológica impermeável quando isolada com uma camada impermeabilizante que permite a coleta da água drenada em poços.

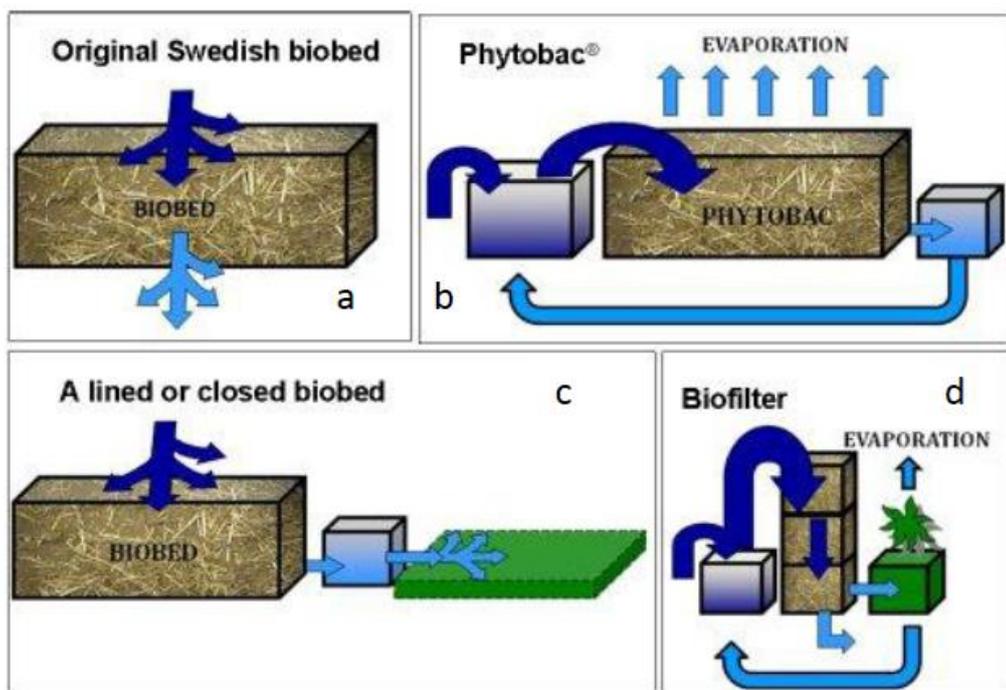


Fonte: CASTILLHO, TORSTENSSON, STRENSTRON, 2008.

Desde o desenvolvimento inicial, a difusão desta eficiente forma de degradação de resíduos de agrotóxicos foi sendo aprimorada e modificada para diferentes sistemas em vários países, sendo algumas variações denominadas

Biobac ou Phytobac na França, biofilter na Bélgica, biomassbed na Itália (KARANASIOS, TSIROPOULAS, KARPOUZAS, 2013; SPLIID, HELWEG, HENRICHSON, 2006; VISCHETTI e.t al., 2008), biobac e biomesas na América Latina e biobeds modificados em vários outros países como Dinamarca, Holanda, Estônia, Polônia (CASTILLO, TORSTENSSON, STENSTRÖM, 2008) e na China (GAO et al., 2015). O conceito desses sistemas é bastante similar, pois todos consistem em uma matriz biológica que retém os agrotóxicos na matéria orgânica ou partículas do solo, conforme a Figura 5.

Figura 5 – Sistemas de camas biológicas em alguns países: (a) o *Biobed* original desenvolvido na Suécia, onde o resíduo é colocado para degradação e sofre lixiviação gradual; (b) Phytobac, que inclui um sistema de mais de um ciclo acrescido na mesma Biomistura, que sofre evaporação; (c) sistema de *Biobed* fechado, onde o resíduo é adicionado e a seguir transferido para área com cobertura vegetal; (d) sistema com biofiltros.



Fonte: de WILDE, 2010.

O aperfeiçoamento dos sistemas de camas biológicas ocorre conforme variações do clima e temperatura, possuindo sistemas de drenagem aberta, implantados onde o regime de chuvas é baixo, e a degradação do agrotóxico ocorre de forma mais rápida. Os sistemas de drenagem fechada, onde o resíduo é degradado por mais tempo, normalmente é adotado devido a uma probabilidade

maior de o resíduo sofrer lixiviação antes de ser decomposto (CASTILLO, TORSTENSSON, STENSTRÖM, 2008; DIEZ, 2010; FAIT et al., 2007; FOGG et al., 2003; KARANASIOS et al., 2010; ROFFIGNAC et al., 2008; SNIEGOWSKI et al., 2011; SPLIID, HELWEG, HENRICHSON, 2006; TORSTENSSON, 2000; VISCHETTI et al., 2008).

2.3.1 Elementos que compõem uma cama biológica

Além dos componentes básicos de uma cama biológica, o sistema pode contar com outros elementos, dependendo da necessidade do usuário. De acordo com Castillo, Torstensson e Stenstrom (2008), a eficiência de retenção e degradação dos agrotóxicos depende de cada um dos componentes do sistema, que pode apresentar a seguinte composição:

- ✓ Camada de argila: a argila tem baixa permeabilidade e alta capacidade de sorção, é usada como uma camada impermeável que auxilia a diminuir o fluxo de água para a parte inferior da cama biológica aumentando o tempo de retenção dos agrotóxicos. A pré-condição para uma camada de argila ser funcional é que esta deve ser úmida e inchada para evitar a formação de rachaduras e prevenir processos de fluxos preferenciais, pois pode ocorrer um fluxo preferencial se a argila secar por fora, por exemplo, por evapotranspiração ou por pausa no fluxo capilar de água, tais condições podem surgir quando uma camada de drenagem é colocada por baixo da camada de argila, como no caso dos sistemas permeáveis.

- ✓ Biomistura: deve ter a capacidade de reter e degradar os agrotóxicos, promovendo uma alta capacidade de ligação e atividade microbiológica. Estas duas propriedades são afetadas pela composição, homogeneidade, tempo de uso, umidade e temperatura da biomistura. Esta camada é a parte mais importante da cama biológica, sendo composta por 25% de turfa, 25% de solo e 50% de palha, misturados homogeneamente. Cada componente ocupa um importante papel na eficiência da retenção e degradação dos agrotóxicos, reduzindo a sua concentração, devido à degradação produzida pelos microorganismos que se encontram na mistura.

A escolha do material orgânico a ser usado como biomistura é crucial. A eficiência da biomistura na descontaminação depende da habilidade de adsorção do material e da presença de microorganismos ativos na biomistura, genotípica e

fenotipicamente versáteis para a degradação de diferentes resíduos mesmo em altas concentrações. Diferentes tipos de materiais orgânicos podem ser empregados na degradação dos resíduos de agrotóxicos, e a escolha está estritamente relacionada com a disponibilidade local e o custo. Dentre os materiais orgânicos disponíveis destaca-se a alta eficiência de algumas misturas orgânicas contendo material lignocelulósico devido à presença de fungos que são muito ativos na biodegradação de resíduos persistentes (COPPOLA et al, 2011).

✓ Cobertura vegetal: camada de grama que contribui grandemente para o aumento da eficiência da cama biológica, especialmente na parte superior da biomistura onde a maioria dos agrotóxicos são retidos e degradados, e controlando a lixiviação dos agrotóxicos que apresentam maior mobilidade, mantendo a umidade da biomistura. Dessa forma, favorecendo a evapotranspiração e permitindo uma maior degradação à nível da raiz pelas enzimas peroxidases. Também ajuda a regular a mistura do sistema por criação de um transporte de água para cima. Uma biomistura em sistemas sem camada de grama e turfa pode ser difícil de ser balanceada.

✓ Cascalho: cobertura de pedras pequenas de aproximadamente 10 cm de espessura localizada no fundo da cama biológica, entre a biomistura e a cobertura impermeabilizante. Atua como um filtro para evitar que resíduos orgânicos provenientes da biomistura possam entupir o sistema de drenagem e recirculação.

✓ Areia: cobertura com aproximadamente 5,0 cm de espessura que exerce a função de filtragem, mais eficiente que o cascalho e mais fino que a argila; sua utilização é opcional.

✓ Sistema de impermeabilização: Consiste em um revestimento das paredes e do fundo do fosso, por concreto ou outro material impermeável. Este revestimento tem a função de atuar como uma barreira para evitar o contato dos agrotóxicos com o solo adjacente à cama biológica. Sobre este revestimento se instala uma geomembrana que atua como um filtro dos líquidos percolados.

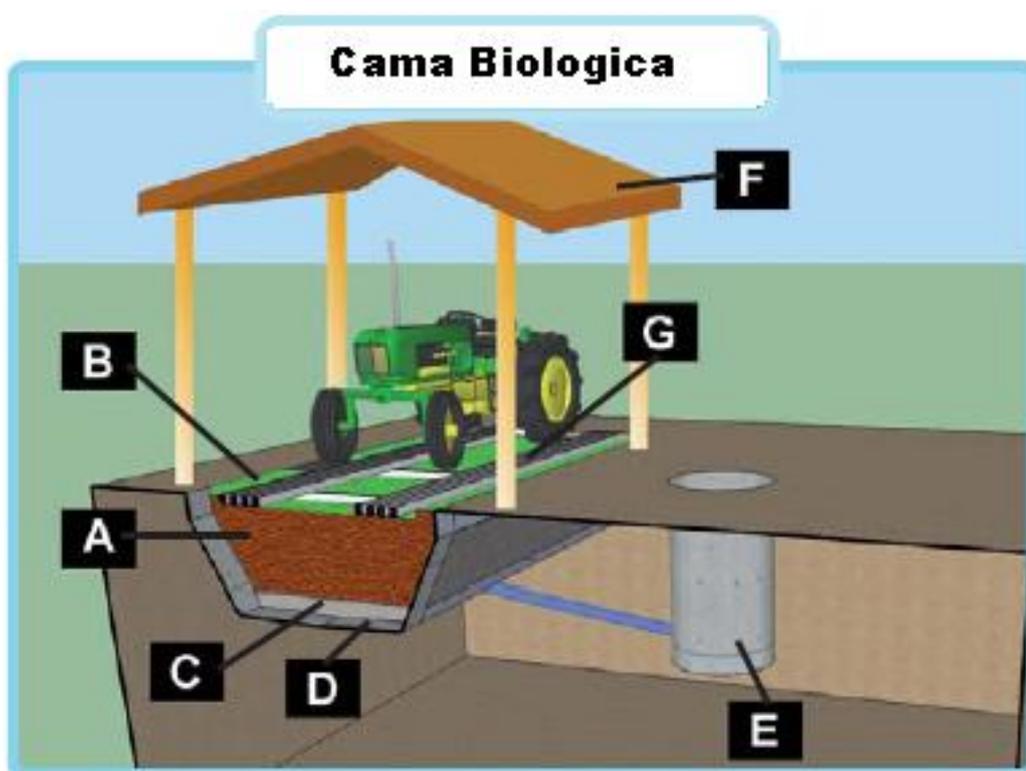
✓ Sistema de suporte: Consiste em uma estrutura metálica, onde o equipamento será apoiado, desde que suporte o seu peso.

✓ Sistema de recirculação: Consiste em um poço com revestimento de concreto conectado ao sistema da cama biológica e a uma bomba, cuja função

principal é receber e conter os líquidos percolados desde a biomistura, fazendo com que eles circulem novamente pela cama biológica.

✓ Teto de proteção: Consiste em uma estrutura que tem a função de proteger a cama biológica de chuvas, evitando a saturação da biomistura com excesso de água. Na Figura 6 pode ser visualizado cada componente da cama biológica.

Figura 6 – Componentes de uma cama biológica. Biomistura (A), cobertura vegetal (B), camada de cascalho (C), sistema de impermeabilização (D), sistema de recirculação (E), teto de proteção (F), sistema de suporte para a máquina ou implemento agrícola (G)



Fonte: (PROYECTO D09R1006, 2013).

2.3.2 Componentes da Biomistura

A principal função da biomistura é promover uma flora microbiana robusta com uma capacidade eficiente e durável de degradação de agrotóxicos. Portanto, quando se altera a composição original no sistema de camas biológicas sem considerar sua proporcionalidade e componentes, pode ocorrer um enfraquecimento

funcional, podendo levar a uma diminuição na taxa de degradação dos agrotóxicos e ao acúmulo de metabólitos, os quais podem ter efeitos tóxicos na quantidade microbiana e em sua atividade (VISCHETTI et al., 2007).

A biomistura é constituída basicamente de três compostos: o solo, a turfa e a palha, podendo ou não ocorrer alteração desses elementos. O solo corresponde a 25% da composição da biomistura e é extraído até 20 cm de profundidade da superfície da terra, sem a camada de vegetais e de um mesmo lugar da propriedade. Os solos mais adequados para o uso em camas biológicas são aqueles que possuem alto teor de matéria orgânica, sendo possível o uso de solos arenosos. Recomenda-se evitar o uso de solos com grande quantidade de argila, pois estes diminuem a biodisponibilidade dos agrotóxicos, dificultam a homogeneização na biomistura e tendem a interagir com a água, afetando o movimento dos líquidos no sistema (CASTILLO, TORSTENSSON, STENSTRÖM, 2008).

A função do solo é reter os agrotóxicos, dependendo de seu pH e conteúdo de matéria orgânica, por isso deve ter um conteúdo de terra vegetal que promova a atividade microbiológica, assim como uma fonte importante de microorganismos que participem ativamente da degradação dos agrotóxicos, os quais possam agir sinergicamente com os fungos. A presença de bactérias no solo pode aumentar a degradação dos agrotóxicos assim como ocorre com outros poluentes orgânicos.

A turfa é um material orgânico esponjoso proveniente de um tipo de musgo extraído de sedimentos naturais, e em geral contém carbono, oxigênio, hidrogênio e nitrogênio. Possui uma grande capacidade de absorver água, contribuindo para manter a umidade do sistema, controle de mistura e também tem a função de adsorver os agrotóxicos para facilitar sua degradação pelos microorganismos além de contribuir para a regulação do pH (CASTILLO, TORSTENSSON, STENSTRÖM, 2008; VISCHETTI et al., 2004, 2007).

O elemento mais abundante na biomistura é a palha, que é o principal substrato para a degradação de agrotóxicos e atividade microbiológica, cuja função é estimular a atividade de fungos da podridão branca (Figura 7), com capacidade de degradar a lignina, através da formação de enzimas como as peroxidases e as lacases (CASTILLO et al., 2001; COPPOLA, et al., 2007; VISCHETTI et al., 2007), uma vez que a grande especificidade destas enzimas as torna adequadas para a degradação de misturas de agrotóxicos.

A palha é um material orgânico com alto teor de lignina e celulose, obtida no campo, principalmente como resíduo de colheita de palha de trigo, aveia ou arroz (CASTILLO, TORSTENSSON, STENSTRÖM, 2008). Apesar da facilidade de se obter a palha em resíduos de colheita, sua obtenção nem sempre é possível em fazendas com atividade frutícola ou florestal, de tal forma que esta pode ser substituída por serragem, casca de cevada ou casca de aveia. Entretanto, deve-se ter um cuidado especial, pois estas substituições totais ou parciais modificam as características da biomistura (PROYECTO D09R1006, 2013).

Figura 7 – Imagem do fungo da podridão branca.



Fonte: CASTILLO, TORSTENSSON, STENSTRÖM, 2008.

2.3.3 Fatores que afetam o desempenho das camas biológicas

A decomposição biológica de agrotóxicos é a forma mais importante de remover estes compostos do ambiente, pois os microorganismos têm a habilidade de interagir, química ou fisicamente, com as substâncias, causando mudanças estruturais ou completa degradação das moléculas alvo. Entre a comunidade microbiana, bactérias, fungos e actinomicetos são os principais responsáveis pela degradação dos agrotóxicos, sendo que os fungos geralmente biotransformam os agrotóxicos em outros xenobióticos, pela introdução de pequenas mudanças na estrutura molecular, liberando um produto não-tóxico no solo, onde este pode ser suscetível à degradação por bactérias (DIEZ, 2010).

A degradação dos agrotóxicos é principalmente determinada pelas propriedades da biomistura, enquanto a camada de grama contribui indiretamente para a degradação através da regulação do balanço de água para o processo

biológico na biomistura. Uma biomistura ideal deve promover a sorção de agrotóxicos e uma flora microbiológica robusta e eficiente, com capacidade de degradação tolerante a altas concentrações de agrotóxicos, em aplicações repetidas e em misturas variadas (CASTILLO, TORSTENSSON, STENSTRÖM, 2008).

Fatores como composição da biomistura, homogeneidade, tempo de vida das camas biológicas, temperatura, fluxo, concentração de efluentes e profundidade da cama são parâmetros fundamentais para o funcionamento das camas biológicas, conseqüentemente é importante estabelecer a proporção da biomistura que vai fornecer a mais alta eficiência em sorção e degradação (DIEZ, 2010).

2.3.3.1 Efeitos da composição da biomistura na degradação dos agrotóxicos

A composição da biomistura é crucial para a sorção de agrotóxicos e o tipo de atividade microbiológica prevalente envolvendo a quantidade, a atividade e a versatilidade genotípica e fenotípica dos microorganismos responsáveis pela degradação dos agrotóxicos e seus metabólitos. A biomistura consiste em palha, turfa e solo, e a introdução de outros sistemas bioprofiláticos frequentemente resultam em modificações deste conteúdo original.

Podem ocorrer interações quando vários agrotóxicos são degradados, como competição por enzimas degradantes ou inibição da degradação de certos agrotóxicos devido à formação de metabólitos tóxicos pela degradação de outros agrotóxicos presentes. Por exemplo, TCP, um metabólito do clorpirifós, possui atividade antimicrobiana e pode inibir futuras degradações do clorpirifós e outros processos (CASTILLO, TORSTENSSON, STENSTRÖM, 2008).

De acordo com Vischetti et al. (2004) e Castillo, Torstensson e Stenström (2008), turfas com maior conteúdo de matéria orgânica e maior acidez favorecem o crescimento de fungos que degradam agrotóxicos, mas uma proporção de turfa maior do que 50% diminui a atividade microbiológica, talvez por tornar o pH muito baixo e diminuir a disponibilidade de água. Níveis de turfa de 25% por volume fornece um pH próximo ao adequado (pH=9) para os fungos que degradam lignina. O volume final de 25% na mistura no sistema de camas biológicas é feita no solo vegetal, o qual contribui na capacidade de sorção e degradação dos agrotóxicos pelos microorganismos, especialmente aqueles com a habilidade de degradar metabolicamente (VISCHETTI et al., 2004). Um fator importante que frequentemente

ativa o sistema de degradação por ligninas pelos fungos é a limitação de nutrientes, especialmente a deficiência de nitrogênio, portanto não se recomenda a adição de plantas com este nutriente na biomistura, como por exemplo as leguminosas.

Devido à baixa disponibilidade, elevado custo e a limitada sustentabilidade como substrato renovável, o uso da turfa tem sido proibido na Europa (OMIROU et al., 2012) e também na China. Uma alternativa para substituir a turfa é a utilização de carvão vegetal, também chamado de biocarvão, obtido por combustão de material vegetal, o qual possui uma elevada capacidade de adsorção de contaminantes orgânicos, além do baixo custo e disponibilidade, podendo ser produzido localmente (PROYECTO D09R1006, 2013). Na China, uma das adaptações mais frequentes para substituir a turfa é usar recursos locais que exerçam a mesma função, como o substrato de cogumelo, uma vez que a China é o maior consumidor de cogumelos do mundo, e que este é um resíduo sólido remanescente após o cultivo orgânico de fungos comestíveis (GAO et al., 2015).

Vários compostos orgânicos tem sido testados como possíveis substratos na biomistura, dependendo da disponibilidade na região/país específico (KARANASIOS, TSIROPOULOS, KARPOUZAS, 2013). Em geral, materiais lignocelulósicos são mais vantajosos, pois são uma fonte disponível em fazendas, são persistentes e fornecem carbono, energia e nutrientes através da sua lenta degradação, sendo desnecessária a adição desses elementos na biomistura. Materiais orgânicos com baixo conteúdo de lignina ou alta taxa de nitrogênio podem não fornecer atividade microbiológica suficiente para a degradação dos agrotóxicos e seus metabólitos (CASTILLO, TORSTENSSON, STENSTRÖM, 2008).

Karanasios et al. (2010) utilizaram resíduos de cultura de girassol, folhas de oliveira, substratos de cogumelos, talos de uvas, cascas de laranja e espigas de milho para substituir a palha da biomistura, uma vez que estes produtos são facilmente encontrados na agricultura grega, em quantidades suficientes e com baixo ou nenhum custo e no lugar da turfa, foram testadas folhas de oliveira. Os talos de videira e os substratos de cogumelo mostraram alta capacidade de adsorção e degradação entre os substratos lignocelulósicos testados. Substratos com alto teor fenólico de olignocelulose devem ser evitados, pois mostraram levar a restrições na degradação.

Coppola et al. (2011) utilizaram podas de resíduos lenhosos depositadas no campo há 5 anos, misturadas com cortes de palhas de trigo. A composição da

biomistura foi de 60% de compostagem e 40% de palha de trigo. Os resultados sugerem que a biomistura orgânica é capaz de degradar a mistura de fungicidas que foram aplicados em várias etapas. Em estudo realizado na Costa Rica por Omirou et al. (2012) a composição da biomistura foi modificada, utilizando cascas de cítricos e semente de uvas no lugar da turfa. O substrato mostrou alta capacidade de dissipação de fungicidas, com total retenção dos agrotóxicos.

Coppola et al. (2006), compararam materiais orgânicos (compostagem urbana e de jardim individual ou misturados com cascas de frutas cítricas ou palha) com a mistura do modelo original. Encontraram maior teor de degradação dos agrotóxicos quando utilizaram compostagem de jardim na biomistura, do que com compostagem urbana e uma maior degradação acrescentando cascas de cítricos, provavelmente devido à presença da enzima peroxidase de manganês que degrada lignina, presente na biomistura composta por palha. Tortella et al. (2013) testaram espinhos de pinheiros, folhas de eucalipto e cascas de laranja. Foi observado um aumento significativo de degradação da atrazina, adicionando-se cascas de laranjas (98%) e folhas de eucalipto (95%), quando comparados ao sistema controle (biobed tradicional modelo Sueco).

Um estudo desenvolvido na Suécia demonstrou que os níveis de palha na biomistura se relacionam positivamente com o conteúdo de fenoxilases, com a respiração microbiana e com a degradação da maior parte dos agrotóxicos estudados (CASTILLO, TORSTENSSON, 2007). A atividade da enzima fenoxilase é maior com o conteúdo de palha, mas a alta concentração de turfa pode inibir a atividade da fenoxilase por vários mecanismos. A fenoxilase pode ocorrer na forma livre extracelular em solos e ser facilmente extraída de diferentes formas, mas também pode se ligar a complexos organominerais e ácido húmico. Uma vez que a degradação da turfa produz fenol, o qual pode atuar como um inibidor da fenoxilase, a turfa também pode favorecer a complexação da fenoxilase com o ácido húmico e preservar no solo, e o ácido húmico pode também reduzir a atividade da fenoxilase (VISCHETTI et al., 2004).

Em outros estudos, também se observou que a presença de um material lignocelulósico na biomistura é indispensável para a completa degradação de muitos agrotóxicos, sobretudo aqueles com anel aromático que tem a degradação atribuída ao sistema de enzimas degradantes de lignina, porque ocorre uma ação microbiana mais robusta em comparação com biomisturas compostas com outros tipos de

materiais orgânicos (CASTILLO et al., 2001; CASTILLO, TORSTENSSON, 2007; COPPOLA et al., 2007; VISCHETTI et al., 2007).

Há pouca compreensão sobre a aplicação de xenobióticos e de como a presença microbiana e sua atividade influencia a taxa de biodegradação de agrotóxicos. Vários esforços têm sido feitos para isolar novos microorganismos que são capazes de degradar diferentes xenobióticos orgânicos e o estado atual do conhecimento é derivado principalmente de estudos de culturas sobre os microorganismos individuais degradando agrotóxicos individuais, mas a degradação de agrotóxicos em material orgânico geralmente envolve a conversão bioquímica dos agrotóxicos por consórcios microbianos (COPPOLA et al., 2011).

Assim, a degradação microbiana de agrotóxicos em camas biológicas pode ser vista como o resultado final de um complexo e interativo processo de funções metabólicas e co-metabólicas. A importância de cada processo depende das características de cada agrotóxico, mas pode ser regulada pela composição da biomistura (KARANASIOS, TSIROPOULOS, KARPOUZAS, 2012). Todos estes dados comprovam que é possível alterar a composição original da cama biológica por substratos ambientalmente e economicamente mais viáveis, e ao mesmo tempo, manter ou ainda aumentar a eficiência de degradação dos agrotóxicos.

Outro fator chave na eficiência das camas biológicas é o manejo da água, definida como a frequência e a intensidade da carga de águas residuais em processos de biopurificação (camas biológicas). Um estudo realizado por de Wilde et al. (2010), mostrou que o fluxo de água afeta fortemente a capacidade de retenção da biomistura com turfa e sugeriu que uma carga de água média de 12,5 L m³ no sistema poderia ser suficiente para a retenção eficaz de agrotóxicos.

2.3.4 Manutenção das camas biológicas

Devido à decomposição natural que afeta a palha e a compactação natural da biomistura, sua altura diminui aproximadamente 10 cm por ano, portanto, é necessário agregar biomistura fresca novamente à cama biológica e repor a cobertura da grama antes de começar a utilização em cada temporada de aplicação de agrotóxicos. Estima-se que o funcionamento ótimo de uma biomistura seja de 4 a 5 anos, podendo chegar de 6 a 8 anos, motivo pelo qual ao fim deste período deve-

se refazer a biomistura, procedimento que deve ser planejado de 2 a 3 meses antes da temporada de aplicação dos agrotóxicos para que a biomistura se estabilize.

O período onde ocorre a maior concentração do agrotóxico nas camas biológicas é durante a aplicação destes nas lavouras. Uma vez ocorrido o derrame, os agrotóxicos são retidos na parte superior do sistema e a maior parte é degradada dentro de um período de um ano. Níveis de concentração dos agrotóxicos abaixo dos limites de detecção são encontrados nas partes inferiores, sugerindo um transporte mínimo até o fundo da cama biológica (CASTILLO, TORSTENSSON, STENSTROM, 2008).

É importante considerar que a biomistura removida da cama biológica pode conter quantidades de resíduos de agrotóxicos, por este ter sido utilizado recentemente e muitos agrotóxicos serem degradados lentamente (SPLIID, HELWEG, HENRICHSON, 2006; VISCHETTI et al., 2008). Possíveis formas de lidar com este material incluem dispersão, deposição em aterro ou incineração. Algumas destas técnicas podem levar à depuração completa do substrato, mas são bastante caras, como é o caso da incineração, além disso, não podem ser considerados processos terminais, pois incluem transferência do contaminante para outro meio (TORSTENSSON, 2000).

Para a compostagem da biomistura deve-se ter o cuidado de adequar o percentual de umidade, com tempo de compostagem entre 6 e 12 meses, após este tempo, o material compostado pode ser descartado na propriedade de forma segura, podendo ser empregado como adubo suplementar (GEBLER, 2011). No entanto, ainda não há relatos sobre o impacto desta prática na diversidade e na função dos micro-organismos do solo, considerando seu papel fundamental como condutores dos principais ciclos geoquímicos. Esta é uma área de pesquisa futura considerando a introdução de ferramentas moleculares avançadas que permitam um melhor conhecimento da ecologia e funções dos micro-organismos do solo (KARANASIOS, TSIROPOULOS, KARPOUZAS, 2012).

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

A umidade das camas biológicas é de grande importância uma vez que afeta a disponibilidade de oxigênio, a atividade microbiológica e a supersaturação do sistema podendo causar lixiviação dos agrotóxicos. A supersaturação pode ocorrer, por exemplo, se o pulverizador é lavado sobre o sistema. Na Suécia, os reatores são empregados exclusivamente para manusear agrotóxicos concentrados e para enchimento dos equipamentos pulverizadores. Durante o período de vegetação, a lavagem dos pulverizadores, assim como dos tratores, deve ser feita no campo (CASTILLO, TORSTENSSON, STENSTROM, 2008; COPOLLA et al., 2007).

2.3.5 Perspectivas futuras - Camas biológicas como uma alternativa para o tratamento de efluentes agroindustriais

Até o momento, o uso de sistemas de camas biológicas é restrito aos efluentes contaminados por agrotóxicos, produzidos pelas atividades de manejo e lavagem de máquinas agrícolas. Contudo, as atividades agroindustriais alternativas produzem efluentes contaminados com altas cargas de agrotóxicos. Um exemplo disto é o tratamento pós-colheita de frutas, que produz grandes volumes de águas residuais, as quais contêm elevadas concentrações de fungicidas e antioxidantes, usados para proteger as frutas da deterioração durante o armazenamento, e constituem uma fonte séria de contaminação dos recursos hídricos naturais (CASTILLO et al., 2000; KARAS et al., 2015).

Apesar da grande produção de efluentes contaminados, o único sistema de depuração disponível atualmente é baseado em adsorção de agrotóxicos em carvão ativado granular (CARNIEL, 2015; KARAS et al., 2015). Este sistema reduz a concentração de contaminantes em até 7000 vezes, no entanto, o elevado custo para a sua construção e manutenção, além da avançada tecnologia de operação impede a implementação em instalações de embalagem de frutas. Na ausência de sistemas apropriados, estes lugares de empacotamento de frutas acabam por descarregar seus resíduos de águas contaminadas no sistema de tratamento de águas municipais, em campos abandonados ou lagoas de evaporação (GAO et al., 2015).

Assim, torna-se necessário um sistema eficiente, de baixo custo e sustentável para a depuração dos efluentes que recebem esses resíduos, que normalmente continuam contaminados com alguns agrotóxicos resistentes ao tratamento

municipal (GAO et al., 2015). Os sistemas de biopurificação do tipo cama biológica podem oferecer uma solução integrada para o tratamento de águas residuais provenientes da exploração e pós-colheita na produção de frutas. Portanto, com os elevados volumes de águas residuais (25-100 m³) produzidos pela indústria de embalagens de frutas, dentro de um curto período de tempo (3-4 meses), fazem-se necessária a adaptação deste sistema bem como rotinas de gestão da água e conteúdo da biomistura para depurar efetivamente estes efluentes (KARANASIOS, TSIROPOULOS, KARPOUZAS, 2012).

2.4 LIMITES MÁXIMOS RESIDUAIS (LMR)

Limite máximo residual (LMR) é definido pela legislação nacional como a quantidade máxima de resíduos de agrotóxicos legalmente aceita nos alimentos, geralmente expressa em mg Kg⁻¹, em decorrência da aplicação adequada de um produto numa fase específica da cultura, desde a sua produção até o seu consumo. No caso dos ditiocarbamatos, os LMRs são expressos em mg CS₂ Kg⁻¹, uma vez que todos os compostos pertencentes à classe dos ditiocarbamatos formam CS₂ quando degradados (ANVISA, 2011).

O Comitê do *Codex Alimentarius*, autoridade de referência mundial que desenvolve normas alimentares, regulamentos e práticas sobre resíduos de agrotóxicos, que é formado pela FAO (*Food and Agriculture Organization of the United Nations*) e pela Organização Mundial de saúde (OMS) foi criado em 1966 com o objetivo de estabelecer LMRs aceitáveis, uma vez que é inevitável a presença de muitos destes compostos químicos nos alimentos. Desde 2005, esses limites são uma referência obrigatória no comércio mundial de produtos agrícolas, podendo variar de país para país, sendo condicionados quer pelas práticas agrícolas, quer pelos hábitos alimentares (NOBREGA, 2014).

A definição de agrotóxico pelo *Codex Alimentarius* é muito semelhante à da legislação brasileira, sendo definido como a concentração máxima de resíduo de um agrotóxico (expresso em mg kg⁻¹) legalmente permitido no alimento ou na ração animal. Os valores de LMRs para agrotóxicos, estabelecidos pelo *Codex Alimentarius* são baseados em dados de resíduos, obtidos principalmente a partir de testes supervisionados. Esses dados podem variar consideravelmente de região pra região, por apresentarem diferentes necessidades para o controle local das

infestações, resultando em diferentes quantidades e tipos de resíduos nos alimentos. Dessa forma, o *Codex* considera o máximo possível essas variações para o estabelecimento de seus LMRs, desde que haja dados disponíveis que possam dar suporte a essa ação (FAO, 2005).

Os LMRs especificados pela legislação brasileira para agrotóxicos podem ser diferentes quando comparados com os LMRs de outros órgãos internacionais como o *Codex Alimentarius*, dessa forma, para produtos destinados à exportação, os LMRs a serem obedecidos devem ser os referentes aos países de destino do produto, que muitas vezes são bem menores que os estabelecidos para o mercado brasileiro (KUSSUMI, 2007).

O emprego correto e eficaz dos agrotóxicos na agricultura deve ser feito considerando os riscos toxicológicos envolvidos na aplicação, de modo que os resíduos sejam menores possíveis e dentro dos LMRs aceitáveis. A observância do período de carência, que corresponde ao intervalo entre a última aplicação e a colheita, pode prevenir o aparecimento de resíduos de agrotóxicos superiores aos LMRs, pois quando isso ocorrer significa que houve violação das Boas Práticas Agrícolas (BPA). Se os LMRs são excedidos, comparados à exposição da Ingestão Diária Aceitável (IDA) e/ou dose de Referência (DRf), serão indicativos de um possível risco de contaminação crônica ou aguda e os alimentos ou produtos agrícolas que estão de acordo com os LMRs são considerados toxicologicamente aceitáveis (KUSSUMI, 2007).

O objetivo principal das legislações ao estabelecer um LMR é garantir, com certa segurança, que a população consuma alimentos com níveis de resíduos de agrotóxicos dentro dos limites estabelecidos, não devendo, segundo os conhecimentos científicos atuais, ter nenhum problema de saúde associado a esta ingestão (CAJKA, 2008; KUSSUMI, 2001) e ainda regular o comércio internacional. Uma forma crucial de efetuar esse controle é a realização de monitoramentos de resíduos de agrotóxicos para avaliar os riscos apropriados da exposição humana através da alimentação (HIEMSTRA, KOK, 2007).

2.5 MÉTODOS CROMATOGRÁFICOS PARA ANÁLISE DE AGROTÓXICOS

Com os LMRs dos agrotóxicos em alimentos em queda, aumenta-se a demanda por alimentos de melhor qualidade por parte do governo e consumidores, direcionando as análises de agrotóxicos para metodologias mais sensíveis e adequadas, possibilitando a realização de medidas de segurança mais robustas, aumentando a proteção do consumidor. Por esta razão, há uma necessidade de desenvolvimento de métodos analíticos sensíveis e confiáveis que sejam capazes de quantificar um grande número de compostos em baixos limites determinados pela legislação (DEHOUCK, 2015).

A determinação de agrotóxicos consiste em várias etapas: amostragem, processamento da amostra (extração dos analitos e purificação, quando necessário) e análise instrumental (identificação e quantificação). Diante de um processo tão complexo, a escolha de um método analítico correto para este tipo de determinação é de extrema importância (KUSSUMI, 2007), devendo ser sensível o suficiente para cobrir não somente os limites permitidos pela legislação, mas também a detecção de substâncias já proibidas, especialmente para compostos potencialmente genotóxicos e carcinogênicos (RIDGWAY, LALLJIE, SMITTE, 2007).

Nesse contexto, a cromatografia, associada a detectores modernos, como a espectrometria de massas, é a técnica mais amplamente empregada para a separação, identificação e quantificação de agrotóxicos (PINHO, NEVESSI, QUEIROZ, 2009). Na década de 60, a cromatografia gasosa (GC, do inglês *Gas Chromatography*), utilizando colunas recheadas, foi adotada devido a sua capacidade de análise multirresíduo de agrotóxicos. Através do desenvolvimento de colunas capilares e detectores mais seletivos e mais sensíveis, aumentou-se o número de agrotóxicos detectados em uma única análise (POZZEBON, 2002), devido a estas características, a GC tornou-se uma das técnicas mais amplamente empregada para análises de resíduos de agrotóxicos (TADEO et al., 2000).

2.5.1 Métodos individuais

A forma mais comum e eficiente para a execução de análises de resíduos de centenas de diferentes compostos é através do emprego de métodos multirresiduais (MMRs), que são capazes de alcançar LMRs da ordem de 0,01 a 10 $\mu\text{g kg}^{-1}$. No

entanto, muitos destes métodos multirresiduais não conseguem analisar todos os agrotóxicos com a exatidão requerida em uma única análise devido à alta diversidade na composição química dessas centenas de agrotóxicos, o que compromete o uso de uma única estratégia para análise simultânea. Isso explica porque em alguns casos ainda é necessário o desenvolvimento de métodos individuais para a análise de apenas um composto ou um pequeno grupo de compostos com estrutura química semelhante.

Os fungicidas DTC representam um dos grupos mais complexos para serem determinados, sendo muito difícil incluí-los no escopo de um método multirresíduo, dessa forma estes compostos são analisados apenas individualmente, devido à sua alta instabilidade na presença de umidade e oxigênio, baixa solubilidade em água ou solventes orgânicos polares, e a necessidade prévia de hidrólise para a quantificação do CS₂ (GRIMALT, DUHOCK, 2016). Na determinação de DTC, além da escolha de métodos sensíveis, devem-se ter cuidados especiais durante o preparo da amostra, para não ocorrer perdas significativas (GARCINUNO, FERNÁNDEZ-HERNANDEZ, CÁMARA, 2004a).

Um cuidado importante é em relação à presença natural de CS₂ em algumas culturas, o que pode fornecer resultados errôneos (falso positivo), como ocorre com os vegetais pertencentes à família das *Brassicaceae*, principalmente a couve-flor e o repolho, que devido à presença de compostos contendo enxofre, podem gerar naturalmente CS₂. A formação endógena do CS₂ e outros compostos voláteis que contém enxofre como sulfeto de carbono é devido à degradação natural de isotiocianatos, os quais derivam de uma degradação enzimática de glicosinolatos, presentes em plantas dicotiledôneas (ABARKELI, 2015).

Frente à utilização dos DTC em larga escala em uma ampla variedade de culturas agrícolas, muitos métodos analíticos estão sendo desenvolvidos para permitir tais determinações, em diferentes amostras, empregando técnicas variadas (BERRADA et al. , 2010). Segundo Araújo (2001), o método mais antigo para a determinação de DTC encontrado na literatura foi desenvolvido por Clarke et al. em 1951, o qual se resume nas seguintes etapas: a) decomposição ácida dos DTC para gerar CS₂; b) absorção do CS₂ em solução alcoólica de KOH, onde ocorre a formação de xantano e; c) determinação do xantano através da titulação com iodo. Desde então, diversos métodos foram propostos para esta finalidade, quer seja

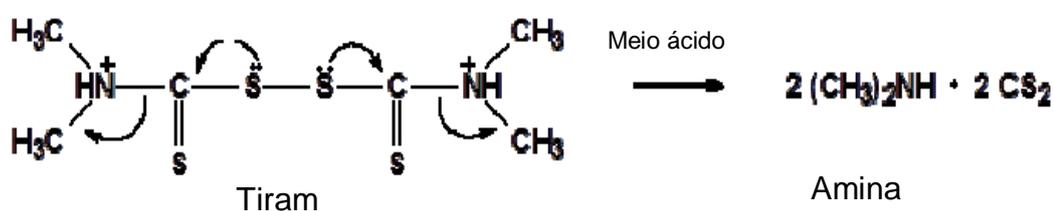
determinação direta, através da determinação dos próprios compostos da classe dos ditiocarbamatos, ou na forma de CS₂.

Quase a totalidade destes métodos estão baseados na hidrólise dos ditiocarbamatos em meio ácido (HCl) na presença de SnCl₂, proposto originalmente por Keppel em 1971, no qual o CS₂ é absorvido em uma solução contendo amina para formar um complexo que é medido espectrofotometricamente. Muitas modificações em relação ao método original estão relatadas na literatura, principalmente em relação ao pré-tratamento da amostra, objetivando reduzir o tempo de análise e as dificuldades do método de Keppel, visto ser este um método trabalhoso, além da preocupação ambiental, uma vez que o método original utiliza acetato de chumbo.

Uma variação deste método envolve a dissolução do CS₂ em uma camada de solvente orgânico (como por exemplo, o isoctano) com subsequente análise por GC (COLDWELL, PENGELLY, RIMMER, 2003; MUJAWAR et al., 2014). No entanto, a metodologia analítica aplicada para se analisar ditiocarbamatos em alimentos não discrimina entre os compostos empregados nas culturas. Os resultados são então expressos em termos de dissulfeto de carbono (CS₂), que é derivado de qualquer DTC presente (ABAKERLI et al., 2015).

A partir de um mol de qualquer ditiocarbamato, sob condições ácidas e sob alta temperatura, ocorre a formação de dois mols de CS₂ (HILL, 1992). Na Figura 8, está exemplificada a quebra da molécula de tiram, em meio ácido, gerando duas moléculas de CS₂ (WHO, 1988).

Figura 8 – Hidrólise ácida de tiram formando amina e CS₂.



A conversão entre a massa de qualquer DTC em CS₂ pode ser obtida através da Equação 1 (KEPPEL, 1971).

$$\text{CS}_2 \text{ (1 mg)} = \frac{\text{MM p.a.}}{2 \times \text{MM CS}_2} = \frac{\text{MM p.a.}}{152} \quad (1)$$

Onde:

MM = Massa Molecular

p.a. = princípio ativo da classe dos ditiocarbamatos

Muitos métodos para determinação de CS₂ presentes na literatura são baseados na análise espectrofotométrica (BOHRER, NASCIMENTO, GOMES, 1999; CALDAS et al., 2004; KESARI, GUPTA, 1998; MALIK et al., 2000; PIZZUTTI et al., 2007) e na espectrofotometria UV-Vis (BERRADA et al., 2010; KAZOS, et al., 2007; VRYZAS, PAPADAKIS, PAPADOPOULOU-MOURKIDOU, 2002).

Há relatos também de análise por HPLC com detecção no ultravioleta (THOMPSON et al., 1983), por DAD (GARCINUNO, FERNÁNDEZ-HERNANDEZ CÁMARA, 2004a) ou por espectrometria de massas (BLASCO et al., 2002; BONNECHÉRE, HANOT, VAN LOCO, 2011; CRNOGORAC, SCHWACK, 2009) e nas análises por GC com o detector por captura de elétrons (ECD), com o detector fotométrico de chama (FPD com filtro para enxofre) (MUJAWAR et al., 2014), detector por armadilha de íons (ITD), detector fotométrico de chama pulsada (PFPD) (SILVA, 2011) e por espectrometria de massas (MS) (COLDWELL, PENGELLY, RIMMER, 2003; MUJAWAR et al., 2014).

2.5.2 Métodos multirresiduais

Métodos analíticos para análise de resíduos de agrotóxicos requerem constante otimização, primeiramente para a obtenção de melhores sensibilidade e seletividade, assim como menores limites de detecção e de quantificação (PELAJIC et al., 2016). As técnicas mais eficientes para análise de resíduos de agrotóxicos envolvem o emprego de métodos de extração multirresidual, que abrangem diferentes classes de agrotóxicos (ANASTASIADES, MASTOVSKA, LEHOTAY, 2003; DIEZ et al., 2006), permitem a determinação de um grande número de substâncias em apenas uma análise (LOZANO et al., 2016, UCLÉS et al., 2017) e são alternativas para a alta demanda por análise de resíduos de agrotóxicos, pois representam um monitoramento mais rápido e eficiente, resultando em um aumento na produtividade dos laboratórios, bem como, em uma redução do custo das análises (ANASTASIADES, MASTOVSKA, LEHOTAY, 2003; DIEZ et al., 2006; HERNANDEZ et al., 2006).

Estes métodos requerem utilização de procedimento único de extração e purificação, assim como, unificação das condições de separação cromatográfica (Diez, et al, 2006). Para serem considerados ideais, os métodos multirresiduais devem fornecer resultados satisfatórios de recuperação para um amplo espectro de agrotóxicos de diferentes polaridades; devem ser seletivos, no sentido de evitar a presença de compostos interferentes da matriz no extrato final; devem separar os analitos da fase aquosa; além de serem de baixo custo e seguros em termos de toxicidade (MASTOVSKA, LEHOTAY, 2004).

Os principais problemas encontrados no desenvolvimento destes métodos são as diferentes propriedades químicas e físicas dos analitos, a diversidade e a complexidade das matrizes onde estes possam estar presentes (LEHOTAY, 2002; MASTOVSKA, et al., 2005). No geral, a complexidade da matriz resulta em efeitos adversos à análise, necessitando de uma etapa de purificação antes da análise cromatográfica para a remoção de componentes indesejáveis presentes na matriz. No entanto, esta etapa adicional pode resultar em perdas do analito e aumentar o tempo e o custo da análise, além do fato de que etapas adicionais levam a fontes de erros adicionais (LEHOTAY, 2002). Portanto, o preparo de amostras é uma das partes mais importantes do procedimento analítico, devendo ser rápido, exato, preciso e econômico (PELAJIC et al., 2016).

A escolha do solvente também é um dos pontos fundamentais no desenvolvimento de um método multirresidual (HIEMSTRA, KOK, 2007; HERCEGOVÁ et al., 2007), preferindo-se o emprego de solventes ambientalmente amigáveis, seguros e menos nocivos quimicamente (LOZANO et al., 2016). Além disso, o solvente deve ser compatível com os analitos, com o preparo de amostra e se possível, compatível com o método cromatográfico empregado para evitar etapa de troca de solvente (HERCEGOVÁ et al., 2007; MASTOVSKA, LEHOTAY, 2004). Basicamente, esses três requerimentos significam que todos os analitos de interesse devem ser suficientemente solúveis e estáveis no respectivo solvente e o mesmo solvente deve ser usado no procedimento de extração e purificação para evitar etapa de troca de solventes e as propriedades do solvente devem permitir uma análise de uma diversidade de resíduos de agrotóxicos (HERCEGOVÁ et al., 2007).

Muitos métodos multirresiduais são desenvolvidos e disponibilizados na literatura, e os mais utilizados para determinação de agrotóxicos em frutas e vegetais envolvem extração inicial com os solventes orgânicos mais comumente

empregados (metanol, acetona, acetonitrila e acetato de etila) na extração de grande número de agrotóxicos em alimentos através de agitação mecânica ou homogeneização, frequentemente em misturas com água, diclorometano ou éter de petróleo, em pH ácido (ANASTASIADES, MASTOVSKA, LEHOTAY, 2003; CAJKA et al., 2008; DIEZ, et al, 2006; HERCEGOVÁ et al., 2007; HIEMSTRA, KOK, 2007; MASTOVSKA, LEHOTAY, 2004; PEJALIC et al., 2016). Cada um desses solventes de extração tem suas vantagens e desvantagens em termos de seletividade e eficiência, dependendo principalmente das características dos agrotóxicos em análise e do tipo de matriz onde serão analisados (HERCEGOVÁ, 2007; HIEMSTRA, KOK, 2007).

Os métodos de extração multirresiduais podem ser afetados por uma variedade de fatores, incluindo as características da amostra (pH, quantidade de água, lipídeos e açúcares), solvente utilizado para extração, razão amostra/solvente, procedimento de extração (método de agitação por exemplo), temperatura de extração, princípio de partição (adição ou não de solventes apolares e/ou sais), tempo gasto nas etapas de agitação, número de repetições e materiais utilizados na etapa de purificação. Estes métodos possuem muitas etapas analíticas, portanto, uma grande possibilidade de gerar erros e as chances de cometê-los aumenta à medida que aumenta o número de etapas em um método, assim, a tendência atual é o desenvolvimento de métodos cada vez mais simples com o mínimo de etapas.

Normalmente, a forma mais simples de melhorar a eficiência de um método analítico é reduzir a quantidade de amostra utilizada para uma quantidade mínima, a qual forneça resultados estatisticamente satisfatórios. Os métodos que utilizam quantidades excessivas de amostra requerem maiores volumes de solventes e conseqüentemente geram mais resíduos e gastos do que o necessário (ANASTASIADES, MASTOVSKA, LEHOTAY, 2003).

As tendências para os próximos anos, no que diz respeito a MMRs, é o uso de quantidades iniciais de amostras cada vez menores, técnicas mais seguras e menos agressivas ao meio ambiente, técnicas mais rápidas e menos laboriosas, mantendo altos valores de recuperação e boa precisão, reduzindo custos financeiros e minimizando o uso de solventes tóxicos (HERCEGOVÁ et al., 2007). Uma evolução nos métodos de extração juntamente com a melhora paralela das técnicas analíticas tem permitido a redução na complexidade do tratamento das amostras e tem aumentado a exatidão e precisão das análises (GRIMALT, DEHOUCK, 2016).

2.5.2.1 Método de extração Luke e mini-Luke

O primeiro método multirresíduo foi desenvolvido por Mills et al. na década de 60 para determinação de agrotóxicos organoclorados apolares em alimentos não gordurosos, o qual baseia-se na extração com acetonitrila e partição com uma mistura de acetonitrila/água. Nos anos 70, pesquisadores introduziram o cloreto de sódio no método de Mills para melhorar as etapas de extração e partição (HERCEGOVÁ et al., 2007; PICÓ, 2016).

No entanto, o desenvolvimento e aplicação de agrotóxicos com características mais polares, como os organofosforados e organonitrogenados, demandou novos métodos de extração multirresíduo que englobassem estes compostos. Em 1975, Luke et al. desenvolveram o método de Luke, o qual consiste na extração de 100 g de amostra utilizando acetona (200 mL), seguida de partição líquido-líquido com solventes apolares (éter de petróleo e diclorometano), sendo utilizados 100 mL de cada. Visando obter maiores percentuais de recuperação para os compostos polares, adicionou-se cloreto de sódio (NaCl) na fase aquosa para favorecer a transferência destes para a fase orgânica. A água co-extraída ainda presente na fase orgânica é retirada, em seguida, com adição de sulfato de sódio anidro (DIEZ et al, 2006; SCHENCK et al., 2002; LOZANO et al., 2016).

Em 1981, Luke et al. simplificaram o método, eliminando a etapa de purificação com florisil como consequência do surgimento da espectrometria de massas (DIEZ, et al., 2006) e nos anos 80 e 90 houve o desenvolvimento de métodos miniaturizados os quais conservaram as vantagens do método original de Luke, mas melhoraram alguns pontos críticos. Em 1987, o ministério da agricultura da Holanda (*Food and Consumer product Safety Authority, VWA*) desenvolveu em seu laboratório o método de extração mini-Luke, uma vez que neste método utilizam-se 30 mL de cada solvente do método original de Luke e elimina a etapa de particionamento com cloreto de sódio (KOK, HIEMSTRA, VREEKER, et al., 1987). O método consiste na extração de 15 g de frutas e vegetais já processados, adicionando acetona (30 mL) seguido de agitação em ultra-turrax por 30 s, sendo posteriormente adicionados éter de petróleo e diclorometano (30 mL cada), e realizando-se nova agitação nas condições descritas acima.

A água co-extraída ainda presente na fase orgânica é retirada pela adição de sulfato de sódio anidro, o extrato é centrifugado e a porção líquida é transferida para

frasco com tampa, sendo necessária uma etapa de evaporação antes da análise no sistema cromatográfico. A evaporação do extrato é realizada em banho de água (temperatura de 40°C, podendo ser aumentada até 62°C) até quase secura total, e o restante do solvente é evaporado à temperatura ambiente (LEHOTAY, et al, 2005).

A miniaturização desse método possibilitou a redução na quantidade de amostra, bem como de solventes utilizados, entretanto, alguns agrotóxicos mais polares apresentaram valores baixos de recuperação (< 70%). Para solucionar esse problema, nos anos 90, desenvolveu-se no VWA um método alternativo de extração, uma modificação do método mini-Luke, onde foi adicionado sulfato de sódio anidro na etapa de extração, melhorando a extração dos agrotóxicos polares e conseqüentemente, obtendo melhores valores de recuperação. Dessa forma, a etapa de particionamento com cloreto de sódio não se realiza desde a miniaturização do método de Luke pelo VWA, pois a adição dos solventes apolares (diclorometano e éter de petróleo) já é suficiente para uma separação bem definida entre a fase orgânica e a fase aquosa (HIEMSTRA, KOK, 2007).

Os solventes clorados, como diclorometano utilizado no método de Luke e mini-luke, constituem um risco ambiental e por isso, um problema no momento do descarte, representando uma importante desvantagem destes solventes. Os solventes miscíveis com a água, como acetona e acetonitrila, extraem tanto agrotóxicos polares quanto apolares de matrizes não gordurosas, promovendo a extração em uma única fase quando em contato com a matriz. No entanto, quando se utiliza extrações com acetona, é necessária a adição de solventes apolares para que ocorra a separação entre as fases, devido à maior dificuldade em separar misturas de água e acetona, o que pode resultar na diluição do extrato (MASTOVSKA, LEHOTAY, 2004; SCHENCK et al., 2002).

Em 2016, Lozano et al. desenvolveram a miniaturização do método mini-Luke, com a finalidade de reduzir ainda mais o volume de solvente utilizado e reduzir ou evitar solventes clorados. Este método foi denominado New Dutch mini-Luke (método NL) e foi validado e implementado na rotina no Netherlands Food and Consumer Product Safety Authority (Nederlandse Voedsel en Warenautoriteit, NVWA). O método NL extrai agrotóxicos polares e apolares, pois utiliza acetona como solvente de extração e subseqüentemente, éter de petróleo e diclorometano como solventes de partição (UCLÉS et al., 2017).

A modificação mais recente do método New Duch mini-Luke, foi realizada por Dias et al. (2017), os quais propuseram reduzir a quantidade de amostra e substituir a mistura diclorometano/éter de petróleo por isooctano/tolueno em volumes iguais ao método miniaturizado por Lozano et al. em 2016. O método otimizado por Dias et al. (2017) elimina a etapa de purificação e evaporação que geralmente é requerida quando são utilizados os solventes de extração mais comuns para análises em GC, como acetonitrila e mistura de acetona:DCM:éter de petróleo, antes da injeção no GC-MS/MS.

O método otimizado por Dias et al., (2017) foi tomado como base para o presente estudo pois oferece vantagens como velocidade de extração (não requer etapa de evaporação ou purificação), relativa limpeza dos extratos, embora não seja aplicada uma etapa de purificação, e a compatibilidade com detectores utilizados na cromatografia gasosa, seletivos e espectrometros de massas.

2.5.3 Métodos Cromatográficos para análise de agrotóxicos em camas biológicas

Os trabalhos publicados na literatura sobre camas biológicas estão relacionados a estudos de função microbiológica (VISCHETTI et al., 2007), estudos do efeito da composição e da temperatura da biomistura na degradação dos agrotóxicos em escala laboratorial (CASTILHO, TORSTENSSON, 2007) e principalmente na atividade microbiológica como respiração e conteúdo de fenoxilase (GAO et al., 2015). Há poucos estudos relatados sobre desenvolvimento de metodologias analíticas tanto para análise individual quanto para análise multirresidual (RIVERO et al., 2016; SPLIID, HELWEG, HEINRICHSON, 2006).

A maioria destes trabalhos publicados envolve a técnica de cromatografia líquida, como a HPLC-UV (KARAS et al., 2015; KARANASIOS, TSIROUPOULAS, KARPOUZAS, 2013; VISCHETTI et al., 2004) e a LC-MS/MS (SPLIID, HELWEG, HEINRICHSON, 2006), havendo relatos sobre o emprego de GC-ECD (GAO et al., 2015), GC-NPD (KARANASIOS et al., 2010) e GC-MS (TORTELLA et al., 2013).

Os métodos multirresiduais disponíveis nas análises de agrotóxicos em camas biológicas normalmente empregam grande quantidade de amostra (FOGG, BOXAL, 2004; VISCHETTI et al, 2004) e/ou volume de solvente (COOPER et al, 2016; COPPOLLA, CASTILHO, VISCHETTI, 2011; FOGG, BOXAL, 2004; SPLIID,

HELWEG, HEINRICHSON, 2006; VISCHETTI et al., 2004) incluindo solventes clorados (COOPER et al, 2016; VISCHETTI et al., 2004; COPPOLLA, CASTILHO, VISCHETTI, 2011), além disso, esses métodos são muito complexos, trabalhosos e demorados (COOPER et al, 2016; DIAZ et al., 2016; MUKHERJEE et al, 2016; SPLIID, HELWEG, HEINRICHSON, 2006; VISCHETTI et al., 2004; KARAS et al., 2015; KARANASIOS, TSIROUPOULAS, KARPOUZAS, 2013).

2.6 TÉCNICAS ANALÍTICAS

As técnicas analíticas tradicionalmente empregadas para análises multiresiduais de agrotóxicos em laboratórios analíticos modernos que permitem identificar e quantificar centenas de agrotóxicos em nível de traços em um grande número de matrizes complexas são a cromatografia gasosa e a cromatografia líquida, especialmente quando acopladas à espectrometria de massas (GC-MS e LC-MS) e em combinação com vários procedimentos de extração e purificação (UCLÉS et al., 2016; TSUCHIYAMA et al., 2017).

A combinação da espectrometria de massas com a cromatografia líquida ou gasosa faz com que os componentes das amostras sejam separados no tempo (LC ou GC) e tenham suas massas individuais analisadas (MS) para isolar, identificar e quantificar qualquer componente ionizável. Desta forma, o acoplamento LC-MS/GC-MS, tem sido utilizado em inúmeras aplicações em vários campos da ciência e da análise química para análise de uma enorme faixa de compostos orgânicos, desde pequenas moléculas como metabólitos e peptídeos, até moléculas maiores como, por exemplo, as proteínas (FERNANDEZ-ALBA, 2005; PRIMER, 2001).

2.6.1 Cromatografia Gasosa

A cromatografia gasosa (GC, do inglês *Gas Chromatography*) é uma técnica cromatográfica de separação com excelente poder de resolução na qual os compostos são separados baseados na sua volatilidade, na análise de compostos voláteis ou volatilizáveis, que sejam termicamente estáveis, com peso molecular relativamente baixo, como organoclorados, organofosforados e piretróides (PICÓ, 2016). Seu princípio de separação se baseia na diferente distribuição de substâncias

da amostra entre uma fase estacionária e a fase móvel (um gás) (COLLINS, BRAGA, BONATO, 2009).

Desde a sua introdução há mais de 60 anos, a cromatografia gasosa tornou-se um pilar dentre as técnicas da química analítica e com o surgimento das colunas capilares de sílica fundida, uma das maiores vantagens desta técnica é o seu poder de separação largamente empregado em análises de alimentos (HERCEGOVÁ et al., 2007). Métodos típicos em GC-MS utilizam colunas analíticas longas (30m x 0,25 mm i.d), o que geralmente requer corridas com tempo superiores a 30 min por amostra, especialmente em métodos multirresiduais com mais de 100 compostos (PICÓ, 2016).

A GC é uma técnica com eficiente capacidade de separação, a qual é complementada por detectores, hardware e software adequados para a sua aplicação em diferentes áreas (ZINI, 2009). No entanto, ainda apresenta o inconveniente de somente ser aplicada para a análise de substâncias voláteis e termicamente estáveis, caso contrário, necessita de uma etapa de derivatização do composto, o que nem sempre é viável.

GC-MS é provavelmente a técnica mais comum de determinação multirresidual na análise de agrotóxicos em produtos alimentares e ambientais (PELAJIC et al., 2016), sendo a análise por GC-MS/MS mais exata do que a análise apenas por GC-MS, pois a seletividade aumentada da técnica MS/MS reduz a interferência dos componentes da matriz e também permite o alcance de menores limites de detecção (HERCEGOVÁ et al., 2007).

Os detectores seletivos em GC são baseados nas diferentes propriedades de algumas moléculas/analito, como por exemplo, alguns átomos ou grupos funcionais (STASHENKO, MARTÍNEZ, 2010a). Os principais detectores empregados em GC são o detector por ionização em chama (FID, do inglês *Flame Ionization Detector*), o detector por captura de elétrons (ECD, do inglês *Electron Capture Detector*), o detector fotométrico de chama pulsada (PFPD, do inglês *Pulsed Flame Photometric Detector*) e o detector por espectrometria de massas (MS, do inglês *Mass Spectrometry*) (COLLINS, BRAGA, BONATO, 2009; SAMSIDAR et al., 2018).

O acoplamento das técnicas GC-MS é uma poderosa ferramenta, sendo quase perfeita para a análise multirresidual de alimentos e de várias outras amostras (STASHENKO, MARTÍNEZ, 2010b; PELAJIC et al., 2016), pois juntas proporcionam

uma excelente separação, detectabilidade e identificação estrutural dos compostos analisados (FERNANDEZ-ALBA, 2005).

2.6.2 Espectrometria de Massas (MS)

O uso de detectores clássicos torna as análises quantitativas mais limitadas de um modo geral, pois a identificação do analito através do seu tempo de retenção (t_R) característico pode gerar um grande problema, visto que vários compostos podem apresentar o mesmo t_R (LANÇAS, 2009).

A espectrometria de massas fornece alta especificidade baseada na estrutura molecular do analito (HERCERGOVÁ et al., 2007) e se destaca entre os possíveis detectores a serem utilizados em cromatografia líquida e gasosa, pela sua versatilidade de acoplamento em ambas as técnicas, combinando as vantagens da cromatografia como a alta seletividade e eficiência de separação com informações estruturais e aumento da seletividade, oriundos da espectrometria de massas (LANÇAS, 2009).

A espectrometria de massas é definida como o estudo da matéria pela formação de íons em fase gasosa e posteriormente caracterizados por um espectrômetro de massas de acordo com sua massa, carga, estrutura ou propriedades físico-químicas. O resultado de uma análise por MS se dá pela forma de um espectro, onde a abcissa corresponde à razão entre a massa e o número de carga do íon (m/z) e a ordenada está relacionada à sua intensidade. A m/z tem como unidade o Dalton (Da). Em virtude do alto grau informativo das análises, a MS pode ser utilizada tanto qualitativamente (ou seja, para identificação de composição elementar de compostos e elucidação estrutural) quanto como para análises quantitativas, em geral para determinar analitos à nível de traço em matrizes complexas (IGLESIAS, Waters, 2008). A formação de íons é uma etapa crítica de qualquer aplicação da MS, pois independentemente do analisador, a análise de massas requer íons (PRIMER, 2001).

Quando um analisador por MS é empregado, o modo de aquisição selecionado pode ser o monitoramento de íon selecionado (SIM, do inglês *Selected Ion Monitoring*) ou o modo full scan com monitoramento de m/z 50-600. No modo *full scan*, o analisador de massas monitora uma faixa de razão m/z e o cromatograma obtido nesse modo de aquisição é conhecido como cromatograma total de íons (TIC,

do inglês *Total Ion Chromatogram*) (GROSS, 2004; STASHENKO, MARTINEZ, 2010b). O modo *full scan* é normalmente empregado para análises qualitativas ou quantitativas, quando a informação espectral completa é considerada importante. Normalmente, o modo SIM é empregado para quantificação de um composto alvo, nas menores concentrações possíveis (LANÇAS, 2009).

No modo SIM, o analisador monitora um número limitado de íons que são indicativos de um composto específico, ou seja, monitora razão *m/z* específicas e para melhorar a identificação e a quantificação dos analitos, no mínimo de 2 a 3 íons devem ser selecionados (GRIMALT, DEHOUCK, 2016). O modo SIM é significativamente mais sensível do que o modo *full scan*, devido ao fato de um único íon, ou vários íons característicos do analito presente em uma mistura complexa, poderem ser selecionados e monitorados (STASHENKO, MARTINEZ, 2010b).

Quando se emprega MS em sequencia (MS/MS) para a aquisição de dados é possível selecionar o monitoramento de múltiplas reações (MRM, do inglês *Multiple-Reaction Monitoring*) o qual é um modo de aquisição muito seletivo. O principal problema para confirmar a identidade dos compostos nestes casos é a presença de interferentes isobáricos que são compostos com a mesma massa nominal e diferente estrutura química, mas a prática normal para confirmar a identidade dos compostos é selecionar vários fragmentos característicos. Assim, quando a forma em tandem MS/MS é selecionada, ocorre uma melhora na especificidade, porque se ocorrer a eluição de vários compostos de massa molecular idêntica, normalmente íons isobáricos podem ser distinguidos pelas reações MRM, porque a fragmentação na célula de colisão frequentemente resulta na produção de íons diferentes.

O modo de monitoramento de reações múltiplas (MRM) é um dos métodos de aquisição mais interessantes, pois proporciona especificidade, seletividade e detectabilidade ao detector de massas. Este modo de varredura consiste em selecionar uma reação de fragmentação, neste caso, tanto o primeiro quanto o segundo analisador são focalizados nas massas selecionadas, portanto, não há varredura, mas sim, algo que é o análogo ao modo SIM. Os íons selecionados pelo primeiro analisador serão detectados caso os mesmos produzam um dado fragmento, através de uma reação selecionada. A ausência de varredura permite que o equipamento focalize apenas no íon precursor e no fragmento, aumentando a detectabilidade para o monitoramento, que é associada a um aumento na seletividade (SILVA, 2011; STASHENKO, MARTINEZ, 2010b).

Os principais componentes de um espectrômetro de massas são a fonte de ionização, o analisador de massas e o detector conforme representado na Figura 9, sendo que estes componentes são operados sob condições de vácuo (PRIMER, 2001). A seguir, uma abordagem sucinta das fontes de ionização, analisadores de massas e detectores mais utilizados de forma geral e os utilizados neste estudo.

Figura 9 – Esquema das principais partes de um espectrômetro de massas, ilustrando a fonte de íons dentro de um sistema de baixa pressão (vácuo). Ionização por impacto de elétrons.



Fonte: adaptado de LANÇAS, 2013.

2.6.2.1 Ionização em cromatografia gasosa

A fonte de ionização é a parte do equipamento responsável por converter os analitos de interesse em íons em fase gasosa, pré-requisito fundamental para qualquer análise por MS. A compreensão dos mecanismos envolvidos na ionização de cada uma das fontes é de extrema importância, já que isso define quais são os analitos possíveis de serem analisados. A ionização pode ocorrer tanto no modo negativo quanto positivo, dependendo das características do analito de interesse, e em geral ocorre das seguintes formas:

- 1- Ejeção ou captura de elétrons formando espécies conhecidas como íon molecular (M^+ ou M^-);
- 2- Protonação ou desprotonação (adição ou remoção de um íon H^+), levando a formação de moléculas protonadas ou desprotonadas (IGLESIAS, Waters, 2008).

Os modos de ionização, mais empregados no acoplamento GC-MS são a ionização por impacto de elétrons (EI, do inglês *Electron Ionization*) e a ionização química, as quais operam sob baixa pressão, usualmente denominado vácuo.

A ionização química foi desenvolvida especialmente para aumentar a produção do íon molecular e reduzir fragmentações associadas à ionização por

elétrons. Essa característica é importante quando se busca avaliar a presença de diferentes compostos no espectro (por facilitar a visualização/atribuição das espécies) e determinar a massa exata do composto, necessitando-se de uma ionização mais suave, que não induza a fragmentação do analito (IGLESIAS, Waters, 2008).

Nesta técnica, as moléculas do analito, em fase gasosa, são introduzidas na câmara de ionização do espectrômetro de massas, que contém um gás reagente. Esta mistura, (moléculas do analito + gás reagente) é bombardeada com elétrons, assim como na EI. Mas, como o gás reagente está em excesso em relação ao analito (normalmente em proporção maior que 1000:1), ele é ionizado quase que exclusivamente e passam a ocorrer reações entre íons, em fase gasosa do gás reagente e as moléculas do analito, dando origem aos íons pseudo-moleculares do analito $[M^+H]^+$. Por esse processo ser relativamente de baixa energia, quase não é observado fragmentação (CHIARADIA, COLLINS, JARDIM, 2008).

Entretanto, quando se deseja obter informações estruturais ou aumentar a seletividade de métodos quantitativos, a fragmentação passa a ser desejada. Nesse caso, isso ocorre em condições muito bem controladas dentro do próprio MS, em dispositivos conhecidos como câmara de colisão ou dentro do próprio analisador (no caso do íon trap) (IGLESIAS, Waters, 2008).

No modo EI, o analito de interesse em fase gasosa é bombardeado por elétrons, com energia relativamente elevada (70 eV). As moléculas do analito absorvem esta energia desencadeando vários processos, dentre os quais o mais simples é aquele em que o analito é ionizado pela remoção de um único elétron (M^+). Este processo requer tipicamente 10 eV e o restante da energia gera fragmentação dos analitos, a fragmentação rápida pode conduzir a não observação do íon molecular no espectro, perdendo-se, portanto, umas das mais importantes informações analíticas oferecidas pela MS (CHIARADIA, COLLINS, JARDIM, 2008).

O modo EI é um processo direto, onde a energia é transferida dos elétrons para as moléculas das amostras, através das colisões. Este procedimento resulta numa fragmentação significativa das moléculas, cujo espectro resultante representa a abundância das várias razões massa/carga. O padrão espectral é usado para a identificação do composto, no entanto, para algumas amostras, talvez não haja seletividade suficiente no modo EI, pois a interferência causada por componentes da matriz pode dificultar a informação espectral (PRIMER, 2004). A EI é o modo de

ionização mais utilizado em GC-MS (90% de todos os trabalhos), uma vez que fornece um grande número de íons os quais permitem a identificação dos compostos em estudo (LANÇAS, 2009; PRIMER, 2004).

2.6.2.2 Analisadores de Massas

Dentre os principais componentes de um espectrômetro de massas (MS), o analisador de massas possui relevância particular pelo fato de ser o responsável pela seleção e/ou separação (ou ausência dela) dos íons, de acordo com a relação existente entre suas massas (m) e cargas (z), ou seja, a razão m/z de cada íon. As características de construção e operação diferem de um analisador para outro, assim como seus benefícios e limitações (LANÇAS, 2013; IGLESIAS, Waters, 2008).

A escolha do analisador de massas mais apropriado depende de fatores como a aplicação (faixa de massas desejada), o desempenho (resolução) bem como do custo, e em função desses fatores, não existe um analisador de massas que seja ideal para todas as aplicações. Os analisadores de massas mais comumente empregados na rotina de laboratórios de análise de resíduos de agrotóxicos em frutas e vegetais tem sido o triploquadrupolo (QqQ) e o trapeamento de íons (IT, do inglês *Ion Trap*), devido a seletividade, sensibilidade e rendimento destas técnicas (UCLÉS et al., 2016). Outros empregados são: quadrupolo; por tempo de voo (TOF, do inglês *Time of Flight*) e o quadrupolo-tempo de voo. Há ainda outros mais atuais como o analisador de ressonância íon-ciclotônica com transformador de Fourier (FT-ICR, do inglês *Fourier Transform Ion-Cyclotron Resonance Mass spectrometry*) (STASHENKO, MARTINEZ, 2010b).

O íon trap continua sendo empregado como uma alternativa ao single quadrupolo, mas atualmente é possível realizar combinações da maioria dos analisadores de massa, permitindo a realização de tandem-MS triplo-quadrupolo o que aumenta a sensibilidade e a selectividade dos métodos analíticos. Por esta razão, o analisador QqQ tem sido o mais frequentemente empregado na detecção por MS (GRIMALT, DEHOUCK, 2016; PICÓ, 2016).

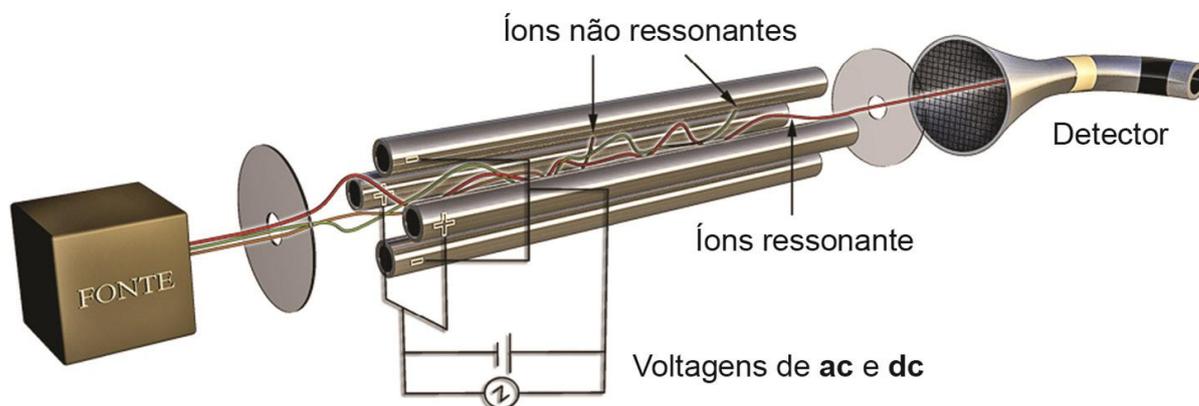
2.6.2.2.1 Quadrupolo e Triplo Quadrupolo

O quadrupolo é o analisador de massas mais popular no momento devido, principalmente, à sua simplicidade, preço relativamente baixo, boa linearidade em análises quantitativas, facilidade de ser entendido e operado (LANÇAS, 2013) e boa resolução e qualidade de espectro de massas (SILVA, 2011). Um quadrupolo é composto de quatro barras cilíndricas, usualmente de metal, dispostas em dois pares, nos quais se aplicam uma corrente contínua tipo DC (corrente direta) e um potencial RF (rádio frequência) por onde passam os íons formados na fonte de íons. Um par de barras é mantido em um potencial elétrico positivo e atua como um filtro para massas mais elevadas, enquanto que o outro, a um potencial negativo, que age como um filtro para massas menores, conforme a Figura 10.

Os quadrupolos operam a uma resolução constante (a qual depende da razão Rf/DC), mantendo a razão Rf/DC constante. Considerando-se uma dada amplitude para as voltagens Rf e DC, somente os íons que apresentarem determinada razão massa/carga (m/z), que esteja em ressonância com o campo aplicado, irão passar pelas barras do quadrupolo e serão detectados. Os demais íons que entrarem no quadrupolo terão suas trajetórias instáveis e, como consequência, atingirão as barras e serão eliminados pela bomba de vácuo.

Deve-se ter um controle preciso sobre a voltagem e também sobre a rádio frequência aplicada às barras dos pólos, que geram um campo eletrostático o qual age como filtro de massas, pois esses campos determinam quais razões m/z podem passar através dos filtros e serem detectadas, quando se aplica uma determinada voltagem. A Rf sofre variação para que os íons de diferentes razões m/z obtenham uma trajetória estável ao longo do quadrupolo chegando ao detector, gerando assim o espectro de massas (LANÇAS, 2013).

Figura 10 – Esquema de um espectrômetro de massas típico evidenciando as quatro barras que constituem um analisador do tipo quadrupolo.

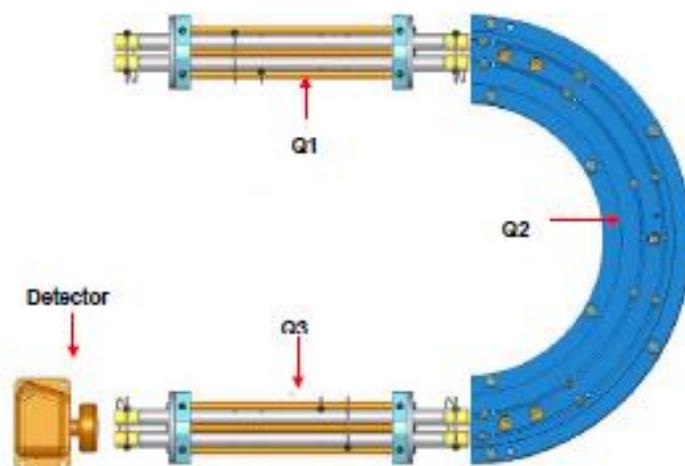


Fonte: LANÇAS, 2013.

Os íons produzidos na fonte de ionização são focalizados até o centro da região entre os quatro cilindros e atravessam o quadrupolo axialmente. Suas trajetórias são dependentes do campo elétrico produzido, onde apenas íons de determinada razão m/z terão a trajetória estável e chegarão ao detector. A trajetória dos íons é um pouco complexa, mas simplificada seguem uma trajetória helicoidal. Os demais íons terão suas trajetórias instáveis, como consequência, atingirão as barras e serão eliminados. Devido ao fato de cada íon possuir uma frequência própria que depende da sua massa, somente aqueles íons cuja frequência é coincidente com a do quadrupolo podem atravessá-lo, já que neste caso não experimentam a deflexão pelo campo (STASHENKO, MARTINEZ, 2010b).

O analisador tipo triplo quadrupolo (QqQ), conforme pode ser observado na Figura 11 é constituído por três quadrupolos em série. O primeiro (Q1) e o último quadrupolo (Q3) operam como um filtro de massas (separador), enquanto o segundo quadrupolo (Q2), opera apenas com Rf que permite que todos os íons selecionados em Q1 passem por ele sem serem selecionados. O Q2 é utilizado apenas como uma região de compartilhamento de íons totais ou ainda uma célula de colisão na qual ocorre a fragmentação dos íons selecionados em Q1 (MS1). Geralmente por dissociação induzida por colisão com um gás inerte (CID, do inglês, *Collision-Induced Dissociation*), e também como direcionador de íons enviados ao Q3 (MS2) (CHIARADIA, COLLINS, JARDIM, 2008).

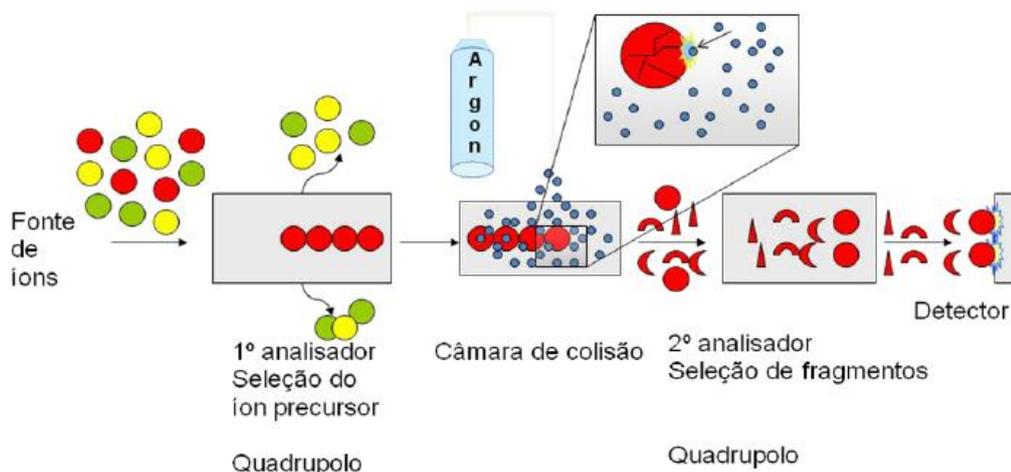
Figura 11 – Esquema de um triplo quadrupolo, evidenciando os três quadrupolos que formam este tipo de analisador de massas.



Fonte: IGLESIAS, Waters, 2008.

Na dissociação induzida por colisão (CID), o íon precursor proveniente do Q1 é acelerado por um potencial elétrico para uma região com um gás inerte de elevada energia (geralmente Ar, He ou N₂), levando a um aumento na energia potencial deste íon até ocasionar sua fragmentação, conduzindo à formação de íons produtos (ilustrado na Figura 12). Os controles de potenciais DC e Rf operam normalmente no Q1 e no Q3, enquanto que no Q2, apenas o potencial Rf fica habilitado (SILVA, 2011; STASHENKO, MARTINEZ, 2010b).

Figura 12 – Esquema de um equipamento do tipo triplo-quadrupolo, onde os dois analisadores estão separados por uma câmara de colisão.



Fonte: IGLESIAS, Waters, 2008.

Dentre as técnicas de operação para obtenção do espectro de massas empregando os analisadores de massas tipo quadrupolo estão o modo de varredura completa (*full scan*), o monitoramento de íons selecionado (SIM, do inglês *Select Ion Monitoring*) (LANÇAS, 2009) e o monitoramento de reações múltiplas. Normalmente, métodos QqQ selecionam no mínimo duas reações de transição por analito, entretanto, devido à baixa razão m/z de alguns agrotóxicos e o uso de ionização química (CI, do inglês *Chemical Ionization*) o número ou abundância de íons pode ser baixo ou ser muito difícil obter duas transições razoáveis. Em outras situações o fragmento m/z pode ser tão baixo para ser selecionado e a seleção da razão m/z não é muito específica, pois uma m/z baixa pode pertencer a qualquer composto presente no sistema, por exemplo, no caso dos ditiocarbamatos com m/z 76 (GRIMALT, DEHOUCK, 2016).

2.6.2.3 Detectores

Detectores são dispositivos responsáveis por converter o feixe de íons em sinal elétrico, posteriormente processado pelo sistema de dados do computador de aquisição. O detector é o último módulo de um espectrômetro de massas. Existe uma grande variedade de detectores para MS, sendo a escolha efetuada a partir do projeto do espectrômetro, suas aplicações analíticas bem como da técnica cromatográfica utilizada na operação (LANÇAS, 2009). Este mede a abundância de elétrons gerados pelos íons, para cada relação m/z . A maioria dos sistemas de MS usa algum tipo de multiplicador de elétrons como detector, combinado a um amplificador de sinal. O registro de todas as cargas detectadas durante a varredura constitui o espectro de massas.

2.6.2.3.1 Detector baseado na multiplicação de elétrons

Os detectores baseados na multiplicação de elétrons (EM, do inglês *Electron Multiplier*) são os mais utilizados atualmente para a detecção de íons. Ao sair do analisador, a corrente elétrica desses íons é medida, em um eletromultiplicador, depois é amplificada e convertida em sinal gráfico, isto é, a intensidade ou abundância do íon-fragmento em um espectro de massas. As multiplicações de

elétrons utilizam como cátodo um metal, óxido metálico ou liga que apresenta facilidade em perder elétrons quando atingida por um íon.

Os elétrons removidos do cátodo são direcionados para um eletrodo que apresenta uma diferença de potencial positivo em relação ao cátodo, atraindo os elétrons. Este processo é multiplicado em cascata em vários eletrodos, denominados dínodos. Cada dínodo apresenta uma diferença de potencial em relação ao anterior, facilitando a atração dos elétrons. Ao final do processo, um elevado número de elétrons é coletado no ânodo para cada íon que chegou inicialmente no cátodo (SILVA, 2011; STASHENKO, MARTINEZ, 2010b).

2.6.2.3.2 Detector baseado em fotomultiplicador dinolítico

Os íons ao sair do quadrupolo são convertidos em elétrons pelos dínodos de conversão. Estes elétrons encontram um átomo de fósforo que, quando ativado, emite fótons. Os fótons atingem um fotocátodo na frente da fotomultiplicadora para produzir elétrons e o sinal é amplificado por esta fotomultiplicadora, a qual é selada em vidro e mantida sob vácuo, evitando a contaminação e permitindo que o detector mantenha o seu desempenho por um período consideravelmente mais longo que os multiplicadores de elétrons convencionais (IGLESIAS, WATERS, 2008; WATERS, 2005)

2.7 VALIDAÇÃO DE MÉTODOS CROMATOGRÁFICOS

A validação de métodos analíticos tem recebido uma atenção considerável na literatura e por agências reguladoras devido a ser este um requisito importante na análise química para garantir o fornecimento de dados confiáveis e de qualidade (RAMBLA-ALEGRE et al., 2012). De acordo com RIBANI et al. (2004), validação é um processo contínuo que começa no planejamento da estratégia analítica e continua ao longo de todo o seu desenvolvimento e transferência.

No Brasil, o INMETRO, com o decreto DOQ-CGCRE-008 (revisão 04) de 2011 e a ANVISA, com a resolução – RE nº 899, de 29 de maio de 2003, são os órgãos responsáveis no estabelecimento de guias para validação de processos analíticos. No âmbito internacional destacam-se a Conferencia Internacional em Harmonização (ICH, 2005), União Internacional de Química Pura e aplicada –

IUPAC (THOMPSON, ELLISON, WOOD, 2002) e o SANTE (Saúde e Proteção do Consumidor, do francês *Sante et protection des consommateurs*) (SANTE, 2017).

Neste contexto, a validação da metodologia analítica na área de resíduos de agrotóxicos é realizada para garantir que a mesma seja exata, específica e reprodutível. Este procedimento envolve a interação entre o princípio ativo e a matriz dentro de uma marcha analítica que resulta na quantificação por métodos instrumentais. A validação de métodos assegura a credibilidade destes durante o uso rotineiro, sendo algumas vezes mencionado como o processo que fornece uma evidência documentada de que o método realiza aquilo para o qual é indicado fazer (RIBANI et al., 2004; VIEIRA, LICHTIG, 2004).

Geralmente, a validação do método envolve a execução e a interpretação de experimentos planejados para se avaliar as características do método. Assim, todas as variáveis de um método devem ser consideradas, incluindo aquelas atribuídas aos equipamentos, padrões, calibrações, analista e ambiente (RIBANI et al., 2004).

De acordo com o DG-SANTE (2017), em um processo de validação, pode ser utilizada no mínimo uma *commodity* (matriz) representativa de um determinado grupo, dependendo do escopo pretendido pelo método, tanto para métodos individuais quanto para métodos multirresiduais. A conformidade da metodologia deve ter alguns parâmetros obrigatórios, tais como: curva analítica, linearidade, especificidade, exatidão, precisão, limite de detecção, limite de quantificação, resistência e robustez (RIBANI et al., 2004; VIEIRA, LICHTIG, 2004). São necessários no mínimo 5 replicatas (verificação da precisão) em ambos os limites de reportagem (verificação da sensibilidade) e pelo menos uma concentração mais elevada, por exemplo, o LMR (SANTE, 2017).

2.7.1 Curva Analítica e Linearidade

A curva analítica consiste na determinação da resposta de determinado instrumento à variação na concentração da substância em estudo, sendo o método de quantificação mais frequentemente utilizado. Para se obter a curva analítica são necessárias soluções padrão de concentrações definidas obtidas através de padrões de referência (RIMAYI et al., 2015). O GD-SANTE/2017 (2017) e também a ANVISA recomendam no mínimo cinco níveis de concentração a serem analisadas em ordem crescente.

A linearidade avalia a capacidade de uma técnica analítica de demonstrar que os resultados obtidos são diretamente proporcionais à concentração do analito na amostra, dentro de um intervalo especificado (RIBANI et al., 2004) e está normalmente relacionada com a variação da inclinação da linha de regressão e é determinada através da curva analítica do princípio ativo, obtida da resposta do detector versus a concentração, através da equação linear (2) (INMETRO, 2011):

$$y = \underline{a}x + \underline{b} \quad (2)$$

onde:

y = resposta dada em termos de área do pico, ou altura do pico se ele for simétrico;

x = concentração da solução padrão;

\underline{a} = coeficiente angular (inclinação da reta)

\underline{b} = coeficiente linear (intersecção com o eixo y, quando x = 0).

O coeficiente angular deve ser reprodutível e o linear não deve ser significativamente diferente de zero. A regressão linear deve apresentar um coeficiente de determinação (r) maior que 0,99, pois quanto mais próximo de 1, menor a dispersão do conjunto de pontos experimentais e menor a incerteza dos coeficientes de regressão estimados (RIBANI et al., 2004). Em determinados momentos observa-se que o modelo de regressão linear é incapaz de descrever adequadamente os dados do modelo, assim é necessário fazer uso do modelo quadrático. Uma regressão quadrática consiste em determinar um polinômio de segundo grau que se ajuste aos dados disponíveis (KEMMERICH, 2013).

2.7.2 Especificidade

A especificidade de um método representa a sua capacidade de avaliar de forma inequívoca a substância em exame na presença de componentes que poderiam interferir com a sua determinação numa mistura complexa (FAO, 2000). Correspondem ao grau de interferência de espécies, como outro princípio ativo, reagentes, impurezas e produtos de degradação, garantindo que o pico de resposta seja exclusivamente de um componente simples, isto é, que não existam interferentes naquele tempo de retenção.

Para verificar a especificidade de um método, deve-se primeiramente verificar se os reagentes empregados na análise não apresentam interferentes no mesmo tempo de retenção do analito. É necessário também analisar uma amostra “branco”, onde a amostra não é submetida a aplicação do agrotóxico em estudo, para verificar a presença de interferentes da própria matriz (VIEIRA, LICHTIG, 2004).

2.7.3 Exatidão

A exatidão representa o grau de concordância entre os resultados individuais encontrados em um determinado ensaio e o valor de referência aceito como verdadeiro (SANTE, 2017). Os processos mais empregados na avaliação de um método são: materiais de referência, comparação de métodos, ensaios de recuperação e adição padrão (RIBANI et al., 2004).

De acordo com instruções do *Codex Alimentarius*, na indisponibilidade de material de referência certificado, a exatidão pode ser avaliada através dos ensaios de fortificação e recuperação, sendo expressa como o percentual de resposta obtida pela fortificação de uma amostra “branco”

. A fortificação consiste na adição de uma solução padrão de resíduo (s) de agrotóxico (s) de concentração conhecida a uma amostra branco, e através da análise desta amostra, pode-se verificar se a marcha analítica determina o princípio ativo quantitativamente.

O *Codex Alimentarius* e o DG-SANTE (2017) sugerem recuperações de 70 a 120% para análise de resíduos de agrotóxicos (FAO/WHO, 2000), com precisão de até $\pm 20\%$, entretanto, dependendo da complexidade analítica e da amostra, este valor pode ser de 50-120%, com precisão de até $\pm 15\%$ (RIBANI et al., 2004).

A limitação deste procedimento é o fato de o analito adicionado não estar necessariamente na mesma forma que na amostra. Assim, a presença de analitos adicionados em uma forma mais facilmente detectável poderia ocasionar avaliações excessivamente otimistas da recuperação (INMETRO, 2011).

2.7.4 Precisão

A precisão expressa o grau de repetibilidade entre os resultados de análises individuais quando o procedimento é aplicado mais de uma vez em uma mesma

amostra homogênea, em idênticas condições de análise (VIEIRA, LICHTIG, 2004). Normalmente, é determinada para circunstâncias específicas de medição e podem ser expressas por meio da repetibilidade, reprodutibilidade e da precisão intermediária.

A precisão é avaliada através do desvio padrão absoluto (S), o qual utiliza um número significativo de medições, normalmente maior que 20. Na prática, em validação de métodos, o número de determinações é geralmente pequeno e o que se calcula é a estimativa do S, sendo expressa em termos de desvio padrão relativo (RSD) ou coeficiente de variação (CV) (INMETRO, 2011). Para métodos empregados em nível de análise de traços ou impurezas, valores de desvio padrão relativo de até 20% são aceitos, dependendo da complexidade da amostra (SANTE, 2017), podendo ser calculado através da Equação 3.

$$RSD\% = \frac{s}{x_m} \times 100 \quad (3)$$

Onde:

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

x_i = valores individuais;

x_m = média das medidas em replicatas;

N = número de medidas.

- Repetibilidade: representa a concordância entre os resultados de medições sucessivas de um mesmo método, efetuadas sob as mesmas condições de medição, mesmo procedimento, mesmo analista, mesmo instrumento usado sob as mesmas condições, mesmo local, e repetições em um curto intervalo de tempo (INMETRO, 2011).
- Precisão intermediária: refere-se à precisão avaliada utilizando o mesmo método, no mesmo laboratório ou em laboratórios diferentes, mas definido exatamente quais condições a variar, tais como: diferentes dias de análise, diferentes analistas, diferentes equipamentos. Esta medida de precisão é reconhecida como a mais representativa de variabilidade dos resultados em um laboratório e, como tal, mais aconselhável para se usar (INMETRO, 20011; VIEIRA, LICHTIG, 2004).
- Reprodutibilidade: é o grau de concordância entre os resultados das

medições de uma mesma amostra, efetuadas sob condições variadas como operado, local, equipamentos, etc. Refere-se aos resultados dos estudos de colaboração entre laboratórios e deve ser considerada em situações como a padronização de procedimentos analíticos (RIBANI et al., 2004; INMETRO, 2011).

2.7.5 Limites de Detecção e de Quantificação

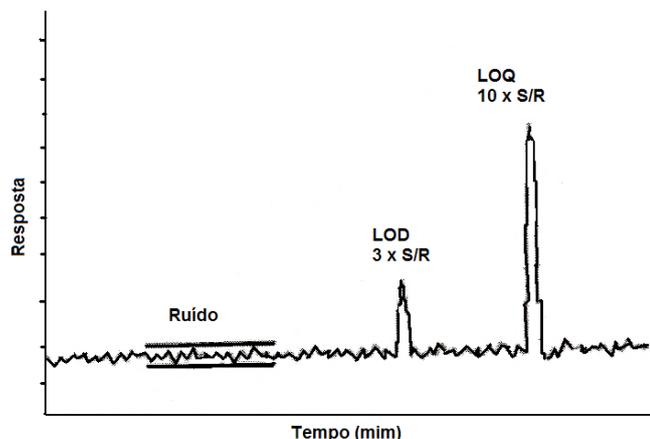
O limite de detecção (LOD, do inglês *Limit of Detection*) representa a menor concentração da substância em análise que pode ser detectada, mas não necessariamente quantificada, com certo limite de confiabilidade utilizando um determinado procedimento experimental, sendo expresso como uma concentração em uma determinada relação sinal-ruído, usualmente 3:1.

O limite de quantificação (LOQ, do inglês *Limit of Quantification*) representa a menor concentração do analito que pode ser medido com certa confiabilidade nas condições experimentais. O LOQ engloba uma relação entre a concentração, precisão e exatidão, sendo determinado em relação sinal-ruído, usualmente 10:1. O LOD e o LOQ são geralmente expressos em unidades de concentração (RIBANI et al., 2004; VIEIRA, LICHTIG, 2004).

O LOQ do método também pode ser definido como o menor nível de fortificação que pode ser quantificado com valores de exatidão (70-120%) e precisão ($20\% \leq RSD$) aceitáveis conforme descrito no DG-SANTE/11813/2017 (SANTE, 2017).

Existem várias formas diferentes de se calcular LOD e LOQ: pelo método visual, pelo método relação sinal ruído, pelo método baseado em parâmetros da curva analítica ou pelos parâmetros do menor nível de concentração empregado nos estudos de fortificação, para o LOQ. O método mais empregado é o da relação sinal-ruído, como pode ser observado na Figura 13, que representa a relação entre o sinal cromatográfico e o ruído da linha de base, e conseqüentemente o LOD e o LOQ.

Figura 13 – Diagrama demonstrando o ruído da linha base, e o sinal para LOD e LOQ, para o método cromatográfico.



Entende-se por ruído, nos métodos cromatográficos, a flutuação da linha base do cromatograma, considerando a diferença entre a maior altura e a maior profundidade dos picos, não relacionada a nenhum composto detectado (SILVA, 2005). Porém, em técnicas analíticas de separação como as cromatográficas, a medida do ruído às vezes é subjetiva, uma vez que a curva analítica é construída a partir do valor das áreas dos picos e não a partir da altura dos picos, senso assim importante utilizar o método baseado nos parâmetros da curva analítica, que é estatisticamente mais confiável (RIBANI et al, 2004).

Para alcançar limites de quantificação desejados em sistemas analíticos modernos, o extrato final deve ser concentrado de modo que a injeção de $\frac{1}{2}$ μ L no modo splitless forneça o grau necessário de sensibilidade. Entretanto, caso não seja realizada a etapa de concentração para evitar perdas, é necessário utilizar o sistema de vaporização com temperatura programável (PTV, do inglês *Programmed Temperature Vaporizing*), o qual permite injeção de grandes volumes de amostra (20-200 μ L). Em um injetor do tipo PTV, as amostras são injetadas abaixo do ponto de ebulição do solvente de extração e a temperatura da porta de entrada do injetor é mantida mais baixa enquanto ocorrer a eliminação de vapores de solvente via saída da válvula split. Após a etapa de ventilação, o injetor é rapidamente aquecido e os analitos são transferidos para entrada da coluna analítica (DIEZ, et al, 2006). Quando são realizadas medidas em amostras com baixos níveis de concentração é importante saber qual o menor valor de concentração do analito ou da propriedade que pode ser detectado pelo método (INMETRO, 2011).

2.7.6 Efeito Matriz

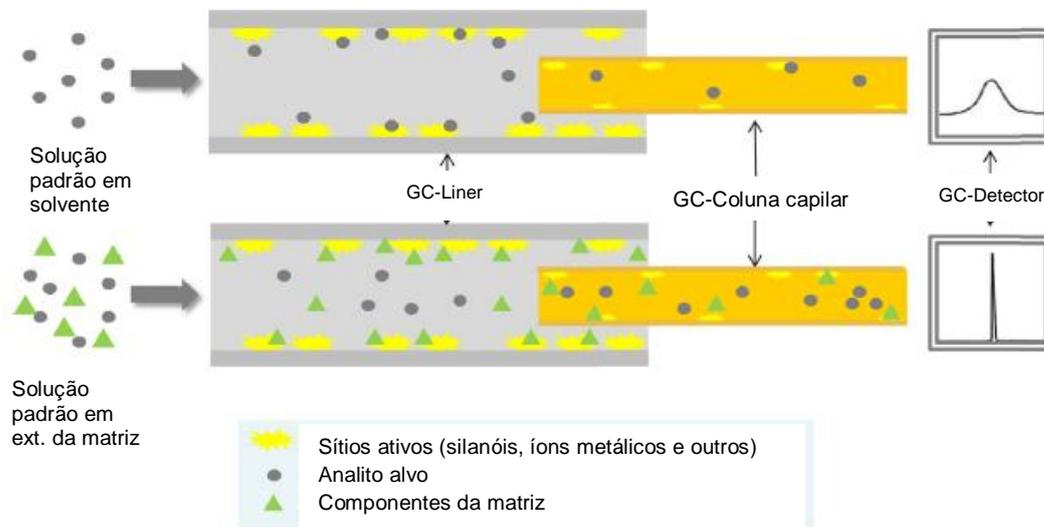
Em análises de resíduos de agrotóxicos empregando GC, a quantificação de muitos agrotóxicos é adversamente afetada por um fenômeno conhecido como “efeito matriz”, o qual tem sido estudado há muitas décadas (ANASTASSIADES, MASTOVSKÁ, LEHOTAY, 2003; HERCEGOVÁ et al., 2007). Esse efeito é observado como um aumento na resposta do detector quando o analito está presente no extrato da matriz em comparação com a resposta do mesmo analito presente apenas em solvente orgânico. (HERCEGOVÁ et al. 2007).

A explicação mais aceitável para esse fenômeno é que quando soluções analíticas preparadas em solvente livre de matriz são analisadas no sistema GC, os analitos podem se ligar aos sítios ativos livres (principalmente os grupos silanóis) no liner do injetor do GC, na coluna e na fonte de íons, o que é refletido na formação de picos com bandas, caldas ou outras alterações (FUJIYOSHI et al., 2016; RIMANYI et al., 2015).

Entretanto, quando o analito é injetado estando presente em extrato da matriz, os componentes co-extraídos da matriz (grupos hidroxil, amino, fosfato e outros grupos relativamente polares) podem bloquear ou competir efetivamente com o analito para reagir com os sítios ativos presentes no sistema do GC durante o transporte do analito do injetor para o detector (Figura 14). Essa interação pode diminuir a disponibilidade desses sítios ativos para interagir com os analitos, diminuindo as perdas dos analitos e aumentando a intensidade do sinal (ANASTASSIADES, MASTOVSKÁ, LEHOTAY, 2003; DIEZ et al., 2006; HERCEGOVÁ et al., 2007; TSUCHIYAMA, KATSUHARA, NAKAJIMA, 2017).

Dessa forma, a redução na transferência dos analitos para a coluna ou detector é causada pela adsorção do analito nestes sítios ativos ou por degradação térmica, fato que pode explicar as altas taxas de recuperações (>120%) que são observadas quando comparadas com calibração apenas com solvente (FUJIYOSHI et al., 2016; RIMANYI et al., 2015).

Figura 14 – Esquema do fluxo para o aprimoramento do efeito matriz em GC.



Fonte: Adaptado de FUJIYOSHI et al., 2016.

Vários fatores influenciam o efeito matriz, entre eles destacam-se: a estrutura química (ligações de hidrogênio características) e propriedades físicas dos analitos; o número e o tipo de sítios ativos no liner e na coluna do GC; o tipo de matriz nos alimentos e amostras em geral; a razão da concentração analito/matriz; a temperatura de injeção e o tempo de interação (vazão, pressão, volume de injeção, volume de expansão do solvente, diâmetro da coluna e tempo de retenção). Entre esses fatores o analito e sua concentração não podem ser alterados, mas pode-se tentar reduzir ou eliminar este efeito variando-se cada um dos demais aspectos, principalmente o processo de injeção (ANASTASSIADES, MASTOVSKÁ, LEHOTAY, 2003; FUJIYOSHI et al., 2016; HERCEGOVÁ et al., 2007; TSUCHIYAMA, KATSUHARA, NAKAJIMA, 2017).

Para corrigir o efeito matriz, numerosas estratégias têm sido propostas, incluindo: método da adição de padrão, redução ou eliminação dos componentes da matriz (por purificação extensiva da amostra) ou dos sítios ativos; modificação da técnica de injeção em GC; mascaramento dos sítios ativos do liner (FUJIYOSHI et al., 2016; HERCEGOVÁ et al., 2007; TSUCHIYAMA, KATSUHARA, NAKAJIMA, 2017), uso de analitos protetores e uso de padrões internos marcados. A maioria destes métodos, entretanto, apenas obteve sucesso em aumentar o tempo, o

trabalho e o custo da análise porque o efeito matriz não pode ser eliminado completamente (HERCEGOVÁ et al., 2007; RIMAYI et al., 2015).

O uso de injeção a frio, direto na coluna, é uma alternativa para reduzir o efeito matriz, mas técnicas on-column levam a um desgaste maior da coluna e são impraticáveis para aplicações de rotina para matrizes complexas. Injeção por vaporização com temperatura programável (PTV) é geralmente preferida sobre técnicas on-column, mas envolve o uso de um liner como técnica clássica de injeção.

A purificação extensiva dos extratos é outra ferramenta que pode funcionar em teoria para eliminar o efeito matriz, mas é insustentável na prática, devido ao largo espectro de polaridades dos compostos em análises multirresiduais e multiclassas e também devido à complexidade das matrizes. Como em alguns casos, o efeito matriz normalmente fornece picos mais definidos e mais altos, isso pode servir para melhorar as análises, sendo melhor tirar vantagem deste fenômeno do que tentar eliminá-lo (ANASTASSIADES, MASTOVSKÁ, LEHOTAY, 2003).

No campo das análises de resíduos de agrotóxicos, uma prática comum em muitos laboratórios é a utilização do método de superposição de matriz (“matrix-matched”), combinado com o uso de analitos protetores, como a ferramenta mais prática para compensar o efeito matriz (ANASTASSIADES, MASTOVSKÁ, LEHOTAY, 2003; GRIMALT, DEHOUCK, 2016; HERCEGOVÁ et al., 2007; TSUCHIYAMA, KATSUHARA, NAKAJIMA, 2017;).

O maior obstáculo do método de superposição de matriz é a dificuldade em preparar extratos de matrizes para padrões de calibração, pois se sabe que o efeito matriz pode variar de uma amostra para outra mesmo sendo o mesmo tipo de amostra. Embora o uso do mesmo extrato branco de matriz como amostra possa fornecer uma matriz ideal para calibração, isso não é factível na realidade de análises de rotina. Considerando que o efeito matriz residual é complicado e frequentemente impraticável, a inconsistência do efeito matriz entre diversas amostras pode afetar severamente a qualidade dos resultados obtidos neste método de superposição de matriz, especialmente quando as matrizes alimentares são altamente complexas (TSUCHIYAMA, KATSUHARA, NAKAJIMA, 2017).

Outra desvantagem desse método é que após injeções repetidas de soluções de amostras, os componentes de baixa volatilidade da matriz vão se acumulando em superfícies potencialmente inertes e acabam formando novos sítios ativos que

causam os mesmos problemas. Esta é a razão porque realizar análises no sistema GC com matriz é apenas um remédio ineficaz e de curta duração, o qual também aumenta a necessidade de manutenção do sistema GC ao longo do tempo (ANASTASSIADES, MASTOVSKÁ, LEHOTAY, 2003; FUJIYOSHI et al., 2016).

A exatidão nas análises quantitativas dos analitos susceptíveis depende da compensação consistente do efeito matriz ou da superação deste problema. Idealmente, a causa raiz (silanóis, íons metálicos e outros sítios ativos na superfície do sistema GC) deve ser eliminada para resolver este problema. Entretanto, é virtualmente impossível ter uma superfície de GC que seja totalmente inerte, de baixo custo e tolerável a aquecimento para evitar o problema do efeito matriz, até mesmo colunas com fase poliméricas mais estáveis são destruídas em altas temperaturas produzindo grande atividade superficial (ANASTASSIADES, MASTOVSKÁ, LEHOTAY, 2003).

3 MATERIAIS E MÉTODOS

O desenvolvimento e a validação de método cromatográfico individual para determinação de ditiocarbamatos em camas biológicas, empregando GC-MS com espectrômetro de massas triplo-quadrupolo bem como a validação de método multirresidual para determinação de resíduos de agrotóxicos em camas biológicas, empregando GC-MS/MS, foram desenvolvidos no Centro de Pesquisa e Análise de Resíduos e Contaminantes (CEPARC), Departamento de Química da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), em parceria com a Estação de Fruticultura Temperada (EFCT), da Embrapa Uva e Vinho (Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária), localizada na cidade de Vacaria, RS.

A biomistura “branco” (sem agrotóxicos) para o estudo de ambos os métodos e as amostras contaminadas analisadas, foram fornecidas pela Embrapa, onde foi realizado o estudo do desempenho das camas biológicas, bem como avaliação ecotoxicológica do sistema, por Carniel (2015).

3.1 INSTRUMENTAÇÃO

- Cromatógrafo a gás 450 (Varian, Holanda);
 - Amostrador automático modelo 8400 (Varian, Holanda);
 - Injetor modelo 1079 PTV (Varian, Holanda), com insersor de vidro silanizado, diâmetro interno de 3,4 mm. Modo de injeção split/splitless (1:5);
 - Coluna capilar CP Sil-8 CB (95% dimetilpolisiloxano e 5% fenil) de sílica fundida, 50 m de comprimento, 0,32 mm de d.i. e 1,2 µm de espessura de filme (Varian Chrompack, Holanda);
 - Coluna capilar VF-5 MS (95% metilpolisiloxano e 5% fenil) de sílica fundida, 30m x 0,25 d.i. x 0,25 µm de espessura de filme (Varian Chrompack, Holanda);
- Espectrômetro de massas TQ-MS 320 (Bruker, EUA) com sistema de aquisição de dados Workstation 6.6 (Varian, EUA);
- Banho de ultrassom 12 (Branson, Alemanha);
- Homogeneizador Polytron modelo PT/MR 3100 (Kinematica, Suíça);
- Centrífuga modelo Hareus Varífuge (Thermo Scientific, Alemanha);

- Compressor de ar ambiente com reserva horizontal 110 L 10/110 red, para resfriamento do injetor (Chiaperini Industrial, Brasil);
- Balança Analítica com precisão de quatro casas decimais PM 600 (Metler, Suíça);
- Balança Analítica com precisão de duas casas decimais PM 600 (Metler, Suíça);
- Sistema de purificação de água Mili-Q ELIX (Milipore, Brasil);
- Dispensadores de volume, capacidade de 10, 30 e 50 mL (Brand, Alemanha);
- Micropipetadores automáticos de várias capacidades (Brand, Alemanha);
- Banho termostatizado com agitação, tipo Dubnoff (Nova Instruments, Brasil);
- Concentrador modelo Rapidvap (Labconco Corporation, EUA);
- Pipetador Hand Step (Brand, Alemanha);
- Seringas de volumes de 10, 25, 50, 100, 250, 500 e 1000 μ L (Hamilton, Suíça);
- Frascos de vidro âmbar, com capacidade de 20, 50 e 100 mL, com tampa rosqueável e batoque de teflon e silicone (Bester, Holanda);
- Vidrarias comuns de laboratório (béqueres, balões volumétricos calibrados, entre outros);
- Frascos de vidro com capacidade de 250 mL, com tampa rosqueável;
- Tubos de polipropileno, com tampa rosqueável, com capacidade de 250 mL.

3.2 GASES

- Hélio 99,999% de pureza (Air Gases, Brasil) – gás de arraste;
- Argônio 99,999% de pureza (Air Liquid, Brasil) – gás de colisão.

3.3 REAGENTES E SOLVENTES

- Água purificada em sistema Mili-Q ELIX (Milipore, Brasil);
- Isoctano (2,2,4-trimetilpentano), grau resíduo de agrotóxico (Macron Chemicals, EUA);
- Material de referência dos agrotóxicos selecionados para este estudo incluindo os padrões internos marcados com pureza acima de 98,0%, Dr. Ehrenstorfer (Augsburg, Alemanha),
- CS₂ com pureza acima de 98,5% (Sigma Aldrich, USA);
- Solução concentrada de ácido clorídrico, P.A. (Synth, Brasil);
 - Cloreto de Estanho (OSO), P.A.- (Synth, Brasil);

- Acetona, tolueno e ácido fosfórico, grau resíduo (Meallinckroft, EUA);
- Isoctano grau resíduo (Lab-Scan Analytical sciences, Irlanda);
- Extran alcalino (Merck, Brasil).

3.4 AGROTÓXICOS SELECIONADOS PARA ESTUDO

No método individual, o agrotóxico da classe dos ditiocarbamatos selecionado para este estudo em camas biológicas foi o Tiram. Já para o método multirresidual foram selecionados sete agrotóxicos para serem determinados em camas biológicas. As características de pureza, classe, grupo químico e toxicologia de todos os agrotóxicos estudados encontram-se na Tabela 3.

Tabela 3 – Agrotóxicos estudados nos métodos individual e multirresidual, com suas respectivas classes, grupo químico, classificação toxicológica e fórmula molecular.

Agrotóxico	Classificação toxicológica	Fórmula molecular	Classe	Grupo químico
Captana	Classe IV	$C_9H_8Cl_3NO_2S$	Fungicida	Dicarboximida
Clorotalonil	Classe III	$C_8Cl_4N_2$	Fungicida	Isoftalonitrila
Clorpirifós-etílico	Classe II	$C_9H_{11}Cl_3NO_3PS$	Inseticida, formicida e acaricida	Organofosforado
Fenitrotiona	Classe II	$C_9H_{12}NO_5PS$	Inseticida e formicida	Organofosforado
Fosmete	Classe I	$C_{11}H_{12}NO_4PS_2$	Inseticida e acaricida	Organofosforado
Metidationa	Classe II	$C_6H_{11}N_2O_4PS_3$	Inseticida e acaricida	Organofosforado
Tebuconazol	Classe IV	$C_{16}H_{22}ClN_3O$	Fungicida	Triazol
Tiram	Classe III	$C_6H_{12}N_2S_4$	Fungicida	Dimetilditiocarbamato

3.5 PREPARO DAS SOLUÇÕES ANALÍTICAS

3.5.1 Soluções utilizadas no método individual

A solução estoque de tiram foi preparada na concentração de 1 g L^{-1} (solução A), através da dissolução da substância sólida em tolueno. A partir da solução A, foi preparada uma solução analítica intermediária de concentração de $0,1 \text{ g L}^{-1}$ (solução B) em tolueno. Ambas as soluções foram empregadas nos ensaios de fortificação e recuperação do analito, sendo armazenadas em frasco âmbar e em congelador à $-18 \text{ }^{\circ}\text{C}$.

Para a confecção da curva analítica, inicialmente foi preparada uma solução estoque de CS_2 em isoctano, na concentração de 4 g L^{-1} (solução estoque). A partir dessa solução, foram preparadas as soluções de trabalho através de diluições, nas concentrações de 40 e 4 mg L^{-1} , ambas em isoctano/tolueno (9:1, v/v). As soluções utilizadas para a confecção da curva analítica preparadas tanto em isoctano/tolueno (9:1, v/v), quanto no extrato “branco” de biomistura, nas concentrações de $0,05$; $0,1$; $0,5$; 1 ; 3 ; 5 e 10 mg L^{-1} , foram armazenadas por um período de até 15 dias.

A solução de cloreto de estanho a $1,5\%$ em $\text{HCl } 4 \text{ mol L}^{-1}$ foi preparada pela dissolução de 15 g de cloreto de estanho em solução de ácido clorídrico 4 mol L^{-1} .

3.5.2 Soluções utilizadas no método multirresidual

A solução estoque individual de cada agrotóxico, incluindo as soluções dos padrões internos marcados, foram preparadas em tolueno e armazenadas em frasco âmbar em congelador à $-18 \text{ }^{\circ}\text{C}$. Para o preparo dessas soluções, foi realizado o cálculo para determinar a massa de cada substância a ser pesada, de acordo com a pureza de cada agrotóxico, a fim de se obter a concentração de 1000 mg L^{-1} . Uma solução analítica na concentração de 1 mg L^{-1} , de uma mistura contendo todos os sete agrotóxicos (com exceção dos padrões intenos e do produto de degradação tetrahydroftalimida) foi preparada em isoctano:tolueno (9:1, v/v) em um volume total de 50 mL . Essa solução intermediária (1 mg L^{-1}) foi utilizada nos estudos de fortificação e recuperação e para o preparo das soluções analíticas para a confecção das curvas analíticas, tanto em solvente orgânico quanto em extrato “branco” de

biomistura, nas concentrações de 1; 5; 10; 20; 50; 100; 200 e 300 ng mL⁻¹. Estas soluções também foram empregadas para o estudo da linearidade e do efeito matriz.

As soluções analíticas dos padrões internos utilizados neste estudo foram preparadas em tolueno, a partir de diluições da solução estoque individual de cada agrotóxico. A solução do padrão interno do procedimento (PCB-153) foi preparada na concentração de 100 mg L⁻¹ e a solução do padrão interno do instrumento (HCB-C13) foi preparada na concentração de 10 mg L⁻¹.

O solvente de extração empregado no método 1 (acetona:água:ácido fosfórico, 98:1:1, v/v/v) contendo o padrão interno do procedimento (PCB-153, 50 ng mL⁻¹) foi preparado pela transferência de 980 mL de acetona para frasco volumétrico com capacidade para 1 L, seguido da adição de 10 mL de água e 10 mL de ácido fosfórico, adicionado de 50 µL da solução estoque de PCB-153 na concentração de 1 g L⁻¹. Todas as soluções analíticas foram armazenadas em congelador a -18 °C e antes de serem utilizadas, foram retiradas do congelador para aguardar até que atingissem a temperatura ambiente.

3.6 DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DO MÉTODO INDIVIDUAL

3.6.1 Otimização das condições cromatográficas

Para a determinação do tempo de retenção do CS₂ foram injetadas soluções desta substância preparadas em isoctano:tolueno (9:1, v/v) na concentração de 3 mg L⁻¹ no sistema GC-MS. As condições cromatográficas empregadas neste estudo foram baseadas no estudo de Pizzutti et al. (2017), onde alguns parâmetros foram otimizados para melhor desempenho da análise, e estão descritas no item 3.6.1.1.

3.6.1.1 Condições Cromatográficas do sistema GC-MS

- ✓ Temperatura do injetor: 250 °C;
- ✓ Programação da válvula do sistema *split* do injetor: *split* na razão de 1:5. Com início de 20% por 0,1min, fechamento da válvula do *split* até 1,75 min e injeção de 100% até o final da corrida;
- ✓ Coluna capilar CP Sil-8 CB (item 3.1);

- ✓ Programa de temperatura do forno da coluna: temperatura inicial de 45 °C mantida por 4 minutos, com incremento de 30 °C min⁻¹ até 230 °C;
- ✓ Volume de injeção: 1,0 µL;
- ✓ Vazão do gás de arraste: constante em 1,0 mL min⁻¹;
- ✓ Modo de ionização: EI positivo;
- ✓ Temperatura da fonte de ionização: 290 °C;
- ✓ Temperatura do *Transferline*: 285 °C;
- ✓ Temperatura do *Manifold*: 40 °C;
- ✓ Filamento permaneceu ligado entre 4 e 5 minutos;
- ✓ Íons monitorados: íon 76, no modo SIM, sendo o íon 76 empregado para a quantificação por ser o íon mais abundante. Nestes casos, onde o analito possui uma massa muito baixa, o emprego de um pico isótopo para a confirmação do mesmo é aceito (FERNÁNDEZ-ALBA, 2005).

Sabe-se que a massa molecular CS₂ é de 76 u e, devido à baixa massa molecular, os espectros de massa correspondentes (íons do produto) não são ricos em íons fragmentados. No entanto, outros critérios devem ser levados em consideração para a identificação do CS₂, porque os íons com massas superiores não estão disponíveis. A confirmação pode ser realizada com o pico de isótopo de *m/z* 78 e a relação isotópica muito específica de 10:1 (*m/z* 76/78). A identificação completa é adicionalmente baseada nos critérios, como o tempo de retenção correto (+/- 0,1 min, para a amostra em relação ao padrão), formas de picos cromatográficos e o alinhamento dos picos nos cromatogramas de íons reconstruídos de *m/z* 76 e 78.

3.6.2 Análise dos solventes e reagentes e da biomistura “branco”

Para verificar a pureza dos solventes e reagentes empregados, com relação a possíveis interferentes, realizou-se a análise dos mesmos através do procedimento de extração discutido no item 3.6.5, com exceção da etapa de adição do analito (fortificação). Dessa forma, pôde-se certificar de que os solventes e reagentes eram apropriados para serem empregados no desenvolvimento do método proposto.

A biomistura “branco” (sem conter o analito estudado) também foi submetida ao mesmo procedimento de extração, para se certificar de que esta não continha a substância em estudo, ou outro interferente no mesmo tempo de retenção do CS₂.

Para a validação do método analítico foi utilizado como “branco”, biomisturas provenientes de reatores (camas biológicas) montados na sede da Embrapa, com a biomistura composta por palha, solo e turfa na proporção de 50:25:25 (v/v/v), isenta de agrotóxicos ditiocarbamatos ou outros agrotóxicos. A palha de trigo utilizada na biomistura foi triturada em pedaços de aproximadamente 2 cm. O solo, caracterizado como Latossolo Bruno Álico, com teor de argila na faixa de 65%, areia na faixa de 8% e silte na faixa de 27%, foi coletado a 10 cm da superfície, nos pomares da estação da Embrapa. A turfa utilizada foi adquirida da empresa Beifort de Garibaldi, RS.

Após a coleta, os solos foram peneirados em malha de 2 mm, e desfaunados por três ciclos de congelamento a -20 °C durante 24 horas para posterior contaminação. A umidade foi ajustada entre 40 e 60% da capacidade de retenção de água. Os valores de pH e demais características químicas e físicas de cada solo encontram-se na Tabela 4.

Tabela 4 – Características físicas e químicas dos solos empregados como “branco”.

Parâmetros	Latossolo	Nitossolo
pH (água)	4,9	4,8
SMP	5,9	5,3
CTC efetiva (mole/dm ³)	10,01	8,65
Matéria Orgânica	0,8	0,5
Carbono Orgânico		
Total (mg/dm ³)	7,7	6,3
Ca (cmolc/ dm ³)	6,88	3,99
Mg (cmolc/ dm ³)	2,13	1,40
P (mg/ dm ³)	13,9	2,1
Cu (mg/ dm ³)	10,6	18,3
Fe (mg/ dm ³)	77,7	55,3
K (mg/ dm ³)	271	141
Teor de argila (%)	30	47
Teor de Areia(%)	24	18
Teor de Silte (%)	46	35
Classe Textural	Franco argiloso	Argila

Fonte: Laboratório de Análise de Solos – LAS, UDESC/CAV, 2015.

3.6.3 Construção das Camas Biológicas

Para avaliar a degradação do agrotóxico mancozebe, na Estação Experimental Embrapa Uva e Vinho de Vacaria - RS, foi realizada uma simulação de camas biológicas, denominadas reatores. Os reatores foram construídos utilizando caixas de água com capacidade de 360 litros, nas quais o fundo foi preenchido com brita para evitar a entrada de partículas sólidas nos canos de drenagem que foram inseridos para possibilitar a coleta do lixiviado.

Uma camada fina de tecido tule foi adicionada sobre a camada de brita a qual foi recoberta por uma camada de biomistura devidamente homogeneizada, ou por uma camada de solo (Latosolo ou Nitossolo), peneirados em mesh de 4 mm. Posteriormente, uma camada de grama foi depositada sobre a camada da biomistura ou solos, sendo denominado de reator piloto (Figura 15).

Figura 15 - Montagem dos reatores pilotos. No fundo o reator possui um cano (A) para a drenagem do lixiviado e sobre este cano uma camada de pedra britada (B) para auxiliar na filtração do lixiviado. A biomistura (C) foi colocada acima da camada de pedra e por fim o reator recebe uma camada de grama (D).



Foto: Luciano Gebler.

Nove reatores foram construídos em duplicatas, denominados A e B, conforme disposto na Figura 16, resultando em um total de 18 reatores. Cinco deles continham biomisturas (reatores 1 a 5) e quatro continham dois tipos representativos de solo brasileiro - Latossolo e Nitossolo (reatores 6 a 9). Os reatores que continham biomistura (reatores 1 a 5) foram construídos de acordo com o modelo original desenvolvido na Suécia, com uma mistura de palha, solo e turfa nas proporções de 50:25:25 (v/v/v) (CASTILHO, TORSTENSSON, STRENTON, 2008).

Os reatores 6 e 7 foram construídos apenas com Latossolo, enquanto os reatores 8 e 9 foram construídos apenas com Nitossolo. Esses solos (Latossolo e Nitossolo) eram solos agrícolas localizados em um pomar comercial onde a fruticultura era praticada há mais de 10 anos e foram coletados da camada superficial entre zero e dez centímetros de profundidade para maximizar a vida microbiana proporcionando "semente" para os processos de biorremediação do sistema. O controle de umidade nos reatores foi realizado através da aplicação de uma cobertura plástica para evitar a entrada de chuvas que podem causar uma saturação do sistema e também para controlar a adição de volumes de efluentes da lavagem dos maquinários, de modo a evitar a lixiviação.

Figura 16 - Mapa dos reatores que sofreram contaminação com ditiocarbamatos. Reatores 2, 3, 4, 5 utilizaram biomistura. Reatores 6 e 7 utilizaram latossolo e reatores 8 e 9 empregaram nitossolo para a construção das camas biológicas.



Foto: Luciano Gebler

3.6.4 Contaminação dos reatores

A sobra de caldas de tanques pulverizadores se deve à imprecisão dos equipamentos comerciais de pulverização, pois é comum haver tal sobra, mesmo após a devida calibração para aplicação do produto sobre uma determinada área. Essa calda mais os efluentes das lavagens dos equipamentos realizadas após a execução do tratamento fitossanitário no campo compunham o efluente depositado nos reatores, sendo que cada um deles recebeu três alíquotas, distribuídas homogeneamente sobre sua superfície.

Os reatores receberam no total três descartes de efluentes produzidos das sobras dos tanques dos pulverizadores e efluentes da lavagem externa das máquinas e equipamentos, após aplicação do agrotóxico Mancozebe (produto comercial Dithane NT[®] 4 g L⁻¹ (correspondente a 2,25 g L⁻¹ de CS₂). As contaminações ocorreram no início do estudo, em dezembro de 2013, e novamente três meses após a primeira contaminação, nos dias 6 e 14 de março de 2014.

Os reatores 1A e 1B (não representados na figura 16) não foram contaminados (reatores “branco”). Os reatores 2A, 2B, 3A e 3B foram contaminados com uma dose única de mancozebe (produto comercial Dithane NT[®], 4 g L⁻¹ - correspondente a 2,25 g L⁻¹ de CS₂), com 1 (reatores 2A e 2B) e 0,5 L (reatores 3A e 3B), respectivamente, para simular um derrame acidental. Os reatores 4 a 9 (A e B cada) receberam um total de três alíquotas de efluentes provenientes de um tanque pulverizador com resíduos e da lavagem de máquinas e equipamentos utilizados na aplicação a campo do agrotóxico comercial Dithane NT[®] (Tabela 5). Os reatores 4 (A e B), 6 (A e B) e 8 (A e B) receberam o dobro do volume de efluentes, em relação aos seus reatores pares 5 (A e B), 7 (A e B) e 9 (A e B), para avaliar a capacidade de saturação do sistema (Tabela 5).

Tabela 5 – Data de aplicação e volume do agrotóxico (efluentes provenientes dos pulverizadores) aplicados nos reatores contaminados com Dithane NT® (4 g L⁻¹) em cada etapa de contaminação.

Data de aplicação	Reatores/volume (L) aplicado de Dithane NT®											
	4		5		6		7		8		9	
	Biomistura		Biomistura		Latossolo		Latossolo		Nitossolo		Nitossolo	
	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B
18/12/13	50	50	25	25	50	50	25	25	50	50	25	25
06/03/14	50	50	25	25	50	50	25	25	50	50	25	25
14/03/14	50	50	25	25	50	50	25	25	50	50	25	25
Total (L)	150	150	75	75	150	150	75	75	150	150	75	75

A amostragem foi realizada de acordo com a Tabela 6. As sub-amostras foram retiradas dos reatores em forma de colunas com sacos de plástico, visando atingir toda a profundidade e, ao mesmo tempo, realizada em pelo menos 3 ou mais pontos (centro e lados), sendo todas as sub-amostras misturadas para tornar a amostra composta representativa. As bolsas de plástico com as amostras foram armazenadas em congelador a -80 °C até análise para evitar a degradação de mancozebe após o passo de amostragem (MATOS et al., 2001).

Tabela 6 – Esquema de amostragem, em número de meses após a contaminação dos reatores com Dithane NT® (mancozebe).

Tempo de coleta dos reatores	Data	Tempo após contaminação (meses)
T0	Dezembro/2013	0
T1	Fevereiro/2014	2
T2	Abril/2014	4
T3	Julho/2014	7
T4	Agosto/2014	8
T5	Fevereiro/2015	14

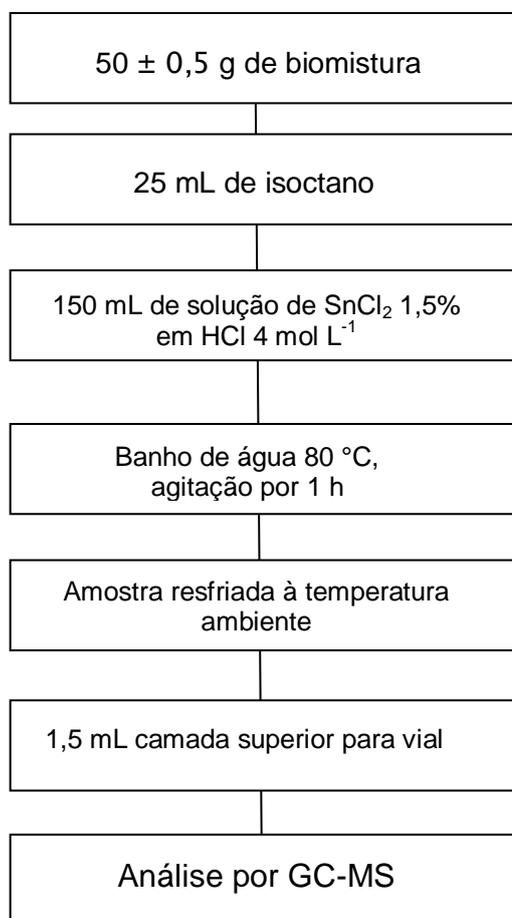
3.6.5 Procedimento de extração de ditiocarbamatos

3.6.5.1 Procedimento de fortificação e extração da biomistura

Para a realização do procedimento experimental do método individual, esquematizado na Figura 17, pesou-se $50 \pm 0,5$ g de biomistura em frascos de vidro com tampa rosqueável, com capacidade de 250 mL e em seguida fortificou-se a biomistura com solução do agrotóxico tiram, em três diferentes concentrações: 1; 3 e 5 mg kg^{-1} , adicionando-se 80, 240 e 400 μL respectivamente, da solução 1000 mg L^{-1} . Também foram analisadas 7 amostras “branco” de biomistura. Na sequência, adicionou-se 25 mL de isoctano, sendo necessária agitação manual nesta etapa para completa homogeneização. Após agitação, acrescentou-se 150 mL de solução de SnCl_2 1,5% em HCl 4 mol L^{-1} e fechou-se rapidamente o frasco, pois a partir do momento que se adiciona a solução ácida ao meio, inicia-se a hidrólise das moléculas de ditiocarbamatos formando CS_2 , o qual pode ser perdido por volatilização.

Posteriormente, colocaram-se os frascos em banho de água com agitação, a $80 \text{ }^\circ\text{C}$ por 1h. Após este período, os frascos foram retirados e deixados à temperatura ambiente para resfriamento. Após total resfriamento, realizou-se a transferência de 1,5 mL da camada superior contendo o solvente orgânico (que contém o CS_2 solubilizado em isoctano) para vial e analisou-se por GC-MS. O procedimento de fortificação foi realizado em 7 replicatas ($n=7$), tanto para o “branco” de biomistura quanto para cada porção de biomistura fortificada.

Figura 17 - Representação esquemática do método de extração para a determinação de resíduos de ditiocarbamatos em camas biológicas.



3.6.6 Validação do Método individual para determinação de ditiocarbamatos em camas biológicas

3.6.6.1 Curva analítica e linearidade

O preparo da curva analítica é uma das etapas mais importantes na análise química, pois sem um procedimento de calibração adequado, a precisão e a exatidão podem estar comprometidas. Para a obtenção das curvas analíticas, foram preparadas soluções analíticas em diferentes concentrações, de ordem crescente: 0,05; 0,1; 0,5; 1; 3; 5 e 10 mg CS₂ L⁻¹, tanto em solvente orgânico (isoctano/tolueno 9:1, v/v) quanto no extrato “branco” de biomistura, e injetou-se 1 µL de cada solução analítica no sistema GC-MS, obtendo-se as áreas, no tempo de retenção pré-determinado.

Através dos dados obtidos verificou-se a linearidade do método cromatográfico. Além do coeficiente de determinação, a linearidade foi avaliada através dos valores de resíduos (Apêndice 2), que demonstram o percentual de variação de cada ponto de uma curva analítica com relação ao modelo matemático empregado ($y = ax + b$). Segundo o DG-SANTE, valores de resíduos entre + ou - 20% são ideais para considerar um método como sendo linear.

3.6.6.2 Limites de detecção e de quantificação

Para a determinação do limite de detecção e do limite de quantificação do instrumento, foram realizadas injeções em ordem decrescente de concentração (10; 5; 3; 1; 0,5; 0,1 e 0,05 mg CS₂ L⁻¹) até que o pico atingisse uma altura referente a três vezes o ruído da linha base, nas proximidades do tempo de retenção do pico de interesse. Para a determinação do limite de quantificação, adotou-se o mesmo procedimento, mas considerando o valor para o qual a altura do pico fosse dez vezes superior ao ruído da linha base.

3.6.6.3 Precisão e precisão intermediária

A precisão, em termos de repetitividade da resposta do instrumento, empregada no método cromatográfico, foi avaliada efetuando-se 7 injeções de cada solução analítica nas concentrações de 0,05; 0,1; 0,5; 1; 3; 5 e 10 mg CS₂ L⁻¹ no sistema GC-MS. Cada solução injetada foi retirada de um vial diferente, selado, para que não ocorresse perda do CS₂ durante o tempo de espera entre as injeções. Para avaliar a precisão intermediária do método, foram realizados estudos de fortificação e recuperação em três diferentes concentrações (1; 3 e 5 mg kg⁻¹), com 7 replicatas (n=7), conforme descrito no item 3.6.5,1, sendo cada extrato acondicionado em um vial individual e injetado uma vez. Após um intervalo de 3 dias, este procedimento foi repetido por outro analista e então foram calculadas as médias dos percentuais de recuperação das sete replicatas de cada analista. Posteriormente, foram calculados os resultados médios obtidos pelos dois analistas, para cada nível de concentração e então se calculou o RSD%.

3.6.6.4 Exatidão (Estudo de fortificação e recuperação)

Os ensaios de recuperação do analito são realizados pela análise de matriz “branco” adicionadas de quantidades conhecidas do mesmo. O analito deve ser adicionado na amostra em pelo menos três diferentes concentrações, por exemplo, próximo ao limite de detecção, próximo à concentração máxima permitida e em uma concentração próxima à da faixa de uso do método.

Para os estudos de recuperação, efetuou-se a adição de tiram ao “branco” de biomistura, em três diferentes concentrações (1; 3 e 5 mg kg⁻¹), com sete replicatas cada (n=7), seguido da extração pelo método descrito no item 3.6.5.1. Após a extração, cada extrato foi acondicionado em um vial individual e analisado por GC-MS para a identificação e quantificação do CS₂. Os resultados obtidos após extração e análise foram denominados de valor obtido, e o valor da fortificação da amostra foi o valor real. Os percentuais de recuperação foram obtidos empregando-se a equação 2 (item 2.7.1).

3.6.6.5 Efeito Matriz

No desenvolvimento de um método analítico, as possíveis interferências da matriz na análise cromatográfica devem ser levadas em consideração. Para isso, são preparadas duas curvas analíticas, sendo uma a partir de soluções analíticas preparadas em solvente orgânico e a outra a partir de soluções analíticas preparadas no extrato “branco” de biomistura (*matrix-matched calibration*). Na avaliação do efeito matriz, realiza-se uma comparação entre as inclinações das retas das curvas analíticas obtidas a partir da análise das soluções analíticas preparadas em solvente orgânico e daquelas preparadas no extrato “branco” de biomistura, de acordo com a equação (4) (SANTE, 2017).

$$\text{Efeito Matriz (\%)} = \left[\left(\frac{\text{inclinação da curva analítica em matriz}}{\text{inclinação da curva analítica em solvente}} \right) - 1 \right] \times 100 \quad (4)$$

Através deste cálculo, é verificado se a matriz exerce efeito positivo (aumento de sinal) ou negativo (diminuição de sinal) sobre o resultado da análise. Considera-se que quando o resultado for fora da faixa de $\pm 20\%$ o efeito matriz começa a

exercer influência nas análises, sendo recomendada a construção das curvas analíticas no extrato da matriz para minimizar este efeito (SANTE, 2017).

3.6.6.6 Análise de biomisturas contaminadas

Após o desenvolvimento e validação do método cromatográfico para determinação de ditiocarbamatos em camas biológicas, foram realizadas análises em amostrais de camas biológicas, construídas pela EMBRAPA na cidade de Vacaria (RS, Brasil). Cada análise foi realizada em triplicata.

3.7 VALIDAÇÃO DO MÉTODO MULTIRRESIDUAL PARA DETERMINAÇÃO DE AGROTÓXICOS EM CAMAS BIOLÓGICAS

As condições cromatográficas utilizadas neste estudo foram estabelecidas a partir do estudo otimizado e validado para determinação multirresidual de agrotóxicos em frutas e vegetais, desenvolvido por Dias et al. (2017).

3.7.1 Condições cromatográficas

- Volume de injeção: 5 μL ;
- Modo de injeção: split (razão 1:5);
- Rampa de temperatura do forno da coluna: 80 °C (1,0 min), 180 °C a 25 °C min^{-1} , 280 °C a 10 °C min^{-1} e 300 °C a 30 °C min^{-1} (1,0 min);
- Temperatura do injetor: rampa iniciando em 80 °C (0,1 min), aumentando para 300 °C a 200 °C min^{-1} (20 min);
- Gás de arraste: Hélio;
- Vazão do gás de arraste: 1,2 mL min^{-1} ;
- Tempo total de corrida: 20 min;
- Condições do MS: Temperatura da fonte de íons: 250 °C;
Temperatura do *Transfer line*: 280 °C;
Temperatura do Manifold: 45 °C;
Modo de aquisição de íons: MRM;

Duas transições MRM foram monitoradas para cada um dos agrotóxicos, de acordo com os parâmetros descritos na Tabela 7.

Tabela 7 – Agrotóxicos estudados, tempos de retenção e parâmetros de análise do espectrômetro de massas para determinação dos agrotóxicos por GC-MS/MS.

Agrotóxico	Massa mol.	t_R (min)	Ion Quant. (m/z)	Primeira transição			Segunda transição		
				Ion precursor	Ion Produto	CE (eV)	Ion precursor	Ion Produto	CE (eV)
Captana	301	12.16	107	263	107	10	263	148	10
Clorotalonil	266	8.89	231	266	168	20	266	231	15
Clorpirifós	350	10.89	349	314	258	10	314	268	10
Fenitrotiona	277	10.61	109	277	109	20	277	260	5
HCB-C13 (P.I.I)	290	7.63	255	290	220	25	290	255	15
Metidationa	302	12.39	85	125	79	10	145	85	10
Fosmete	317	15.76	105	160	105	20	160	133	10
PCB-153(P.I.P)	360	14.3	290	360	290	25	360	325	12
Tebuconazol	308	15.07	125	250	125	20	250	153	10
Tetrahidrofit. ^a	151	5.71	80	151	80	10	151	123	5

^a Produto de degradação de agrotóxico (captana), não incluído na solução analítica mistura e nas soluções de fortificação.

CE – energia de colisão

3.7.2 Controle de qualidade

Com a finalidade de propiciar um controle de qualidade eficiente para avaliar a eficácia do procedimento de extração e do sistema de injeção, foram utilizados dois padrões internos isotopicamente marcados. PCB-153 foi utilizado como padrão interno do procedimento (P.I.P.) e HCB-C13 foi utilizado como padrão interno do instrumento (P.I.I.). Para o método 1, o P.I.P. foi adicionado diretamente no solvente de extração, acetona:água:ácido fosfórico (98:1:1, v/v/v) na concentração de 50 ng mL⁻¹ e o P.I.I. foi adicionado diretamente na mistura de isoctano:tolueno (9:1, v/v) na concentração de 100 mg L⁻¹, a qual foi empregada para reconstituir o resíduo após evaporação do extrato da amostra, anteriormente à análise por GC-MS/MS.

Para o método 2, as biomisturas “branco” foram fortificadas com 25 µL da solução 100 mg L⁻¹ de PCB-153 (P.I.P.) e foram adicionados 10 µL de HCB-C13 (P.I.I.) na concentração de 10 mg L⁻¹ em vial contendo 990 µL do extrato em isoctano:tolueno (9:1, v/v), anteriormente às análises por GC-MS/MS.

3.7.3 Análise dos solventes, reagentes e do “branco” da biomistura

Para a verificação da pureza dos solventes e dos reagentes utilizados, realizou-se a análise dos mesmos através dos procedimentos de extração,

discutidos no item 3.7.4.3, porém, sem a adição de biomistura e dos analitos. Da mesma forma, foi realizada a análise da biomistura utilizada como “branco”, a qual foi empregada nos estudos de fortificação e recuperação, para garantir a ausência de agrotóxicos na mesma.

3.7.4 Otimização do método de extração multirresidual

3.7.4.1 Otimização dos parâmetros de extração

Inicialmente, dois métodos de extração multirresidual foram avaliados para a determinação de agrotóxicos em camas biológicas e comparados com o objetivo de selecionar um método eficiente para a extração de clorpirifós, fenitrotiona, metidationa, fosmete, captana e seu produto de degradação (tetrahidroftalimida), clorotalonil e tebuconazol. O primeiro método (método 1) foi baseado no método proposto por Quatrin et al. (2017), o qual foi desenvolvido para determinação específica de clorpirifós em camas biológicas. O segundo método (método 2) foi baseado na última otimização do método ND mini-Luke para determinação multirresidual de agrotóxicos em frutas e vegetais e foi estudado e validado por Dias et al. (2017).

As porções de biomistura “branco” foram fortificadas nas concentrações de 100 e 200 $\mu\text{g kg}^{-1}$, em triplicata ($n=3$) para cada concentração. Foram então extraídas separadamente com os dois procedimentos de extração. Nesta etapa inicial, foram considerados apenas os valores de recuperação e desvio padrão relativo (RSD%).

3.7.4.2 Procedimento de extração do método 1

Uma porção de biomistura previamente homogeneizada ($5 \pm 0,5$ g) foi pesada diretamente em um tubo de centrifuga de PTFE com capacidade para 250 mL e foi extraída com 30 mL da mistura acetona:água:ácido fosfórico (98:1:1, v/v/v) contendo o padrão interno do procedimento (P.I.P.), PCB-153 (50 ng mL^{-1}) através de agitação empregando homogeneizador ultra-turrax por 1 min a 15.000 rpm. A amostra foi centrifugada a 3300 rpm durante 5 minutos e após centrifugação, uma alíquota de 2

mL da camada superior (solvente orgânico) foi filtrada através de uma membrana de PTFE de 0,2 µm.

Com a finalidade avaliar o melhor fator de concentração do método, o método 1 foi avaliado utilizando-se dois diferentes volumes do extrato filtrado para evaporação e reconstituição. No teste 1 foi empregado alíquotas de 125 µL do extrato e no teste 2 alíquotas de 1000 µL do extrato filtrado, que foram evaporadas até secura em concentrador (50 °C, 450 mBar, 7 minutos) e posteriormente reconstituídos com 250 e 1000 µL, respectivamente, de isooctano:tolueno (9:1, v/v) contendo HCB-C13 (P.I.I.) a 100 ng mL⁻¹. O extrato final de ambos os procedimentos foi injetado no sistema GC-MS/MS.

3.7.4.3 Procedimento de extração do método 2

Neste método, uma porção de 10 ± 0,5 g de biomistura previamente homogeneizada foi pesada diretamente em um tubo de centrífuga de PTFE com capacidade para 250 mL fortificada com a mistura dos agrotóxicos estudados, nas concentrações de 20, 50, 100 e 200 µg kg⁻¹, adicionando-se 20, 50, 100 e 200 µL, respectivamente, da solução analítica mistura 10 mg L⁻¹. Nesta etapa, cada porção de biomistura também foi fortificada com 25 µL do P.I.P. PCB-153 na concentração de 100 mg L⁻¹.

Posteriormente, foram adicionados 20 mL de acetona e a mistura foi agitada com ultra-turrax por 20 s a 3800 rpm, adicionando-se em seguida 20 mL de isooctano e 10 mL de tolueno e novamente a mistura foi homogeneizada com ultra-turrax por 20s a 3800 rpm. Após centrifugação da amostra (3300 rpm durante 5 min), uma alíquota de 2 mL foi retirada da camada superior (orgânica) e filtrada através de uma membrana de PTFE de 0,2 µm. Finalmente, 990 µL do extrato filtrado foram transferidos para vial e o volume foi completado até 1 mL pela adição de 10 µL com a solução do P.I.I., HCB-C13 na concentração de 10 mg L⁻¹. Esse extrato foi injetado diretamente no sistema GC-MS/MS, sem nenhuma etapa de purificação e evaporação.

3.7.5 Validação do método multirresidual

Considerando o fato de que não há documento estabelecido para os critérios de validação de métodos para determinação de agrotóxicos especificamente para camas biológicas, o documento de orientação DG-SANTE N.11813/2017 (SANTE, 2017) foi tomado como base, embora este documento seja aplicado para a determinação de agrotóxicos em alimentos e rações. O estudo de validação foi realizado em termos de precisão e exatidão (recuperação% e RSD%), precisão intermediária (RSD%), limite de detecção (LOD) e quantificação (LOQ), linearidade, faixa linear, seletividade e efeito matriz (%).

3.7.5.1 Curva analítica e linearidade

A linearidade das curvas analíticas foi avaliada através da resposta do sinal dos analitos presentes nas soluções analíticas em oito concentrações (1; 5; 10; 20; 50; 100; 200 e 300 ng mL⁻¹) preparadas tanto em solvente orgânico quanto em extrato “branco” de biomistura (*matrix-matched calibration*). Todas as soluções analíticas foram injetadas sete vezes, em condições de repetibilidade, incluindo o branco dos solventes e o extrato “branco” de biomistura. Cada injeção foi realizada a partir de um vial individual, a fim de não alterar a concentração da solução contida no vial, uma vez que os analitos estão presentes em uma solução mistura que contém acetona, que é muito volátil.

Posteriormente, foram coletadas as áreas dos picos cromatográficos de cada analito, em cada concentração injetada para as sete replicatas e foram realizados os cálculos da média das áreas e do RSD% para cada analito. Colocando-se os valores das concentrações de cada agrotóxico estudado no eixo das abscissas e as respectivas áreas obtidas no eixo das ordenadas, obteve-se o coeficiente de determinação (r^2), o coeficiente angular (a), o coeficiente linear (b) bem como a equação da reta.

Além do coeficiente de determinação, a linearidade para cada agrotóxico estudado foi avaliada através dos valores de resíduos (Apêndice 2), que demonstram o percentual de variação de cada ponto de uma curva analítica com relação ao modelo matemático empregado ($y = ax + b$). Segundo o DG-SANTE,

valores de resíduos entre + ou - 20% são ideais para considerar um método como sendo linear.

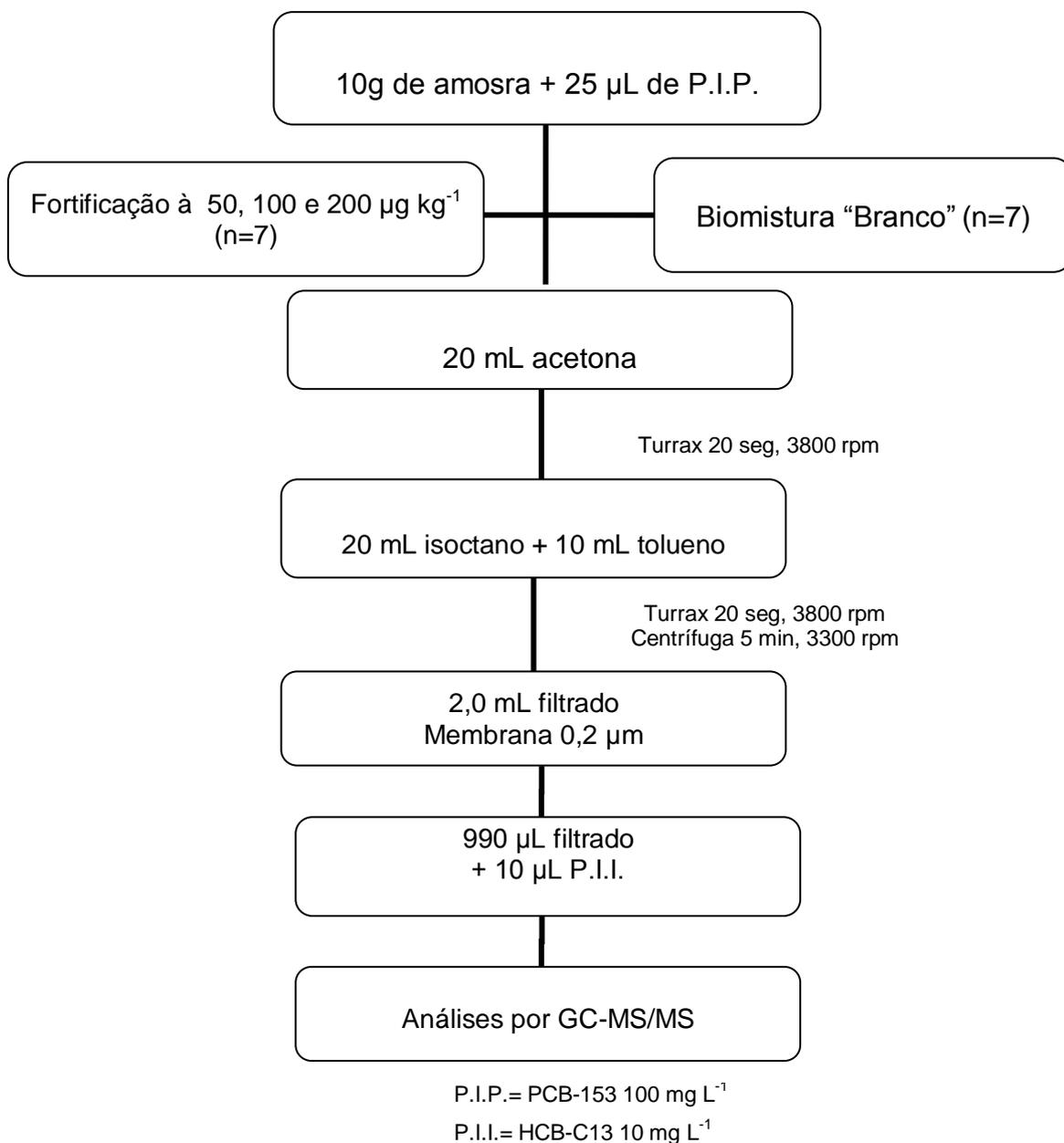
3.7.5.2 Limites de detecção e de quantificação

A partir da avaliação dos dados da linearidade das curvas analíticas, de cada um dos agrotóxicos estudados, foram determinados os limites de detecção do método e do instrumento para cada agrotóxico, a partir das áreas e do RSD% (7 replicatas) de cada substância, presentes nas soluções analíticas. O limite de detecção do instrumento (LOD) foi considerado igual à concentração em que a relação sinal/ruído (S/N) foi ≥ 3 e o limite de quantificação do método (LOQ) foi definido como o menor nível de fortificação que pode ser quantificado com valores de exatidão (70-120%) e precisão ($RSD \leq 20\%$) aceitáveis, conforme descrito no documento guia GD-SANTE (SANTE, 2017).

3.7.5.3 Exatidão (Estudo de fortificação e recuperação)

Para os estudos de fortificação e recuperação, porções de biomistura “branco” foram fortificadas com a solução analítica mistura contendo 7 agrotóxicos nas concentrações de 50; 100 e 200 $\mu\text{g kg}^{-1}$, adicionando-se 50, 100 e 200 μL , respectivamente, da solução 10 mg L^{-1} . Para cada concentração foram realizadas sete replicatas ($n=7$) utilizando o método de extração otimizado neste estudo, descrito no item 3.7.4.3 (método 2) e esquematizado a seguir na Figura 18.

Figura 18 – Esquema do procedimento de extração do método multirresidual 2, utilizado nos ensaios de fortificação e recuperação de agrotóxicos em camas biológicas.



3.7.5.4 Precisão intermediária

Para a determinação da precisão intermediária, os estudos de fortificação e recuperação foram repetidos de forma completa, para os 3 níveis de concentração com sete replicatas cada (n=7), por um segundo analista. Cada amostra extraída foi acondicionada em vial individual de GC, e cada injeção foi realizada de um vial

diferente com o objetivo de evitar concentração da amostra, caso houvesse evaporação de solvente entre as injeções e também evitar perdas por volatilização de analitos mais voláteis.

3.7.5.5 Efeito matriz

O efeito matriz ocorre devido às substâncias co-eluídas da matriz que interagem com os sítios ativos no *liner*, produzindo supressão ou aumento de sinal em comparação com o sinal do analito injetado em solvente orgânico (ANASTASSIADES, MASTOVSKÁ, LEHOTAY, 2003; LOZANO et al., 2016). O efeito matriz foi calculado com base nas inclinações das curvas analíticas obtidas a partir da análise das soluções analíticas preparadas em solvente orgânico e daquelas preparadas no extrato “branco” de biomistura, de acordo com a equação (4), descrita anteriormente no item 3.6.6.5.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 MÉTODO INDIVIDUAL PARA DETERMINAÇÃO DE DITIOCARBAMATOS EM CAMAS BIOLÓGICAS

Até o presente momento, não há na literatura, nacional ou internacional, nenhum método desenvolvido para a determinação de ditiocarbamatos em camas biológicas. Desta forma, o presente estudo foi baseado no método anteriormente reportado por Pizzutti et al. (2017) para frutas e hortaliças.

4.1.1 Condições cromatográficas otimizadas

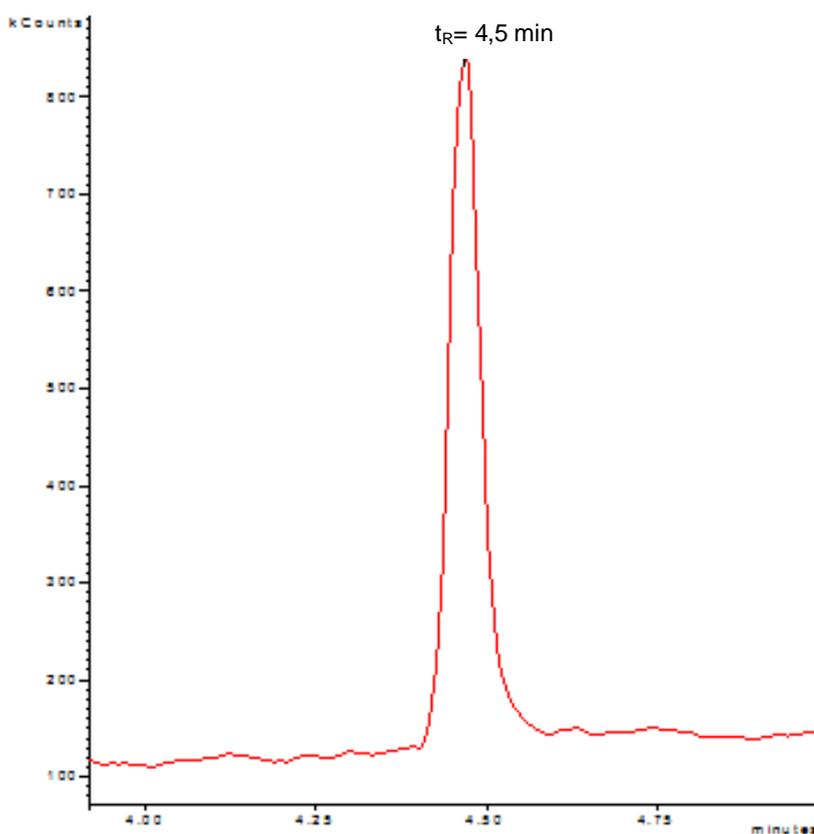
Para a otimização da separação cromatográfica e identificação da substância selecionada para este estudo, preparou-se uma solução analítica na concentração de 3 mg CS₂ L⁻¹, contendo CS₂ (produto de degradação), a qual foi injetada separadamente no sistema GC-MS, determinando-se o tempo de retenção desta substância.. Desta forma, foram estabelecidas as melhores condições cromatográficas para a separação e quantificação do CS₂, as quais estão representadas na Tabela 8.

Tabela 8 – Condições cromatográficas otimizadas para a separação e quantificação de CS₂ em camas biológicas.

Parâmetros avaliados	Parâmetros Otimizados
Coluna analítica	CP Sil 8-CB (50 x 0,32 mm; 1,2 µm)
Gás de arraste	Hélio (99,999% de pureza)
Vazão da fase móvel	1,0 mL min ⁻¹
Volume de injeção	1,0 µL
Detector	Espectrômetro de massas triplo-quadrupolo
Fonte de ionização	Impacto de elétrons (EI)
Energia de ionização	70 eV
Modo de injeção	Split (razão 1:5)
Tipo de injetor	PTV

Após a determinação destes parâmetros, uma solução analítica de CS₂ em isoctano/tolueno (9:1, v/v), na concentração de 3 mg L⁻¹ foi injetada no sistema GC-MS para se obter o cromatograma de separação desta substância, assim como confirmar o tempo de retenção, demonstrado na Figura 19.

Figura 19 – Cromatograma total de íons obtido por GC-MS (modo SIM), através da injeção de uma solução analítica de CS₂ (3 mg L⁻¹), sob as condições cromatográficas otimizadas, demonstrando o tempo de retenção para o CS₂.

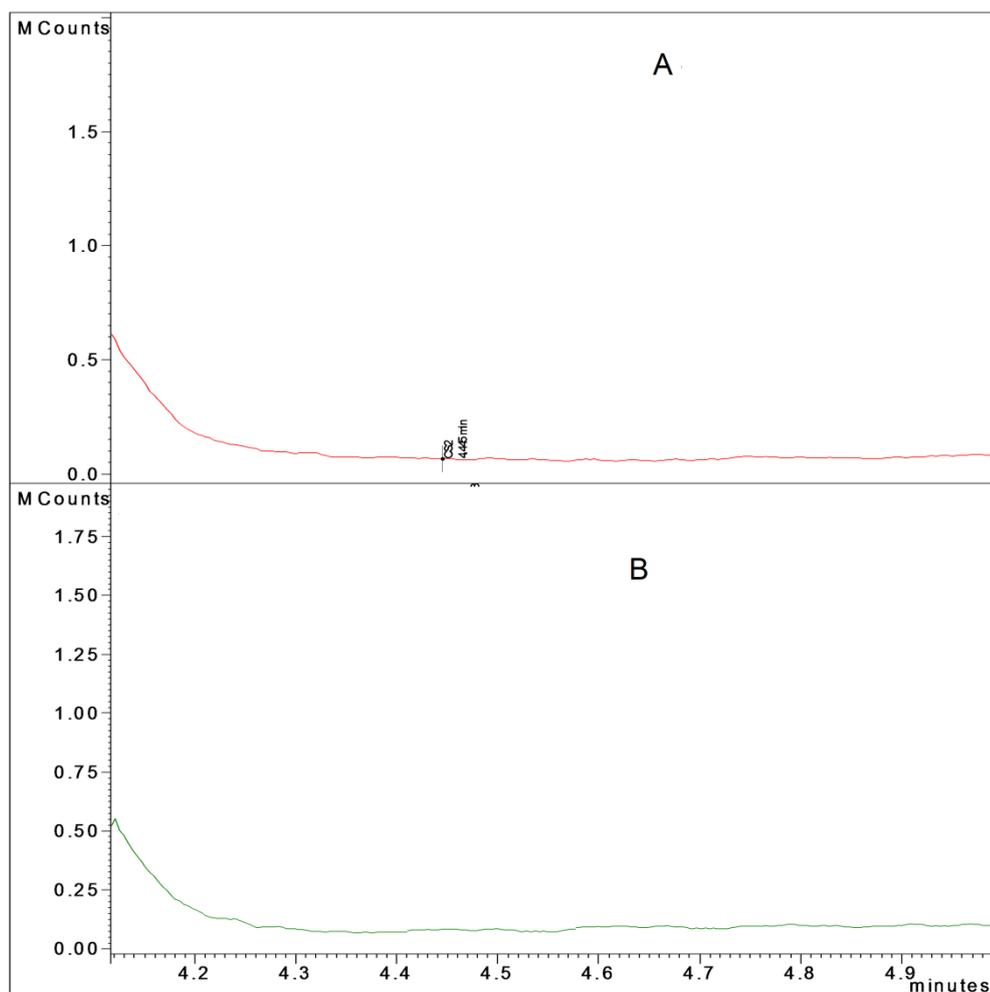


4.1.2 Análise dos solventes, reagentes e da biomistura “branco”

Os solventes e reagentes, assim como a biomistura “branco” foram submetidos ao procedimento de extração otimizado, descrito no item 3.6.5.1 para avaliar a presença de interferentes. Nos cromatogramas obtidos destas análises, representados na Figura 20, pode-se observar que tanto no cromatograma da biomistura “branco” (A) quanto para os cromatogramas dos solventes e reagentes (B), não há presença de interferentes no tempo de retenção do CS₂ (4,5 min).

Portanto, os solventes e reagentes estavam apropriados para serem utilizados no desenvolvimento deste método, bem como a biomistura “branco”.

Figura 20 – Cromatograma total de íons obtido por GC-MS (modo SIM), (A) através da análise da biomistura “branco” e (B) dos solventes e reagentes, empregados na determinação de ditiocarbamatos.



4.1.3 Validação do método individual

Após definidas as melhores condições cromatográficas para a separação e quantificação de ditiocarbamatos (em termos de CS₂) em camas biológicas, realizou-se a validação do método analítico, conforme os parâmetros descritos a seguir.

4.1.3.1 Curva analítica e linearidade

A Tabela 9 apresenta as equações das curvas analíticas para o CS₂, com os respectivos coeficiente angular (a – inclinação), coeficiente linear (b – intersecção) e coeficiente de determinação (r²), bem como a faixa linear do método para as soluções analíticas preparadas em solvente orgânico e em extrato “branco” de biomistura, concentrações de 0,05; 0,1; 0,5; 1; 3; 5 e 10 mg L⁻¹. As soluções preparadas em extrato “branco” de biomistura e em solvente orgânico foram analisadas no sistema cromatográfico conforme a seguinte sequência de injeção: primeiramente injetou-se o “branco” dos solventes seguido pelo “branco” da biomistura e logo após, as soluções das curvas analíticas preparadas em solvente orgânico e em extrato “branco” da biomistura, intercaladas com o “branco” dos solventes e o “branco” da biomistura, até que todas as 7 repetições fossem injetadas.

Tabela 9 - Parâmetros das curvas analíticas obtidos nos estudos de linearidade, nas concentrações de 0,05 a 10 mg CS₂ L⁻¹.

Solvente	Faixa Linear (mg CS ₂ L ⁻¹)	a	b	r ²
Isoctano/tolueno (9:1, v/v)	0,05 - 10	1014092,2	-267465	0,9946
Extrato “branco” de biomistura	0,05 - 10	841509,8	-161870	0,9937

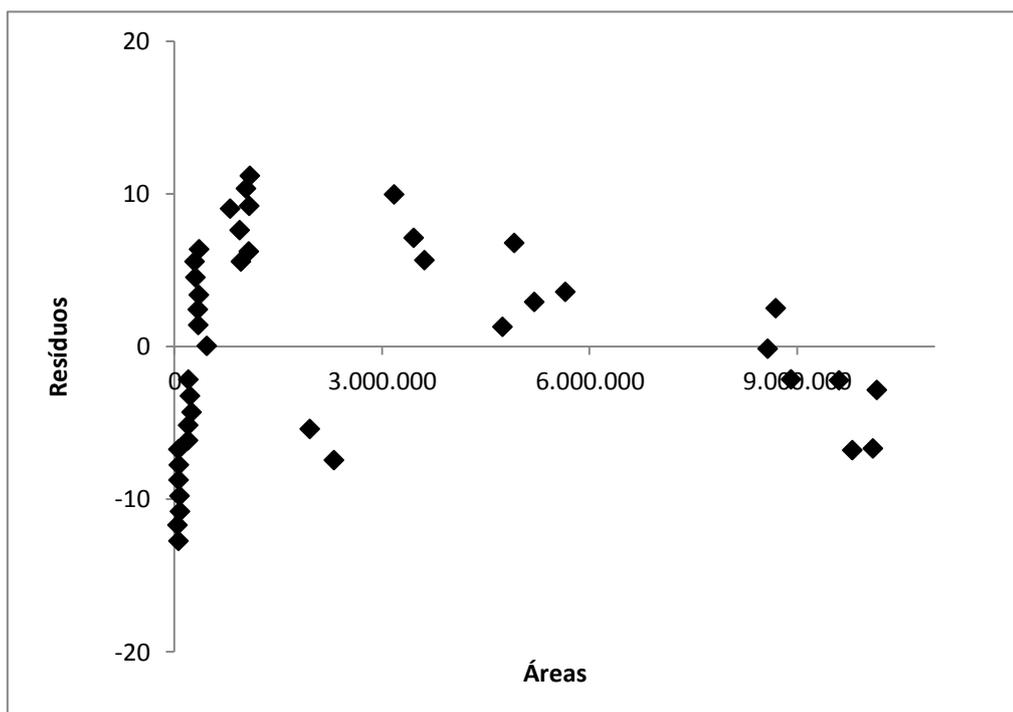
Observa-se através das equações das retas, que o modelo sugerido é linear no intervalo de 0,05 – 10 mg CS₂ L⁻¹, já que o coeficiente de determinação é maior que 0,993, o que segundo o GD-SANTE (2017) é satisfatório, tanto para as curvas obtidas empregando-se extrato “branco” de biomistura quanto para aquelas preparadas em isooctano/tolueno. Os dados do estudo da linearidade, com as médias das áreas e os RDS% estão apresentados na Tabela 10.

Tabela 10 – Média das áreas (n=7) obtidas através de injeções das soluções das curvas analíticas, nas concentrações de 0,05 a 10 mg CS₂ L⁻¹, preparadas no extrato “branco” de biomistura e em isoctano/tolueno (9:1), com seus respectivos RSD%.

Concentração (mg CS ₂ L ⁻¹)	Curva analítica (extrato “branco” de biomistura)		Curva analítica (isoctano/tolueno 9:1)	
	Média das áreas	RSD%	Média das áreas	RSD%
0,05	16487	8	-	-
0,1	153818	8	151224	9
0,5	232815	14	208667	11
1	331448	21	282391	19
3	922296	19	882978	19
5	4390174	21	5069143	16
10	8546691	21	9785179	10

Os resíduos calculados (conforme descrito no apêndice 2) estão demonstrados na Figura 21, estando todos dentro dos valores determinados pelo DG-SANTE (2017), os quais devem se encontrar nos limites de ± 20% de desvios (indicativo de linearidade).

Figura 21 – Resíduos da curva analítica obtida a partir de soluções analíticas preparadas em extrato “branco” de biomistura e analisadas por GC-MS.



4.1.3.2 Avaliação do efeito matriz

Considerando-se que o efeito matriz promove aumento ou diminuição da resposta do detector na presença de um analito no extrato da matriz comparado com o mesmo analito presente em solvente orgânico, pode-se dizer que o efeito matriz foi insignificante para a substância estudada (ditiocarbamato tiram).

Para a avaliação do efeito matriz, bem como da seletividade do método, foram comparadas as curvas analíticas obtidas a partir de soluções analíticas preparadas em solvente orgânico bem como daquelas preparadas em extrato de biomistura “branco”. Quando comparadas as sete concentrações das soluções preparadas em solvente orgânico com aquelas preparadas no extrato de biomistura “branco” (Figura 22), percebe-se uma leve diferença na inclinação das retas das curvas analíticas, podendo ser atribuída ao efeito da matriz. No entanto, esse mesmo efeito não ocorre quando comparadas as curvas analíticas obtidas apenas com as soluções de menor concentração, observado na Figura 23, onde pode-se observar o efeito oposto, com uma leve inclinação da reta obtida com as soluções analíticas preparadas em extrato “branco” da biomistura.

Figura 22 – Comparação entre as curvas analíticas obtidas a partir de soluções analíticas de CS₂, preparadas em isoctano:tolueno (9:1) e em extrato “branco” de biomistura.

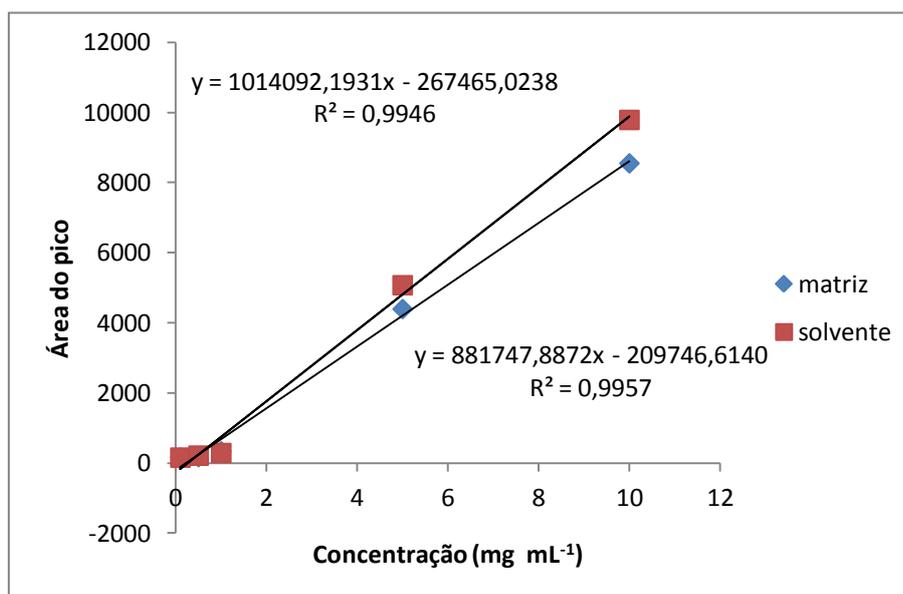
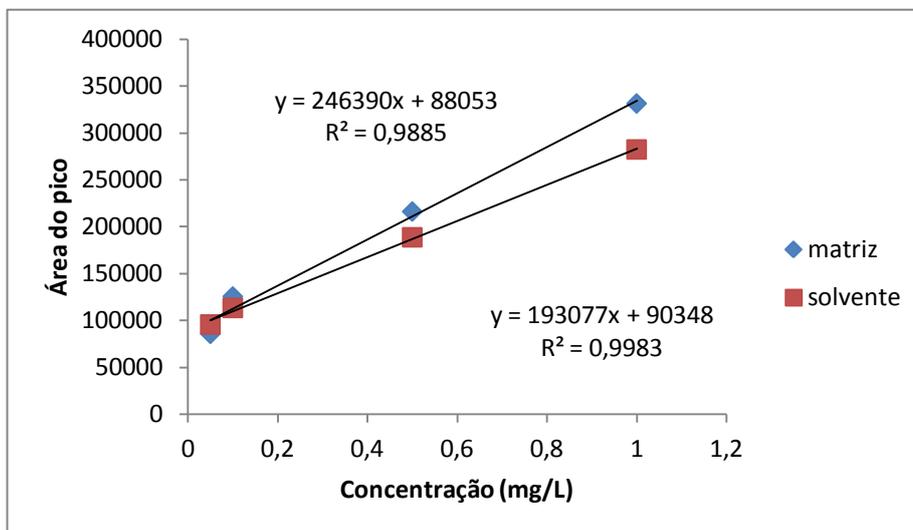


Figura 23 – Comparação entre as curvas analíticas obtidas a partir das soluções analíticas de CS₂ de menor concentração (0,05 - 1,0 mg CS₂ L⁻¹), preparadas em isoctano:tolueno (9:1) e em extrato “branco” de biomistura.



Os valores calculados através dos coeficientes angulares das retas mostram a relação entre a concentração e o respectivo efeito matriz (Tabela 11). Através destes resultados, pode-se concluir que o efeito matriz é insignificante, pois de acordo com o DG-SANTE (2017), os resultados com efeito matriz entre $\pm 20\%$ são considerados aceitáveis para determinação de contaminantes em nível de traços. Como o efeito matriz sofre variações ao longo do tempo e de acordo com as condições do instrumento, este deve ser constantemente avaliado, tanto na etapa de desenvolvimento do método quanto na aplicação em análises de rotina (PIZZUTTI et al, 2009).

Tabela 11 – Valores de efeito matriz calculados para tiram (em termos de CS₂), para cada concentração estudada das soluções analíticas empregadas para a confecção das curvas analíticas.

Concentração CS ₂ (mg mL ⁻¹)	Efeito Matriz (%)
0,05	-
0,1	2
0,5	-12
1	17
3	14
5	-13
10	-13

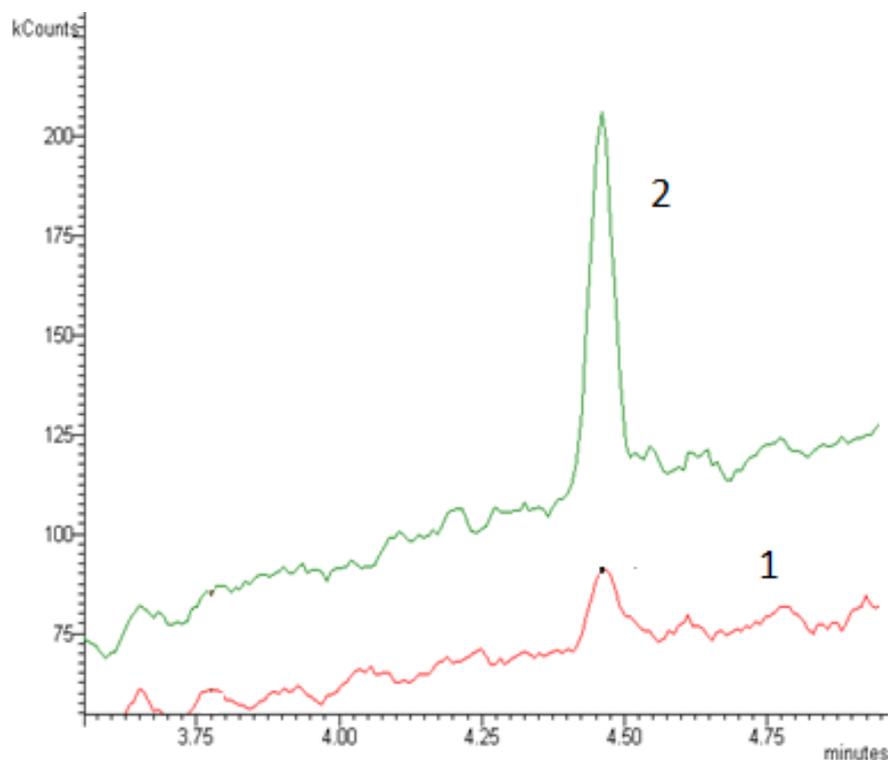
4.1.3.3 Limites de detecção e de quantificação

Os resultados de LOD e LOQ estimados, do instrumento e do método para CS₂ foram obtidos segundo o procedimento descrito no item 3.7.5.2 e estão demonstrados na Tabela 12. Os valores de LOD e LOQ do instrumento e do método foram considerados satisfatórios, considerando que o método não apresenta nenhuma etapa de pré-concentração e de purificação, e considerando-se a complexidade da matriz (biomistura) analisada. Os cromatogramas obtidos correspondentes ao LOD e ao LOQ estimados estão representados na Figura 24.

Tabela 12 – Valores de LOD e LOQ, do instrumento e do método, obtidos para o CS₂, no sistema cromatográfico GC-MS (modo SIM).

	Instrumental		Método	
	LOD (mg L ⁻¹)	LOQ (mg L ⁻¹)	LOD (mg CS ₂ kg ⁻¹)	LOQ (mg CS ₂ kg ⁻¹)
CS ₂	0,1	0,5	0,2	1,0

Figura 24 – Cromatogramas totais de íons obtidos por GC-MS (modo SIM), através da injeção das soluções analíticas de CS₂ nas concentrações de 0,1 e 0,5 mg L⁻¹, correspondentes ao LOD_i (1) e ao LOQ_i (2) do instrumento, respectivamente.



4.1.3.4 Precisão e exatidão (estudos de fortificação e recuperação)

Os valores de recuperação, com o respectivo RSD%, para os estudos de fortificação em três diferentes concentrações (1, 3 e 5 mg CS₂ kg⁻¹), para o método otimizado, estão descritos na Tabela 13. O estudo da fortificação em cada concentração foi realizado em 7 replicatas (n=7) e os resultados da recuperação para o CS₂ foram calculados através dos parâmetros da curva analítica ($y=ax + b$).

Tabela 13 – Valores médios (n=7) de recuperação e RSD%, obtidos por GC-MS (modo SIM) nos estudos de fortificação, através da análise de “branco” de biomistura fortificada), nas concentrações de 1, 3 e 5 mg CS₂ kg⁻¹.

Fortificação (mg CS ₂ kg ⁻¹)	Concentração na curva (mg CS ₂ L ⁻¹)	Recuperação Média (%)	RSD (%)
1	2	89	9
3	6	98	10
5	10	96	11

Os resultados encontrados para os estudos de fortificação e recuperação de CS₂ foram completamente satisfatórios para as três concentrações estudadas, pois todos se encontraram dentro dos limites recomendados pelo DG-SANTE (2017), os quais devem estar entre 70 e 120%, com valores de RSD < 20%.

4.1.3.5 *Precisão intermediária*

Para o estudo da precisão intermediária, foram repetidos os ensaios de fortificação e recuperação, descritos no item 3.7.5.3, alternando-se o analista e em um intervalo de três dias após o primeiro procedimento. Após a injeção dos extratos no sistema GC-MS, foram coletadas as áreas dos picos cromatográficos do CS₂ e foram realizados os cálculos das recuperações para cada concentração. Após, calculados os valores médios de recuperação obtidos com as extrações realizadas pelo segundo analista (Tabela 14), foram calculadas as médias das recuperações entre os resultados obtidos pelos dois analistas para se obter o valor da precisão intermediária em termos de RSD%. Estes resultados encontram-se na Tabela 15.

Tabela 14 – Valores médios (n=7) de recuperação e RSD%, obtidos por GC-MS (modo SIM) nos estudos de fortificação para a determinação da precisão intermediária do método, através da análise de “branco” de biomistura fortificada nas concentrações de 1, 3 e 5 mg CS₂ kg⁻¹.

Fortificação (mg CS ₂ kg ⁻¹)	Concentração na curva (mg CS ₂ L ⁻¹)	Recuperação Média (%)	RSD (%)
1	2	91	15
3	6	111	11
5	10	118	13

Tabela 15 – Comparação entre os valores médios de recuperação, obtidos por GC-MS (modo SIM) através da análise de biomisturas “branco” fortificadas nas concentrações de 1, 3 e 5 mg CS₂ kg⁻¹ (n=7), realizadas por dois analistas, no intervalo de 3 dias, no estudo da precisão intermediária.

Fortificação (mg CS ₂ kg ⁻¹)	Concentração na curva (mg CS ₂ L ⁻¹)	Média de Recuperação % (n=7)		RSD (%)
		Analista 1	Analista 2	
1	2	86	91	2
3	6	98	111	8
5	10	96	118	15

Os resultados de repetitividade e precisão intermediária obtidos para o método são aceitáveis, uma vez que estes valores encontram-se dentro dos limites aceitos nos processos de validação de métodos cromatográficos, de acordo com o DG-SANTE (2017), onde a precisão aceitável para valores de área deve ser ≤ 20%.

4.1.3.6 Análise de amostras de biomisturas

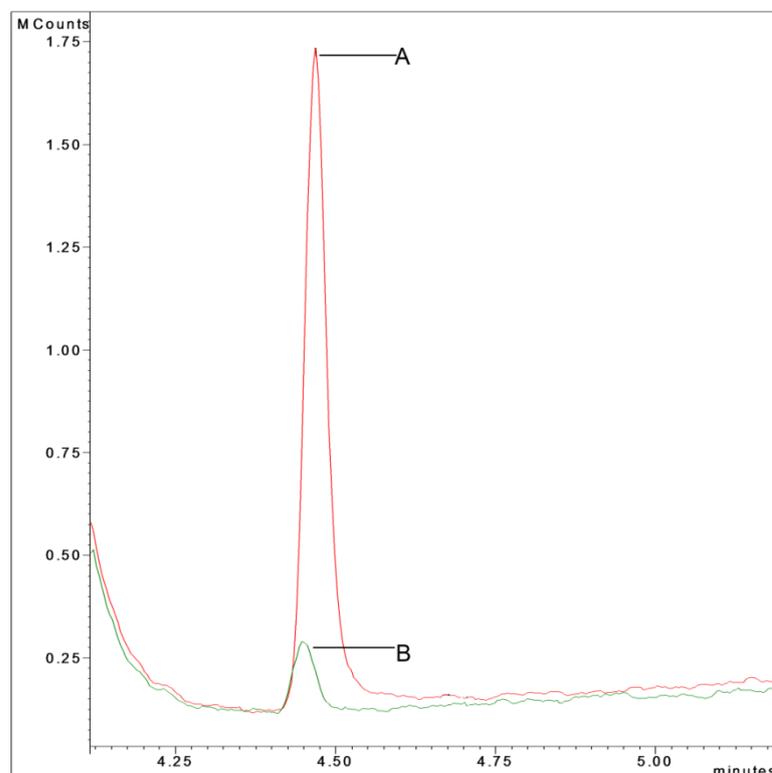
Após a análise das amostras de biomisturas dos reatores nos quais foram simulados um derrame acidental, utilizando uma única aplicação de 1 L (reatores 2A e 2B) e 0,5 L (reatores 3A e 3B) de Dithane NT[®] contendo 4 g L⁻¹ de mancozebe (correspondente a 2,25 g L⁻¹ de CS₂), foram calculadas as concentrações de mancozebe, em termos de CS₂.

Em relação a esses resultados, 100% das amostras de biomistura dos reatores analisados apresentaram concentração de CS₂ abaixo do LOQ do método (1 mg CS₂ kg⁻¹) já no primeiro período de coleta, dois meses após a contaminação inicial. Ao final do período de 14 meses, todas as amostras de biomisturas analisadas para os reatores descritos, apresentaram resíduos de CS₂ abaixo do LOD do método (0,2 mg CS₂ kg⁻¹). É possível que esses resultados estejam relacionados com a alta capacidade de degradação do mancozebe pelos reatores estudados.

A alta taxa de degradação do mancozebe também pode ser atribuída à suas características próprias, uma vez que os DTC são conhecidos pela alta instabilidade no ambiente, sendo geralmente instáveis na presença de umidade, oxigênio e em sistemas biológicos (CRNOGORACK, SCHWACK, 2009; MUJAWAR et al., 2014). Esses resultados indicam que o macozebe foi rapidamente degradado. Além disso, a capacidade de saturação dos reatores foi avaliada adicionando o dobro do volume de solução contendo mancozebe aos reatores 2 (A e B). O reator manteve sua capacidade de degradação mesmo após receber uma concentração dobrada do agrotóxico mancozebe, uma vez que as concentrações de CS₂ estavam quase todas abaixo do LOD (0,2 mg CS₂ kg⁻¹) do método, 14 meses após contaminação.

A Figura 25 apresenta os cromatogramas de CS₂ obtidos pela análise por GC-MS, do reator 2A, o qual recebeu uma única dose concentrada de mancozebe (4 g L⁻¹) em dois tempos de amostragem (T1 e T5). Comparando os dois cromatogramas, é possível verificar a diminuição da intensidade do sinal do CS₂ no cromatograma B (14 meses após contaminação), em relação ao cromatograma A (dois meses após contaminação). Esses resultados fornecem evidências de que as camas biológicas sejam eficientes na redução das concentrações de mancozebe ao receber um derrame acidental.

Figura 25 – Cromatogramas de CS₂, obtido por GC-MS (modo SIM), através da análise de amostras de biomistura do reator 2A, coletadas (A) dois meses e (B) quatorze meses após contaminação do reator com uma dose concentrada de mancozebe (4 g L⁻¹), simulando um derrame acidental.



Os reatores 4 a 9 (com suas replicatas A e B) foram construídos com diferentes composições (biomistura, Latossolo e Nitossolo) e receberam efluentes diluídos de Dithane NT[®] provenientes das máquinas pulverizadoras. Entre todas as amostras analisadas destes reatores, apenas o reator 4A apresentou uma concentração de CS₂ superior a 10 mg kg⁻¹ (em T1).

Comparando-se os resultados obtidos para as amostras coletadas nos tempos de coleta T1 e T5, houve diminuição nas concentrações de CS₂, especialmente para os reatores 4B, 9A e 9B, o que indica a degradação do mancozebe desde o tempo de coleta T2 (Tabela 16). Além disso, a determinação da concentração de CS₂ no tempo de amostragem T1 (reatores 5A e 5B) e T4 (reatores 6A, 7A e 7B), pode ser devido à falta de homogeneidade da amostra. Além da homogeneização incompleta da amostra, a turfa ou o solo poderiam produzir torrões com diferentes níveis de degradação do mancozebe, influenciando os processos de amostragem do agrotóxico.

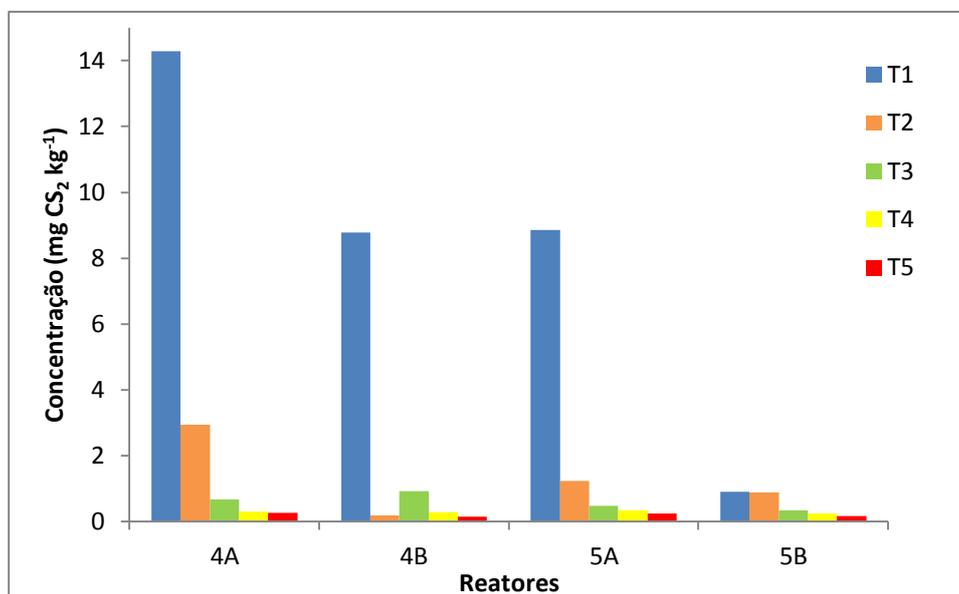
Tabela 16 – Concentrações de mancozebe, em termos de CS₂, obtidas por GC-MS (modo SIM), através da análise de amostras dos reatores compostos por biomistura (reatores 4 e 5), latossolo (reatores 6 e 7) e nitossolo (reatores 8 e 9), os quais receberam soluções diluídas de efluentes de tanque pulverizador e caldas de lavagem de máquinas agrícolas contendo Dithane NT[®] (4 g L⁻¹), em cinco tempos de coleta (T1 a T5) por um período de 14 meses.

Reatores	Concentração média (n=3) (mg CS ₂ kg ⁻¹)/RSD%				
	T1 (2 meses)	T2 (4 meses)	T3 (7 meses)	T4 (8 meses)	T5 (14 meses)
4A	14/3	3/30	<LOQm	<LOQm	<LOQm
4B	8/7	<LOQm	<LOQm	<LOQm	<LOQm
5A	9/6	≤LOQm	<LOQm	<LOQm	<LOQm
5B	<LOQm	<LOQm	<LOQm	<LOQm	<LOQm
6A	6/29	5/1	3/40	2/10	<LOQm
6B	6/32	<LOQm	<LOQm	<LOQm	<LOQm
7A	5/14	2/9	≤LOQm	≤LOQm	<LOQm
7B	3/4	≤LOQm	<LOQm	<LOQm	<LOQm
8A	6/33	≤LOQm	<LOQm	<LOQm	<LOQm
8B	3/4	<LOQm	<LOQm	<LOQm	<LOQm
9A	2/32	<LOQm	<LOQm	<LOQm	<LOQm
9B	3/3	<LOQm	<LOQm	<LOQm	<LOQm

LOQm: Limite de quantificação do método (1,0 mg CS₂ kg⁻¹)

Avaliando-se a concentração de CS₂ nos reatores com biomistura (4 e 5), (Figura 26), nota-se que a degradação do mancozebe nestes reatores é muito semelhante. Pois a partir do T2 praticamente todos os reatores mostram concentração de CS₂ <LOQm, com exceção do reator 4A.

Figura 26 – Concentrações de mancozebe, em termos de CS_2 , obtidas por GC-MS (modo SIM), através da análise de amostras de biomisturas dos reatores 4 e 5, os quais receberam soluções diluídas de efluentes de tanque pulverizador e caldas de lavagem de máquinas agrícolas, contendo Dithane NT[®] (4 g L^{-1}), em cinco tempos de coleta (T1 a T5) por um período de 14 meses.



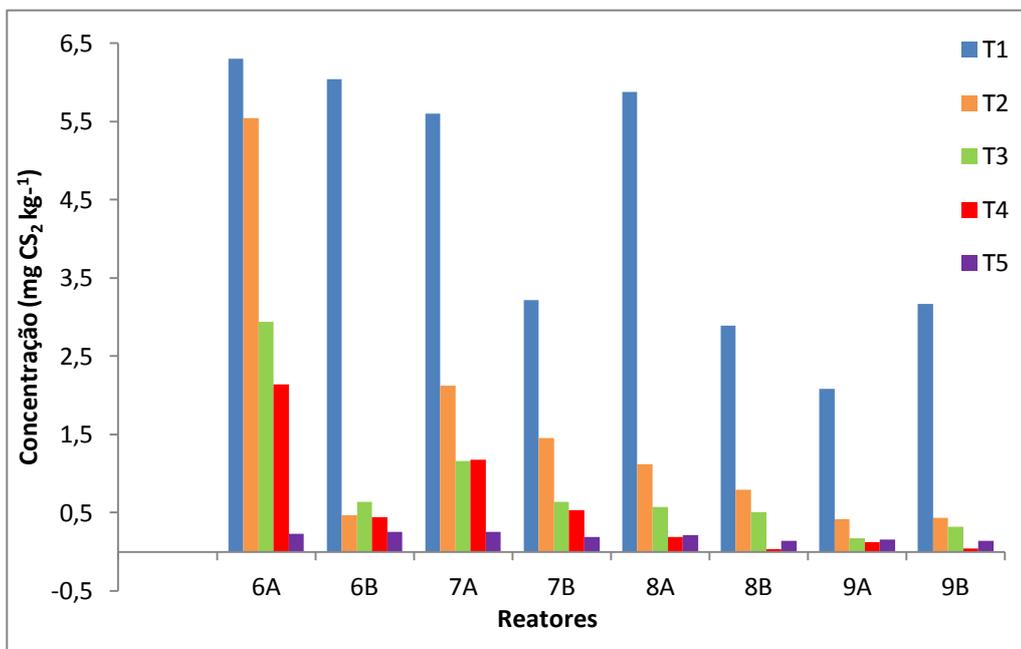
Limite de quantificação do método (LOQm)= $1,0 \text{ mg CS}_2 \text{ kg}^{-1}$

O gráfico apresentado no apêndice 1 demonstra a variação da concentração de mancozebe ao longo do tempo, referente aos reatores 4A e 5A. Observa-se que há um decaimento na concentração, que se mantém contínuo ao longo do tempo. O intervalo de confiança mostra que os dados apresentam uma adequada confiabilidade estatística, uma vez que apenas 3 pontos de todos os dados se localizam fora do intervalo de confiança de 95%, representado pelas linhas azuis.

As características do solo, tais como o pH, potencial de oxi-redução, concentração de aglutinantes orgânicos e inorgânicos a que um metal, por exemplo, poder ligar ou adsorver, e presença de Ca^{2+} , Fe^{2+} e Mg^{2+} podem interferir na disponibilidade química e biológica de mancozebe, uma vez que sua presença no solo proporciona competição entre eles pelos locais de adsorção (MATOS et al., 2001). Como o Latossolo e o Nitossolo têm quase o mesmo valor de pH, matéria orgânica e teor de carbono orgânico total, essas características podem não causar diferenças na disponibilidade de mancozebe. A principal diferença entre esses 2 tipos de solo é a sua quantidade de metal, como pode ser verificado na Tabela 4 no item 3.6.2. Mancozebe é composto principalmente por Mn e Zn (CRNOGORAC,

SCHWAK, 2009), essa característica pode influenciar em uma maior disponibilidade na presença de cátions concorrentes, como Ca^{2+} (MATOS et al., 2001). Essas características do mancozebe podem explicar a diferença na repetibilidade dos resultados entre dois reatores contaminados, observados pela persistência do CS_2 nos reatores 6A, 7A e 7B, o que pode ser comparado na Figura 27.

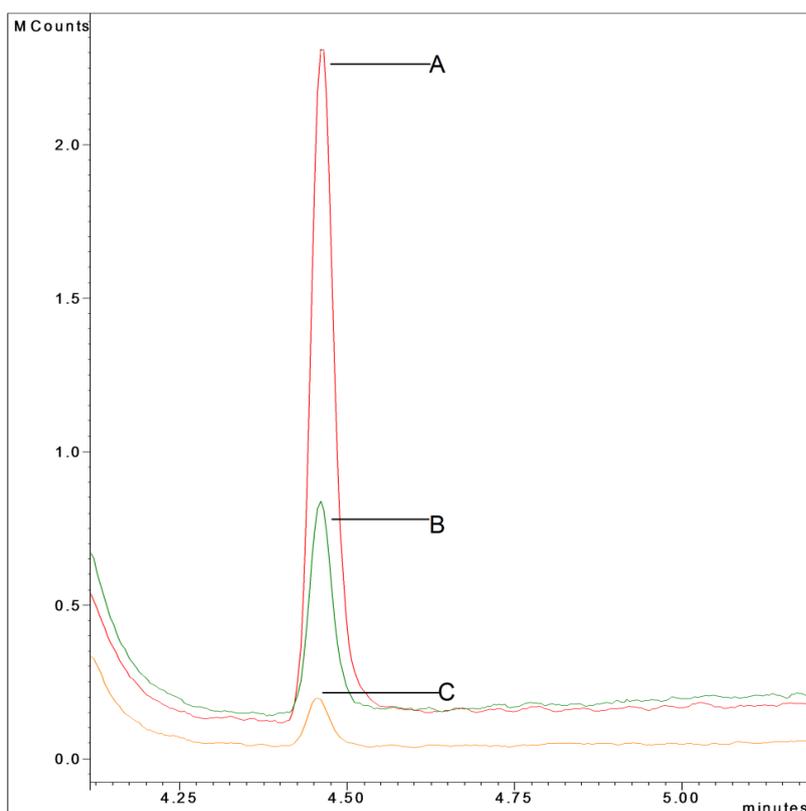
Figura 27 – Concentrações de mancozebe, em termos de CS_2 , obtidas por GC-MS (modo SIM), através da análise de amostras de solos, dos reatores compostos por Latossolo (reatores 6 e 7) e Nitossolo (reatores 8 e 9), os quais receberam soluções diluídas de efluentes de tanque pulverizador e caldas de lavagem de máquinas agrícolas contendo Dithane NT[®] (4 g L^{-1}), em cinco tempos de coleta (T1 a T5), durante 14 meses.



Limite de quantificação do método (LOQm)= $1,0 \text{ mg CS}_2 \text{ kg}^{-1}$

Na Figura 28, pode-se visualizar a diminuição da intensidade do sinal entre os picos de CS_2 , no cromatograma A (dois meses após contaminação do reator) e nos cromatogramas B e C (6 meses e quatorze meses, respectivamente, após contaminação do reator) o que está de acordo com a diminuição da concentração de CS_2 após quatorze meses de contaminação dos reatores, comprovando a eficiência de degradação do mancozebe no sistema de camas biológicas.

Figura 28 – Cromatogramas de CS₂ obtidos por GC-MS (modo SIM), através da análise do reator 6B ((composto pot latossolo) em três tempos de coleta (A) dois meses, (B) sete meses e (C) quatorze meses após contaminação deste reator com efluentes do pulverizador e com caldas de lavagem contendo Dithane NT[®] (4 g L⁻¹).



A mobilidade ambiental e a persistência de qualquer agrotóxico são controladas primariamente pelas características de sorção do solo, pela solubilidade em água e pela meia-vida do agrotóxico. Os agrotóxicos altamente solúveis, com baixa capacidade de sorção tendem a se mover mais rapidamente através do sistema de camas biológicas do que os agrotóxicos com alta capacidade de sorção. Esse fato reduz o tempo de residência do agrotóxico diminuindo as oportunidades para os microrganismos degradá-los (COOPER et al., 2016).

Os agrotóxicos são degradados, em sua maioria, por processos co-metabólicos, favorecidos pelos constituintes da cama biológica. As bactérias e os fungos produzidos através da degradação da palha produzem enzimas que são capazes de quebrar produtos químicos tóxicos que, de outra forma, não poderiam ser degradados (CASTILHO, TORSTENSSON, 2007). No entanto, os agrotóxicos têm susceptibilidade diferentes frente às enzimas oxidativas produzidas por bactérias e fungos devido às diferenças estruturais. Dessa forma, mesmo os

agrotóxicos com alta capacidade de sorção que são retidos dentro da cama biológica podem apresentar baixas taxas de degradação (COOPER et al., 2016).

Pouco se sabe sobre a composição, bem como sobre a dinâmica da comunidade microbiana em sistemas de camas biológicas, mas há evidências de que a concentração bacteriana está envolvida no processo relevante em sistemas de camas biológicas, como a decomposição da matéria orgânica proveniente de detritos de plantas e degradação de poluentes orgânicos (DIAZ et al. 2016; KARAS et al., 2015, 2016; TORTELLA et al, 2012, 2016).

Embora os efeitos dos agrotóxicos possam ser estudados isolados, no campo esta realidade é bastante diferente, sendo necessária a integração de agrotóxicos presentes em camas biológicas uma vez que esse sistema recebe resíduos de todos os tipos de inseticidas, fungicidas, herbicidas e de todos os grupos de agrotóxicos que podem ser aplicados no campo. A degradação microbiana de agrotóxicos em sistemas de camas biológicas pode ser vista como o resultado final de um processo complexo e interativo entre funções metabólicas e co-metabólicas (KARANASIOS, TSIROPOULOS, KARPOUZAS, 2013).

Os resultados deste estudo demonstram claramente a eficácia de um sistema com biomistura formada por palha-turfa-solo na redução dos resíduos de mancozebe, mesmo quando são depositados volumes substanciais de águas contaminadas provenientes dos pulverizadores. Esse sistema mostrou-se eficaz para reduzir as concentrações de agrotóxicos ditiocarbamatos a níveis ambientalmente aceitáveis, o que proporciona uma diminuição significativa do risco de contaminação das águas.

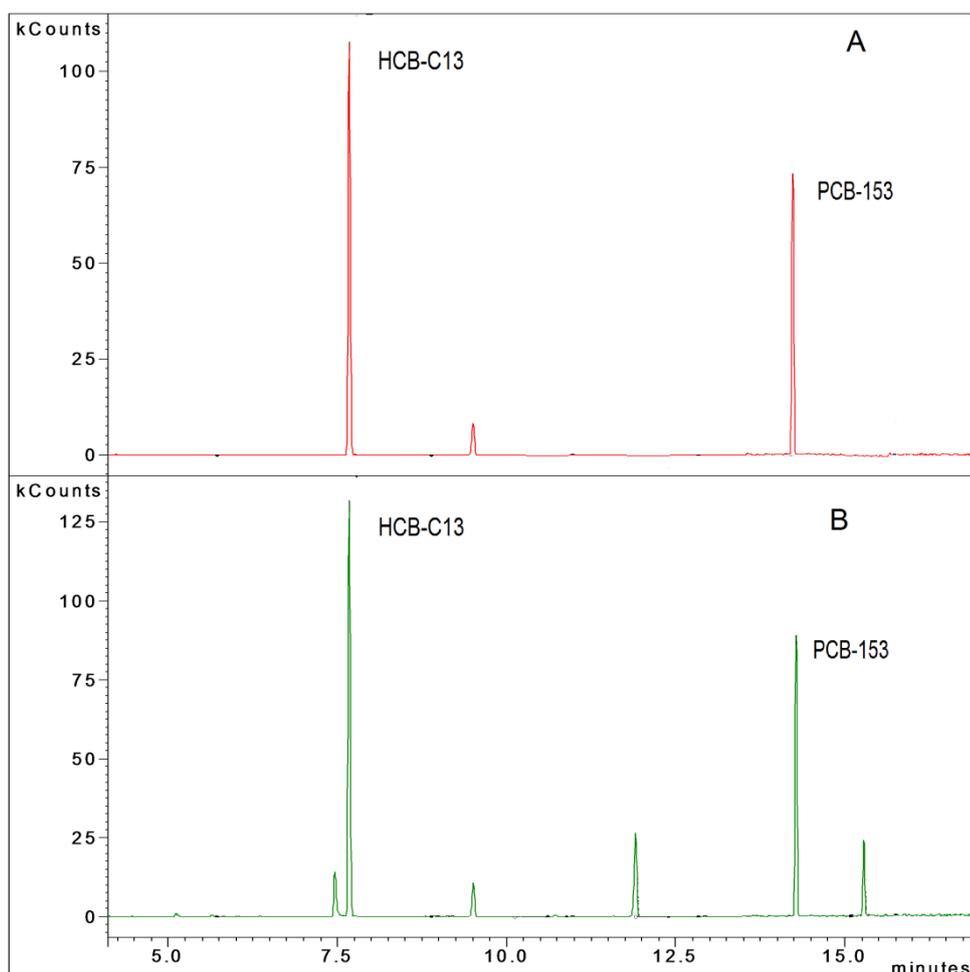
4.2 MÉTODO MULTIRRESIDUAL

4.2.1 Análise dos solventes, reagentes e do “branco” da biomistura

Previamente aos estudos de extração e fortificação das amostras, todos os solventes e reagentes empregados durante o estudo, bem como o “branco” da biomistura, foram submetidos ao mesmo procedimento de extração, descrito no item 3.7.4.3, com a finalidade de se verificar a pureza dos mesmos, evitando-se contaminações. Na Figura 29, pode-se visualizar os cromatogramas obtidos para (A) solventes e reagentes bem como para o (B) “branco” da biomistura através das

análises de extratos dos mesmos no sistema GC-MS/MS (modo MRM), aplicando-se o método multirresidual otimizado. Pode-se claramente observar a presença de apenas um pico no cromatograma dos solventes e reagentes (A), sendo os outros dois picos pertencentes aos padrões internos do procedimento (PCB-153) e do instrumento (HCB-C13). No cromatograma do “branco” da biomistura (B), é possível visualizar picos de outras substâncias presentes na matriz, além dos picos dos padrões internos utilizados para controle de qualidade do método.

Figura 29 – Cromatogramas totais obtidos por GC-MS/MS (modo MRM), através da análise do (A) extrato branco dos solventes e reagentes e (B) do “branco” da biomistura empregando o procedimento de extração validado para determinação multirresidual de agrotóxicos em camas biológicas.



4.2.2 Otimização do método cromatográfico

4.2.2.1 Seleção do método de extração

A avaliação dos métodos de extração 1 e 2, descritos nos itens 3.7.4.2 e 3.7.4.3, permitiu selecionar o método que apresentasse recuperações entre 70% e 120% e $RSD \leq 20\%$ para todos os agrotóxicos estudados. O método 1 não alcançou os critérios de validação do documento DG-SANTE (2017), pois as recuperações obtidas ficaram fora dos limites recomendados de 70%-120%, e os valores de RSD entre 2 e 28% como demonstrado na Tabela 17. De alguma forma, podem ter ocorrido perdas dos agrotóxicos durante a etapa de evaporação ou ainda durante a extração pelo fato de se utilizar apenas 5,0 g de amostra, o que poderiam explicar recuperações menores encontradas para o método 1.

Tabela 17 – Valores médios de recuperação e RSD%, obtidos por GC-MS/MS (modo MRM), através da análise de biomisturas “branco” fortificadas com os agrotóxicos avaliados no método multirresidual, nas concentrações de 100 e 200 $\mu\text{g kg}^{-1}$ e extraídas empregando o método 1 (acetona:água:ácido fosfórico, 98:1:1, v/v/v) (n=3).

Agrotóxico	fortificação ($\mu\text{g kg}^{-1}$)							
	Teste 1 (evaporação de 125 μL / reconstituição em 250 μL)				Teste 2 (evaporação de 1000 μL /reconstituição em 1000 μL)			
	100		200		100		200	
	Rec. %	RSD%	Rec. %	RSD%	Rec. %	RSD%	Rec. %	RSD%
Captana	n.d.	-	n.d.	-	n.d.	-	n.d.	-
Tetrahydroftalimida ^a	73	4	62	8	32	28	25	27
Clorotalonil	96	2	135	14	58	17	60	12
Clorpirifós	66	11	62	6	57	6	67	4
Fosmete	106	6	82	6	52	12	104	14
Metidationa	62	4	70	5	73	7	73	4
Tebuconazol	79	4	66	6	71	2	29	10
Fenitrotiona	74	4	62	5	55	4	30	7

^a Produto de degradação do agrotóxico captana, não incluído na solução mistura de fortificação; n.d., não detectado.

O método de extração 2 apresentou percentuais de recuperações e RSD% dentro dos limites recomendados pelo DG-SANTE (2017), como demonstrado na Tabela 18. Portanto, o método 2 foi selecionado para a validação em camas biológicas. Uma vez que na análise dos resultados preliminares, o método 2 apresentou os melhores valores de recuperação e precisão, foram realizados novos estudos de fortificação e recuperação nas concentrações de 20 e 50 $\mu\text{g kg}^{-1}$, para a verificação dos limites de quantificação para cada agrotóxico.

Tabela 18 – Valores médios de recuperação e RSD%, obtidos por GC-MS/MS (modo MRM), através da análise de biomistura “branco” fortificada com os agrotóxicos avaliados no método multirresidual, nas concentrações de 20, 50, 100 e 200 $\mu\text{g kg}^{-1}$ e extraídas empregando o método 2 (acetona:isooctano:tolueno, 2:2:1, v/v/v) (n=3).

Agrotóxico	Fortificação ($\mu\text{g kg}^{-1}$)							
	20		50		100		200	
	Rec. %	RSD%	Rec. %	RSD%	Rec. %	RSD%	Rec. %	RSD%
Captana	26	12	53	10	n.d.	-	n.d.	-
Tetrahidroftalimida ^a	137	1	75	3	99	7	73	10
Clorotalonil	189	0,5	84	1	103	3	87	6
Clorpirifós	108	2	84	9	89	12	89	6
Fosmete	169	14	118	3	106	7	99	2
Metidationa	93	8	112	7	94	15	102	4
Tebuconazol	132	0,7	91	11	104	10	101	5
Fenitrotona	139	0,5	108	5	93	8	96	3

^a Produto de degradação do agrotóxico captana, não incluído na solução mistura de fortificação; n.d., não detectado.

4.2.3 Validação do método multirresidual

4.2.3.1 Curva Analítica e Linearidade

A avaliação da linearidade das curvas analíticas foi efetuada com base em injeções de soluções analíticas preparadas tanto em solvente orgânico (acetona:isooctano:tolueno, 2:2:1, v/v/v) quanto em extrato “branco” de biomistura, nas concentrações de 1, 5, 10, 20, 50, 100, 200 e 300 ng mL^{-1} . Essas soluções foram analisadas sete vezes (n = 7) cada uma e após foram realizados os cálculos

das médias das áreas obtidas. O RSD entre as áreas, as equações das curvas analíticas, os coeficientes de determinação (r^2) e o intervalo linear foram determinados para cada agrotóxico e estão descritos na Tabela 19.

Tabela 19 – Parâmetros das curvas analíticas obtidas através de soluções analíticas preparadas em solvente orgânico (acetona:isooctano:tolueno, 2:21, v/v/v) e em extrato “branco” de biomistura, para os agrotóxicos estudados e analisados por GC-MS/MS (modo MRM).

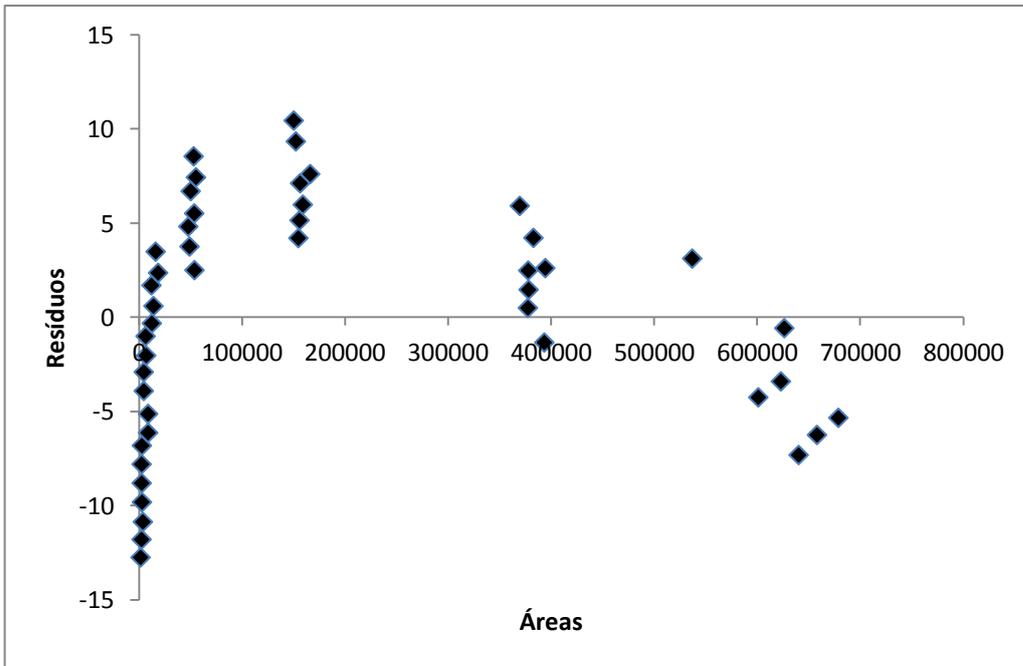
Agrotóxico	Curva analítica em solvente orgânico			Curva analítica em extrato “branco” de biomistura		
	Inclinação (a)	Intersecção (b)	r^2	Inclinação (a)	Intersecção (b)	r^2
Captana	-	-	-	-	-	-
Tetrahydroftalimida ^a	1460	23080	0,9892	2149	32112	0,9918
Clorotalonil	2620	64241	0,9819	2825	41726	0,9924
Clorpirifós	5985	50977	0,9986	5359	72947	0,9871
Fenitrotona	3129	59999	0,9642	4027	46508	0,9977
Fosmete	3314	65086	0,956	4973	35580	0,995
Metidationa	10801	156782	0,9721	13726	81639	0,9993
Tebuconazol	8263	160680	0,978	9649	38408	0,9981

^a Produto de degradação do agrotóxico captana, não incluído na solução mistura de calibração e fortificação.

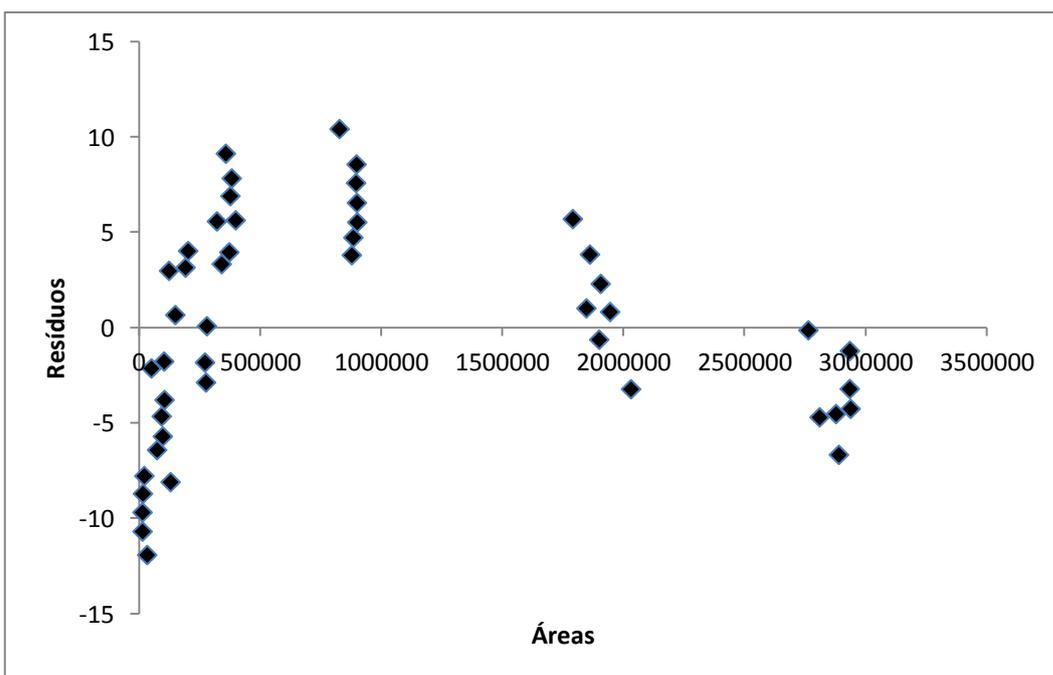
As curvas analíticas de cada agrotóxico estudado, quando preparadas em extrato “branco” de biomistura, apresentaram coeficientes de determinação $r^2 > 0,99$ para 5 agrotóxicos e o produto de degradação tetrahydroftalimida e o clorpirifós apresentaram $r^2 > 0,98$. Já quando as soluções analíticas dos agrotóxicos foram preparadas em solvente orgânico, os valores de r^2 foram maiores do que 0,956 para todos os agrotóxicos estudados. O desvio padrão relativo calculado dos resíduos das curvas analíticas obtidas a partir de soluções analíticas preparadas em extrato “branco” de biomistura, foi inferior a 20% (Figura 30) para todos os agrotóxicos, os quais estão de acordo com os critérios adotados pelo GD-SANTE (2017) para considerar um método como sendo linear.

Figura 30 – Resíduos das curvas analíticas obtidas a partir de soluções analíticas preparadas em extrato “branco” de biomistura e analisadas por GC-MS/MS (modo MRM), para os agrotóxicos (A) tetrahydroftalimida, (B) tebuconazol, (C) fosmete, (D) metidationa, (E) clorpirifós, (F) clorotalonil e (G) fenitrotona.

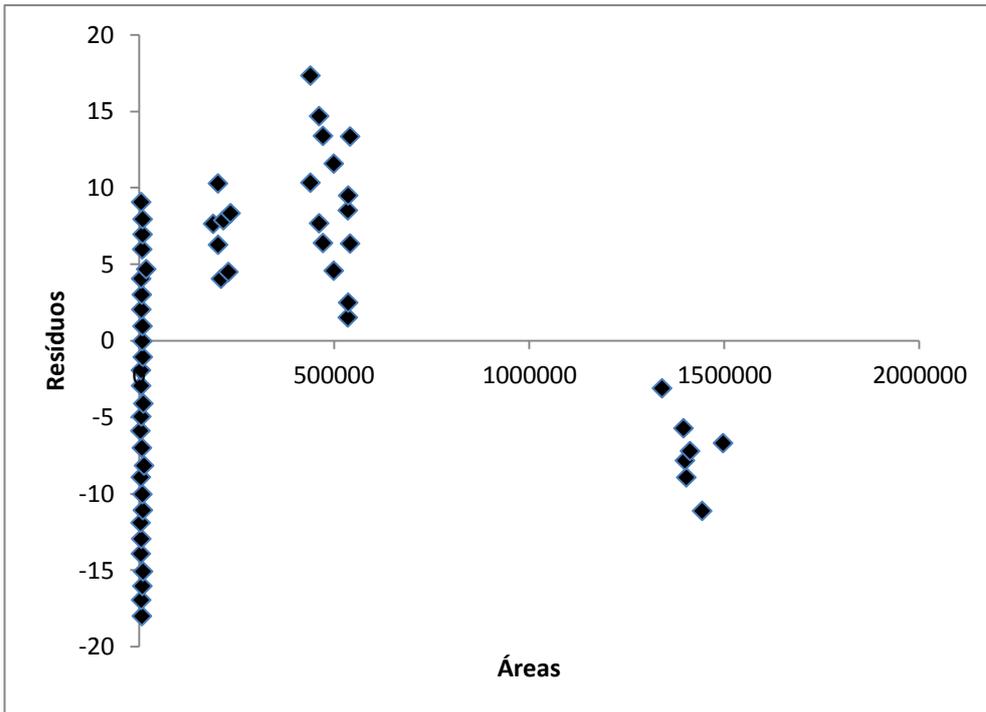
(A) Tetrahydroftalimida



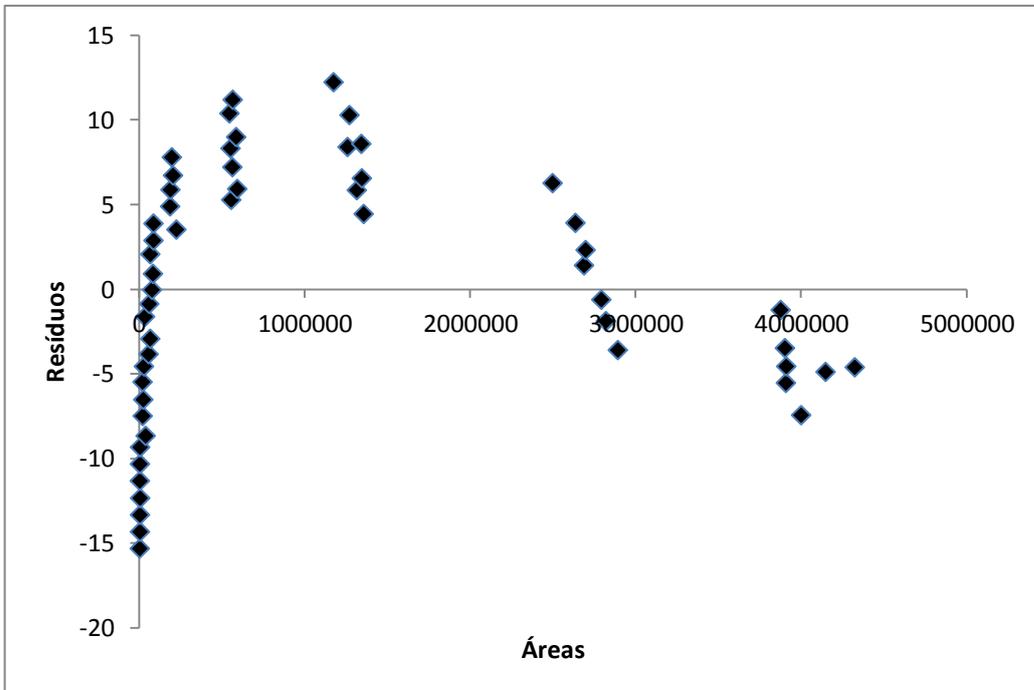
(B) Tebuconazol



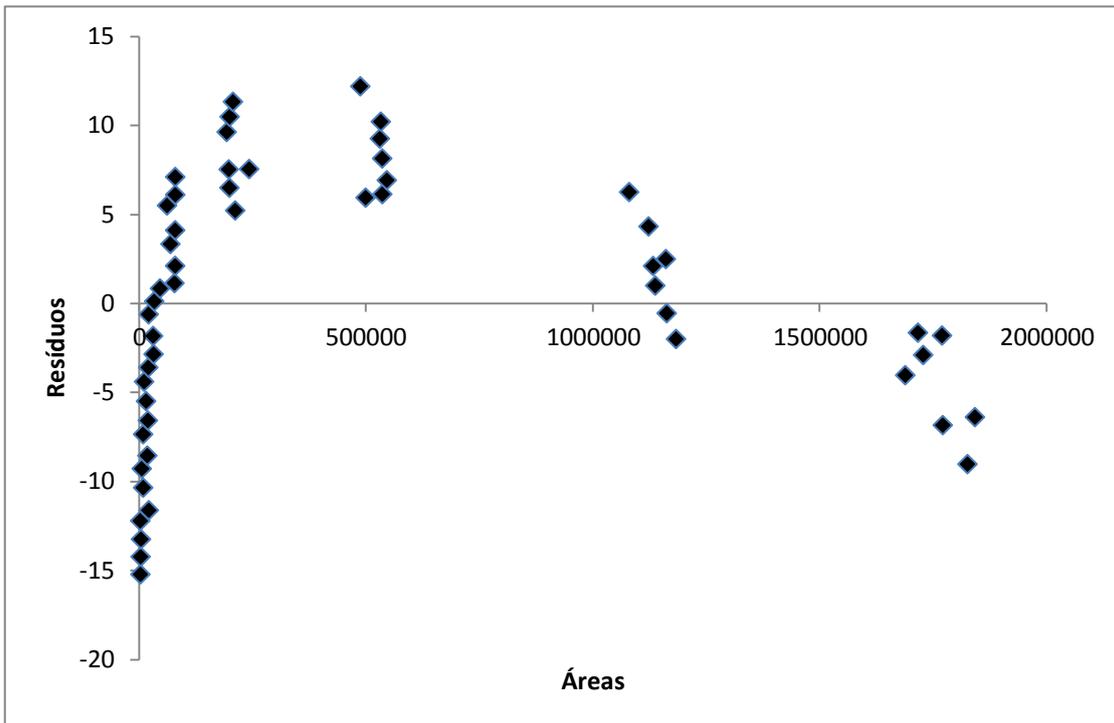
(C) Fosmete



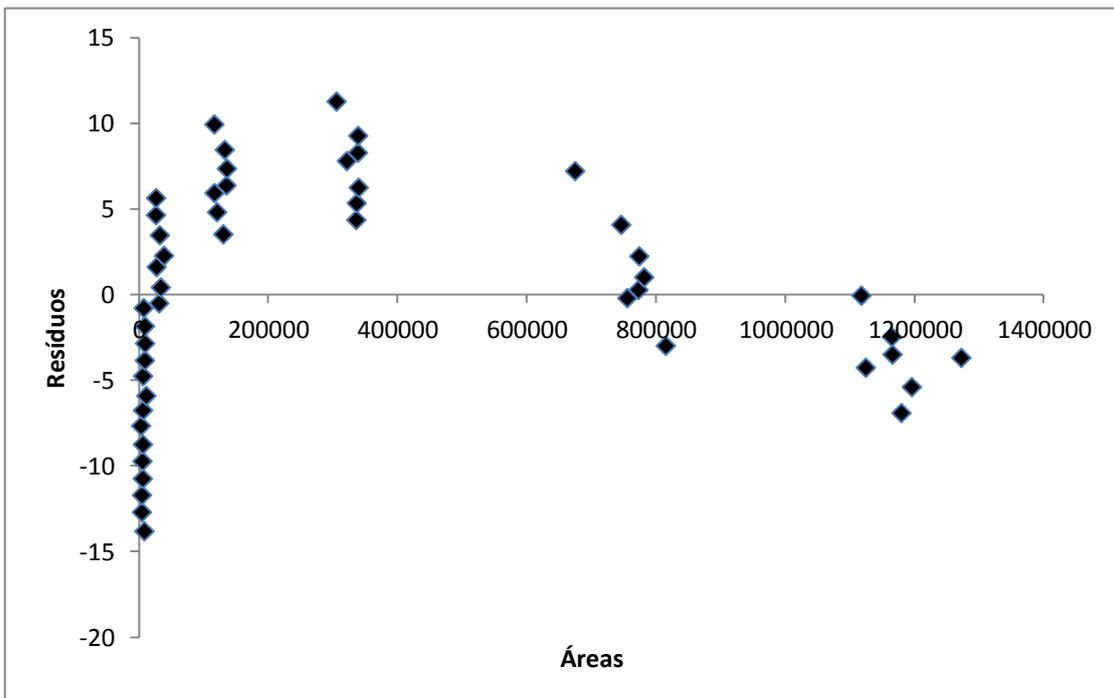
(D) Metidationa



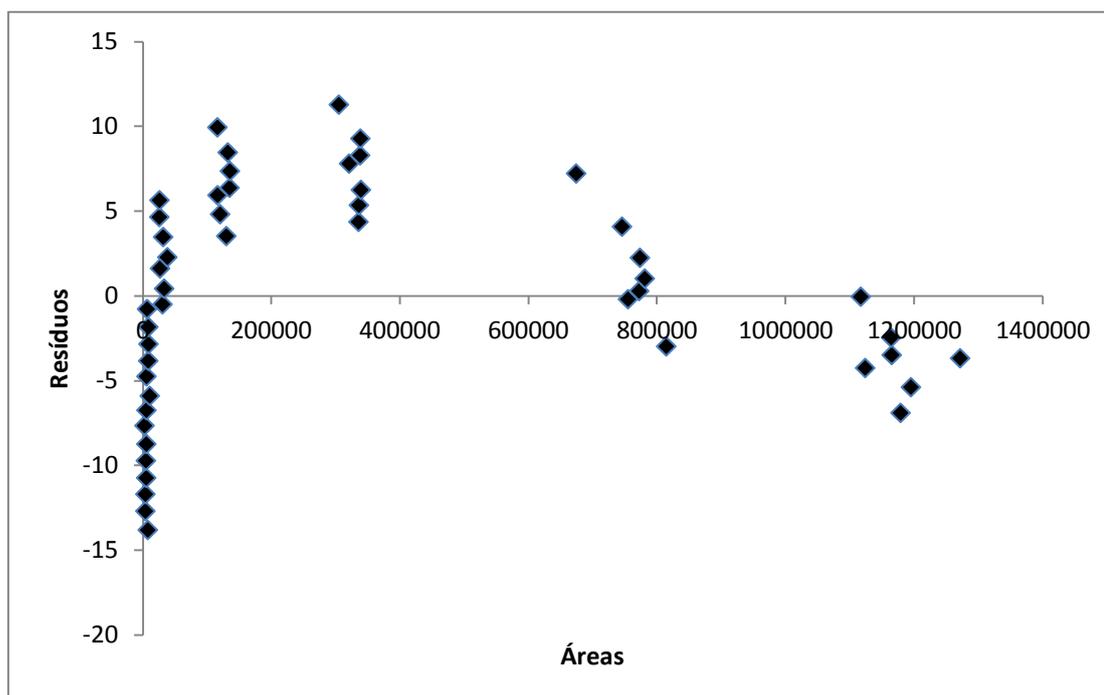
(E) Clorpirifós



(F) Clorotalonil



(G) Fenitrotiona



A resposta do triplo quadrupolo-MS foi linear de 1 a 300 ng mL⁻¹ para clorpirifós, fosmete e metidathiona e de 5 a 300 ng mL⁻¹ para tetrahydroftalimida (produto de degradação da captana), clorotalonil, fenitrotiona e tebuconazol (Tabela 20).

4.2.3.2 Limites de detecção e de quantificação

O LOD do método foi de 10 µg kg⁻¹ para clorpirifós, fosmete e metidathiona e de 20 µg kg⁻¹ para tetrahydroftalimida (produto de degradação da captana), clorotalonil, fenitrotiona e tebuconazol. De acordo com o DG-SANTE (2017), o LOQ do método é definido como o menor nível de fortificação que atende aos critérios de recuperação e precisão aceitáveis dentro de uma faixa de 70 a 120% e RSD ≤ 20%. De acordo com esse critério, para todos os agrotóxicos estudados, o LOQ do método foi de 50 µg kg⁻¹. Os valores para LOD e LOQ (Tabela 20) são satisfatórios, considerando a complexidade da matriz e a simplicidade do método, uma vez que não são necessárias etapas de purificação e evaporação.

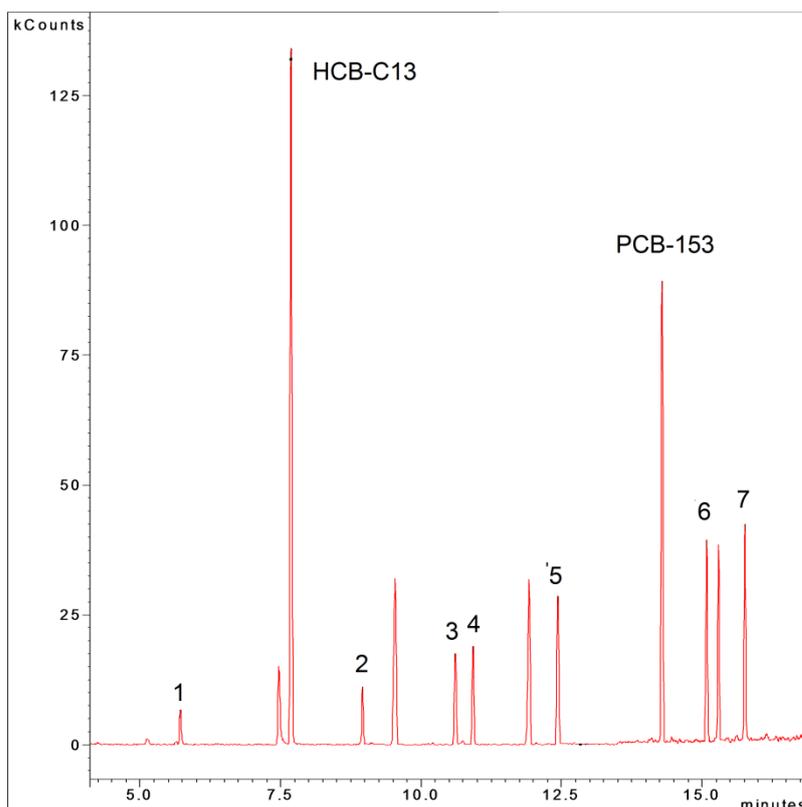
Tabela 20 – Faixa linear, limites de detecção (LOD) e de quantificação (LOQ) do método, para os agrotóxicos estudados e analisados por GC-MS/MS (modo MRM).

Agrotóxico	Faixa Linear (ng mL ⁻¹)	LOD (µg kg ⁻¹)	LOQ (µg kg ⁻¹)
Captana	-	-	-
Tetraidroftalimida ^a	5-300	20	50
Clorotalonil	5-300	20	50
Clorpirifós-etil	1-300	10	50
Fenitrotiona	5-300	20	50
Fosmete	1-300	10	50
Metidationa	1-300	10	50
Tebuconazol	5-300	20	50

^a Produto de degradação do agrotóxico captana, não incluído na solução mistura de fortificação.

Na Figura 31, pode-se observar o cromatograma obtido pela análise de uma solução analítica em extrato “branco” de biomistura, contendo os 6 agrotóxicos, na concentração de 50 ng mL⁻¹. Neste cromatograma é possível visualizar os picos dos padrões internos do procedimento (PCB-153) e do instrumento (HCB-C13), além dos picos dos demais agrotóxicos estudados, numerados de acordo com o tempo de retenção de cada substância: 1-tetraidroftalimida, 2-clorotalonil, 3-fenitrotiona, 4-clorpirifós, 5-metidationa, 6-tebuconazol e 7-fosmete.

Figura 31 – Cromatograma total obtido a partir de uma solução analítica preparada em extrato “branco” de biomistura, na concentração de 50 ng mL⁻¹, representando os 6 agrotóxicos avaliados e o produto de degradação tetrahidroftalimida, obtido por GC-MS/MS (modo MRM). Os picos foram numerados de acordo com o tempo de retenção de agrotóxico: 1-Tetradifrofitalimida, 2-clorotalonil, 3-fenitrotiona, 4-clorpirifós, 5-metidationa, 6-tebuconazol e 7-fosmete.



4.2.3.3 Efeito Matriz

Atualmente, a abordagem mais prática e reconhecida para compensar o efeito matriz é o método de superposição de matriz (“matrix-matched calibration”) (ANASTASSIADES, MASTOVSKÁ, LEHOTAY, 2003; TSUCHIYAMA, KATSUHARA, NAKAJIMA, 2017), sendo necessário preparar as soluções analíticas tanto em solvente orgânico quanto no extrato “branco” da matriz, possibilitando a avaliação do efeito matriz através da comparação das inclinações das curvas analíticas obtidas a partir destas soluções (UCLÉS et al, 2017; RAJSKI et al, 2013). Os valores obtidos de efeito matriz dentro do intervalo de -20 a 20% (supressão ou aumento de sinal), geralmente é considerado insignificante de acordo com o documento de orientação DG-SANTE (2017). Para valores de efeito matriz considerados médios (supressão ou aumento de ± 20 a $\pm 50\%$) ou fortes (supressão ou aumento $> \pm 50\%$) torna-se

necessário empregar o método de superposição de matriz (UCLÉS et al, 2017; RAJSKI et al, 2013; TAHA, GADALLA, 2017).

Os valores obtidos de efeito matriz através da equação 4, descrita no item 3.6.6.5 classificaram-se entre médio e forte para todos os agrotóxicos estudados (Tabela 21), com exceção do clorpirifós, cujo valor de -20% encontra-se dentro dos limites considerados como não significativos. Por esta razão, todas as curvas analíticas foram confeccionadas a partir de soluções analíticas em extrato “branco” de biomistura nas análises quantitativas. Esses valores de efeito matriz estão de acordo com o comportamento desses agrotóxicos em sistemas de GC devido à acumulação de substâncias da matriz em sítios ativos no insersor e na coluna cromatográfica. Matrizes comumente consideradas difíceis, como no caso das camas biológicas, tendem a apresentar mais agrotóxicos com um efeito matriz fortemente positivo ($> \pm 50\%$) (UCLÉS et al, 2017).

Tabela 21 – Efeito matriz calculado através da diferença da inclinação das curvas analíticas obtidas através de soluções analíticas preparadas em solvente orgânico e em extrato “branco” de biomistura, em oito concentrações, injetadas sete vezes cada concentração (n=7), para os agrotóxicos analisados por GC-MS/MS (modo MRM).

Agrotóxico	Efeito matriz (%)
Captana	n.d.
Tetrahydroftalimida ^a	47
Clorotalonil	61
Clorpirifós	-20
Fenitrotiona	51
Fosmete	106
Metidationa	38
Tebuconazol	25

^a Produto de degradação do agrotóxico captana, não incluído na solução mistura de fortificação;

4.2.3.4 Exatidão e precisão (estudo de fortificação e recuperação)

Os resultados obtidos nos ensaios de fortificação e recuperação (%) e os desvios padrões relativos (RSD%) das biomisturas fortificadas a 50, 100 e 200 µg

kg⁻¹ e extraídas pelo procedimento de extração otimizado, esquematizado na figura 18 e descrito no item 3.7.4.3, são mostrados na Tabela 22. Os resultados obtidos para os seis agrotóxicos testados mais um produto de degradação são satisfatórios, com valores de recuperações na faixa de 75 a 117%, para as três concentrações de fortificação, com todos os valores de desvio padrão relativo (RSD%) inferiores a 14%, estando de acordo com o GD-SANTE (2017).

Os dados obtidos neste estudo foram submetidos estatisticamente aos testes de Grubbs (verifica preliminarmente a existência de um valor anômalo em cada extremidade do conjunto), teste F (comparação de variância) e teste t (comparação de médias) e os resultados obtidos da análise estatística foram satisfatórios.

Tabela 22 – Valores médios (n=7) de recuperação e RSD%, obtidos por GC-MS/MS (modo MRM), através da análise de biomistura “branco” fortificadas nas concentrações de 50, 100 e 200 µg kg⁻¹, no estudo da exatidão e precisão do método multirresidual.

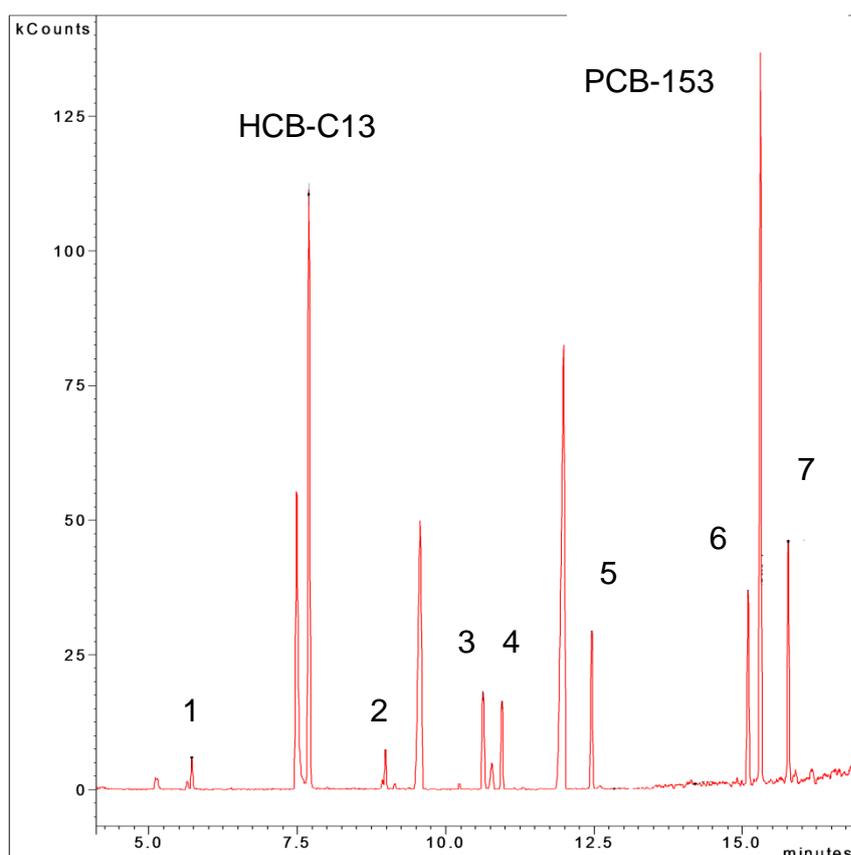
Agrotóxico	Conc. de fortificação (µg kg ⁻¹)/ Conc. na curva analítica (ng mL ⁻¹)					
	50/10		100/20		200/40	
	Rec (%)	RSD (%)	Rec (%)	RSD (%)	Rec (%)	RSD (%)
Captana	n.d.	-	n.d.	-	n.d.	-
Tetrahydroftalimida ^a	81	2	108	10	93	11
Clorotalonil	75	6	95	8	80	3
Clorpirifós	116	10	110	13	103	6
Fenitrotiona	86	6	117	6	104	5
Fosmete	104	9	107	14	107	8
Metidationa	111	4	116	3	105	5
Tebuconazol	107	5	112	6	104	5

^a Produto de degradação do agrotóxico captana, não incluído na solução mistura de fortificação; n.d., não detectado.

Na Figura 32, tem-se um cromatograma obtido dos ensaios de fortificação e recuperação, correspondente ao nível intermediário de fortificação (100 µg kg⁻¹). Pode-se verificar no cromatograma, que apesar do efeito matriz apresentado pelos agrotóxicos estudados, o cromatograma apresenta boa resolução e separação de picos, sendo possível visualizar os picos cromatográficos dos padrões internos do procedimento (PCB-153) e do instrumento (HCB-C13), além dos picos dos agrotóxicos avaliados, numerados de acordo com o tempo de retenção, na seguinte ordem: 1-tetradiftoftalimida (t_R=5,71 min), 2-clorotalonil (t_R=8,89 min), 3-fenitrotiona

($t_R=10,61$ min), 4-clorpirifós ($t_R=10,89$ min), 5-metidationa ($t_R=12,39$ min), 6-tebuconazol ($t_R=15,07$ min), e 7-fosmete ($t_R=15,76$ min).

Figura 32 – Cromatograma total obtido por GC-MS/MS (modo MRM), através da análise de biomistura “branco” fortificada na concentração de $100 \mu\text{g kg}^{-1}$, apresentando os 6 agrotóxicos estudados e o produto de degradação tetrahidroftalimida, numerados de acordo com o tempo de retenção: 1-Tetradifroftalimida, 2-clorotalonil, 3-fenitrotiona, 4-clorpirifós, 5-metidationa, 6-tebuconazol e 7-fosmete.



A degradação de fungicidas N-trihalometiltio, como a captana, é bastante rápida na presença de substâncias básicas e pode ocorrer não apenas no ambiente e nos organismos vivos, mas também no processamento e análise de amostras. Estudo relativo à estabilidade de agrotóxicos em diferentes solventes mostram que a captana e o clorotalonil apresentam instabilidade em certos solventes, como acetonitrila e acetato de etila (MASTOVSKÁ, LEHOTAY, 2004). Geralmente, essas substâncias são propensas a degradação em condições básicas, sendo necessário estabilizar as mesmas adicionando HAc ao solvente. Seguindo, os autores relataram não haver diminuição significativa da concentração de captana e clorotalonil em tolueno, isoctano ou hexano, mesmo quando as soluções foram mantidas durante 5

dias em vial de GC (MASTOVSKÁ, LEHOTAY, 2004). O que não foi verificado neste trabalho, uma vez que a captana não foi detectada, apenas seu produto de degradação, tetrahidroftalimida.

O clorotalonil está incluído entre os agrotóxicos mais desafiadores para ser determinado nos métodos multirresiduais utilizando GC como passo determinante, pois apesar de ser termicamente estável, é suscetível ao efeito matriz (MASTOVSKÁ, LEHOTAY, 2004). Neste estudo, foram observados valores satisfatórios de recuperação para o clorotalonil bem como boa estabilidade e forma do seu pico cromatográfico.

4.2.3.5 Precisão intermediária

Para a avaliação da precisão intermediária do método, foi realizado um segundo estudo de validação, exatamente nas mesmas condições nas quais foram realizados os ensaios de fortificação e recuperação descritos do item 3.7.5.3, variando-se dois parâmetros, analista e dia de realização. Os valores da média da recuperação e do RSD% obtidos pelo segundo analista encontram-se na Tabela 23. Verifica-se que todos os valores encontram-se dentro daqueles recomendados pelo DG-SANTE (2017), onde as recuperações foram na faixa de 78 a 114% com RSD \leq 17%. Para o cálculo da precisão intermediária do método, foram calculados os valores de RSD% entre as recuperações médias, entre os valores obtidos nos estudos de fortificação e recuperação pelos dois analistas, com valor de precisão intermediária \leq 20% (Tabela 24).

Tabela 23 – Valores médios de recuperação e RSD%, obtidos por GC-MS/MS (modo MRM), através da análise de biomisturas “branco” fortificada nas concentrações de 50, 100 e 200 $\mu\text{g kg}^{-1}$, no estudo da precisão intermediária do método multirredidual (n=7).

Agrotóxico	Conc. de fortificação ($\mu\text{g kg}^{-1}$)/ Conc. na curva analítica (ng mL^{-1})					
	50/10		100/20		200/40	
	Rec (%)	RSD (%)	Rec (%)	RSD (%)	Rec (%)	RSD (%)
Captana	n.d.	-	n.d.	-	n.d.	-
Tetrahydroftalimida ^a	108	3	112	4	112	6
Clorotalonil	97	3	105	4	79	7
Clorpirifós	95	7	114	3	104	15
Fenitrotiona	78	4	106	8	97	8
Fosmete	107	5	106	6	97	12
Metidationa	108	3	112	5	97	17
Tebuconazol	81	4	110	8	85	15

^a Produto de degradação do agrotóxico captana, não incluído na solução mistura de fortificação; n.d., não detectado.

Tabela 24 – Comparação entre os valores médios de recuperação e RSD% (n=7) obtidos por GC-MS/MS (modo MRM), através da análise de biomistura “branco” fortificada nas concentrações de 50, 100 e 200 $\mu\text{g kg}^{-1}$, realizadas por dois analistas, no intervalo de 3 dias, no estudo da precisão intermediária.

Agrotóxico	Conc. de fortificação ($\mu\text{g kg}^{-1}$)/ Conc. na curva analítica (ng mL^{-1})								
	50/10			100/20			200/40		
	Rec.% (n=7)		RSD (%)	Rec.% (n=7)		RSD (%)	Rec. (n=7)		RSD (%)
	Analista 1	Analista 2		Analista 1	Analista 2		Analista 1	Analista 2	
Captana	n.d.	n.d.	-	n.d.	n.d.	-	n.d.	n.d.	-
Tetrahydroftalimida ^a	81	108	20	108	112	2	93	112	13
Clorotalonil	75	97	18	95	105	7	80	79	0,3
Clorpirifós-etil	116	95	14	110	114	2	80	104	19
Fenitrotiona	86	78	7	117	106	8	104	97	5
Fosmete	104	107	2	107	106	1	107	97	7
Metidationa	112	108	2	116	112	3	105	97	6
Tebuconazol	107	81	19	112	110	1	104	85	14

^a Produto de degradação do agrotóxico captana, não incluído na solução mistura de fortificação; n.d., não detectado.

4.2.3.6 *Controle de qualidade*

Para verificar o desempenho do método analítico, foram utilizados dois padrões internos isotopicamente marcados, os quais foram adicionados em diferentes etapas do procedimento. Todo o procedimento, a partir da etapa de fortificação, foi controlado utilizando uma solução de PCB-153 como padrão interno do procedimento (P.I.P.). O procedimento foi considerado corretamente realizado quando a recuperação para o P.I.P. estava dentro da faixa de 80-120%. Se esses valores estivessem fora do intervalo aceitável, as extrações deveriam ser repetidas (UCLÉS, et al., 2017; LOZANO, et al, 2016; RAJSKI, et al, 2013). Neste estudo, não houve necessidade de repetição de nenhuma etapa, pois todos os valores encontrados para as recuperações do P.I.P. encontraram-se dentro dos valores aceitáveis de 80-120%.

O desempenho do injetor automático do cromatógrafo também foi acompanhado pelo emprego de um padrão interno do instrumento (P.I.I.), verificando-se as áreas de uma solução de HCB-C13 para análise por GC. As soluções foram consideradas como corretamente determinadas pelo equipamento se as áreas do P.I.I. apresentavam-se com valor de RSD inferior a $\pm 30\%$ da área média. Se apenas uma amostra individual estivesse acima desse valor, deveria ser considerada como uma injeção falha e realizada uma correção, como a repetição da injeção desta amostra. Se houvessem mais desvios, todo o conjunto de soluções deveria ser reanalisado (LOZANO, et al, 2016). Neste estudo, não houve necessidade de repetição de nenhuma injeção, pois todos os valores encontrados das áreas do P.I.I. encontraram-se dentro dos valores aceitáveis de RSD de $\pm 30\%$ da área média.

5 CONCLUSÕES

Considerando o limitado número de trabalhos publicados na literatura internacional e principalmente na brasileira, a respeito da determinação de resíduos de agrotóxicos em camas biológicas e seus efluentes, especialmente ditiocarbamatos, este trabalho pode ser considerado de grande importância, não somente pela complexidade da matriz com a qual se trabalha ou fornecer resultados confiáveis para comprovar a eficácia na degradação de resíduos de agrotóxicos no sistema de camas biológicas construídas no Brasil.

Como o sistema de camas biológicas demonstra ser seguro para o descarte de efluentes e resíduos dos pontos de abastecimento de pulverizadores agrícolas, incluindo a lavagem e limpeza do maquinário, torna-se evidente a necessidade do desenvolvimento e validação de métodos analíticos que sejam eficientes, práticos, de fácil execução e que utilizem solventes que sejam menos tóxicos ao ambiente, diminuindo o grau de contaminação ambiental.

Nesse contexto, na primeira etapa deste estudo, desenvolveu-se e validou-se um método individual para a determinação de resíduos de ditiocarbamatos em camas biológicas, pela quantificação do CS_2 , empregando-se GC-MS. O método de extração mostrou ser eficiente, exato, preciso e prático.

Após a validação do método proposto, o mesmo foi empregado na análise de amostras de camas biológicas provenientes da Embrapa uva e vinho, da cidade de Vacaria, RS. Os resultados demonstraram claramente a eficácia do sistema formado com biomistura composta por palha-turfa-solo ou ainda composto apenas por solo, na redução dos resíduos de mancozebe, seja por volumes substanciais de efluentes líquidos provenientes dos pulverizadores ou mesmo no caso de um derrame acidental de um produto formulado concentrado. Esse sistema mostrou-se eficaz para reduzir as concentrações de mancozebe a níveis ambientalmente aceitáveis, o que proporciona uma diminuição significativa do risco de contaminação das águas superficiais e subterrâneas.

Na segunda etapa, foram estudados dois métodos de extração para determinação multirresíduos de agrotóxicos e de um produto de degradação, em biomistura. O método otimizado substituiu a mistura diclorometano:éter de petróleo por isoctano:tolueno com os mesmos volumes. Essa otimização eliminou o uso de solventes clorados e as etapas de evaporação e purificação dos extratos. Além

disso, o extrato acetona:isooctano:tolueno pode ser injetado diretamente no sistema GC-MS/MS após o passo de centrifugação.

O método otimizado foi validado para análise dos agrotóxicos captana e seu produto de degradação (tetrahidroftalimida), clorotalonil, clorpirifós, fenitrotiona, metidationa, fosmete e tebuconazol em amostra de camas biológicas, por GC-MS/MS. Todos os resultados se encontram de acordo com os critérios de validação do DG-SANTE (2017).

O método demonstrou ser eficiente na extração multirresidual para a determinação de agrotóxicos em biomisturas de camas biológicas, permitindo uma extração mais rápida (excluindo etapas de evaporação e redissolução), com a vantagem do uso de menor quantidade de amostra e a exclusão de solventes clorados.

O emprego de sistemas de cama biológica para descarte de efluentes de agrotóxicos derivados do uso dentro dos limites da propriedade rural é um método que vem sendo considerado seguro para o descarte final destes contaminantes agrícolas. No Brasil, nos últimos anos, essa tecnologia vem sendo testada e adaptada, apresentando resultados similares ou melhores aos obtidos pelos modelos em uso na Europa, devido às condições climáticas favoráveis do Brasil.

Os avanços obtidos através deste trabalho corroboram a eficácia do sistema de camas biológicas na degradação de resíduos de agrotóxicos. Esses dados são importantes, pois conferem maior segurança ao produtor rural sobre o uso desta tecnologia, e também do consumidor do alimento produzido no Brasil, uma vez que empregada de forma adequada podem reduzir o impacto ambiental da agricultura em função do manejo indevido dos resíduos de agrotóxicos.

6 REFERÊNCIAS

ABAKERLI et al., **Carbon disulfide formation in papaya under conditions of dithiocarbamate residue analysis**. Food Chemistry, v. 188, p. 71 – 16, 2015.

ABU-EL-HALAWA, R.; ZABIN, S., **Removal efficiency of PB, Cd and Zn from polluted water using dithiocarbamate ligands**. Journal of Taibah University for science, v. 5, p. 57-65, 2015.

ANDREU, V.; PICÓ, Y., **Determination of pesticides and their degradation products in soil: critical review and comparison of methods**, Trends in Analytical Chemistry, v. 23, p. 772-789, 2004.

AKTAR, M. W.; SANGUPTA, D.; CHOWDRITURY, A., **Impacto f pesticides use in agriculture: their benefits and hazards**. Interdisciplinary toxicology, Berlin, v.2, n. 1, p. 1-12, 2009.

ANASTASSIADES, M. et al. **Fast and easy multiresidue method employing acetonitrile extraction/partitioning and “dispersive solid-phase extraction” for the determination of pesticide residues in produce**. Journal of the Association of Official Analytical Chemists International, v.86, n. 2, p. 412-431, 2003.

ANASTASSIADES, M.; MASTOVSKÁ, K.; LEHOTAY, S., **Evaluation of analyte protectants to improve gás chromatographic analysis of pesticides**, J. Chrom. A, v. 1015, p. 163-184, 2003.

ANVISA, 2010. **Nota técnica de Esclarecimento sobre o risco de consume de Frutas e Hortaliças cultivadas com agrotóxicos**. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br>>. acessado em 23 de fevereiro de 2017.

ANVISA, 2011. **Monografias Autorizadas**. Disponível em www.anvisa.gov.br/toxicologia/monografias/monografias.pdf>. Acessado em 20 de Janeiro de 2015.

APREA, M. C. **Environmental and biological monitoring in the estimation of absorbed doses os pesticides**. Toxicology Letters, v. 210, p. 110 – 118, 2012.

ARAÚJO, W. A., **Desenvolvimento e validação de metodologia analítica para determinação de resíduos de ditiocarbamatos em amostras de água empregando-se GC-ECD e HSA-SPME-GC-FPD**. Dissertação de Mestrado, USP, São Carlos, 2001.

AZEVEDO, L.A.S. **Fungicidas protetores – fundamentos para uso racional**. Campinas: Ed. Graf, 2003. 320 p.

BALA, V., et al. **Dithiocarbamate-thiourea hybrids useful as vaginal microbicides also show reverse transcriptase inhibition: design, synthesis, docking and pharmacokinetics studies**. Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters, v. 25, p. 881-886, 2015.

BARBOSA, L. C. A. **Os pesticidas, o homem e o meio ambiente**. Viçosa; UFV, 2004, p. 23-106.

BARETTA, D., et al., **Fauna Edáfica Avaliada por Armadilhas e Catação Manual Afetada pelo Manejo do Solo na Região Oeste Catarinense**. Revista de Ciências Agroveterinárias, 2:97-106, 2003.

BELDOMENICO, H. R. et al. **Residuos químicos contaminates de los alimentos**. Universidad Nacional Del Litoral, Santa Fé, Argentin, 2005.

BERRADA, H., et al., **Surveillance of pesticide residues in fruits from Valencia during twenty months (2004/05)**. Food Control, v. 21, p. 36-44, 2010.

BLASCO, C., et al., **Determination of fungicide residues in fruits and vegetables by liquid chromatography-atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry**, Journal of Chromatography A, v. 947, p. 227-235, 2002.

BLUME, E.; REICHERT, J. M. **Destino de agrotóxicos no ambiente agrícola**. In: **IV Seminário de Produção Integrada de frutas**. Anais, Bento Gonçalves, 2002.

BONNECHÉRE, A.; HANOT, V.; VAN LOCO, J., **A rapid and environmental friendly determination of the dithiocarbamate metabolites ethylenethiourea and propylenethiourea in fruit and vegetables by ultra high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry**. Journal of Chromatography A, v. 1218, p. 4627-4631, 2011.

BOHRER, D.; DO NASCIMENTO, P. C.; GOMES, H. M., **Improvement in the determination of mancozeb residues by the carbon disulfide evolution method using flow injection analysis**. Journal of agricultural and Food chemistry, v. 47, p. 212-216, 1999.

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

BRASKAR, R. e MOHANTY, B., **Pesticide in mixture disrupt metabolic regulation: *In silico* and *in vivo* analysis of cumulative toxicity of mancozeb and imidacloprid on body weight of mice**. General and Comparative Endocrinology, v. 205, p. 226-234, 2014.

BOXTEL, A. L. V., et al. **Dithiocarbamates are teratogenic to developing zebrafish through inhibition of lysyl oxidase activity**. Toxicology and Applied Pharmacology, v. 244, p. 156-161, 2010.

BOZDAG, M., et al. **Syntesis of a new series of dithiocarbamates with effective human carbonic anhydrase activity and antiglaucoma action**. Bioorganic & Medicinal Chemistry, v. 23, p. 2368-2376, 2015.

CALDAS, E. D., et al., **Dithiocarbamates residues in Brazilian food and the potential risk for consumers**, Food and Chemical Toxicology, v. 42, p. 1877-1883, 2004.

CALDAS, E. D.; TRESSOU, J.; BOON, P. E., **Dietary exposure of Brazilian consumers to dithiocarbamate pesticide – A probabilistic approach**, Food and Chemical Toxicology, v. 44, p. 1562-1571, 2006.

CALVIELLO, G., et al., **DNA damage and apoptosis induction by the pesticides mancozeb in rat cells: Involvement of the oxidative mechanism**, Toxicology and Applied Pharmacology, v. 211, p. 87-96, 2006.

CAJKA, T., et al., **Rapid analysis of multiple residues in fruit-based baby food using programmed temperature vaporiser injection-low-pressure gas chromatography-high-resolution time-of-flight mass spectrometry**, Journal of chromatography A, v. 1186, p. 281-294, 2008.

CAMAROTTO, J. A.; CORDEBELLO, D. M.; BRASIL, F. **Riscos no setor, Alimentação e trabalho rural: A saúde do trabalhador rural e o risco invisível dos agrotóxicos**. UFSCAR, Engenharia de Produção Química, 2004.

CARNIEL, C. S. L. **Avaliação do risco ecológico de Mancozebe e clorpirifós para representantes da macro e mesofauna do solo e eficiência de leitos biológicos de descarte**. 2015, 140p. Dissertação (Mestrado em Ciências do Solo), Universidade do Estado de Santa Catarina: Lages, SC, 2015.

CASTILLO, M. D. P. et al. **Degradation of isoproturon by the white rot fungus *Phanerochaete chrysosporium***. Biology and Fertility of Soils. v.33, p. 521-528. 2001.

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

CASTILLO, M. D. P.; TORSTENSSON, L.; STENSTRÖM, J. **Camas Biológicas – Biotecnologia para la preservación del medio ambiente de la contaminación por agrotóxicos**. 2008a

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

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

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

CERNOHLÁVKOVÁ, J.; JARKOVSKÝ, J.; HOFMAN, J. **Effects of fungicides mancozeb and dinocap on carbon and nitrogen mineralization in soils**. Ecotoxicology and Environmental safety, v. 72, p. 82-85, 2009.

CHIARADIA, M. C.; COLLINS, C. H.; JARDIM, I. C. S. F. **O estado da arte da cromatografia associada à espectrometria de massas acoplada à espectrometria de massas na análise de compostos tóxicos em alimentos.** Química nova, v. 31, p. 623-636, 2008.

COLLINS, C. H.; BRAGA, G. L.; BONATO, P. S. **Fundamentos de Cromatografia**, 2ª ed., Unicamp: Campinas, 2009, cap: 8 e 9.

COLOSIO, C., et al., **Ethylenethiourea in urine as an indicator of exposure to mancozeb in vineyard workers**, Toxicology Letters, v. 134, p. 133-140, 2002.

COLDWELL, M. R.; PENGELLY, I.; RIMMER, D. A. **Determination of dithiocarbamate pesticides in occupational hygiene sampling devices using the isooctane method and comparison with an automatic thermal desorption (ATD) method.** Journal of Chromatography A, v. 94, p. 81 – 88, 2003.

COOPER, R. J., et al., **Assessing the effectiveness of a three-stage on-farm biobed in treating pesticide contaminated wastewater**, J. Environ. Manage., v. 181, p. 874-882, 2016.

COPPOLA, L.; CASTILLO, M. D. P.; VISCHETTI, C. **Degradation of isopropuron and bentazone in peat- and compost based biomixtures.** Pest Management Science, 67:107-113, 2011.

COPPOLA, L., et al. **Fungicides degradation in a organic biomixture: impact on microbial diversity.** New Biotechnology, v. 29, n. 1, p. 99-106, 2011.

COPPOLA, L., et al. **Adaptation of the biobed composition for chlorpyrifos degradation to southern Europe conditions.** Journal of Agricultural and Food Chemistry. v. 55, p. 396-401, 2007.

CORSINI, E., et al., **Immunomodulatory effects of the fungicides Mancozeb in agricultural workers**, Toxicology and Applied Pharmacology, v. 208, p. 178-185, 2005.

CRNOGORAC, G.; SCHWACK, W. **Residue analysis of dithiocarbamate fungicides.** Trends in Analytical chemistry, v. 28, n. 1, p. 40-50, 2009.

DASGUPTA, S., et al., **Pesticide poisoning of farm workers-implications of blood test results from Vietnam**, International Journal of Hygiene and Environmental Health, v. 210, p. 121-132, 2007.

DE WILDE T., et al. **Transport and degradation of pesticides in a biopurification system undervariable flux, part II: a macrocosm study.** Environ Pollut v.158, p. 3317–3322, 2010.

DEHOUCK, P., et al., **Proficiency test on the determination of pesticide residues in grapes with multi-residue methods**, Journal of Chromatography A, v. 1395, p. 143-151, 2015.

DIAS, J. V., et al., **Determination of pesticides in edible oils by liquid chromatography-tandem mass spectrometry employing new generation materials for dispersive solid phase extraction clean-up**, J. Chromatogr. A 1462 (2016) 8-18.

DIAS, J. V., et al., **Large-scope multiresidue analysis of pesticides by LC and GC-MS/MS using a new efficient approach for the NL-acetone extraction method**. In: 6th Latin American Pesticide Residue Workshop, 2017, San José. Book of Abstract, 2017.

DIAZ, J. M. C., et al., **Enhancing pesticide degradation using indigenous microorganisms isolated under high pesticide load in bioremediation systems with vermicomposts**, Bioresour. Technol., v. 214, p. 234-241, 2016.

DIEZ, C. et al. **Comparison of an acetonitrile extraction/partitioning and “dispersive solid-phase extraction” method with classical multi-residue methods for the extraction of herbicide residues in barley samples**, Journal of Chromatography A, v. 1131, p. 11-23, 2006.

DIEZ, M. C. **Biological aspects involved in the degradation of organic pollutants**. Journal of soil science and plant nutrition, v. 10, p. 244-267, 2010.

DOMICO, L. M., et al., **Acute neurotoxic effects of mancozeb and maneb in mesencephalic neuronal cultures are associated with mitochondrial dysfunction**, Neurotoxicology, v. 27, p. 816-825, 2006.

EBC, 2015. Disponível em <http://www.ebc.com.br/noticias/saude/2015/07/brasil-e-lider-mundial-em-consumo-de-agrotoxicos>; acessado em 17/12/2015.

ECKERMAN, D. A.; GIMENES, L. S.; SOUZA, R. C., **Age related effects of pesticide exposure on neurobehavioral performance of adolescent farm workers in Brazil**, Neurotoxicology and Teratology, v. 29, p. 164-175, 2007.

EFSA (European Food Safety Authority). (2010). **Annual report on pesticide residues**. EFSA Journal, 8 (6), 1646.

EPA. **The determination of whether dithiocarbamate pesticides share a common mechanism of toxicity**, Health Effects Division, Office of Pesticide Programs, Environmental Protection Agency, Washington, DC, EUA, 2001.

FAIT, G., et al. **Reduction of point contamination sources of pesticide from a vineyard farm**. Environmental Science & Technology, 41:3302-3308, 2007.

FAO/WHO. *Codex Alimentarius*. V. 2A, **Pesticide residues in food**. 2. ed. Rome:FAO, 2000. Pt!: Methods of analysis and sampling, p. 39-47.

FAO. Food and Agricultural organization Health Organization. (FAO/WHO). 2005. **Pesticide residues in food. Joint FAO/WHO meeting on pesticide residues. Report of the Joint Meeting of the FAO Panel of Experts on Pesticides in food**

and the Environmental and the WHO Cores Assessment Group on Pesticide Residues.

FAO, 2017. . Food and Agricultural organization Health Organization. (FAO/WHO). Disponível em <http://www.fao.org/waicent/faostat/Pest-Residue/pest-e.htm>, acessado em 10 de outubro de 2017.

FAWOLE, O. B., et al., **Effects of a Carbendazim-Mancozeb Fungicidal Mixture on soil Microbial Populations and Some Enzyme Activities in Soil.** Agrosearch, v. 10, p.65-74, 2009.

FERNANDEZ-ALBA, A. R., **Chromatographic Mass Spectrometry Food Analysis for Trace Determination of Pesticide Residues.** Amsterdã, Holanda: Elsevier, 2005.

FERNÁNDEZ-NORTHCOTE, E. N., **Fungicidas: Historia, Presente y Futuro de los Fungicidas Utilizados para el control del Tizón,** Universidad Nacional Agrária, La Molina, Apdo 456, Lima, Peru, 2001.

FOGG, P., et al. **Pesticide degradation in a *Biobed* composting substrate.** Pest Management Science, 59:527-537, 2003.

FOGG, P., et al. **Leaching pesticides from biobeds: effect of biobed depth and water loading.** Journal of Agricultural and Food Chemistry.v. 52, p. 6217-6227, 2004.

FUJIYOSHI, T., et al. **Evaluation of the matrix effect on gas chromatography – massspectrometry with carrier gas containing ethylene glycol as an analyteprotectant.** Journal of Chromatography A, v.1434, p. 136-141, 2016.

FUSTIONI, S.; CAMPO, L.; COLOSIO, C., **Application of gas chromatography-mass spectrometry for the determination of urinary ethylenethiourea in humans,** Journal of Chromatography B, v. 814, p. 251-258, 2005.

GARCINUÑO, R. M.; FERNÁNDEZ-HERNANDO, P.; CÁMARA, C. **Optimization of a matrix solid-phase dispersion method with subsequent clean-up for the determination of ethylene bisdithiocarbamate residues in almond samples,** Journal of Chromatography A, v. 1041, p. 35-41, 2004 a.

GARCINUÑO, R. M.; FERNÁNDEZ-HERNANDO, P.; CÁMARA, C., **Simultaneous determination of maneb and its main metabolites in tomatoes by liquid chromatography using diode array ultraviolet absorbance detection,** Journal of Chromatography A, v. 1043, p. 225-229, 2004 b.

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

GEBLER, L. **Pontos de abastecimento de pulverizadores agrícolas: Uma revisão comparando os modelos em uso.** Revista Brasileira de engenharia Agrícola e Ambiental, v. 15, n. 11, p. 1180-1185, 2011.

GEBLER, L., et al, **Bioreactors to organize the disposal of phytosanitary effluents of Brazilian apple production,** Chem. Eng. Trans. , v. 43, p. 343-348, 2015.

GONZÁLEZ, M., et al. **Effect of dithiocarbamate pesticide zineb and its commercial formulation, azzurro IV. DNA damage and repair kinetics assessed by single cell gel electrophoresis (SCGE) assay on Chinese hamster ovary (CHO) cells,** Mutation Research, v. 534, p. 145-154, 2003.

GREGOIRE, C., et al. **Pollution at and below sites used for mixing and loading of pesticides.** International Journal of Environmental Analytical Chemistry, v. 82, p. 583-590, 2002.

GRIMALT, S.; DEHOUCK, P., **Review of analytical methods for the determination of pesticides residues in grapes.** Journal of Chromatography A, v. 1433, p. 1-23, 2016.

GROSICKA-MACIAG, E., et al. **Dithiocarbamate fungicide zineb induces oxidative stress and apoptosis in Chinese hamster lung fibroblast.** Pesticide Biochemistry and Physiology, v. 102, p. 95-101, 2012.

GROSS, J. H. **Mass spectrometry. A textbook.** 1ª ed. Springer, Alemanha, 2004.

HANO et al.,. **Primary risk assessment os dimethyldithiocarbamate, a dithiocarbamate fungicide metabolite, based on their probabilistic concentrations in a coastal environment.** Chemosphere, v. 131, p. 225-231, 2015.

HERCEGOVÁ, A.; DOMOTOROVA, M.; MATISOVÁ, E. **Sample preparation methods in the analysis of pesticides residues in baby food with subsequent chromatographic determination,** J. Chrom. A, v. 1153, p. 54-73, 2007.

HERNANDEZ, F. et al., **Multiresidue liquid chromatography tandem mass spectrometry determination of 52 nos gas chromatography-amenable pesticides and metabolites in different food commodities.** Journal of chromatography A, v. 1109, p. 1242- , 2006.

HIEMSTRA. M.; de KOK, A. **Comprehensive multi-residue method for the target analysis of pesticides in crops using liquid chromatography-tandem mass spectrometry,** J. Chrom. A, v. 1154, p. 3-25, 2007.

HILL, A. R. C. **Headspace methods for dithiocarbamates. In: Modern methods for pesticides analysis: emerging strategies for pesticide analysis.** CAIRNS, T., SHERNA, J. (Eds.), CRC Press, London, p. 213-231, 1992.

HOFFMAN, L.; TROMBETTA, L.; HARDEJ, D. **Ethylene bisdithiocarbamate pesticides Maneb and Mancozeb cause metal overload in human colon cells.** Environmental Toxicology and Pharmacology, v. 41, p. 78-83, 2016.

IBAMA, 2010. **Pesticides an related commercialized in Brazil in 2009: an environmental approach.** Brasília, 2010.

IGLESIAS, A. H. **Introdução ao acoplamento cromatografia líquida – espectrometria de massas.** Waters Technologies do Brasil, Barueri, SP.

INMETRO. **Orientação sobre a validação de métodos analíticos, DOQ-CGCRE-008.** Revisão 4, 2011.

JULIATTI, F. C. **Modo de ação dos fungicidas sobre plantas e fungos.** 2011. Diapositivo.

KANCHI, S.; SINGH, P.; BISETTY, K. **Dithiocarbamates as hazardous remediation agent: A critical review on progress in environmental chemistry for inorganic species studies of 20th century.** Arabian Journal of Chemistry, v. 7, p. 11-25, 2014.

KANEMOTO-KATAOKA, Y., et al. **Dithiocarbamate fungicides increase intracellular Zn²⁺ levels by increasing influx of Zn²⁺ in rat thymic lymphocytes.** Chemico-Biological Interactions, v. 237, p. 80-86, 2015.

KARAS, P., et al. **Dissipation, metabolism and sorption of pesticides used in fruit-packaging plants: Towards an optimized depuration of their pesticide-contaminated agro-industrial effluents.** Science of the Total Environment, v. 530-531, p. 129-139, 2015.

KARAS, P., et al., **Integrated biodepuration of pesticide-contaminated waste waters from the fruit-packaging industry using biobeds: Bioaugmentation, risk assessment and optimized,** J. Hazard. Mater, v. 320, p. 635-644, 2016.

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

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

KARANASIOS, E. C.; TSIROPOULOS N. G.; KARPOUZAS, D. G. **Quantitative and qualitative differences in the metabolism of pesticides in *Biobed* substrates and soil.** Chemosphere, v. 93 p. 20–28, 2013.

KAUSHIK, P.; KAUSHIK, G., **An assessment of structure and toxicity correlation in organochlorine pesticides.** Journal of Hazardous Materials, v. 143, p. 102-111, 2007.

KAZOS, E. A., et al., **Determination of dithiocarbamate fungicide propineb and its main metabolite propylenethiourea in airborne samples.** Chemosphere, v. 68, p. 2104-2110, 2007.

KEMMERICH, M. **Determinação Multirresidual de Agrotóxicos em pimentão utilizando método de QuECChERS modificado e UHPLC-MS/MS.** Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2013.

KEPPEL, G. E. **Collaborative study of the determination of dithiocarbamate residues by a modified carbon disulfide evolution method.** Journal of the Association of Official Analytical chemists International, v. 54, p. 528-532, 1971.

KESARI, R.; GUPTA, V. K. **A sensitive spectrophotometric method for the determination of dithiocarbamate fungicide and its application in environmental samples.** , Talanta, v. 45, p. 1097-1102, 1998.

KOK, A. de; HIEMSTRA, M.; VREEKER, C. P. **Improved cleanup method for the multiresidue analysis of N-methylcarbamates in grains, fruits and vegetables by means of HPLC with post-column reaction and fluorescence detection,** Chromatographia, v. 24, p. 469-476, 1987.

KSHEERASAGAR, R. L.; KALIWAL, B. B. **Temporal effects of mancozeb on testes, accessory reproductiveorgans and biochemical constituents in albino mice.** Environmental Toxicology and Pharmacology, v. 15, p. 9-17, 2003.

KURZ, M. S. **Estudo de métodos empregando extração em fase sólida e análise por HPLC-DAD e GC-ECD para a determinação de resíduos de agrotóxicos em águas e da degradação a campo.** Tese de doutorado, UFSM, Santa Maria, 2007.

KUSSUMI, T. A. **Desenvolvimento de método multirresíduo para determinação de agrotóxicos benzimidazóis, carbamatos e triazinas em milho por cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas em tandem e sua certificação.** Dissertação de mestrado IPEN/USP, São Paulo, 2007.

LANÇAS, F. M., **A cromatografia Líquida Moderna e a Espectrometria de Massas: finalmente “compatíveis”?** Scientia Chromatographica, v. 1, p. 35-61, 2009.

LANÇAS, F. M. **A cromatografia líquida moderna e a espectrometria de massas: Finalmente “compatíveis”? II. A escolha do analisador de massas.** Scientia Chromatographica, n. 5, vol. 1, p. 27-46, 2013.

LEHOTAY, S. **Deterimination of pesticides residues in nonfatty foods by supercritical fluid extraction and gás chromatography/mass spectrometry: collaborative study.** Jornal of the Association of Official analytical chemists International, v. 85, n.5, p. 1148-1166, 2002.

LEHOTAY, S., et al., **Validation of a fast and easy method for determination of residues from 229 pesticides in fruits and vegetables using gas and liquid**

chromatography and mass spectrometric detection., *Journal of the Association of Official analytical chemists International*, v. 88, p. 595-614, 2005.

Li, Q., et al. **Synthesis and characterization of dithiocarbamate carbon nanotubes for the removal of heavy metal ions from aqueous solutions.**, *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, v. 482, p. 306-314, 2015b.

LI, R. D., et al. **Discovery and optimization of novel dual dithiocarbamates as potent anticancer agents.**, *European Journal of Medicinal Chemistry*, v. 93, p. 381-391, 2015a.

LOZANO, A., et al., **Miniaturisation and optimization of the Dutch mini-luke extraction method for implementation in the routine multi-residue analysis of pesticides in fruits and vegetables**, *Food Chem.*, v. 192 p. 668-681, 2016.

LUKE, M.; FROBERG, J. E.; MATSUMOTO, H. T. **Extraction and cleanup of organochlorine, organophosphate, organonitrogen and hydrocarbon pesticides in produce for determination by gas-liquid chromatography**, *J. AOAC Int.*, v. 58 p. 1020-1026, 1975.

LUKE, M., et al., **Improved multiresidue gas chromatographic determination of organophosphorus, organonitrogen, and organohalogen pesticides in produce, using flame photometric and electrolytic conductivity detectors** *J. AOAC Int.*, v. 64 p.1187-1195, 1981.

MALIK, A. K., et al. **Spectrophotometric determination of cobalt, nickel palladium, copper, ruthenium and molybdenum using sodium isoamylxanthate in presence of surfactants.** *Journal of Agricultural and Food chemistry*, v. 48, p. 5808-5811, 2000.

MASTOVSKÁ, K.; LEHOTAY, S. **Evaluation of common organic solvents for gas chromatographic analysis and stability of multiclass pesticide residues**, *J. Chrom. A*, v. 1040 p. 259-272, 2004.

MASTOVSKÁ, K., et al., **Encyclopedia of analytical science**. 2. Ed. Amsterdam. 2005. 10p.

MATIAS, A. C., et al. **Diethyldithiocarbamate induces apoptosis in neuroblastoma cells by raising the intracellular copper level, triggering cytochrome c release and caspase activation.** *Toxicology in Vitro*, v. 27, p. 349-357, 2011.

MATOS, A. T., ET AL. **Mobility of heavy metals as related to soil chemical and mineralogical characteristics of Brazilian soils**, *Environ. Pollut.* v.111 p.429-435. 2001.

MONACI, E., et al. **Retention capacity of an organic bio-mixture against different mixtures of fungicides used in vineyards.** *Journal of environmental Science and Health Part B.*, v. 44 p.724-729, 2009.

MUJAWAR, S., et al. **Validation of a GC-MS method for estimation of dithiocarbamate fungicide residues and safety evaluation of mancozeb in fruits and vegetables.** Food chemistry, v. 15, p. 175-181, 2014.

MUKHERJEE, S.; TAPPE, W.; WEIHERMUELLER, L., et al., **Dissipation of bentazone, pyrimethanil and boscalid in biochar and digestate based soil mixtures for biopurification systems,** Sci. Total Environ., v.544, p.192-202, 2016

NOBREGA, F. HAMILTON. **Agrotóxicos: Classificação, Propriedades, Toxicidade, Problemas e Soluções.** Meio ambiente, 2014.

ODUM, E. P.; BARRET, G. W. **Fundamentos de Ecologia.** Cengage Learning: São Paulo, 2011.

OLIVEIRA JÚNIOR, R.S.; REGITANO, J.B. **Dinâmica de Agrotóxicos no Solo.** Química e Mineralogia do Solo. SBCS, Viçosa, 2009.

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

ONU 2008 – OMS – **Relatório do Desenvolvimento Humano, 2007/2008.**

OPAS/OMS: Organização Pan-Americana de Saúde, **Manual de vigilância da saúde de populações expostas a agrotóxicos,** organização Mundial da Saúde, Representação do Brasil, 1997.

PANDEY, S. P.; MOHANTY, B. **The neonicotinoid pesticide imidacloprid and the dithiocarbamate fungicide mancozeb disrupt the pituitary-thyroid axis of a wildlife bird.** Chemosphere, v. 122, p. 227-234, 2015.

PELAJIC, M., et al., **Novel multiresidue metho for determination of pesticides in red wine using gas chromatography-mass spectrometry and solid phase extraction,** Food Chem., v. 209, p. 98-106, 2016.

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

PETZ W.; FOISSNER, W. **The effects of mancozeb and lindane on the soil microfauna of a spruce forest: A field study using a completely randomized block design.** Biology Fertil Soils, v. 7 p. 225-231, 1989.

PICÓ, Y. **Pesticides and herbicides: Residue determination,** Encyclopedia of Food and Health, p. 311-318, 2016.

PINHO, G. P.; NEVESII, A. A.; QUEIROZ, M. E. L. R., **Análise de resíduos de agrotóxicos em tomates empregando dispersão da matriz em fase sólida (DMFS) e cromatografia gasosa.** Química Nova, v, 32, n. 1, p. 92-98, 2009.

PIZZUTTI, I. R., et al. **Method validation for the analysis of 169 pesticides in soya grain, without clean up, by liquid chromatography-tandem mass spectrometry using positive and negative electrospray ionization.** Chromatogr. A, v. 1142, p. 123, 2007.

PIZZUTTI, I. R., et al. **Method validation and comparison of acetonitrile and acetone extraction for the analysis of 169 pesticides in soya grain by liquid chromatography-tandem mass spectrometry,** J. Chrom. A, v. 1216 p. 4539-4552, 2009.

PIZZUTTI, I. R. et al. **5th Eupean Pesticide Residues Workshop – Pesticides in Food and drink.** Anais, Estocolmo, 2004.

PIZZUTTI, I. R., et al., **Comparison Between Three Chromatographic (GC-ECD, GC-PFPD and GC-ITD-MS) Methods and a UV-Vis Spectrophotometric Method for the Determination of Dithiocarbamates in Lettuce,** J. Braz. Chem. Soc., v. 28 No. 5 p. 775-781, 2017.

POZZEBON, J. M., **Desenvolvimento de Métodos de Extração, Separação e Quantificação de Herbicidas em fluido Biológico,** 2002, 182p. Tese (Doutorado em Química) – UNICAMP, Campinas, SP.

PRESTES, O. D., **Método rápido para determinação simultânea de resíduos de agrotóxicos e medicamentos veterinários em alimentos de origem animal por LC-MS/MS.** Tese de doutorado em Química, UFSM, Santa Maria, 2011. 130p.

PRIMER, A., **Food Safety – Applications in Mass Spectrometry.** Agilent Technologies, USA, 2004.

PRIMER, A. **Basics of LC/MS.** EUA: Agilent Technologies, 2001.

PROYECTO D09R1006. **Manual de construcción y operación de lechos biológicos: manejo adecuado de residuos de plaguicidas em la producción frutícola de la Región de La Araucanía a través de laimplementación y difusión de lechos biológicos.** Temuco: Universidad de La Frontera, Instituto de Agroindustria, 2013. 124 p.

QUATRIN, G. D. et al., **Avaliação da eficiência do sistema Biobed Brasil na degradação de clorpirifós.** In: III Latin American Biobed Workshop, 2017, Bento Gonçalves. Livro de resumos, 2017.

RAHMAN, M.,; EL-ATY, A. M.; SHIM, J.H. **Matrix enhancement effect: A blessing or a curse for gas chromatography?—A review.** Analytica Chimica Acta, v. 801, p. 14-21, 2013.

RAJSKI, L., et al. **Determination of pesticides residues in high oil vegetal commodities by using various multi-residue methods and clean-ups followed by liquid chromatography tandem mass spectrometry**, J. Chrom. A, v. 1304, p. 109-120, 2013.

RAMBLA-ALEGRE, M.; ESTEVE-ROMERO, J.; CARDA-BROCH, S., **Is it really necessary to validate an analytical method or not? That is the question**. Chromatography A, v. 1232, p. 101-109, 2012.

REGUEIRO, J., et al. **Toxicity evaluation of new agricultural fungicides in primary cultures cortical neurons**. Environmental Research, v. 140, p. 37-44, 2015.

REICHENBERGER, S., et al. **Mitigation strategies to reduce inputs into ground - and surface water and their effectiveness; A review**. Science of the Total Environment, v. 384 p. 1-35, 2007.

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

RIDGWAY, K.; LALLJIE, S. P. D.; SMITH, R. M. **Sample preparation techniques for the determination of trace residues and contaminants in foods**. Journal of Chromatography A, v. 1153, p. 36-53, 2007.

RIMAYI, C., et al. **Alternative calibration techniques for counteracting the matrix effects in GC-MS-SPE pesticide residue analysis – A statistical approach**. Chemosphere, v. 118, p. 35-43, 2015.

RIVERO, A., et al. **Development of analytical methodologies to assess recalcitrant pesticide bioremediation in biobeds at laboratory scale**, Talanta, v. 153 p. 17-22, 2016.

ROEDE, J. R.; JONES, D. P. **Thiol-reactivity of the fungicide maneb**. Redox Biology, v. 2, p. 651-655, 2014.

ROEL, A. R. **A agricultura orgânica ou ecológica e a sustentabilidade da agricultura**. Revista Internacional de Desenvolvimento Local. V. 3, n. 4, p. 57-62, 2002.

ROFFIGNAC, L., et al. **Efficiency of a bagasse substrate in a biological bed system for the degradation of glyphosate, malathion and lambda-cyhalotrin under tropical climate conditions**. Pest Management Science, v. 64 p. 1303-1313, 2008.

SAMSIDAR, A.; SIDDIQUEE, S.; SHAARANI, S. M., **A review of extraction, analytical and advanced methods for determination of pesticides in environmental and foodstuffs**, Trend. Food Sci. & Technol., v. 71, p. 188-201, 2018.

SANTE, Guidance Document. **2017. Guidance document on analytical quality control and validation procedures for pesticide residues analysis in food and feed.** Document No. SANTE/11813/2017.

SANNINO, A.; BANDINI, M.,; BOLZONI, L., **Multiresidue determination of 19 fungicides in processed fruits and vegetables by capillary gas chromatography after gel permeation chromatography**, J. AOAC Int., v. 82 p. 1229-1238, 1999.

SCHENCK, F. J. et al., **Comparison of magnesium sulfate and sodium sulfate for removal of water from pesticide extracts of foods.** JAOAC International, v. 85, n. 5, p. 1177-1180, 2002.

SILVA, R. C., **Comparação entre métodos cromatográficos, empregando GC-ECD, GC-FPD e GC-MS, e espectrofotométrico para determinação de ditiocarbamatos em alface**, 2005. 94p. Dissertação (Mestrado em Química) – UFSM, Santa Maria, RS.

SILVA, R. C., **Método individual e multirresidual para determinação de agrotóxicos em grãos e derivados por GC-PFPD, GC-ITD-MS e LC-MS/MS.** Tese de doutorado, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2011).

SINDAG, 2012. **Sindicato Nacional da Indústria de Produtos para Defesa Agrícola, Defensivos Agrícolas**, Disponível em <<http://www.sindag.com.br/new/setor/interna>. Acessado em 20 de Janeiro de 2016.

SINITOX, 2011. **Sistema Nacional de Informações Tóxico-Farmacológicas. Estatística anual de casos de intoxicações e envenenamento; 2011**, disponível em: www.fiocruz.br/sinitox/dadosnacionais, acessado em 21 de Janeiro de 2016.

SNIEGOWSKI, K., et al. **Improvement of pesticide mineralization in on-farm biopurification system by bioaugmentation with pesticide-primed soil.** FEMS Microbiology Ecology, v. 76, p. 64-73, 2011.

SPLIID, N. H.; HELWEG, A.; HEINRICHSON, K. **Leaching and degradation of 21 pesticides in a full-scale model *Biobed*.** Chemosphere, v, 65, p. 2223-2232, 2006.

STASHENKO, E. E.; MARTÍNEZ, J. R., **GC-MS: Más de um Analizador de Masas, para que?** Scientia Chromatographica, v. 2, p. 25, 2010b.

STASHENKO, E. E.; MARTÍNEZ, J. R. **La cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas como herramienta de alta selectividad para caracterizar fósiles químicos en el petróleo.** Scientia Chromatographica, v. 2, n. 3, p. 33-59, 2010a.

STOPPELLI, I. M. B.; CRESTANA, S., **Pesticide exposure and cancer among rural workers from Bariri, São Paulo State, Brazil.** Environment International, v. 31, p. 731-738, 2005.

SZOLAR, O. H. J., et al., **Environmental and pharmaceutical analysis of dithiocarbamates.** Analytica Chimica Acta, v. 582, p. 191-200, 2007.

TADEO, J. L., et al., **Analysis of herbicide residues in cereals, fruits and vegetables.** Journal of Chromatography A, v. 882, p. 175-191, 2000.

TAHA, S. M.; GADALLA, S. A., **development of na efficient method for multi residue analysis of 160 pesticides in herbal plants by ethyl acetate hexane mixture with direct injection to GC-MS/MS,** Talanta, v. 174, p. 767-779, 2017.

TAN, Y. S., et al. **Molecular mechanisms of apoptosis and cell selectivity of zinc dithiocarbamates functionalized with hydroxyethyl substituents.** Journal of Inorganic Biochemistry, v. 150, p. 48-62, 2015.

THRIRUCHELVAM, M., et al., **Potentiated and preferential effects of combined paraquat and mancozeb on nigrostriatal dopamine systems: environmental risk factors for Parkinson's disease?.** Brain Research, v. 873, p. 225-234, 2000.

THOMPSON, M.; ELLISON, S. L. R.; WOOD, R., **Harmonized guidelines for single laboratory validation of methods of analysis.** (IUPAC Technical Report). Pure APPI. Chem., v. 74, p. 835, 2002.

TSUCHIYAMA, T.; KATSUHARA, M. e NAKAJIMA, M., **Compensation of matrix effects is gas cgromatography-mass spectrometry analysis of pesticides using a combination of matrix matching and multiple isotopically labeled internal standards,** J. Chrom. A, v. 1524, p. 233-245, 2017.

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

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

TORTELLA, G. R., et al., **Chlorpyrifos degradation in a biomixture of biobed at different maturity stages,** Chemosphere, v. 88, p. 224-228, 2012.

TORTELLA, G. R., et al. **Natural wastes rich in terpenes and their relevance in the matrix of an on-farm biopurification system for the biodegradation of atrazine.** International Biodeterioration & Biodegradation, v. 85, p. 8-15, 2013b.

UCLÉS, S., et al. **Matrix interference evaluation employing GC and LC coupled to triple quadrupole tandem mass spectrometry,** Talanta, v. 174, p. 72-81, 2017.

WANG, Z., et al. **Intranasal pyrrolidine dithiocarbamate decreases brain inflammatory mediators and provides neuroprotection after brain hypoxia-ischemia in neonatal rats.** Experimental Neurology, v. 249, p. 74-82, 2013.

WAICHMAN, A. V.; EVE, E.; NINA, N. C. S., **Do farmers understand the information displayed on pesticide product labels? A key question to reduce pesticides exposure and risk of poisoning in the Brazilian Amazon,** Crop Protection, v. 26, p. 576-583, 2007.

WATERS. **Operators guide: Quatro Premier**. Milford, EUA, 2005.

WHITE, K. E.; HOPPIN, J. A., **Seed treatment and its implication for fungicide exposure assessment**. Journal of Exposure Analysis and Environmental Epidemiology, v. 14, p. 195-203, 2004.

WHO, World Health Organization, **Dithiocarbamate pesticides, ethylenethiourea and prophylenethiourea: a general introduction**, Geneva, 1988, 140 p.

WONG, F. P.; WILCOX, W.F. **Comparative physical modes of action of azoxystrobin, mancozeb, and metalaxyl against Plasmopara viticola (grapevine downy mildew)**. Plant Disease. V. 85, p. 649-656, 2001.

VIEIRA, E.; LICHTIG, J., **Validação de métodos cromatográficos em análise de resíduos de agrotóxicos**. Arquivos do Instituto Biológico de São Paulo, v. 71, p. 698-700, 2004.

VISCHETTI, C., et al., **Biomassbed: a biological system to reduce pesticide point contamination at farm level**. Chemosphere, v. 55, p. 823-828, 2004.

VISCHETTI, C., et al. **Microbial impact of pesticide chlorpyrifos on Swedish and Italian biobeds**. Agron. Sustain. Dev., v. 27, p. 267-272, 2007.

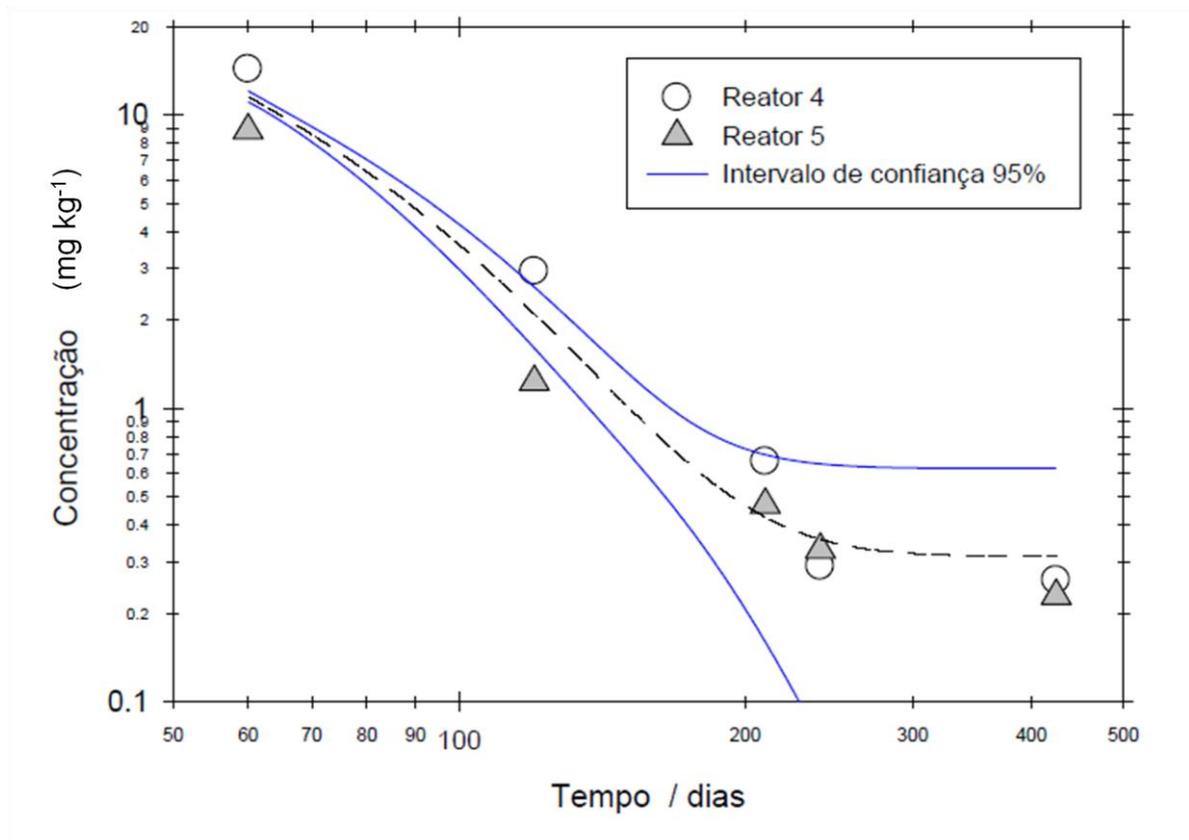
VISCHETTI, C, et al., **The effect of initial concentration, co-application and repeated applications on pesticide degradation in a *Biobed* mixture**. Chemosphere, v. 72 p. 1739-1743, 2008.

VRYZAS, Z.; PAPADAKIS, E. N.; PAPADOPOULOU-MOURKIDOU, E. **Microwave-Assisted Extraction (MAE)-Acid Hydrolysis of Dithiocarbamates for Trace Analysis in Tobacco and Peaches**. Journal of Agricultural and food Chemistry, v. 50, p. 2220-2226, 2002.

ZINI, C. A. **Cromatografia Gasosa Bidimensional**. Scientia Chromatographia, v. 1, n. 1, p. 31-49, 2009.

ZHOU, Y., et al., **Proteasomal Inhibition Induced by Manganese Ethylene-bis-dithiocarbamate: Relevance to Parkinson's Disease** Neuroscience, v. 128, p. 281-291, p. 1-9, 2004.

APÊNCIDE 1 – Gráfico em escala logaritimica relativo às concentrações de mancozebe, em termos de CS_2 , obtidas por GC-MS (modo SIM), através da análise de amostras dos reatores compostos por biomistura (reatores 4 A e 5 A), os quais receberam soluções diluídas de efluentes de tanque pulverizador e caldas de lavagem de máquinas agrícolas contendo Dithane NT[®] (4 g L^{-1}), em cinco tempos de coleta (T1 a T5) por um período de 14 meses.



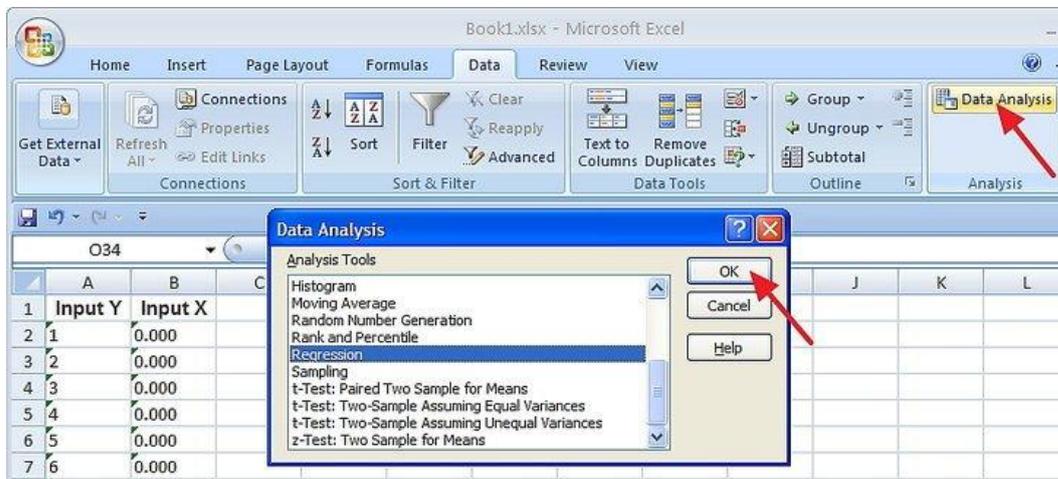
APÊNDICE 2 – Demonstração de como foi calculado os resíduos da curva analítica.

Para se efetuar o cálculo dos resíduos da curva analítica, empregou-se o programa Excel, utilizando a ferramenta “Dados de Análise”. Para tal, preparou-se duas colunas de dados no Excel, na primeira coluna (eixo y) foram colocados os valores das concentrações, repetindo-se todas as 7 replicatas, enquanto na segunda coluna (eixo x) foram colocados os valores das áreas individuais obtidas.

Na barra de ferramentas do Excel, selecionou-se a ferramenta dados, ao abrir a caixa de opções, selecionou-se a opção “Regressão” e selecionou-se as opções “nível de confiança (95%)” e “resíduos (Plotar resíduos)”.

Para direcionar quais dados devem estar em cada eixo, deve-se clicar sobre o eixo que aparece nesta janela e selecionar os dados da coluna desejada. Conforme indicam as figuras abaixo:

A) Clicar na opção “Dados de Análise”, “Regressão” e OK.



B) Selecionar nas colunas com os dados, os correspondentes aos eixos x e y. Selecionar Nível de confiança 95%, resíduos e plotar resíduos e dar ok.

