

* Este exemplar corresponde a redação final da Tese defendida por Abigail Dorigatti e aprovado pela Comissão Julgadora no dia 14 de agosto de 1987.

Campinas 28 de outubro de 1987
Paula

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
INSTITUTO DE QUÍMICA

APLICAÇÃO DE CROMATOGRAFIA GASOSA
EM ESTUDOS DE DISSIPAÇÃO
DE HERBICIDA EM SOLOS BRASILEIROS

Abigail Dorigatti

TESE DE MESTRADO

ORIENTADORA: *Profª Drª Carol H. Collins*
AGOSTO 1987

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL

BANCA EXAMINADORA: *Profª Drª Carol H. Collins*
Profª Drª Isabel S.F. Jardim
Profª Drª Maria Lucia Ribeiro

Aos meus pais, que com exemplo
de amor, humildade e sacrifício
me mostraram o caminho certo.

A minha irmã, que sempre procurou
me apoiar e incentivar nos momentos
difíceis.

Aos meus sobrinhos....
Marcelo, Fabiana, Daniel,
Juliana e Leonardo.

Ao meu irmão, cunhado
e cunhada.

AGRADECIMENTOS

Desejo expressar meus agradecimentos

- . À DEUS, o qual sem acreditá-lo, nada seria possível.
- . À Prof^a Dr^a CAROL H. COLLINS, pela grande dedicação na orientação, compreensão e paciência.
- . Ao Dr. PEDRO BASABE, gerente do Centro de Pesquisa da Monsanto, pela oportunidade de realização deste trabalho.
- . Ao Prof. Dr. FRANCISCO DE A.M. REIS, pelo incentivo inicial do trabalho.
- . À CAPES e CNPq, pela Bolsa de Estudos, concedida.
- . À YURIKO pela colaboração constante.
- . À MARIA AP. LIMA pelo estímulo sempre constante durante toda pós-graduação.
- . À ELIANA, MARTHA, PIERINA, GUADALUPE, JOÃOZINHO, CRISTINE, pela amizade e alegria com que me acolheram no grupo.
- . Ao SÉRGIO pela ajuda nos cálculos.
- . À amiga CÁSSIA pela colaboração.
- . Ao Prof. ROGÉRIO, Prof. PIRES, Prof. KENNETH, pelas discussões matemáticas e físico-químicas.
- . À MIRTES e MARYNEZ pela grandiosa ajuda e amizade.
- . À NADIR, CIDA, SANDRA, MARIA IMACULADA e todos colegas do laboratório da Receita-Federal.
- . À VERA pela paciência e dedicação na datilografia.
- . À SONIA e MARIA DAS NEVES pela ajuda na parte experimental e a convivência agradável.

Aplicação de Cromatografia Gasosa em Estudos de Dissipação de Herbicida em Solos Brasileiros.

Aluna: Abigail Dorigatti

Orientadora: Profa.Dra. Carol Hollingworth Collins

Endereço: Instituto de Química da UNICAMP

Caixa Postal - 6154

13081 - Campinas - SP.

RESUMO

Um estudo de dissipação do herbicida Acetochlor (N-(2-etil-6-metilfenil)-N-etoximetil-2-cloroacetamida) foi executado em dois tipos de solos brasileiros, argiloso e arenoso. O experimento foi montado em condições reais do campo, sujeito a condições climáticas, de acordo com as normas da Agência de Proteção do Meio Ambiente (EPA) dos Estados Unidos.

Foram coletadas amostras antes da aplicação do herbicida e 1, 30, 60, 90, 180 e 360 dias após a aplicação. As amostras foram coletadas em duas profundidades: de 0 a 15 cm e de 15 a 30 cm, para avaliação de uma possível lixiviação do herbicida.

A metodologia analítica foi desenvolvida usando um padrão radiomarcado com carbono-14 do princípio ativo (p.a.) do herbicida. O p.a. e seus metabólitos e produtos de degradação foram extraídos com solvente e transformados no metabólito mais simples, metiletilanilina(MEA), através de reações no laboratório

A técnica de Cromatografia Gasosa, usando coluna recheada e detector termiônico específico, por ser muito sensível, possibilitou a análise e o acompanhamento da dissipação até um baixo nível de resíduo do herbicida no solo.

Os resultados obtidos, as concentrações totais do p.a. do herbicida e seus metabólitos versus tempo, foram analisadas graficamente e também por várias funções matemáticas para se determinar a melhor equação que descreve os resultados e, para obter a meia-vida do herbicida e seus metabólitos no solo.

A função logarítmica foi a que melhor representou os dados, porém considerações físico-químicas sugerem a representação pela equação da cinética de primeira ordem.

Verificou-se a necessidade de ter sido coletadas um maior número de amostras no período de 1 a 30 dias após aplicação, já que neste período se localizou a meia-vida do herbicida.

Constatou-se a importância da homogeneização apropriada do solo (através de moinho de martelo para solo), para se ter melhor repetibilidade nos resultados na análise de resíduo.

Conclui-se que não houve lixiviação do herbicida, pois as curvas de concentração versus tempo para as profundidades de 0 a 15 cm e de 15 a 30 cm, foram aproximadamente paralelas.

Em termos de meia vida, observou-se que o comportamento do herbicida Acetochlor é influenciado pelo tipo de solo e condições climáticas. Portanto, não se pode adotar estudos feitos em solos estrangeiros para serem aplicados no Brasil.

Application of Gas Chromatography in the Study of Herbicide Dissipation in Brazilian Soils.

Candidate: Abigail Dorigatti

Supervisor: Profa.Dra. Carol Hollingworth Collins

Endereço: Instituto de Química da UNICAMP

Caixa Postal - 6154

13081 - Campinas - SP.

ABSTRACT

A study of the dissipation of the herbicide, Acetochlor (N-(2-ethyl-6-methylphenyl)-N-etoxymethyl-2-Chloroacetamide), was carried out on two different Brazilian soils, a clay and a sandy soil. The experiment was performed in the field, under real climatic conditions, following the regulations of the Environmental Protection Agency (EPA) of the United States.

The soils were sampled before and after the 1st, 30th, 60th, 90th, 180th and 360th days after herbicide applications at two depths (0 to 15 cm and 15 to 30 cm) to evaluate the lixiviation of the herbicide.

The analytical methodology was developed using a radio-labelled sample of the herbicide. The active principle, its metabolites and degradation products were extracted using a solvent and chemically transformed to Methylethylaniline (MEA), the most simple metabolite.

Gas Chromatography, with a thermionic specific detector, due to its high sensibility, was used to analyse herbicide dissipation and its residue in the soil.

The total concentrations of the active principle and its metabolites were plotted against time and mathematically analysed using different functions to determine the best one to describe the results and to determine the decay constant of the herbicide and its metabolites in the soil. A logarithmic function provided the best fit of the results. However, physical-chemical considerations suggest first order kinetics.

The need to collect a larger number of samples of the soils between 1 and 30 days after herbicide application was verified, since the decay constant falls within this period. Also, the need for good homogenization, using a hammer mill, was demonstrated, in order to get better repeatability of the results in the analysis of the herbicide residue.

There was no herbicide lixiviation because the curves for concentrations against time are approximately parallel for samples collected from 0 to 15 cm and from 15 to 30 cm depth intervals.

The behavior of the herbicide Acetochlor, depends on the type of soil and the climatic conditions. Therefore, it is not possible to adopt results obtained in foreign soils for use in Brazil.

ÍNDICE

	página
Capítulo 1	
Apresentação	001
Capítulo 2	
Análise de Resíduos de Pesticidas	005
2.1. Introdução	005
2.1.1. Tipos de pesticidas	006
2.1.2. Resíduo de pesticida	014
2.2. Legislação Brasileira e Internacional sobre pesti- cidas.	018
2.2.1. Legislação à nível nacional	019
2.2.2. Legislação à nível internacional	022
2.3. Diretrizes para Estudos de Dissipação de Pesticidas em Solos.	023
2.4. Considerações sobre ensaios de resíduos.	024
2.4.1. Os ensaios em campo	024
2.4.2. Aplicação do pesticida	027
2.4.3. Estudos de degradação	029
2.4.4. Amostragem	029
2.5. Limpeza da vidraria	030
2.6. Pureza dos reagentes	033
Capítulo 3	
Cromatografia Gasosa em Análise de Resíduo	035

3.1. Conceitos básicos	035
3.2. Fase Móvel	037
3.3. Fase Estacionária	037
3.3.1. Cromatografia Gás-Sólido	038
3.3.2. Cromatografia Gás-Líquido.....	039
3.4. Colunas Cromatográficas	040
3.5. Detectores para Cromatografia Gasosa	041
3.5.1. Detector Termiônico Específico	042
3.6. Análise Qualitativa	045
3.7. Análise Quantitativa	047
3.7.1. Padronização externa	049
3.7.2. Padronização interna	050
3.8. Contaminantes	051
Capítulo 4	
Comportamento do Pesticida em Solo	053
Capítulo 5	
Montagem do Experimento no Campo	071
Capítulo 6	
Parte Experimental	075
6.1. Materiais e Reagentes	075
6.2. Preparação dos Padrões	076
6.2.1. Solução padrão de Acetochlor	077
6.2.2. Solução padrão de MEA em hexano	077
6.3. Preparação das Amostras	078
6.4. Desenvolvimento da Metodologia Analítica	079
6.4.1. Extração do Princípio Ativo	080
6.4.2. Hidrólise Ácida e Básica	082

6.4.3. Purificação do metabólito	086
6.4.4. Método de conversão do Acetochlor	088
6.4.5. Validação da metodologia para Acetochlor	088
6.5. Análise de resíduo nas amostras	091
6.6. Quantificação por Cromatografia Gasosa	093
6.7. Cálculos	095
6.7.1 Cálculo da concentração e recuperação analítica do Acetochlor	095
6.7.2 Cálculo da meia-vida	098
Capítulo 7	
Resultados e Discussões	101
7.1. A Técnica Cromatográfica na Quantificação	101
7.2. Desenvolvimento da Metodologia de obtenção de MEA para Análise Cromatográfica	106
7.3. Influência da preparação da amostra	109
7.4. Resultados quantitativos dos testes em campo	113
7.5. Análise da lixiviação do herbicida	117
7.6. Efeito da concentração do herbicida aplicado	117
7.7. A meia-vida do herbicida no solo, aplicando cinéti- ca de primeira ordem.	122
7.8. Meia-vida aplicando outras funções matemáticas	122
7.9. Meia-vida aplicando outras funções matemáticas	130
7.10. Comentários Finais	133
Referências Bibliográficas	136
Apêndice : Classificação de Solos	140

ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
Figura 2.1 - Exemplos de Inseticidas Fulmigrantes	007
Figura 2.2 - Exemplos de Inseticidas Organoclorados	008
Figura 2.3 - Exemplos de Inseticidas Organofosforados ...	008
Figura 2.4 - Exemplos de Inseticidas Carbamatos	009
Figura 2.5 - Exemplos de Rodenticidas	010
Figura 2.6 - Exemplos de Herbicidas	011
Figura 3.1 - Representação Esquemática de Separação em Coluna Cromatográfica Recheada	036
Figura 3.2 - Medidas de Tempo de retenção relativo	046
Figura 3.3 - Linha de base do integrador eletrônico	049
Figura 4.1 - Correlação entre capacidade adsorbtiva e al- gumas propriedades do solo	059
Figura 5.1 - Delineamento das parcelas no ensaio de campo	072
Figura 6.1 - Estrutura do Alachlor e Acetochlor	079
Figura 6.2 - Esquema do método analítico I	081
Figura 6.3 - Esquema das reações para a transformação de Alachlor à DEA	083
Figura 6.4 - Esquema do Rotaevaporador	084
Figura 6.5 - Sistema do refluxo e destilação	085
Figura 6.6 - Esquema do método analítico II	089

Figura 6.7 - Esquema das reações para transformação de Acetochlor à MEA	090
Figura 6.8 - Curva de calibração de MEA	095
Figura 6.9 - Curva de decaimento de concentração de Acetochlor versus tempo	099
Figura 7.1 - Exemplos de Cromatogramas obtidos	102
Figura 7.2 - Curva de calibração para MEA	103
Figura 7.3 - Pontos importantes da hidrólise e destilação	107
Figura 7.4 - Resíduo de Acetochlor encontrado versus tempo, para solo argiloso na dose x para as duas profundidades	118
Figura 7.5 - Resíduo de Acetochlor encontrado versus tempo, para solo arenoso na dose x para as duas profundidades	119
Figura 7.6 - Resíduo de Acetochlor encontrado versus tempo, para solo argiloso na profundidade de 0 a 15 cm para as duas doses de aplicação ...	120
Figura 7.7 - Resíduo de Acetochlor encontrado versus tempo, para solo arenoso na profundidade de 0 a 15 cm para as duas doses de aplicação	121
Figura 7.8 - Valores de $\ln C/C_0$ versus tempo para solo argiloso para duas profundidades e duas doses de aplicação	125
Figura 7.9 - Valores de $\ln C/C_0$ versus tempo para solo arenoso para as duas profundidades e duas doses de aplicação	126

ÍNDICE DE TABELAS

	Página
Tabela 2.1 - Herbicidas mais usados nos E.U.A entre 1950 a 1975	012
Tabela 2.2 - Herbicidas em fase de desenvolvimento	012
Tabela 5.1 - Classificação dos solos	071
Tabela 5.2 - Doses aplicadas do Herbicida	073
Tabela 6.1 - Solução de MEA para Curva Padrão	078
Tabela 6.2 - Preparação das amostras fortificadas	091
Tabela 6.3 - Descrição do conjunto de amostras para cada análise	092
Tabela 7.1 - Exemplos de curva de calibração	104
Tabela 7.2 - Recuperação analítica para Acetochlor em solo arenoso	108
Tabela 7.3 - Resíduo de Acetochlor encontrados em duas profundidades de solo arenoso. Amostras ho- mogeneizadas com almofariz	111
Tabela 7.4 - Recuperação analítica de Acetochlor em solo arenoso. Amostras homogeneizadas com almo- fariz	112

Tabela 7.5	- Resíduo de Acetochlor encontrado em duas profundidades de solo argiloso. Amostras homogeneizadas em moinho de solo	114
Tabela 7.6	- Resíduo de Acetochlor encontrado em duas profundidades de solo arenoso. Amostras homogeneizadas em moinho de solo	115
Tabela 7.7	- Recuperação analítica para Acetochlor em solo argiloso e arenoso. Amostras homogeneizadas em moinho de solo	116
Tabela 7.8	- Sumário de dados usados no cálculo de cinética de primeira ordem para solo argiloso e arenoso	123
Tabela 7.9	- Valores de coeficiente de correlação linear para cinética de primeira ordem	127
Tabela 7.10	- Resultados de meia-vida calculados por regressão linear para cinética de primeira ordem	129
Tabela 7.11a-	Valores das constantes para outras funções matemáticas (usando-se 5 pontos)	131
Tabela 7.11b-	Valores das constantes para outras funções matemáticas (usando-se 4 pontos)	131
Tabela 7.12	- Comparação entre as meia-vidas calculadas para cinética de primeira ordem e função logarítmica	132

CAPÍTULO 1

APRESENTAÇÃO

O presente trabalho de Tese, trata-se de um estudo de dissipação de herbicida em solos brasileiros.

Faz-se necessário ressaltar que este trabalho foi desenvolvido no Centro de Pesquisa de uma Indústria, portanto com um objetivo prático; a obtenção de resultados. Mas, realizado em conjunto com a Universidade, o trabalho se transformou e tomou uma visão e objetivo de pesquisa e desenvolvimento do próprio senso crítico sobre o trabalho realizado.

É fundamental que a produção científica da Universidade seja absorvida pela sociedade como um todo e que a preocupação do cientista se volte para a solução de problemas que afligem a comunidade onde ele vive. Assim sendo a associação entre a Universidade e a Indústria (ou Centros de Pesquisa) é altamente salutar e produtiva, pois os resultados de uma pesquisa acadêmica não ficam restritos a um pequeno grupo de cientistas, mas são aplicados. Dessa aplicação resultam benefícios imediatos para a sociedade em geral.

Como este trabalho é o primeiro sobre Resíduo de Pesticida no Instituto de Química da UNICAMP, houve a necessidade de capítulos explicativos das técnicas usadas, e da metodologia empregada no estudo de resíduo de pesticida.

A Análise de Resíduo de Pesticida é considerada atualmente um dos ramos da Química Analítica, em que se trabalha com

níveis quantitativos muito baixos, na faixa de ppb, e onde a precisão, exatidão e técnicas altamente sensíveis são relevantes.

Existem atualmente muitos químicos e bioquímicos trabalhando nesta área em todo Brasil. O Grupo de Analista de Resíduo de Pesticida (GARP) é constituído de representantes de Indústrias e Órgãos Públicos (Universidade, Instituições, etc.) que se reúnem mensalmente no Instituto Adolfo Lutz em São Paulo. E promove o Encontro Nacional de Analistas de Resíduo, para discussão de problemas analíticos, estudos colaborativos para controle de qualidade analítica dos laboratórios de resíduo, e cursos de treinamento a Nível Nacional e Latino Americano para pessoas que desejam iniciar trabalhos na área. Este grupo também discute leis normativas de registro do pesticida, fornecendo subsídios aos órgãos competentes para estabelecimento de tolerâncias (limite máximo de resíduo) para diferentes pesticidas.

O número de compostos usados como pesticida aumenta e, muitas vezes, os agricultores não estão totalmente educados para usá-los, então o trabalho nessa área é grande e é impossível um controle total da situação.

Existem Leis Normativas que exigem dados sobre o resíduo de pesticida na cultura, para que ele seja registrado e receba uma licença de uso provisório ou definitivo. Por outro lado, para o meio ambiente ainda pouco se exige.

No capítulo 2, tentamos transmitir o que é análise de resíduo, quais são os principais tipos de pesticidas, e uma idéia sobre Legislação existente a nível nacional e internacional. Também apresentamos informações sobre como são realizados ensaios de

dissipação de pesticida em solo fora do Brasil e algumas considerações gerais sobre ensaios de campo, para situar o experimento realizado.

No capítulo 3, apresentamos a técnica quantitativa, Cromatografia Gasosa aplicada a análise de resíduos, onde tentamos explicar os seus princípios fundamentais.

O capítulo 4 é muito importante para situar o nosso trabalho em termos de pesquisa; pois reunimos neste capítulo resumos dos trabalhos e conclusões dos experimentos feitos com pesticida no solo. É também importante para ajudar em nossas interpretações e conclusões dos resultados obtidos, embora nenhum dos trabalhos já realizados no Brasil, tenha sido feito em condições reais de campo. A maioria dos trabalhos brasileiros são do Instituto Biológico em São Paulo, que realizou todos seus experimentos usando composto radiomarcado em laboratório ou simulando condições de campo.

No capítulo 5 descrevemos o trabalho feito por engenheiros agrônomos das Indústrias Monsanto, através do qual tornou-se possível que o nosso estudo fosse realizado em condições de campo e usando regiões típicas açucareiras, Pernambuco e interior de São Paulo, onde o herbicida será usado.

Os capítulos 6 e 7 são comuns em todas as teses; no capítulo 6 está descrita a parte experimental, a qual foi totalmente realizada no Centro de Pesquisa da Indústria Monsanto e no capítulo 7 se encontram os resultados obtidos e a discussão sobre eles.

Com este trabalho pretendemos contribuir com uma parcela para outros estudos de dissipação de pesticida em solo e no meio ambiente.

Com o desenvolvimento de novos produtos químicos, as vezes altamente tóxicos, torna-se necessário a pesquisa em torno de métodos para diminuir o grau de poluição e conhecer seu comportamento no meio ambiente, sendo uma forma de contribuição da ciência na preservação desse planeta já tão devastado. É dever do químico contribuir para a formação de uma consciência ecológica que atinja a sociedade em todos os seus segmentos, e através de trabalhos desse tipo esse objetivo pode ser alcançado.

CAPÍTULO 2

ANÁLISE DE RESÍDUOS DE PESTICIDAS

2.1 - Introdução.

O termo "Pesticida", também encontrado como Praguicida, Produtos Agrotóxicos, Defensivos Agrícolas e Biocidas, é usado para designar uma série de substâncias ou mistura de substâncias destinadas a prevenir a ação ou destruir direta ou indiretamente: insetos (Inseticidas), acáros (Acaricidas), roedores (roticida), fungos (Fungicida), nematóides (Nematicidas), ervas daninhas (Herbicidas), bactérias e outras formas de vida animal ou vegetal prejudiciais à lavoura, à pecuária, seus produtos e outras matérias primas alimentares [1].

Os pesticidas podem ser classificados [2] segundo:

- Sua Natureza Química: hidrocarbonetos clorados, organofosforados, carbamatos, compostos inorgânicos, compostos orgânicos naturais, etc;
- Seu Estado Físico: pó, solução, suspensão, sólidos voláteis, etc.;
- Seu Modo de Ação: veneno estomacal, veneno de contato, fumigantes e outros;

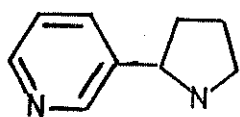
- O Alvo a Ser Atingido: inseticidas, herbicidas, fungicidas, roticidas, algaecidas, moluscicidas, acaricidas e nematóides, etc.;

2.1.1 - Tipos de Pesticidas.

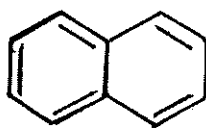
Os inseticidas são usualmente classificados [2] como:

1. venenos estomacais que são absorvidos pelo corpo do inseto através do trato digestivo. São compostos mercuriais (HgCl_2 , HgCl), compostos borados (bórax, $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ e ácido bórico, H_2BO_3), compostos de antimônio, de tálio, fósforo amarelo e formaldeído;
2. venenos sistêmicos que são absorvidos pela planta na aplicação e então ingeridos pelos insetos quando estes se alimentam;
3. fumigantes que são gases químicos (vapor de líquido ou sólidos aquecidos) que matam os insetos através do sistema respiratório. São usados em locais fechados para matar pestes de produtos estocados ou "nursery stock". Os fumigantes mais populares são: cianeto de hidrogênio (HCN) obtido pela ação da umidade atmosférica no cianeto de cálcio (Cianogar), brometo de metila (CH_3Br), dissulfeto de carbono (CS_2), tetracloreto de carbono (CCl_4), nicotina, nafatleno e outros (Figura 2.1).

Figura 2.1 - Exemplos de Inseticidas Fumigantes.



NICOTINA



NAFTALENO

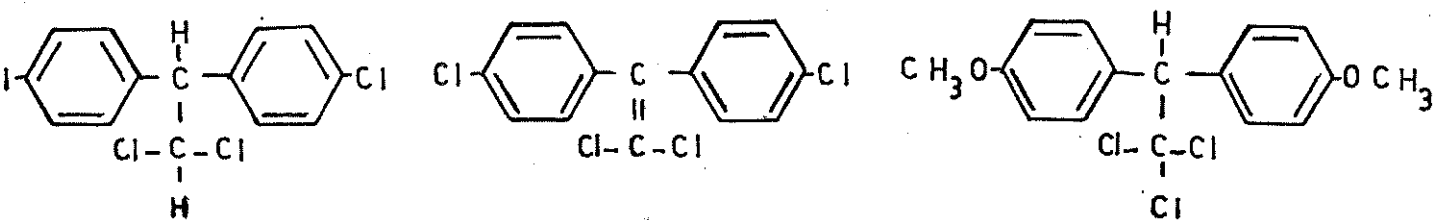
4. venenos de contato que entram através da parede do corpo do inseto ou sistema respiratório. São os hidrocarbonetos clorados, organofosforados, carbamatos, piretróides, etc.

Os hidrocarbonetos clorados incluem o DDT e seus metabólitos, DDD (também conhecido como TDE), DDE, Hexaclorociclohexano (BHC), Aldrin, seu metabólito Dieldrin, Metoxiclor, Mirex e outros (Figura 2.2).

Os hidrocarbonetos clorados, na sua maioria, são inseticidas persistentes e de larga aplicação. Seus resíduos persistem no meio ambiente por um grande período de meses ou até anos.

Os compostos organofosforados são inseticidas mais tóxicos. Alguns deles são considerados veneno humano pois, na faixa de 5mg/kg, são fatais para o homem. Alguns exemplo são: Paration, Paraxon, Malation, TEPP, entre outros (Figura 2.3).

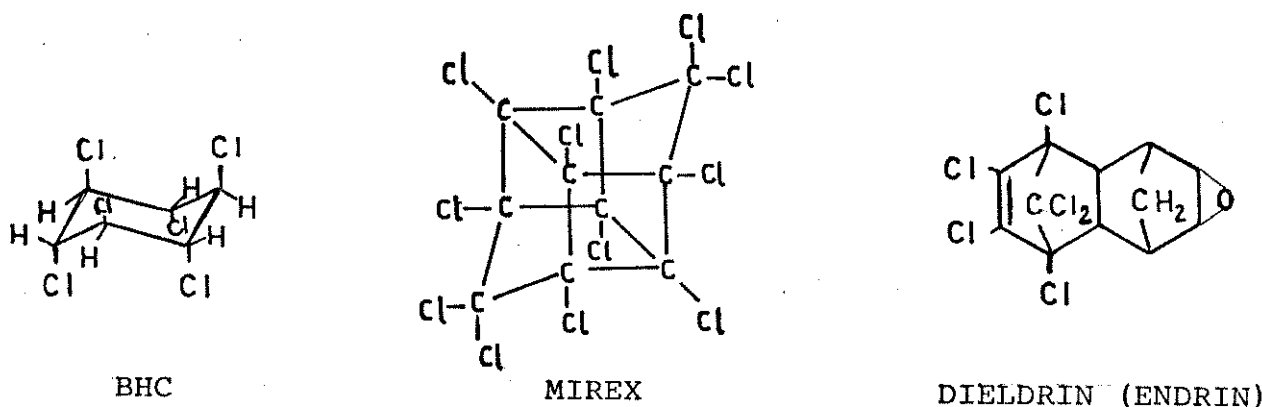
Figura 2.2 - Exemplos de Inseticidas Organoclorados.



DDD (TDE)

DDE

METOXICLOR

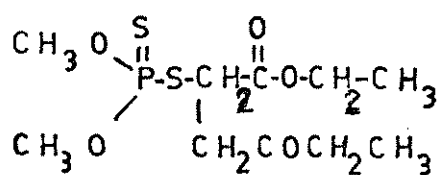


BHC

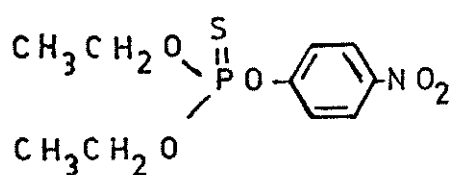
MIREX

DIELDRIN (ENDRIN)

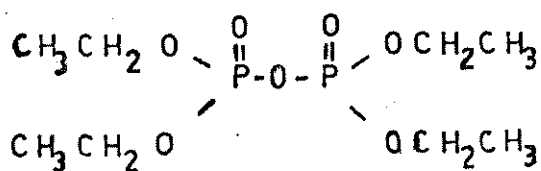
Figura 2.3 - Exemplos de Inseticidas Organofosforados.



MALATION



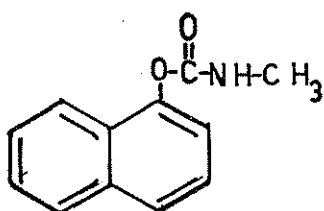
PARATION



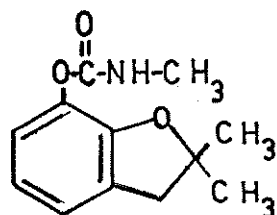
TEPP

Os carbamatos, que são derivados do ácido carbâmico (NH_2COOH), tais como carbaril (Sevin) e Carbofuran (Furadan) são inseticidas de largo campo de ação e relativamente baixa toxidez para mamíferos e alguns insetos. (Figura 2.4).

Figura 2.4 - Exemplos de Inseticidas Carbamatos.



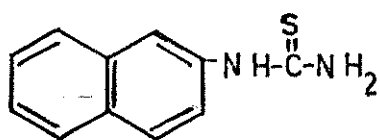
CARBARIL (SEVIN)



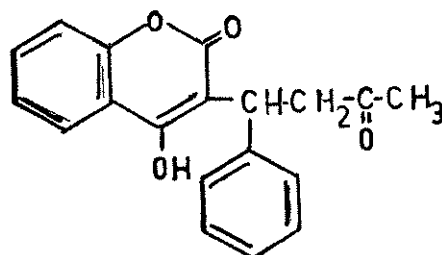
CARBOFURAN (FURADAN)

Os Rodenticidas ou Rotocidas são usados contra roedores: ratos e camundongos, etc. Alguns possuem ação direta como a estriquinina, fluoroacetato de sódio, fósforo, tálio e ANTU (alfa-naftiltiurêia) (Figura 2.5). Outros são anticoagulantes, como o Warfarin. De especial interesse é o norbormida por ser muito seletivo; tóxico para ratos e menos tóxico para outros animais (Figura 2.5).

Figura 2.5 - Exemplos de Roticidas.



α -NAFTILTIIURÊIA
(ANTU)



WARFARIN

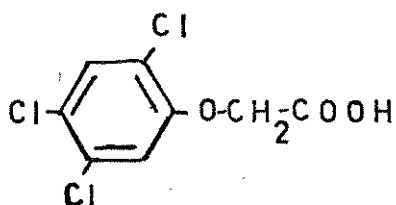
Os Herbicidas são compostos que matam as plantas. Temos os não seletivos, que matam todas as plantas, como arseniato de sódio, clorato de sódio, ácido sulfúrico e alguns óleos, e os herbicidas seletivos, que matam somente certos tipos de plantas. Os herbicidas mais usados são 2,4-D (ácido p-2,4-diclorofenóxi-acético), 2,4,5-T (ácido p-2,4,5-triclorofenoxiacético) e seus ésteres [2] (Figura 2.6).

Para situar o herbicida Acetochlor, em estudo nesta tese, temos na Tabela 2.1, uma lista dos herbicidas mais usados nos Estados Unidos, introduzidos entre 1950 e 1975 [3] e, na Tabela 2.2, alguns herbicidas em desenvolvimento em fase experimental [3].

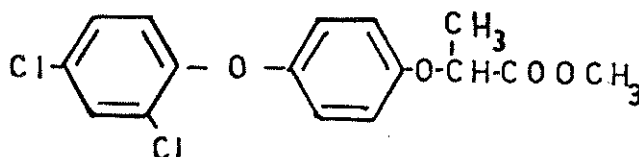
O modo de ação dos herbicidas, embora muito estudado, só é parcialmente conhecido, porque o herbicida mata várias ervas enquanto algumas culturas sobrevivem sem ser afetada, após ser exposta ao mesmo composto químico.

O procedimento lógico para desenvolvimento e teste de um novo composto herbicida é a aplicação deste sobre vários tipos de

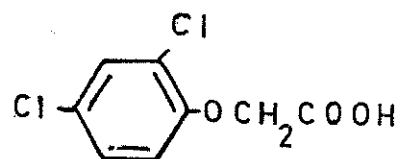
Figura 2.6 - Exemplos de Herbicidas



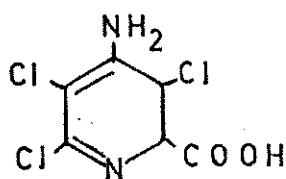
2,4,5 T



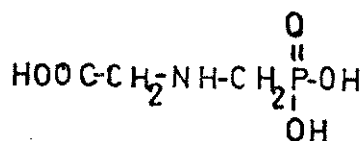
DICLOFOPMETIL



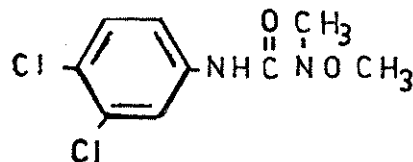
2,4 D



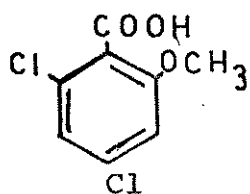
PICLORAN



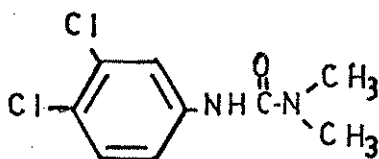
GLIFOSATO



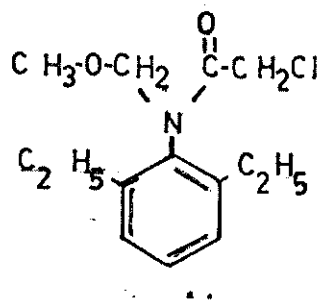
LINURAN



DICAMBA



DIURON



ALACHLOR

TABELA 2.1 - HERBICIDAS MAIS USADOS NOS ESTADOS UNIDOS, INTRODUZIDOS ENTRE 1950 - 1975.

Nome Comum ou código	Nome Comercial	Produtor	Tipos de Herbicidas	Aplicação Típica	Dose de Aplicação de Ingrediente Ativo libras/acre
Acifluorfen Sal sódico	Blazer	Rohm & Haas	Pós-emergente	soja	0,125 a 1
Bentazon	Basagran	Basf Wyandote	Pós-emergente	soja e arroz milho e amendoim	0,75 a 2
Diclofopmetil	Hoelon	American Hoeschst	Pós-emergente	trigo, cevada e soja	0,75 a 1,25
Mefluidide	Vistar	3 M	Pós-emergente	soja	0,25 a 2
Oxifluorfen	Goal	Rohm & Haas	Pré-emergente ou pós-emergente	soja, milho e algodão	0,2 a 2
Pendimentalin	Prowl	American Cyanamid	Pré-emergente ou pré-plantio	milho, soja, batatas, arroz, algodão	depende da cultura e do solo
Triclopyr	Garlon	Dow	Pós-emergente		

TABELA 2.2 - HERBICIDAS EM FASE DE DESENVOLVIMENTO.

Nome Comum ou código	Nome Comercial	Produtor	Tipos de Herbicidas	Aplicação Típica	Doses de Aplicação de Ingrediente Ativo - libras/acre
Acetochlor MON-097	Fist	Monsanto	pré-emergente	milho, soja, amendoim cana de açúcar, algodão e batata	1 a 4
Chlorosulfuron	Glean	Du Pont	pré-emergente e pós-emergente	trigo, cevada e aveia	0,01 a 0,04
DPX-5684	Oust	Du Pont	pré-emergente e pós-emergente	uso industrial	0,25 a 1
Ro 113-8895	-	Maag Agrochemicals	pós-emergente	soja, algodão, amendoim e beterrada	0,125 a 0,75
S-734	-	Uniroyal	pré-emergente	soja e algodão	0,5 a 1
Sethoxydin	Poast	Basf Wyandotte	pós-emergente	soja	0,15 - 035 para ervas anuais 0,15 - 075 para ervas perenes

ervas daninhas e culturas, sendo possível através de "screening" descobrir para que tipo de erva é eficaz [3].

Provavelmente o mecanismo de ação que mais se tem estudado é o do herbicida 2,4-D. Muito se sabe como o composto age na planta mas os grandes detalhes permanecem desconhecidos.

Em parte, acredita-se que o 2,4-D tem uma ação similar ao efeito do regulador de crescimento natural, o ácido 3-indoleacético. Acredita-se que o herbicida seja mais potente que o ácido 3-indoleacético, que degrada-se vagarosamente, sendo acumulativo na planta tratada, causando um crescimento muito rápido, sendo assim as células jovens da planta não amadurecem de maneira normal e partes da planta, como o sistema de transporte de alimentos, são fechados pelo acúmulo de células. O herbicida também afeta a respiração da planta, divisão celular, o balanço de hormônio e a síntese de proteínas [3].

Um modo comum de ação do herbicida é o impedimento da fotossíntese inibindo a formação da clorofila e carotenos, induzindo a decomposição de água e cloroplastos.

Alguns herbicidas inibem a síntese de proteínas, como o Alachlor e Propachlor. O herbicida Glifosato interfere na síntese de aminoácidos, retardando a síntese de proteína.

Herbicidas como siduron e chlorombem retardam o crescimento da raiz e eventualmente causam a morte da planta.

Algumas culturas, como milho e arroz, tem enzimas que desintoxicam a planta do herbicida.

2.1.2 - Resíduo de Pesticida.

"Resíduo de Pesticida" [4] é definido como sendo a quantidade de pesticida e/ou seus derivados remanescente no alimento e no meio ambiente, decorrente do seu emprego. Os níveis de resíduos são normalmente indicados em ppm*.

O conhecimento dos níveis de resíduos em cultura, é necessário, principalmente para a estimativa do resíduo máximo que resulta quando o produto é usado de acordo com as recomendações da "Boa Prática Agrícola"**.

Afim de se obter dados necessários para essa estimativa, devem ser analisados produtos agrícolas de culturas que recebam os tratamentos com o pesticida sob condições agrícolas e climáticas - representativas do seu uso.

Os dados sobre os resíduos são necessários para registro no Ministério da Saúde de um novo produto a ser usado como pesticida em determinadas culturas, ou para a extensão do uso à uma cultura que não tenha registro de um produto que já esteja no mercado.

Para obtenção dos dados de resíduos em uma certa cultura, ou estudo ambiental deste Pesticida, devem ser montados os ensaios de campo, que estejam de acordo com as diretrizes para aplicação, dosagens, etc.

* "ppm" Indica a quantidade em massa do resíduo por um milhão de partes (em massa) da amostra (alimento, solo, etc.) ou pelo termo equivalente, mg de resíduo por kg de amostra [4].

** "Boa Prática Agrícola", ou uso adequado, é definido como emprego correto e eficaz de um pesticida, considerando os riscos toxicológicos envolvidos em sua aplicação, de modo que os resíduos sejam os menores possíveis e toxicologicamente aceitáveis [4].

Além disso as amostras devem ser colhidas segundo critérios para a análise de resíduos.

A análise deve ser executada tomando os devidos cuidados com a limpeza das vidrarias e com escolha de solventes e reagentes apropriados para evitar contaminação durante a análise.

Não existe ainda nenhuma exigência na Legislação Brasileira para estudo de dissipação de Pesticida no meio ambiente. Então, as diretrizes que poderiam ser seguidas para montagem de tal ensaio são as da Agência de Proteção do Meio Ambiente (EPA)* dos Estados Unidos.

Estas diretrizes são recentes, sendo que, antes de 1970, também nos EUA não era exigido dados de química ambiental como pré-requisito para registro de um pesticida.

Somente depois de muitas pesquisas feitas sobre o comportamento dos pesticidas no meio ambiente pelas universidades, laboratórios governamentais, laboratórios de indústrias e, ainda mais importante, a preocupação pública sobre possíveis efeitos crônicos ou agudos sobre qualquer organismo ou ecossistema por pesticidas persistentes, surgiu a necessidade de maiores e melhores informações sobre a química ambiental, acompanhada da necessidade de um processo regulatório.

A primeira manifestação de Registro de Pesticidas ao Departamento de Agricultura dos EUA, notificada 70-15 (1970), [5] foi um documento contendo seis questões básicas que o fabricante de um pesticidas precisava responder para dar suporte ao registro:

*EPA - "Environmental Protection Agency", órgão que cuida do meio ambiente.

1. Qual é o tempo de dissipação do pesticida no solo?
2. Qual é o mecanismo de degradação do pesticida no solo?
3. Se o pesticida sofre ou não lixiviação no solo?
4. Se o resíduo do pesticida se move ou não do lugar de aplicação pelo movimento de água no solo?
5. Se os pesticidas são encontrados ou não no solo após um curto período de aplicação?
6. Em que nível o composto inicial e/ou seu metabólito principal será acumulado aos tecidos de peixes, coelhos e pássaros, qual é a dosagem associada a sintomas agudos de toxidez e quais sintomas são exibidos durante períodos de teste em laboratório em nível crônico?

Atualmente, para se obter o registro de um produto junto ao EPA, vários requisitos são necessários, incluindo estudos de degradação e metabolismo, mobilidade, dissipação e acumulação de pesticida pelo meio ambiente, bem como avaliação dos perigos relacionados com [5]:

1. Exposição direta do homem ao pesticida através da ingestão de alimentos contaminados.
2. Exposição indireta do homem pela distribuição no ambiente de resíduos persistente de pesticidas.
3. Exposição dos animais a alimentos contendo resíduos de pesticidas, que poderiam acumular e concentrar (eventualmente tornando-se um perigo ao homem), através de cadeia alimentar.

Dentro do "Estudo de Degradação" estão incluídos estudos da hidrólise de Pesticida e de sua fotodegradação na água, no solo e no ar, pois através dessas transformações, os pesticidas podem se converter em novos compostos com diferentes propriedades dos seus precursores [5].

O "Estudo de Metabolismo" incluem estudos de metabolismo aeróbicos e anaeróbicos em solo e água.

No "Estudo de Mobilidade" estão incluídos estudos de lixiviação, de adsorção/desorção no solo e também de volatilização.

Através de estudos de lixiviação tem-se a avaliação se há excessiva migração de resíduo persistente no subsolo, contaminando águas subterrâneas, colocando em risco outras formas de vida selvagem a alguma distância de onde o pesticida foi aplicado [5].

O "Estudo de Dissipação" inclui estudos de dissipação em campo para uso terrestre e aquático e estudos de misturas em tanques. Esses estudos de dissipação em campo são usados para avaliar a mobilidade, degradação e dissipação do resíduo de pesticida sob condições atuais de campo, na terra, água ou floresta, que não podem ser feitos em laboratório [5].

O "Estudo de Acúmulo" é realizado em áreas confinadas (laboratório, estufa), frequentemente com o pesticida marcado com carbono-14. O estudo de acúmulo é feito em cultura rotacional, irrigada, e em peixes, etc. [5].

A Agência de Proteção do Meio Ambiente (EPA), acredita que, com maior exigência para o registro do produto, surgirá dados mais seguros e confiáveis para suportar os registros.

Desde 1972 a EPA proibiu o uso de alguns pesticidas importantes, como DDT e Aldrin (pesticidas clorados), bem como compostos mercuriais [2], após várias campanhas públicas de defesa ao meio ambiente.

Em 1975 a EPA também suspendeu o uso de outros dois organoclorados, o Heptachlor e Chlordano [2].

Nos últimos 35 anos foi desenvolvida uma longa variedade de pesticidas; no ano de 1970 cerca de 1.000 compostos diferentes foram registrados para uso em mais de 30.000 pesticidas, entre eles, os herbicidas, que tem crescido substancialmente nestes últimos 30 anos nos EUA. Em 1950 os produtores venderam cerca de 15 herbicidas básicos. Atualmente, existe mais de 180 herbicidas básicos e cerca de 6.000 produtos formulados, em média levando cerca de 10 anos para o herbicida ser lançado no mercado.

A Monsanto estima que a Companhia sintetizou e testou cerca de 12.000 compostos antes de encontrar um herbicida suficientemente promissor no mercado [3].

2.2 - Legislação Brasileira e Internacional sobre Pesticidas.

É muito importante um controle rigoroso dos efeitos não intencionais dos pesticidas sobre diversas formas de vida, incluindo o homem e o meio ambiente. Atualmente, em vários países estão sendo fixados padrões e limites máximos de tolerância de resíduos de pesticidas em alimento. Em alguns países, o teor máximo de resíduos em produtos alimentícios ainda não está regulamentado, mas a dosagem de substância a ser aplicada e o período

de carência são estabelecidos de tal forma que, na época da colheita o resíduo é quase ou completamente inexistente.

Qualquer produto fitossanitário, para ser comercializado e usado no Brasil, deve ser registrado e licenciado pela Seção de Produtos Fitossanitários (SEPROF), na Divisão Sanitária Vegetal (D.S.V.) do Ministério da Agricultura. O registro é baseado nas avaliações das ações dos produtos em relação às culturas, pragas e moléstias, homem e meio ambiente.

Após a aprovação do produto quanto à sua ação fitossanitária, são efetuados estudos toxicológicos ligados à saúde pública pelo Ministério da Saúde.

2.2.1 - Legislação a Nível Nacional.

A Legislação brasileira sobre resíduos de pesticidas está intimamente ligada à legislação sobre alimentos do Ministério da Saúde [6].

O primeiro documento legal sobre resíduos de pesticidas foi o Decreto Federal nº 50.040/61 "Normas Reguladoras do Emprego de Aditivos", que continha duas tabelas: referente a aditivos intencionais em alimentos e outra sobre a tolerância ou limite máximo de resíduos de pesticidas em alimentos.

Este primeiro decreto foi modificado pelo decreto nº 55.871/65 e depois alterado pela resolução 23/66 da CCPA. Em outubro de 1969 foi criada a Comissão Nacional de Normas e Padrões para Alimentos (CNNPA), cujo campo de ação era legislar sobre todos os aspectos relacionados a alimentos, aglutinando todo o

acervo da antiga Comissão Permanente de Aditivos em Alimentos. Pela Resolução nº 30/70, a CNNPA criou diferentes grupos de trabalho e, entre eles, um grupo específico encarregado de elaborar "Normas Gerais sobre Remanescência de Pesticidas em Alimentos", denominado GT-2.

O GT-2 é um grupo interdepartamental e multidisciplinar, formado por engenheiros agrônomos, veterinários, químicos-analistas de resíduos de pesticidas, médicos toxicólogos e biólogos, cada um fornecendo subsídios dentro de sua especialidade.

O GT-2 elaborou um documento (Resolução nº 12/74) contendo definições e requisitos para o registro de um pesticida, de acordo com a orientação dada pelo JMPR*, comitê misto das organizações internacionais (Organismo de Alimentos e Agricultura e Organismo Mundial para a Saúde, FAO/WHO* e por peritos em resíduos de Pesticidas. Através do item 3 deste documento estão interligados o Ministério da Saúde e o Ministério da Agricultura, que é o primeiro organismo a se manifestar quanto ao emprego de um pesticida na agricultura ou na pecuária.

*JMPR - Joint Mission on Pesticide Residues

*FAO - Food and Agriculture Organization

*WHO - World Health Organization

Para o estabelecimento de tolerância, o GT-2 segue a seguinte orientação:

- Quando um pesticida já tem uma ingestão diária aceitável (IDA) para o homem, estabelecida pelo JMPR, as tolerâncias ou limites máximos de resíduos são considerados definitivos quanto ao aspecto toxicológico.

Quando o pesticida ainda não foi avaliado pelo JMPR, o interessado deve apresentar, por ocasião do pedido de registro, os dados constantes da Resolução 12/74. A ingestão diária aceitável (IDA) é calculada pelos toxicólogos do GT-2 [6].

- Se o pesticida já estiver registrado no Ministério da Agricultura, antes da vigência da Resolução nº 12/74, mas não possuir uma IDA estabelecida, na preparação de sua monografia, é concedida uma tolerância provisória e um prazo de três anos para que o interessado apresente os dados toxicológicos exigidos pela Resolução nº 12/74.

- Para pesticidas já registrados no Ministério da Agricultura que possuem uma IDA estabelecida, mas sem dados de resíduos para a cultura cujo uso foi solicitado, é concedido uma tolerância provisória e prazo de dois anos para a apresentação de estudos sobre resíduos após intervalos diferentes entre a última aplicação e a colheita.

As monografias preparadas pelo GT-2, além do estabelecimento de tolerâncias em alimentos, tem a finalidade de fornecer orientações para o uso correto e seguro dos pesticidas, com destaque especial para a modalidade de emprego e intervalos de segurança entre a última aplicação e a colheita.

2.2.2 - Legislação a Nível Internacional.

Considerando-se as tolerâncias de limites máximos de resíduos, cada país possui uma legislação própria e, muitas vezes, as tolerâncias especificadas para cada produto alimentício diferem de um país para outro, como também as culturas nas quais os pesticidas são aplicados [6].

Os dois organismos internacionais, WHO e FAO, ambos subordinados a Organização das Nações Unidas (ONU), estão interrelacionados e trabalham em cooperação para avaliar os dados toxicológicos de cada pesticida, determinar a ingestão diária aceitável para o homem e calcular os limites de tolerância para cada alimento, sempre com base na boa prática agrícola.

Estes dois órgãos, que formam o JMPR, reúnem-se uma vez por ano, afim de verificarem se os resíduos remanescentes não ultrapassam a ingestão diária aceitável, apresentarem propostas e calcularem a tolerância de pesticidas em alimentos, sempre com base na boa prática agrícola, bem como estabelecer limites de resíduos não intencionais (limite prático ou resíduos estranhos).

Estes dados, publicados anualmente no relatório elaborado pela JMPR comitê misto, constituem a base para o estabeleci-

mento da legislação internacional e também servem como subsídio para a legislação de vários países.

Entretanto, as tolerâncias internacionais são estabelecidas pelo "Codex Alimentarius" Mundial, um terceiro organismo internacional coordenado pela FAO/WHO, através do seu Comitê de Resíduos de Pesticidas em Alimentos (CCPR). Este Comitê reúne-se anualmente utilizando, para suas discussões, resoluções e decisões, cujos dados são fornecidos pelo JMPR.

As tolerâncias internacionais são aplicadas na importação e exportação de gêneros alimentícios, pois facilitam o comércio internacional através de uma uniformidade de conceitos, evitando as dificuldades que se têm originado devido as legislações diferentes de cada país [6].

2.3 - Diretrizes para o Estudo de Dissipação de Pesticidas em Solos.

Para testes de persistência do pesticida em solo o EPA indicou as seguintes etapas:

1. Determinar a extensão da dissipação dos resíduos de pesticidas em condições reais de uso.
2. Executar ensaios em pelo menos dois locais que sejam representativos das áreas onde o pesticida será utilizado, incluindo locais adicionais se houver apreciável variação no clima, região, ou qualquer outra característica.

3. Aplicar o pesticida de acordo com procedimento de aplicação e sempre na maior quantidade recomendada no rótulo do produto.
4. Amostrar o solo da área tratada imediatamente após o tratamento para assegurar a extensão da dissipação do pesticida.
5. Obter testemunhas do local onde se pretende fazer a aplicação, antes da aplicação, e também das áreas adjacentes não tratadas, a intervalos estabelecidos, durante o decorrer e término do estudo.
6. Obter antes e após a aplicação. No caso de aplicações múltiplas, coletar a segunda somente após a última aplicação.
7. Coletar as amostras a uma profundidade de 15 cm se não houver lixiviação. No caso de lixiviação do pesticida no solo, as amostras devem ser tomadas a uma maior profundidade.
8. Definir a duração do experimento pelas trajetórias de declínio do pesticida e da formação e declínio dos produtos de degradação, para utilização em culturas, pomares e pastagens.

2.4 - Considerações sobre Ensaaios de Resíduos.

2.4.1 - Os Ensaaios em Campo.

Os ensaios devem ser executados com as formulações comerciais propostas. A aplicação, preferencialmente, deve ser feita com equipamento comercial e de uma maneira análoga à usada pelos lavradores e, ainda, deve-se dispensar o maior cuidado para se assegurar que a aplicação seja uniforme e completa.

Os ensaios devem ser realizados sob condições de campo representativas, em períodos típicos do ano, com práticas agrícolas que sejam comumente usadas. Uma vez que as condições climáticas tem uma influência importante na persistência de um pesticida, os ensaios devem ser feitos nas áreas onde este será usado.

Sendo que um dos objetivos do estudo de resíduos é fornecer a base para a estimativa dos níveis máximos de resíduos, o planejamento dos experimentos deve ser orientado para a determinação e avaliação das condições e fatores que levam aos resíduos maiores, que se obtém após o uso recomendado.

Os ensaios para a avaliação biológica podem ser aproveitados para a obtenção de amostras para análise de resíduos, se tiver havido um prévio planejamento para que os devidos cuidados com os ensaios de resíduos sejam tomados, e também se o tamanho da parcela seja suficientemente grande para se obter amostras representativas [7,8].

2.4.1.1 - Seleção de Locais.

Os ensaios devem ser realizados nas principais áreas de produção e devem ser localizados para cobrir as variações das principais condições (climáticas, sazonais, solo, sistema de cul-

tivo, etc.) que devem ser satisfeitos para o uso pretendido do pesticida [8].

2.4.1.2 - Número de Locais.

O número de locais necessários depende da variação das condições a serem cobertas, a uniformidade das culturas, na prática agrícola e aos resultados que já estão disponíveis.

Se os dados a serem obtidos forem os primeiros, pelo menos três diferentes locais são necessários a fim de se obter informação adequada sobre os níveis de resíduos a serem esperados.

Em culturas de cereais e batatas são necessários pelo menos cinco locais e ensaios de pelo menos dois anos [8].

2.4.1.3 - Repetições.

Não há necessidade de repetição em locais individuais. As variações dos níveis de resíduos são pequenas comparadas com as encontradas em locais diferentes. Quando se quer estudar a uniformidade experimental, usa-se duas ou três repetições em locais individuais com o mesmo tratamento [8].

2.4.1.4 - Parcelas.

O tamanho das parcelas varia de cultura para cultura, mas devem ser suficientemente grande para permitir: (1) aplicar o pesticida de uma maneira precisa e realística, preferivelmente

sob as mesmas condições das práticas normais do local; (2) ter uma parcela testemunha, que deve sempre acompanhar o ensaio, para o fornecimento de amostras livres de resíduos de pesticida sob investigação. A parcela testemunha deve estar localizada próxima às demais, a fim de se assegurar condições climáticas idênticas, mas suficientemente afastada para impedir contaminação a partir de parcelas tratadas (deriva, volatilização, etc.). Deve-se usar bordaduras entre as parcelas, afim de se prevenir contaminação cruzada [8,9].

2.4.2 - Aplicação do Pesticida.

2.4.2.1 - Formulações.

Deve ser usada a formulação que será ou já é comercializada.

2.4.2.2 - Método de Aplicação.

Tanto quanto possível as aplicações devem ser feitas com equipamentos semelhantes aqueles usados nas práticas comerciais locais. Deve-se manter a uniformidade da aplicação, evitando-se qualquer contaminação da parcela vizinha [8,9].

2.4.2.3 - Dosagem.

Deve conter pelo menos dois níveis: a dose máxima recomendada e uma outra, preferencialmente, o dobro da dose recomendada, isto se as condições de fitotoxidade permitirem. Estes dois testes fornecem orientação sobre os níveis de resíduos a serem esperados se as dosagens excederem a permitida e informação sobre as relações entre dosagem e níveis de resíduos.

Quando são usadas pulverizações o volume por unidade de área deve ser o mesmo em todos os locais e a concentração dos pesticida deve ser expressa em unidade de princípio ativo por unidade de área.

A dosagem zero seria a parcela testemunha a qual são necessárias para:

- assegurar que não haja nenhuma interferência na análise, devido a outros compostos da amostra;
- estabelecer o nível de recuperação de um pesticida naquele substrato, pelo método analítico.
- pesquisar, no caso de uma nova cultura, a estabilidade dos resíduos durante o armazenamento.

2.4.2.4 - Número e Época de Aplicações.

O número de aplicações e os intervalos entre elas devem refletir o uso máximo do produto recomendado para as circunstâncias [8,9].

2.4.3 - Estudos de Degradação.

Para ensaio de resíduo, são coletadas amostras da cultura que está sendo estudada. Este mesmo ensaio pode ser usado para estudo de metabolismo e degradação de um pesticida sob condições de campo.

2.4.4 - Amostragem.

A amostragem é a etapa inicial de uma análise e envolve grande responsabilidade, devendo ser feita criteriosamente, pois todo um esforço analítico está na dependência direta dos cuidados com que tenha sido tomada essa amostra para análise.

É de importância fundamental que a amostra seja representativa de um conjunto que se quer avaliar e a forma de torná-la depende da natureza do material. A seleção das porções que compõem a amostra de campo poderia ser feita ao acaso, sistematicamente, ou seletivamente, por períodos pré-estabelecidos, dependendo das circunstâncias.

Deve-se fazer uma identificação clara e segura e, sobretudo, acompanhá-la através de fichas que dêem o máximo de informações. Essa ficha é um guia para o analista, por, muitas vezes, orienta-o no método analítico mais adequado.

Uma vez embaladas e etiquetadas, as amostras devem ser imediatamente enviadas para o Laboratório de Resíduos, acondicionadas em gelo seco para mantê-las nas condições em que foram encontradas, sem mudanças de qualquer tipo, como, deterioração, da-

nos físicos, contaminação, perda do resíduo ou mudança no conteúdo de umidade.

As amostras devem ser analisadas tão rapidamente quanto possível após a coleta. Quando isto não ocorrer devem ser guardadas à -20° C. Alternativamente poderia ser feita uma extração com solvente, sendo os extratos guardados a -20° C [8].

2.5 - Limpeza de Vidraria.

Um dos aspectos fundamentais para análise de resíduos de pesticidas é a garantia da utilização de vidrarias totalmente isentas de contaminação [8]. Vidrarias contaminadas influenciam na análise qualitativa, produzindo picos no cromatograma na etapa final da análise, e quantitativa pois a presença de contaminantes pode levar a superestimação do resultado para um determinado composto. Deve-se tomar todo o cuidado em separar as vidrarias usadas com solução mais concentrada do composto, mesmo durante a lavagem.

A operação de limpeza dos materiais deve ser efetuada, imediatamente após o uso. Quando secos, a remoção de depósito se torna mais difícil.

Para se evitar a contaminação cruzada através do detergente ou de agente de oxidação, especialmente materiais que entram em contato direto com o pesticida, como os utilizados na preparação de padrões (béquers, pipetas, balões volumétricos e outros), estes devem ser bem lavados com acetona (descontaminação) antes de se iniciar as etapas de lavagem.

As principais etapas comumente empregadas na limpeza de vidrarias são:

- Lavagem com detergente.
- Imersão no detergente ou equivalente (se possível a 50° C).
- Lavagem com água de torneira.
- Lavagem com água destilada.
- Lavagem com acetona "grau pesticida".
- Secagem.

A lavagem inicial com água ou detergente, usando-se escova, tem a finalidade de retirar grosseiramente os resíduos de materiais sólidos e/ou oleosos.

O detergente normalmente usado para imersão em laboratórios de análise de resíduo é o produto comercial Extran MA-01 alcalino da Merck.

A solução original do Extran deve ser diluída de acordo com o tipo de resíduo com que se está trabalhando ou seja uma solução de 5% de detergente para resíduos normais e solução até 20% para resíduos muito resistentes. O tempo de imersão deve ser de 2 a 24 horas à temperatura ambiente. Quando a solução é aquecida, cerca de 50° C, o processo de limpeza é acelerado.

Opcionalmente pode-se usar uma solução aquosa de sabão de côco alcalino, preparada com raspa de sabão de côco e adicionando o hidróxido de sódio até pH 10-12. Outras opções seria o emprego de detergentes industriais, tais como Neutro Supersol (Lever) ou Flax (Henckel) [8].

Certos detergentes podem conter compostos orgânicos que interferem na análise cromatográfica. Portanto, qualquer detergente selecionado para limpeza deve ser criteriosamente verificado.

Suspeitando-se que traços de compostos orgânicos estejam na vidraria após o uso de detergente, deve-se usar um agente oxidante, por exemplo, solução sulfocrômica, deixando-se o material imerso por algumas horas.

A lavagem com água de torneira em abundância é feita para remover totalmente o detergente ou solução sulfocrômica.

A lavagem com água destilada é feita para remover depósitos metálicos da água da torneira.

A lavagem seguinte, com acetona, é para eliminar quaisquer traços finais de outro material orgânico e facilitar a secagem.

A secagem do material não volumétrico deve ser feita em estufa. No caso de vidraria volumétrica, a secagem deve ser feita no ambiente, deixando-os invertido em local seguro de contaminação.

Os materiais limpos devem ser armazenados protegidos com papel alumínio, evitando a contaminação por pó ou ar do laboratório.

Complementando a limpeza, é prática comum, pouco antes de iniciar a marcha analítica, lavar a vidraria com o solvente que será utilizado na análise.

2.6 - Pureza dos Reagentes.

A pureza dos reagentes, solventes, adsorventes, água destilada, etc., é de extrema importância, quando amostras estão sendo analisados para resíduos de pesticidas.

Contaminantes estranhos apresentam picos no cromatograma e podem ter tempo de retenção similar ou sobreposto ao característico do pesticida, mesmo em duas ou três fases estacionárias diferentes. Os contaminantes comuns de solventes e reagentes são os ftalatos orgânicos, utilizados na fabricação das tampas plásticas dos vidros. Os ftalatos respondem de modo significativo, mesmo em quantidade a nível de traços nos detectores por captura de elétrons [8,9]. Da mesma forma, certos fosfatos orgânicos, utilizados com a mesma finalidade, como fosfato de tricresila, respondem aos detectores sensíveis ao fósforo, como o Detetor Termiônico Específico ou Detector Fotométrico de Chama, modo fósforo. Por essa razão os solventes comerciais de qualidade "Resíduos de Pesticidas" são embalados em vasilhames de vidro com tampas contendo um protetor interno de teflon, de grande inércia química [8,9].

Outros componentes a nível de traços, presentes nos solventes que são considerados como contaminantes, são compostos oxidantes, como peróxidos orgânicos, que podem oxidar pesticidas durante as etapas de concentração por evaporação, provocando perdas que podem mascarar os resultados. A presença de compostos de caráter ácido ou básico podem gerar artefatos analíticos durante as etapas de concentração e evaporação. A água pode acarretar em

problemas sérios na etapa de "clean-up" com colunas de Florisil, pois podem alterar o perfil de eluição de certos pesticidas, permitindo a passagem de alguns interferentes, já que o Florisil ficará parcialmente desativado.

Existem metodologias para tratamentos de solventes, reagentes e água a serem usados em análise de resíduo (destilação em vidro, extração, calcinação, etc.)

Solventes comercialmente designados "grau pesticida" ou "destilado em vidro" podem, geralmente, ser utilizados sem pré-vios tratamentos, mas torna-se necessário testá-los antes do uso, evaporando-se uma quantidade maior da que será utilizado na marcha analítica e injetando no cromatógrafo gasoso nas mesmas condições de análise. Isto é necessário visto que, mesmo os reagentes "grau pesticida", se estocados por muito tempo, pode formar compostos interferentes, por exemplo, o hexano e a acetonitrila que sofrem reações fotoquímica produzindo compostos que serão detectados pelo Detector por Captura de Elétrons [8,9].

CAPÍTULO 3

CROMATOGRAFIA GASOSA NA ANÁLISE DE RESÍDUOS DE PESTICIDAS

3.1 - Conceitos Básicos.

Devido ao grande número de compostos orgânicos que começaram a ser usados como pesticidas; houve a necessidade de analisar os resíduos destes compostos em vários produtos agrícolas usados para alimentação, e no meio ambiente (ar, água e solo).

As baixas concentrações presentes nas amostras, na ordem de ppm e ppb, requerem técnicas especiais, dentro das quais está a Cromatografia Gasosa.

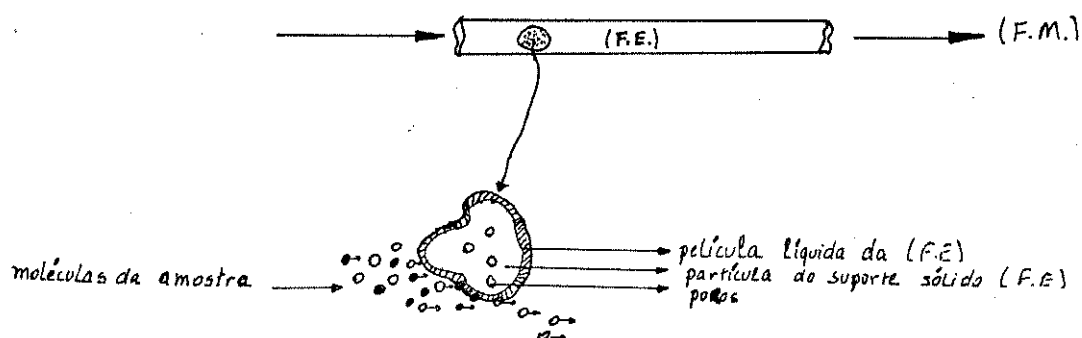
Esta técnica, com mais de trinta anos, tem provado nesse espaço de tempo, ser uma das técnicas mais importantes em Química Analítica Instrumental [10].

O desenvolvimento, nos anos 60, de novas fases estacionárias e o aperfeiçoamento das técnicas de detecção tornou possível a separação, identificação e detecção de compostos orgânicos a níveis de 10^{-11} a 10^{-13} gramas. Assim, a Cromatografia Gasosa tem sido um método muito importante na análise de resíduos de pesticidas e outros poluentes ambientais, devido a sua alta sensibilidade, com o emprego de detectores específicos, grande capacidade de separação e rapidez no tempo de análise [11].

A Cromatografia pode ser conceituada como um método físico-químico de separação de substâncias. Os constituintes da amostra a serem separados são distribuídos entre duas fases: uma

estacionária (F.E.) de grande área superficial e outra, fase móvel (F.M.), um fluido insólúvel que percola através da F.E. [10]. (Figura 3.1).

Figura 3.1 - Representação esquemática de separação de uma coluna cromatográfica recheada.



A fase estacionária fica contida em uma coluna e, com a passagem da fase móvel, as substâncias constituintes da amostra, a qual foi injetada na entrada da coluna, começam a migrar com velocidades maiores ou menores, de acordo com suas interações com a fase móvel e a fase estacionária, devido as suas propriedades físico-químicas.

A Cromatografia Gasosa é uma parte da cromatografia em coluna, onde a fase estacionária pode ser sólida ou líquida e a fase móvel, um gás.

3.2 - Fase Móvel.

As fases móveis, por definição, são fluídas e podem ser um gás, em Cromatografia Gasosa, ou um líquido, em Cromatografia Líquida. A tecnologia cromatográfica é, portanto, classificada de acordo com a natureza física do material empregado como fase móvel.

A alta performance em cromatografia gasosa está baseada no fato de que a fase móvel, sendo um gás, permite um rápido equilíbrio com a F.E.

Devido a baixa viscosidade do gás, a Cromatografia Gasosa permite o uso de colunas longas com alto poder de separação [12].

A qualidade e a pureza do gás de arraste usado é muito importante. Ele deve ser também quimicamente inerte em relação a F.E., e os componentes da amostra compatível com o tipo de detector usado.

Os gases mais usados são: hélio, hidrogênio, argônio, nitrogênio e dióxido de carbono.

3.3 - Fase Estacionária.

Dependendo da fase estacionária utilizada o mecanismo de separação dos compostos presentes na amostra será diferente.

Baseando-se neste fato, a Cromatografia Gasosa pode ser dividida em Cromatografia Gás-sólido, onde o mecanismo de separação envolve o fenômeno de adsorção e Cromatografia Gás-líquido,

onde o mecanismo de separação envolve sempre o fenômeno de partição [10,13].

3.3.1 - Cromatografia Gás-sólido.

A fase estacionária é um sólido de grande área superficial, deve ser uniforme em composição para ter interações reprodutíveis, com diâmetro de partícula regular para ter bom enchimento, e mecanicamente resistente para evitar quebras no manuseio.

Alguns exemplos são:

3.3.1.1 - Materiais adsorventes sintéticos de grande área superficial com granulometria apropriada como, por exemplo: carvão ativo, com áreas de 600 a 3000 m²/g ou sílica com áreas que podem chegar a mais de 500 m²/g.

Estas fases estacionárias são sintetizadas como partículas esféricas ou de estrutura irregular, com malhas na ordem de 80-100, 100-120 ou 120-200 mesh.

3.3.1.2 - Polímeros porosos obtidos por técnicas de polimerização especial de monômeros bifuncionais, usando a obtenção de resinas termorrígidas (não fundem com o calor), insolúveis nos solventes comuns e de alta área superficial, como poliestireno copolimerizado com divinilbenzeno e cianovinilbenzeno.

As resinas assim obtidas tem formas esféricas macrorreticulares com alta área superficial e granulometria controlada.

3.3.2 - Cromatografia Gás-líquido.

A fase estacionária é um líquido de baixíssima pressão de vapor à temperatura de trabalho e alta estabilidade química e térmica, como exemplo: hidrocarbonetos, ésteres e poliésteres, polisiloxanas (siliconas) e polietilenoglicóis.

A razão do maior uso de Cromatografia Gás-líquido é a existência de grande variedade de fases líquidas com diferentes propriedades [13].

As fases estacionárias líquidas são depositadas sobre suportes, para uso em colunas recheadas ou sobre as paredes de tubos capilares.

Os suportes sólidos para uso em colunas recheadas tem a função de reter o líquido para formar um filme líquido com a menor espessura possível e com o menor número de canais (poros finos), a fim de evitar o fenômeno de difusão, que acarreta em um alargamento dos picos e, conseqüentemente, em uma redução no número de pratos teóricos da coluna. Os suportes devem ser quimicamente inertes, ter pouca capacidade de adsorção, ser mecanicamente estáveis, suportar, sem a mínima modificação as condições de uso da coluna e, além disso devem ser cataliticamente inertes. A Superfície específica dos suportes deve ser da ordem de 1 a 20m^2 [10].

Os materiais mais comuns usados como suportes provem da terra diatomácea, frequentemente tratada afim de eliminar o ferro e os grupos quimicamente ativos. Outros materiais, incluem sílica porosa, teflon e sais inorgânicos. Também são usados esferas de vidro e polímeros porosos [10].

3.4 - Colunas Cromatográficas.

A coluna é a parte mais importante do cromatógrafo a gás. A escolha certa do tubo da coluna e a sua fase estacionária (líquida ou sólida) determina a eficiência da separação e da quantificação que pode ser realizada com o sistema [11].

Os materiais normalmente usados para fabricação dos tubos das colunas são o vidro e metais como cobre, alumínio e aço inoxidável [12].

Para análises de resíduos de pesticidas, são recomendadas as colunas de vidro, pois muitos pesticidas, quando expostos à superfície quente do metal, sofrem decomposição. Também é recomendado a injeção na coluna ("on-column"), para a amostra entrar em contacto somente com a fase estacionária e a superfície de vidro da coluna, desde a injeção [11].

As colunas cromatográficas podem ser de dois tipos básicos: recheadas, de diâmetro interno de 2 a 4 mm; e capilares, de diâmetro interno de 0,1 a 0,7 mm; um tipo, de transição entre as duas primeiras, é a coluna capilar recheada de diâmetro interno de 0,5 a 1,0 mm.

A Cromatografia gás-líquido com colunas recheadas tem sido mais usada para análises de resíduos, devido a sua variedade de opção.

O suporte deve ser silanizado para minimizar a adsorção. Vários suportes inertes são recomendados, tais como Cromosorb W ou Cromosorb G, ambos silanizados [8].

As fases líquidas para análise de resíduos devem ser aquelas que, em altas temperaturas, apresentam baixa taxa de sangria, minimizando a contaminação do detector. Materiais como metilsilicones, com polaridade moderada com 50% de grupos fenis, têm provado serem excelentes fases líquida para análises de resíduos de pesticidas [14,15].

3.5 - Detectores para Cromatografia Gasosa.

O Detector para Cromatografia Gasosa é um dispositivo que transforma em sinal elétrico conveniente a variação da composição do gás de arraste ao sair da coluna cromatográfica. O sinal elétrico é registrado e os picos observados são integrados para fins de quantificação.

Existem dezenas de detectores utilizados em Cromatografia Gasosa, alguns de resposta universal e outros seletivos ou específicos, sensíveis somente a uma classe de compostos ou a certos elementos.

O detector mais utilizado em Cromatografia Gasosa é o Detector por Ionização em Chama (DIC), sensível a quase todos os compostos contendo carbono e hidrogênio [10].

Em análise de resíduos de pesticidas os detectores específicos são os mais usados, tais como [11] o Detector por Captura de Elétrons (DCE), que possui alta sensibilidade*, na faixa de ppb, para compostos halogenados, também apresentando resposta pa-

* A sensibilidade pode ser definida como a relação entre a resposta do detector e a concentração da amostra, uma maior inclinação no gráfico resposta do detector versus concentração da amostra implica em maior sensibilidade.

ra outros compostos que contenha S, NO_2 ou $\text{C}=\text{O}$ conjugado; o Detector Termiônico Específico (DTE), que possui sensibilidade na faixa de ppb para compostos contendo fósforo e sensibilidade de ppm para compostos contendo nitrogênio; e o Detector Fotométrico de Chama (DFC), específico para enxofre e fósforo com sensibilidade na faixa de ppb [13].

3.5.1 - Detector Termiônico Específico.

Na literatura este detector é denominado: Detector Termiônico Específico (DTE), Detector Termiônico (DTI) Detector por Ionização de Chama Alcalina (DICA); Detector Quimi-ionização (DQI) ou Detector de Nitrogênio e Fósforo (DNP). O mecanismo de detecção não envolve medidas de corrente de ionização das substâncias eluídas, como no DIC, mas envolve mudanças na ionização de um metal alcalino presente no detector [16].

O detector usando sal de metal alcalino foi primeiramente descrito em 1964. Desde então, tem sido um dos mais usados, especialmente em análises de compostos contendo fósforo e nitrogênio.

O DTE usa um coletor similar ao DIC, contudo este coletor contém uma resistência de alumínio recoberta por um sal de metal alcalino (rubídio ou cézio) que é aquecida eletricamente. Na presença desta fonte termiônica e com um fluxo significativamente menor de hidrogênio e ar sintético do que o usado no DIC, as moléculas orgânicas contendo nitrogênio e fósforo são ionizados mais eficientemente. Os íons são coletados e é medida a corrente resultante.

A característica comum em toda construção do DTE é a medida da corrente de ionização como somatório de todo o processo de ionização que tem lugar no detector, predominando a ionização do metal alcalino. A energia térmica para o processo de ionização é liberada pela combustão ou pelo aquecimento elétrico.

O mecanismo de detecção tem sido explicado sob vários pontos de vista. Assume-se que os produtos de combustão de substâncias que contêm fósforo reagem com o metal alcalino ou com seu sal, sendo que o sinal do detector corresponde a ionização proveniente da evaporação do sal. Sugere-se também que a ionização resulta de colisões do átomo do metal alcalino volatilizado na superfície do sal com intermediários (por ex. radicais) formados na chama. Outro mecanismo envolve a evaporação do sal do metal alcalino na chama como resultado da interação com prótons. O mecanismo tem sido parcialmente elucidado pelos experimentos com o detector sem chama, chamado detector de quimi-ionização. O resultado mostra que a ionização ocorre na fase gasosa e que hidrogênio ou produtos de combustão não são necessários. Neste caso, a ionização depende da quantidade de metal alcalino presente na fase gasosa, a qual depende da temperatura ao seu redor [16].

Apesar de várias teorias terem sido propostas para explicar o mecanismo envolvido no sistema termiônico, em geral a energia térmica é a requerida para atomizar um particular sal de metal alcalino.

O metal alcalino formado, dissociado em íons e elétrons, é submetido a um campo elétrico. Os elétrons são coletados e produzem uma corrente de fundo proporcional ao número de íons. A

presença de moléculas contendo os halogênios, fósforo e nitrogênio podem aumentar a razão (taxa), portanto aumentando o sinal. O sistema é complexo e não permite uma teoria completa do fenômeno que se acredita estar acontecendo. Tem sido provado que o processo não depende da energia térmica e do produto de combustão na chama, propriamente dita. Por estas razões muitos pesquisadores preferem o termo "Ionização Termiônica". As temperaturas para o detector estão na faixa de 600-900° C [13].

O DTE é altamente indicado na detecção específica de compostos orgânicos contendo N ou P, em quantidades extremamente pequenas, na presença de outras classes de compostos. O nível mínimo de detecção de compostos contendo esses elementos é da ordem de 10^{-13} g/s para compostos nitrogenados (determinado com azobenzeno) e 6×10^{-14} g/s para compostos contendo fósforo (determinado com malation).

A seletividade para nitrogênio, determinado pela razão de sensibilidade para compostos contendo nitrogênio comparado com os hidrocarbonetos (N/HC) é da ordem de 5×10^4 , enquanto que a seletividade entre os elementos (P/N) é da ordem de 2:1.

As faixas dinâmicas lineares são 10^5 e 10^4 para N e P, respectivamente.

Desta forma, a quantidade mínima detectável* (Q.M.D.) está entre 10^{-12} e 10^{-11} g do elemento.

* Q.M.D. é definida como quantidade de massa injetada que produz uma resposta do detector igual a duas vezes o ruído. Quando calculado para determinação de um composto é uma medida da função de todo o sistema cromatográfico e não apenas do detector.

Com o decorrer do tempo de uso, há um gasto no sal, diminuindo a sensibilidade e a seletividade da detecção, tornando-se necessárias maiores correntes de aquecimento para se obter a mesma corrente de fundo e a mesma sensibilidade [10].

As condições recomendadas [10] para os gases empregados no DTE. são: vazão do gás de arraste (N_2 ou He): 25 - 30 ml/min; vazão de hidrogênio: 2,5 ml/min; vazão de ar sintético: 120 ml/min.

O DTE é, portanto, um detector destinado unicamente à determinação quantitativa de traços de compostos contendo N ou P em soluções extremamente diluídas, empregando colunas recheadas ou capilares.

3.6 - Análise Qualitativa

A análise qualitativa em cromatografia é um dos aspectos mais importante na determinação de resíduos de pesticidas, pois é de primeira importância a identificação dos pesticidas que estão presentes na amostra.

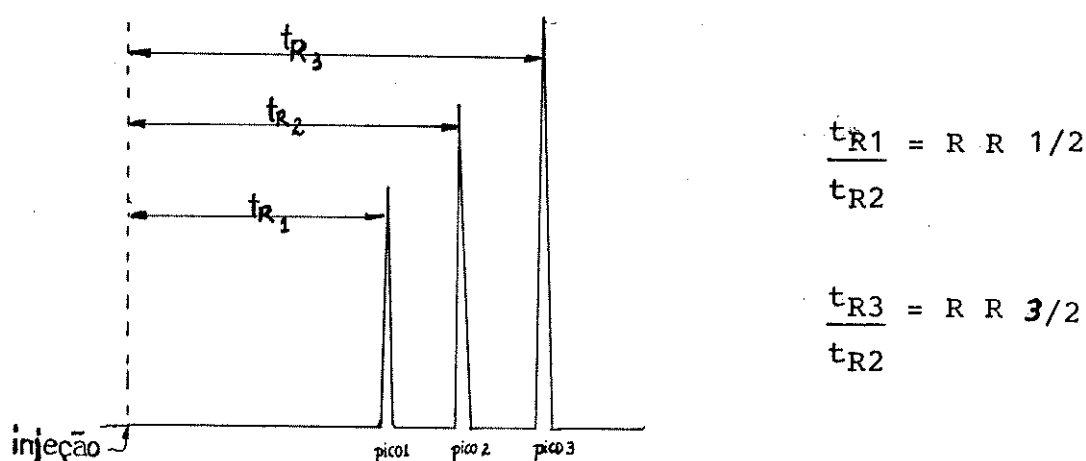
Existem vários métodos que usam a comparação com padrões, onde compara-se o tempo de retenção, "tr", do composto presente na amostra com o tr do padrão injetado nas mesmas condições cromatográficas.

A confirmação da identidade dos tr é obtida adicionando-se uma quantidade de padrão à amostra, onde deve haver um aumento na altura do pico em questão; sem alterar significativamente a largura da base. Para uma confirmação da identificação de um pi-

co, é necessário injetar a amostra em outra coluna de diferente polaridade.

A retenção relativa, isto é, a razão do t_R do composto ao t_R de um padrão, é também muito usado na identificação, pois através deste processo elimina-se desvios nos parâmetros da coluna e condições de operação que poderiam ocorrer no dia a dia (Figura 3.2). O padrão poderia ser outro componente da amostra ou novo composto a ela adicionado.

Figura 3.2 - Medidas da retenção relativa, (RR) com composto 2 tomado como padrão.



Existem tabelas que listam a retenção relativa (RR) de pesticidas em relação ao Aldrin, tomado como padrão, para várias colunas cromatógraficas usadas nas análises de resíduos.

A técnica mais sofisticada e mais segura na identificação é o uso da Cromatografia Gasosa acoplado a Espectrometria de Massas. Nesta, amostras de cerca de 10^{-10} g podem ser identificadas pelos fragmentogramas apresentados. Para identificação de amostras complexas e completamente desconhecidas, deve-se empre-

gar técnicas auxiliares, em que as substâncias a serem analisadas devem ser coletadas na saída da Cromatografia Gasosa para que as suas estruturas moleculares possam ser determinadas, usando-se Espectrometria de Massas e Espectrofotometria Infravermelho, Ultra-Violeta ou Visível, ou ainda pode-se empregar reações específicas, que permitem caracterizar as amostras em grupos de substâncias homólogas.

3.7 - Análise Quantitativa.

A quantificação em Cromatografia Gasosa pode ser feita através de vários métodos, que medem as quantidades relativas registradas nos cromatogramas, como as medidas da altura do pico e o cálculo de sua área.

A determinação de altura de pico é um método de quantificação. É válido para substâncias que apresentam fácil eluição (baixo tempo de retenção), com picos altos e estreitos. As correlações, altura do pico versus concentração, são lineares apenas em uma faixa de concentração. É necessária, portanto, a construção de uma curva de calibração que contenha os níveis de concentração para cada amostra a ser analisada, pois uma extrapolação seria errônea. A medida da altura do pico já foi sugerida para análise de resíduos de pesticidas [17,18,19].

A área de um pico pode ser matematicamente expressa como integração do tempo de resposta do detector, que tem uma correlação quantitativa com a concentração do componente no gás de arraste ou com a massa do componente que passa por ele, dependendo do tipo de detector em uso.

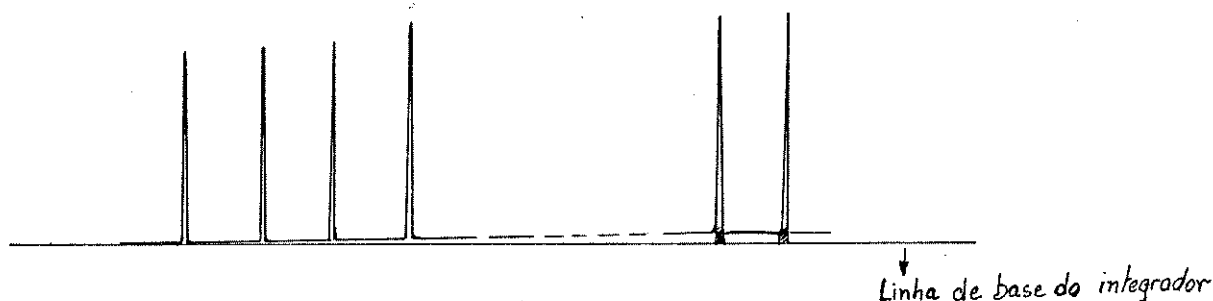
A determinação da área do pico pode ser feita por vários métodos [3,12].

1. Cortando-se o pico e pesando-o; método tedioso e não muito preciso ($\sigma = 3 - 5\%$).
2. Calculando-se a área, multiplicando a altura do pico pela largura medida na metade da altura do pico; método simples e preciso para picos simétricos ($\sigma = 2,5 - 4,0\%$) mas não aplicável para picos assimétricos.
3. Calculando-se a área através da triangulação (metade de produto da altura x largura de base); também método bom só para pico simétricos.
4. Usando-se um planímetro para a medida da área. Neste caso tem-se erros mecânicos, que dependem da habilidade da pessoa que está realizando a análise ($\sigma = 4 - 6\%$).
5. Aplicando-se um integrador mecânico ($\sigma = 1 - 2\%$) eletromecânico ($\sigma = 1 - 2\%$) ou eletrônico ($\sigma = 0,2 - 0,5\%$) [12].

Embora os integradores apresentem, em geral, erros menores, não são recomendados para integração em análise de resíduos de pesticidas, porque estes integram tudo o que estiver acima da linha de base, que é tomada como zero [11]. Usando-se o cromatógrafo com alta sensibilidade o que é necessário quando se trata

de níveis baixíssimos de composto, o sinal da linha de base ou o zero do aparelho tende a cair, e o integrador integra esta parte negativa junto com os picos (Figura 3.3) produzindo superestimação na área dos picos.

Figura 3.3 - Linha de base do integrador eletrônico depois de certo tempo.



As áreas ou alturas obtidas pelos métodos indicados podem ser relacionadas com as áreas ou as alturas dos picos de padrões de concentrações conhecidas e assim determina-se a concentração da amostra. O cálculo da composição pode ser feita através de calibração externa ou adição de padrão interno.

3.7.1 - Padronização Externa.

A padronização externa é a comparação da área ou altura do pico de uma certa substância presente na amostra com a do pico do padrão, injetado separadamente com uma concentração conhecida

(solução padrão). Deve-se construir a curva de calibração relacionando-se à área ou altura do pico versus a concentração, e estimar a concentração da amostra por interpolações, baseando-se na sua altura ou área [9]. Este método é recomendado quando é necessário a análise de um número relativamente grande de amostras em curto tempo.

3.7.2 - Padronização Interna.

A padronização interna consiste na adição de um composto padrão, em uma concentração conhecida, à amostra. Este deve ter tempo de retenção conhecido e diferente de todos os componentes presentes na amostra a ser analisada.

Faz-se a comparação da área ou altura do pico do padrão com pico do composto.

A curva de calibração é feita plotando a razão da área do pico do componente a ser determinado e do padrão versus a razão das massas encontradas em amostras contendo ambos, o componente e o composto padrão em concentrações conhecidas. Na padronização interna não há necessidade de corrigir variações instrumentais; é muito útil para determinações ocasionais. Contudo não é recomendado para a determinação de multi-resíduos de pesticidas, desde que os métodos para multi-resíduos podem detectar e quantificar um grande número de diferentes compostos, e a escolha de um composto padrão adequado, com estruturas e propriedades cromatográficas apropriadas é muito difícil [9].

3.8 - Contaminantes.

Na análise cromatográfica de resíduos de pesticidas aparecem frequentemente picos devidos a contaminantes.

Estes picos estranhos interferem no cromatograma das amostras, levando a falsas interpretações qualitativas e quantitativas.

Por isso é extremamente importante ter em mente o problema de contaminação quando se trabalha com detector específico, que responde a níveis de parte por bilhão do composto.

Estas interferências podem se originar de muitas fontes [20], no campo (discutidas no capítulo 2) e no laboratório.

No laboratório, as fontes de contaminação são os solventes usados para extração, lavagens, transferências e eluição da coluna de purificação (discutidas no capítulo 2). Portanto, é necessário o uso de solventes especiais para análises de resíduos, é importante executar um branco do método, onde deve ser verificado não só os reagentes, mas também todo o material usado, incluindo o papel de filtro, que pode conter gordura como contaminante, ou as fases estacionárias, usadas em coluna para purificação, que pode ter contaminantes do frasco de plástico em que se encontra.

A vidraria também é fonte de contaminação quando não lavada com os devidos cuidados, causando sérios problemas. O uso de tampas de Teflon também é recomendado para se evitar usar a graxa para vidro [11]. A seringa usada na injeção da amostra na cromatografia gasosa deve ser cuidadosamente lavada e separada da

seringa usada para injetar padrões na confecção de curva de calibração.

No cromatógrafo, as fontes de contaminação podem ser o septo que deve ser sempre trocado, sangramento da fase estacionária da coluna, que pode também ocasionar aparecimento de pico de contaminantes, e sujeira no detector.

Deve-se sempre fazer injeção de solvente puro para se verificar as condições do aparelho.

CAPÍTULO 4

COMPORTAMENTO DE PESTICIDAS EM SOLOS

Para os estudos realizados sobre degradação, metabolismo, mobilidade, adsorção, dissipação e acúmulo de pesticida em solo, compararemos os métodos usados para extração do princípio ativo, os metabólitos e produtos de degradação e os métodos usados para a identificação e a quantificação dos mesmos. Compararemos também a meia-vida encontrada para os diferentes pesticidas e seus produtos de degradação em diferentes tipos de solos e os fatores que afetam a interação: pesticida versus solo. Não é nosso objetivo apresentar uma revisão detalhada e exaustiva dos estudos de dissipação de pesticidas já realizados dentro e fora do Brasil, mas mostraremos alguns trabalhos relacionados para situar o presente trabalho de tese.

Existem três fatores importantes que são considerados nos estudos de interação entre pesticida e solo: "Propriedade do Pesticida", "Propriedade do Solo" e "Fatores Ambientais", os quais afetam muito a interação do pesticida com o solo [21].

Dentre os estudos de movimento de pesticida em solos, existe a tendência dos autores de enfatizar um ou outro destes fatores, algumas vezes até com discordância nas conclusões de um trabalho para outro.

A maior parte dos experimentos nos trabalhos realizados foram montados em laboratórios, usando colunas de solo, ou placas cromatográficas com solo. Outros experimentos foram realizados

em laboratórios simulando condições de campo em câmaras de crescimento, e outros fora do laboratório em caixas ou tubos de PVC contendo o solo em teste e enterrados em leito de areia, porém, não em condições de campo. Não foram encontrados estudos publicados sobre dissipação de pesticida em condições reais de campo.

Constenha, Moza, Scheunert [22], realizaram um trabalho sobre o comportamento de Buturon-14C em solo durante sete anos. As amostras de solo foram colocadas em condições ambientais de clima, em caixas 60 x 60 x 70 cm fora de laboratório. Foram coletadas amostras 1,5; 2,5; 3,5; 6,0; e 6,5 anos após a primeira aplicação do herbicida.

O Buturon e seus metabólitos foram extraídos com clorofórmio. A separação dos metabólitos foi realizada por cromatografia em camada delgada, a identificação por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa e a quantificação por espectrometria de cintilação líquida.

Os autores enfatizam que a remoção de resíduos radioativos do solo pela colheita das plantas e pela lixiviação com água é de importância secundária quando comparada com a perda para atmosfera, a qual pode ser atribuída pela total degradação em CO₂ por mineralização e/ou conversão para o produto volátil do Buturon pelo fator abiótico, bem como pelos microorganismos.

Verificou-se que esses processos são mais ativos durante os primeiros anos e diminuem com o tempo. Os autores sugerem que o herbicida forma um complexo estável com ácido húmico e/ou argila do solo e impossibilita a degradação biótica ou abiótica. A análise dos resultados de concentração de resíduos versus tempo

mostra que a dissipação do herbicida no solo segue uma cinética de primeira ordem [22].

Os autores concluem que, embora o herbicida Buturon seja conhecido como não persistente, alguns de seus produtos de conversão persistem no solo por mais de 6 anos [22].

Helene, Lord e Rüegg [23], estudaram a persistência, lixiviação e volatilização de Aldrin-14C em dois solos brasileiros. O experimento foi montado no laboratório, em frascos fechados com tampas plásticas, forradas com espuma de poliuretano, para absorver o material volátil e, também, fora do laboratório onde os solos foram colocados em colunas de PVC de 30cm de comprimento por 5cm de diâmetro e introduzidas em leito de areia.

A extração do pesticida foi feita com uma mistura de hexano e isopropanol, 1:1, com agitação mecânica por 4 horas. O extrato de solo foi quantificado por cromatografia gasosa com detector por captura de elétrons e por cintilometria e os metabólitos foram identificados por cromatografia em camada delgada. Os resultados obtidos para o experimento montado fora do laboratório mostraram que após um ano, recuperou-se 36% da atividade aplicada nos 10 cm superiores de um solo rico em matéria orgânica, em contraste com outro solo, pobre em matéria orgânica, na qual persistia apenas 8% distribuídos nos 20cm superiores.

No experimento do laboratório, verificou-se que, após 120 dias, 30,9% da radioatividade aplicada ao solo rico em matéria orgânica foi detectada na espuma e 61,7% da radioatividade aplicado ao outro solo, pobre em matéria orgânica. Um aumento da umidade do solo determina aumento da radioatividade detectada na

espuma sobre o segundo solo. Cromatografia em camada delgada de extrato de solo revelou a presença de Aldrin e Dieldrin, seu metabólito, além de um terceiro material radiativo, não identificado.

Yaron e Swoboda [24], também realizaram estudo do comportamento do inseticida Aldrin-14C, usando soluções aquosas eletrolíticas em colunas de solo arenoso e argiloso, simulando condições de campos. A quantificação foi realizada usando cromatografia gasosa e também espectrometria de cintilação líquida.

Esses autores observaram, que a maior adsorção ocorreu em solos ricos em ambos argila e matéria orgânica, menor adsorção em solos argilosos, pobre em matéria orgânica, que funcionaram como inerte.

Com este estudo fica confirmada as conclusões anteriores de Helen, Lord e Ruegg [23].

Hamaker, Goring et al [25], estudaram sorção e lixiviação de um novo e potente herbicida e regulador de crescimento, Ácido 4-amino-3,5,6-tricloropicolínico, em oito tipos de solo. A sorção foi determinada usando solução neutra (2ml) do padrão do herbicida radiomarcado com carbono-14, que foi adicionado em 0,5 grama de solo. A mistura foi deixada a 25°C com agitação intermitente e, depois, a mistura foi centrifugada por 20 minutos. Foi feito contagem por cintilação líquida do sobrenadante. Os resultados confirmaram que a presença de matéria orgânica é mais indicativa da adsorção do herbicida no solo do que o tipo de solo. Um experimento de lixiviação em coluna do solo em teste confirma esse resultado. Uma outra conclusão importante foi que, quando se

baixa o pH, o solo tem comportamento de coluna de troca iônica e não de adsorção.

Musumeci e Lord [26], estudaram adsorção, lixiviação e persistência do fungicida Carbendazin, radiomarcado com carbono-14, em três tipos de solos brasileiros.

O experimento de adsorção foi realizado adicionando-se uma grama de solo seco em solução de Carbendazin-14C e, após agitação mecânica por quatro horas, tirando-se alíquota para contagem no cintilador líquido.

Os experimentos de lixiviação foram realizados usando-se cromatografia em camada delgada onde a fase estacionária foi cada solo em teste, aplicando-se Carbendazin-14C e usando-se água destilada como fase móvel. A revelação foi feita através da impressão deixada em um filme fotográfico.

A extração do fungicida do solo para o estudo de persistência foi realizado com uma mistura 1:1 de acetona e cloreto de amônio aquoso. Depois a acetona foi evaporada e a quantificação foi por cintilação líquida. Os autores concluíram que os solos com alto conteúdo de matéria orgânica apresentam elevada sorção e menor mobilidade do Carbendazin em termos da lixiviação. O Carbendazin foi persistente nos três solos, ocorrendo, porém, maior degradação em solo com mais alto teor de matéria orgânica. Isto é explicado pelo fator da existência de maior concentração de microorganismos em solos com mais alto teor de matéria orgânica.

Utilizando experimento semelhante ao de Musumeci e Lord [26], Helling [43] estudou o movimento do herbicida 5-Triazina em diferentes tipos de solos, onde a lixiviação foi estudada em co-

lunas de solos na vertical e o movimento foi estudado em placas de camada delgada com solo. Dos resultados encontrados, o autor conclui que a Triazina tem baixa ou moderada mobilidade, que depende da capacidade adsorbtiva do solo e do poder adsorbtivo do herbicida estudado.

Yaron and Saltzman [21] realizaram um trabalho sobre interações físico-químicas do inseticida Paration com o solo e seus constituintes. Paration é um dos pesticidas organofosforados mais usados no controle de insetos em planta e na superfície do solo.

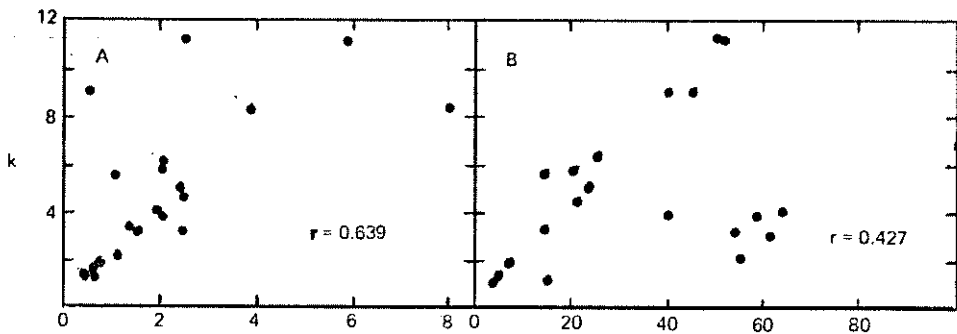
Algumas conclusões práticas sobre comportamento do Paration podem ser tiradas:

- O solo no meio ambiente constitui um sistema de três (3) fases: partículas inorgânicas e matéria orgânica forma a fase sólida; solo-água, a qual tem substâncias dissolvidas, forma a fase líquida; solo-ar com diferentes composição da atmosfera forma fase gasosa. A fase sólida (mineral e orgânica) é cerca de 50% do volume do solo. O inseticida Paration é distribuído nas três fases. Na ausência de água, o Paration é preferencialmente distribuído na fase sólida.
- A afinidade do Paration com os constituintes da fase sólida do solo decresce na ordem: matéria orgânica > fração de argila > fração arenosa.
- Dentre os constituintes do solo, os que potencialmente reagem com o inseticida são argila mineral, carbonato, enxofre e a matéria orgânica do solo. Esta última é uma matéria não homogênea e uma das mais complexas existentes na natureza.

- A degradação química de Paration em solo é um processo lento e a taxa de degradação é dependente das propriedades do solo e fatores ambientais.

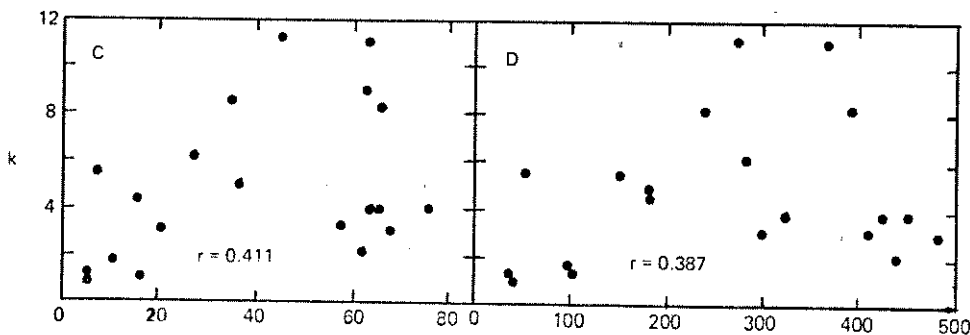
Dentre muitas conclusões importantes do trabalho está o fato que a análise de correlação das propriedades do solo e a sorção de Paration (Figura 4.1) mostra que o conteúdo de matéria orgânica é o fator principal, que afeta a afinidade de paration para o solo.

Figura 4.1 - Correlação entre capacidade sortiva para Paration e algumas propriedades do solo (Saltzman e Yaron [21]).



Matéria Orgânica (%)

Capacidade de Troca de Cátion
(mg/100g solo)



Argila (%)

Área Superficial (m^2/g)

Contudo, o coeficiente de correlação, 0,639, é baixo, indicando que não há uma característica simples do solo que pode ser usada para prever a sorção de Paration pelo solo. Os minerais envolvidos no solo são importantes. Por exemplo, íons de cálcio aumentam a degradação do pesticida.

A presença de água livre muda a distribuição, porque a água não agirá somente como um solvente, mas também como competidor de sítios de adsorção. A persistência de Paration em áreas úmidas é maior, devida a sua presença também na fase líquida.

As diferenças na persistência de paration em solos com diferentes propriedades indicam que a degradação química é afetada primeiramente pelos constituintes do solo.

A linearidade da curva de degradação (obtida plotando $\log(a-x)$ versus t , onde a é quantidade inicial de Paration e x a quantidade hidrolizada no tempo t , indica uma reação de primeira ordem. A meia-vida, $t_{1/2}$, é calculada com a equação:

$$\ln \frac{a}{a-x} = Kt$$

$$t_{1/2} = \frac{1}{K} \ln \left(\frac{a}{a/2} \right) \quad t_{1/2} = \frac{\ln 2}{K}$$

Thomas e Swoboda [27], estudaram o movimento do inseticida Paration em colunas com oito tipos diferentes de solo, simulando a lixiviação com água destilada. Foi usado Paration radio-marcado com fósforo-32. A quantificação foi feita por cintilação

líquida e, também, por cromatografia gasosa com detector termiônico específico. Com os dados obtidos os autores concluíram que a adsorção é proporcional a conteúdo de matéria orgânica e dependente do tipo de solo e também que é pouco provável a contaminação de águas subterrâneas por lixiviação de Paration em condições normais de chuva.

Paration é geralmente considerado não persistente em solo. Carlo et al [28] mostraram que Paration foi detectado em solo 16 dias após aplicação. Contudo Nicholson et al [29] encontraram Paration em solo 9 meses após aplicação. Mac Phee et al [30] conseguiu recuperar 21% do Paration aplicado no solo 4 anos e meio anteriormente. Tais discordâncias de resultados é devido a complexidade das ligações formadas entre os pesticidas e o solo.

Andrea, Lord, Bromilow e Rüegg [31], estudaram degradação de Paration-14C em dois tipos de solos brasileiros. O experimento todo foi realizado em laboratório a temperatura ambiente, onde se adicionou diretamente ao solo solução aquosa de Paration-14C.

O $^{14}\text{CO}_2$ liberado foi medida, bem como a quantidade de inseticida extraído. A extração foi feita com hexano e n-propanol (1:1) com agitação por 4 horas, separando o sobrenadante. As quantificações foram feitas por cintilação líquida.

Os autores concluem que a recuperação de Paration por extração ocorreu mais rapidamente no solo rico em matéria orgânica. Deste, uma maior quantidade de radiocarbono foi liberada sob a forma de $^{14}\text{CO}_2$, em comparação com o solo pobre em matéria orgânica. A evolução de $^{14}\text{CO}_2$ do solo rico em matéria orgânica decresceu rapidamente em solo seco, mas só uma pequena influência

do conteúdo de umidade foi observada com o solo pobre em matéria orgânica.

O radiocarbono remanescente nos solos foi analisado por combustão depois de 234 dias. O total recuperado do solo rico em matéria orgânica foi de 95,6%. Do solo pobre em matéria orgânica, foi recuperado 78,7%.

Os resultados encontrados são concordantes com outros trabalhos [2, 27, 32, 33].

Lichtenstein [34], estudou as ligações irreversíveis que o inseticida Paration faz com o solo, sendo que este resíduo não era extraído pelos meios convencionais e não era detectado. Só foi possível saber da existência de resíduos não extraíveis depois do uso de padrões radiomarcado. Lichtenstein, usando paration 14-C, quantificou o resíduo pela avaliação de 14CO_2 liberado após combustão da amostra extraída anteriormente com um solvente.

O autor salientou que deve ser reconsiderado o conceito de persistência de resíduo de pesticida, embora desconhecendo, em muitos casos, a natureza da ligação pesticida-solo, pois neste experimento também foi visto que, depois de se ter colocado minhocas para viver e plantação de aveia no solo com Paration-14C não extraível, o pesticida foi translocado para minhocas e tecidos das plantas.

Para estudar a transferência de resíduo para cultura Lichtenstein [34] usou dois tipos de solos, arenoso e argiloso. Estes foram tratados com seis inseticidas com diferentes solubilidades em água, de 0,001ppm (DDT) a 320ppm (Carbofuron), deixando as plantas crescerem nestes solos.

Os resultados do experimento mostram que a translocação do inseticida para as plantas depende do tipo de solo e da solubilidade do inseticida em água. A transferência foi maior para solo arenoso e para o inseticida mais solúvel em água (Carbofuron).

Konrad e Chesters [35], estudaram a degradação de Ciodrin, um inseticida organofosforado, em três tipos de solos com diferentes concentrações de matéria orgânica, pH e conteúdo de argila. Foram utilizadas amostras de solo esterelizadas e não esterelizadas e inseticida radiomarcado com carbono-14. A análise consistiu de extração com benzeno e identificação por cromatografia gasosa, seguido de contagem de carbono-14 por cintilação líquida.

Segundo os autores, é provável que a adsorção e degradação ocorram concorrentemente no primeiro estágio de incubação e um verdadeiro equilíbrio de adsorção é impossível de se obter. Os autores mostraram que a degradação do Ciodrin segue uma cinética de primeira ordem e que a meia-vida depende do tipo de solo e está relacionada com a adsorção. No solo argiloso, a adsorção foi 66% e a meia-vida foi de 2,0 horas; no solo arenoso, a adsorção foi 53% e a meia-vida 71 horas.

No sistema de solo seco (sem umidade) a meia-vida para degradação do Ciodrin foi 180, 410 e 540 horas para pH 9, 6 e 2, respectivamente. Os autores concluíram que as diferenças de degradação encontrada para cada tipo de solo foram devido a vários fatores, mas o mais importante seria o pH, cuja função seria protonar os grupos ácidos da matéria orgânica.

Nicholls e Briggs [36], estudaram a influência da solubilidade em água no movimento e na degradação do herbicida Simazina em solos em condições ambientais de clima, durante o inverno e verão, comparando estes resultados a um modelo do experimento feito em laboratório.

Os experimentos (dentro e fora) do laboratório foram montados usando tubos de PVC de 15 cm de comprimento e 5,5 cm de diâmetro interno. Foi feito diariamente medidas de nível de chuva, evaporação de água e os máximos e mínimos de temperatura na superfície do solo. A extração do princípio ativo foi realizada com metanol, por 4 horas em agitador orbital. A quantificação resíduo de Simazina foi feita por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) em cada seção do tubo de PVC, dentro e fora do laboratório. A recuperação foi de 90%.

O experimento de adsorção foi realizado, no laboratório, pesando-se 2 gramas de solo e homogeneizando-o por 2 horas com uma solução de Simazina, 2 µg/ml, em cloreto de cálcio 0,01. Após centrifugação o sobrenadante foi quantificado por CLAE.

O experimento de degradação foi realizado pegando-se o solo fresco, passado em peneira e seco ao ar. Depois foi misturada Simazina formulada, equivalente a 5 µg do princípio ativo por grama de solo. As amostras de solo tratado foram colocadas em frascos, fechados em condições anaeróbicas e deixadas por 16 semanas nas seguintes condições: com 10, 15 e 20% de água (ml/g) e nas temperaturas de 5, 10 e 15°C. Semanalmente foram retiradas amostras em duplicatas para análise, usando extração e quantificação por CLAE.

Com este experimento os autores mostraram que a degradação segue a cinética de primeira ordem com relação a temperatura e o conteúdo de água.

Os autores também concluíram que o mecanismo de retenção é por adsorção e não devido a insolubilidade do herbicida em água.

Engelhardt et al [37], estudaram a degradação do inseticida Metilazimfos, radiomarcado com carbono-14, por bactéria isolada do solo. Foram usados dois tipos de solo para os experimentos, os quais foram amostrados depois de 37, 67, 100, 136, 164 e 197 dias de incubação. O princípio ativo e seus metabólitos foram extraídos com clorofórmio sob agitação magnética, separados por cromatografia de camada delgada, identificado por espectrometria de massa e quantificados por contador de cintilação líquida.

Dentre as observações importantes do trabalho foi a degradação do inseticida, pois é intensa após um período de 197 dias de incubação, com a liberação de dois derivados do ácido benzóico. Isto indica que ligações são clivadas no solo. Foram identificados 17 metabólitos.

Os autores concluíram que o inseticida pode ser metabolizado via solo e facilmente decomposto a derivados do ácido benzóico.

Sethunathan e MacRae [38], estudaram a persistência e biodegradação de Diazinon em solos esterilizados e não esterilizados.

Foram usados três tipos de solos com diferentes concentrações de matéria orgânica e pH. O experimento foi montado em

colunas preenchidas com os solos e mantidas em câmara de crescimento a temperatura de $30^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$. Foram coletadas amostras antes da aplicação e 1, 15, 25 e 50 dias após aplicação.

A extração do princípio ativo e seus metabólitos foi feita com acetona sob agitação mecânica e depois com hexano. A quantificação foi feita usando cromatografia gasosa.

Os autores concluem que o desaparecimento de resíduo de Diazinon, tanto para solo esterelizado como não esterilizado, segue cinética de primeira ordem com meia-vida de 8,8 dias para solo argiloso não esterilizado e 33,8 dias para o solo argiloso esterilizado. A meia-vida para solo limo argiloso não estabilizado foi 17,4 dias, enquanto, para o solo esterelizado foi 43,8 dias, mostrando que os resíduos desaparecem mais rapidamente do solo não esterilizado do que no esterilizado e que a microflora do solo tem importante papel na influência da persistência do inseticida.

Os resultados obtidos para solo argiloso com pH ácido (4,7), no entanto, mostra que a perda de inseticida foi mais rápida no solo esterilizado. Os valores de meias-vidas encontrados foi de 9,9 e zero dias para os solos não esterilizado e esterilizado, respectivamente.

A extrema rapidez de perda do inseticida mostra sua instabilidade em solução ácida e também que Diazinon não é muito efetivo para proteger as culturas que crescem em solo similar.

Staiger e Quistad [39], estudaram degradação e movimento de Fluvalinato- ^{14}C em três tipos de solos. Fluvalinato é o princípio ativo de um inseticida experimental com atividade de piretróide.

O experimento foi montado em câmara de crescimento mantendo 16 horas de luz fluorescente a 28°C e 8 horas de escuro a 18°C. Algumas amostras foram mantidas em condições aeróbicas com atmosfera de oxigênio e outras em condições anaeróbicas com atmosfera de nitrogênio. As amostras foram retiradas semanalmente e analisadas por cromatografia líquida de alta eficiência e por cintilação líquida. A extração foi feita com metanol. O resíduo persistente no solo seco depois da extração foi determinada por combustão e contagem do $^{14}\text{CO}_2$ liberado.

A adsorção versus desorção foi estudada em placas de cromatografia em camada delgada com cada tipo de solo.

Os autores concluem que tem uma rápida degradação de Fluvalinato nos três tipos de solo. A meia-vida de Fluvalinato em solo limo arenoso e solo limo argiloso foi 6 dias, enquanto que em solo argiloso foi de 8 dias em condições aeróbicas e 15 dias em condições anaeróbicas.

Os resultados encontrados para as meias-vidas contrastam com outros piretróides estudados anteriormente que mostram meias-vidas longas no escuro: Permetrin ($t_{1/2}$ = 3 semanas), Fluvalinato ($t_{1/2}$ = 7 semanas) e Decametrina ($t_{1/2}$ = 8 semanas).

Também os resultados da quantidade de resíduo incorporado (não extraídos) no solo são diferentes. Enquanto que depois de oito semanas são incorporados somente 10-20% do Fluvalinato aplicado em condições aeróbicas e 16% em condições anaeróbicas, para outros piretróides (Permetrin, Cipermetrin e Phenotrim) são incorporados 32, 30 e 50% das doses aplicadas, respectivamente.

Os resultados do movimento de Fluvalinato em placas de camada delgada para os três tipos de solo mostram que o inseticida é imóvel, pois tem afinidade com solo onde é adsorvido rapidamente.

As verduras, por exemplo, alface e almeirão, que cresceram no solo tratado com Fluvalinato-14C não acumularam quantidade apreciável de radionuclídeo.

Os autores concluem que o Fluvalinato não causa mínimo impacto ao meio ambiente, por sua imobilidade e rápida degradação, que são aspectos importantes para um inseticida ser ambientalmente aceitável.

Luchini, Lord e Rüegg [40], estudaram sorção de inseticidas em vários solos brasileiros.

Foram usados dez tipos de solos coletados pelo Instituto Biológico em São Paulo e pelo Instituto Agrônomo em Campinas.

Foram testados sete inseticidas: Aldrin, DDT, Dieldrin, Lindano, Malation, Paration e Carbaril e seus correspondentes compostos radiomarcado com carbono-14.

O estudo de sorção foi realizado adicionando-se um grama de solo em 10ml de solução aquosa do pesticida e agitando-se de tempo em tempo. Após 24 horas de equilíbrio, a solução sobrenadante foi separada e extraída com etér de petróleo. O extrato foi analisado por cromatografia gasosa e por cintilação líquida.

Os autores concluem que cada composto é sorvido diferentemente nos vários solos, mas os resultados se agrupam.

As determinações mostram que nos solos mais ricos em matéria orgânica sorvem todas as substâncias, com exceção do Aldrin,

mais intensamente do que nos demais solos. DDT e Aldrin foram os pesticidas organoclorados mais e menos sorvidos, respectivamente, tendo sido o Dieldrin duas a quatro vezes mais fortemente sorvido do que o Aldrin. Nos diferentes solos, a sorção do Lindano foi variável. Os inseticidas organofosforados, Malation e Paration, apresentaram forte sorção nos solos mais pobres em matéria orgânica, sendo moderadamente sorvidos pelos demais solos. A sorção do Carbaril foi pequena em todos os solos.

Smith e Milward [41], estudaram a degradação do herbicida Asulan em três tipos de solos.

A extração foi realizada com metanol, usando agitação mecânica por uma hora. A separação foi feita com centrífuga. A técnica de detecção usada foi a cromatografia em camada delgada com revelador, onde o nível de detecção foi 0,2ppm.

Contrariando muitos estudos de degradação, os autores mostram que o comportamento do herbicida Asulam é parecido nos três tipos de solo: argiloso, limo-argiloso e arenoso, em contraste a maioria dos trabalhos [1,6,9,13,22] de dissipação que afirmam que o tipo de solo e a quantidade de matéria orgânica no solo determinam a adsorção do herbicida no solo.

Smith e Milward [41], também indicam que o Asulam degrada rapidamente, com meia-vida de sete dias. Embora a quantidade formada parece ser dependente do tipo de solo, menos de 10% do herbicida aplicado foi transformado no metabólito do Asulan, a sulfanilamida.

A partir dos vários estudos sobre os diversos pesticidas aqui apresentados, pode-se concluir que o estudo de comportamento de pesticidas é um trabalho complexo. Os resultados de meia-vida, metabolismo, degradação, dissipação e mobilidade diferem-se de pesticida para pesticida, de região para região e em entre tipos de solos diferentes. Portanto torna-se arriscado uma extrapolação ou previsão dos resultados.

CAPÍTULO 5

MONTAGEM DO EXPERIMENTO NO CAMPO

Esta parte, tão essencial ao estudo de resíduo do herbicida, foi feita por engenheiros agrônomos das Industrias Monsanto S/A., seguindo normas do "Environmental Protection Agency" (EPA), indicadas no capítulo 2.

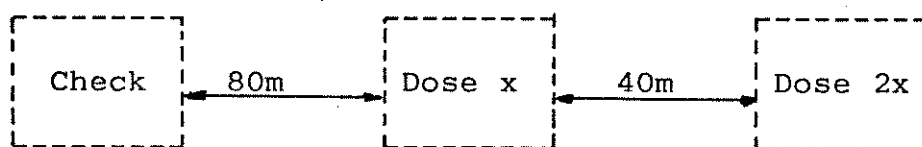
Foram selecionadas duas regiões açucareiras, que usam herbicida na culturas de cana de açúcar. Os locais selecionados: cidade de Franca (estado de São Paulo) e a cidade de Tracunhaem (estado de Pernambuco). A classificação dos solos estão na Tabela 5.1, (ver também o Apêndice).

Tabela 5.1. - Classificação dos solos

Local	Argila	Areia	Areia	Limo	Classe Textural
	%	Grossa %	Fina %	%	
Franca	20,6	7,2	26,0	46,2	Argiloso
Tracunhaem	10,0	57,0	21,0	23,0	Arenoso

Para a montagem dos ensaios foram arrendadas fazendas nestes locais, as quais foram divididas em três parcelas denominadas: "check", "dose x" e "dose 2x", com espaçamento entre elas e bordaduras, que delimitam as parcelas formando cordões de isolamento com o objetivo de protegê-las contra contaminações. Essas bordaduras delimitantes não receberam nenhum tratamento e não foram coletadas amostras nestas áreas (figura 5.1.).

Figura 5.1 - Delineamento das parcelas no ensaio de campo.



O herbicida foi aplicado após o plantio da cana, em solo limpo de ervas daninhas e com brotos de cana de 10-15 cm de altura. A aplicação foi pré-emergente, nome dado à aplicação antes da emergência das ervas daninhas. O herbicida usado tem como princípio ativo o Acetochlor, do grupo das acetanilidas. O seu nome químico é [N-(2-etil-6-metilfenil)-N-etóximetil-2 cloroacetona-mida]. A formulação usada foi concentrado emulsionável contendo 960 g/l de ingrediente ativo. As plantas, susceptíveis ao herbicida, sofrem inibição no crescimento e posterior morte. O herbicida também possui uma ação inibidora na síntese das proteínas, e é absorvido pelo coleóptilo das ervas daninhas monocotiledôneas durante a emergência.

*"check": parcela testemunha, onde o solo não recebeu aplicação de herbicida.

No ensaio, o Acetochlor foi aplicado na dose x (recomendada no rótulo do produto), e dose 2x(dobro da dose recomendada), para avaliação a nível de resíduo remanescente, de um possível erro cometido pelo agricultor na aplicação (Figura 5.1) e (Tabela 5.2).

Tabela 5.2 - Doses aplicadas do herbicida.

Local	Dose x (kg/ha)	Dose 2x (kg/ha)	Tipo de Solo
Franca	4,32	8,64	Argiloso
Tracunhaem	5,28	10,56	Arenoso

As amostras foram coletadas em profundidades de 0 a 15 cm e de 15 a 30 cm, para avaliação de possível lixiviação do herbicida no solo.

Os intervalos de coleta foram: antes da aplicação, após aplicação e 30, 60, 90, 180 e 360 dias após aplicação.

Amostragens foram feitas individualmente para cada profundidade, cada dosagem e cada parcela, usando sempre, equipamentos de amostragem limpos.

As amostras foram coletadas com auxílio de um amostrador próprio para solo, que as retira em forma de cilindro. Foram retiradas dez amostras aleatoriamente, dentro de cada parcela, e de cada profundidade. Estas foram homogeneizadas separadamente sobre plástico limpo, divididas em quatro partes, desprezadas duas partes, novamente homogeneizadas e divididas segundo regras de amostragem e redução de amostra, até se obter 3 kg de sub-amostras, que foram individualmente colocadas em sacos plásticos e posteriormente em sacos impermeáveis, próprios para análise de resíduos. Os sacos (PVC) foram enviados para o laboratório acondicionados em caixa de isopor contendo gelo seco, para manter a integridade da amostra original.

Recebidas no laboratório, as amostras foram armazenadas em freezer até a análise.

CAPÍTULO 6

PARTE EXPERIMENTAL

6.1 - Materiais e Reagentes.

- Balança Analítica (Mettler)
- Moinho de martelo para solo (Manesco Ranieri)
- Agitador mecânico
- Ultracentrífuga (Sorval)
- Evaporadores Rotativos (Monsanto)
- Manta aquecedora de capacidade 500 ml (Fisaton)
- Placas de aquecimento e agitação (Mettler)
- Contador de partículas beta (Beckman)
- Cromatógrafo à Gás (Varian modelo 3700)
- "Autosampler" para injeção (Varian Série 8000)
- Vidros de amostra para "autosampler", capacidade 2 ml (Varian)
- Seringa de 10 μ l (Hamilton)
- Frasco de polietileno de 300 ml
- Pissetas de Teflon
- Balão de fundo redondo de 500 ml (Pirex)
- Sistema de refluxo e destilação
- Vidrarias comuns de laboratório como béquer, balão volumétrico, baquetas, almofariz, funil de separação, pipetas, etc.
- Acetonitrila (Merck, Grau Pesticida)

- Hexano (Merck, Grau Pesticida)
- Ácido Sufúrico concentrado (Merck p.a)
- Ácido Sulfúrico em concentrações de 4N, 2N, 1N e 0,5N
- Hidróxido de sódio 50% p/v (Qeel)
- Etanol (Grupo Química Grau Pesticida)
- Sulfato de sódio* (Merck p.a)
- Acetochlor 99,9% (Monsanto)
- Metiletilanilina 99,9% (Monsanto)
- Dietilanilina 99,9% (Monsanto)
- Alachlor radiomarcado com carbono-14 (Monsanto)
- Coquetel para cintilação líquida (Instagel)

* O sulfato de sódio foi calcinado em mufla a 500°C.

6.2.- Preparações de Padrões.

Será descrito a seguir a preparação de solução padrão de Acetchlor em etanol a qual foi usada para fortificações, e da solução padrão de metiletilanilina (MEA) em hexano, a qual foi usada para curva padrão na quantificação por cromatografia gasosa.

Após serem preparadas, as mesmas foram diluídas até a concentração conveniente de uso, colocadas em frasco de vidro ambar e guardadas em geladeira na temperatura de 0-2°C .

6.2.1. Solução padrão de Acetochlor em etanol.

Pesou-se 0,1000g de Acetochlor e diluiu-se a 100,0 ml com etanol, grau pesticida. Tirou-se uma alíquota de 10,0 ml desta solução de 1000,0 ppm e diluiu-se a 100,0ml com etanol. A partir desta solução de 100,0 ppm tirou-se alíquotas de 1,0 e 5,0 ml e diluiu-se para 100,0ml com etanol. Estas soluções de 1,0 e 5,0 ppm, respectivamente foram utilizadas para as fortificações.

6.2.2 - Soluções padrões de MEA em hexano.

Pesou-se 0,0100g de padrão analítico de metiletilanilina (MEA) e diluiu-se a 100,0ml com hexano. Desta solução de 100,0 ppm, tirou-se uma alíquota de 10,0ml e completou-se para 100,0ml. Desta solução de 10,0ppm, tirou-se várias alíquotas e completou-se a 100,0ml, para se obter a curva no cromatógrafo à gás, como indicado na Tabela 6.1

Tabela 6.1 - Soluções de MEA para Curva Padrão.

Aliquotas da solução 10 ppm (ml)	Volume Total (n-hexano) (ml)	concentração da solução (ppm)
0,5	100	0,05
1,0	100	0,10
2,0	100	0,20
3,0	100	0,30
5,0	100	0,50
7,0	100	0,70
10,0	100	1,00

6.3 - Preparação das Amostras.

As amostras de solo, após a coleta, foram estocadas a -20°C em Freezer. Para serem utilizadas, foram deixadas à temperaturas ambiente até o descongelamento sendo retiradas das embalagens e colocadas em formas grandes de alumínio para secagem da umidade, durante uma noite ou mais, quando necessário.

As amostras, depois de secas, foram trituradas de duas maneiras:

1. em almofariz, quebrando os torrões de solo e homogeneizando o máximo possível. Tirou-se uma porção para iniciar a marcha analítica.
2. Em moinho de martelo para solo, onde conseguiu-se um pó mais fino e mais homogêneo que a trituração anterior.

6.4 - Desenvolvimento da Metodologia.

A metodologia desenvolvida foi para análise de Alachlor, que é também usado como herbicida e é muito parecido com o Acetochlor (Figura 6.1)

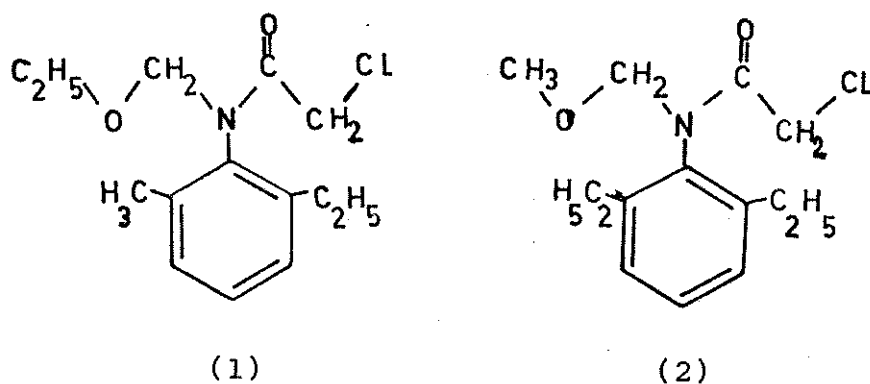


Figura 6.1 - Composto (1): "Acetochlor" - [N(2-etil-6-metilfenil)-N-etóximetil-2-cloroacetamida].

Composto (2): "Alachlor"- [N(2,6-dietilfenil)-N-metóximetil-2-cloroacetamida].

Utilizou-se o Alachlor radiomarcado com carbono-14 para os estudos das principais etapas do método, ou seja, etapas limitantes da recuperação final. As etapas estão indicadas na Figura 6.2.

Os dados quantitativos para este herbicida (Alachlor) não foram liberados para publicação visto que, toda a parte experimental foi desenvolvida no Centro de Pesquisa Agrícola das Indústrias Monsanto, que liberou somente a parte dos estudos, sobre o herbicida Acetochlor para ser incluído nesta tese.

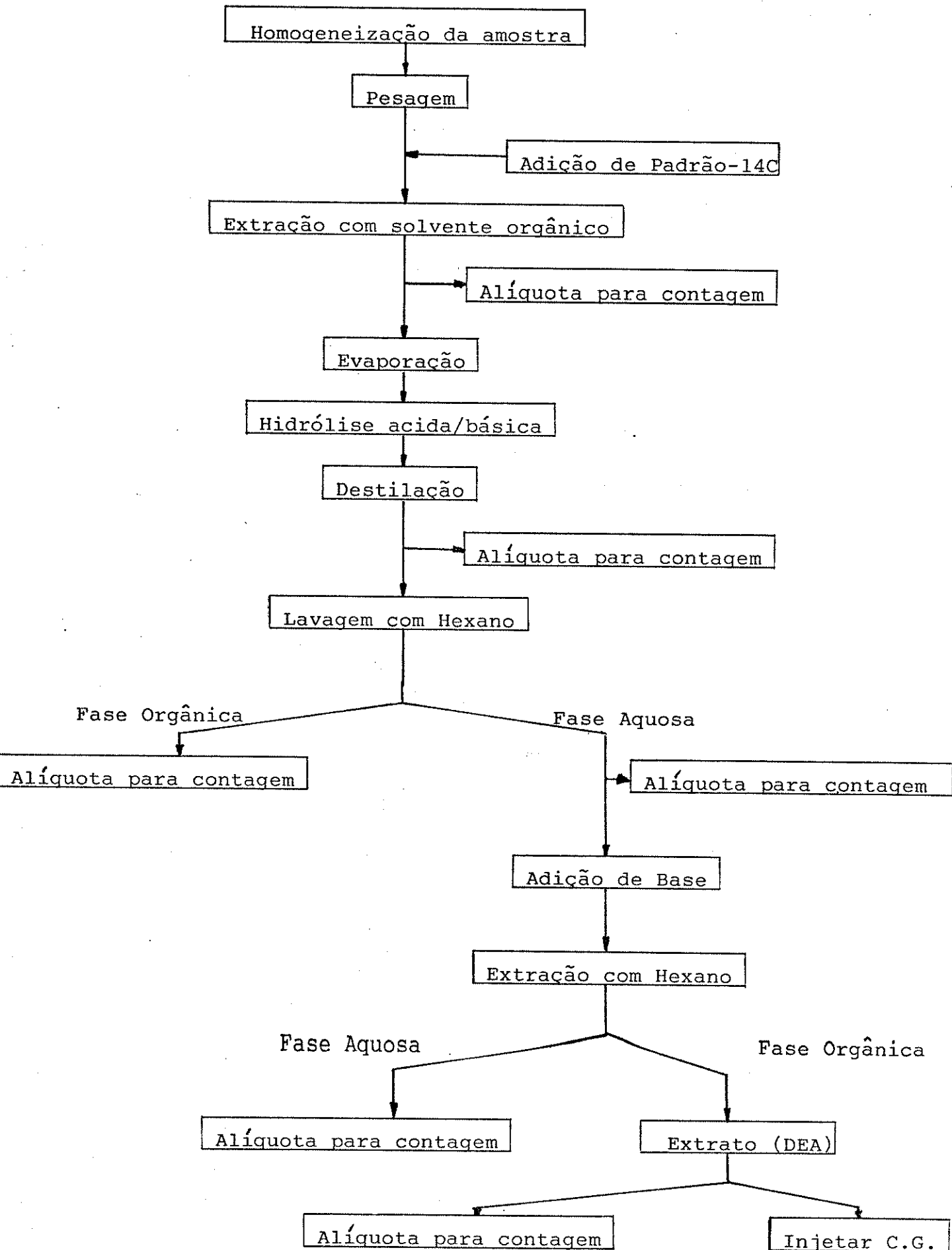
6.4.1 - Extração do princípio ativo.

Pesou-se 25 g de solo "check" ou testemunha *, homogeneizados em frasco de polietileno de 250 ml. Adicionou-se 1ml de solução de Alachlor 14-C em etanol e misturou-se a amostra por alguns minutos. Nesta etapa foram testados os solventes mais comuns para extração de resíduos de pesticidas em solo, segundo Chiba [7]:

- acetonitrila
- acetonitrila 80% em água
- acetona
- metanol
- isoctano/isopropanol 1:2

* "check" ou testemunha - Amostra de solo que não recebeu aplicação de herbicida.

Figura 6.2 - Esquema do Método Analítico I.



No procedimento geral para cada solvente, adicionou-se 130ml de solvente a 25 g do solo contendo o Alachlor-14C, fechou-se o frasco, colocando-o no agitador mecânico por 40 min., com velocidade média.

Após centrifugação por 10 min a 10.000 rpm para separar a parte sólida, tirou-se uma alíquota de 1ml do sobrenadante, colocando-se nos frascos contendo "coquetel" para cintilação líquida. Em seguida foram levados ao contador para avaliação.

A acetonitrila apresentou a maior recuperação e foi utilizada como solvente para a extração do princípio ativo*.

6.4.2 - Hidrólise Ácida/Básica.

Nesta etapa, estudou-se a transformação do princípio ativo, e seus metabólitos encontrados no solo, ao metabólito mais simples, a dietilanilina (DEA). Este processo envolveu a quebra de várias ligações, como pode ser vista na Figura 6.3. Esta etapa é limitante quanto a recuperação, visto que, devido a interferentes da matriz (amostra de solo), as reações não são completas.

O extrato em acetonitrila com volume conhecido (100ml) foi evaporado em balão de 500 ml, fundo redondo em evaporador rotativo até quase secura, usando uma temperatura de 35°C (Figura 6.4).

Acoplou-se o balão contendo o extrato ao sistema de refluxo e destilação (Figura 6.5). Adicionou-se 50 ml de ácido sulfúrico, na concentração em teste pelo funil de adição (A). Man-

* Também na literatura existem estudos de extração de Alachlor, contido em solos, com acetonitrila e água (9:1) [44] e em soja, com acetonitrila 100% [45], com resultados bastante satisfatórios.

Figura 6.3 - Formulas estruturais do Alachlor e seus metabólitos e as transformações à DEA.

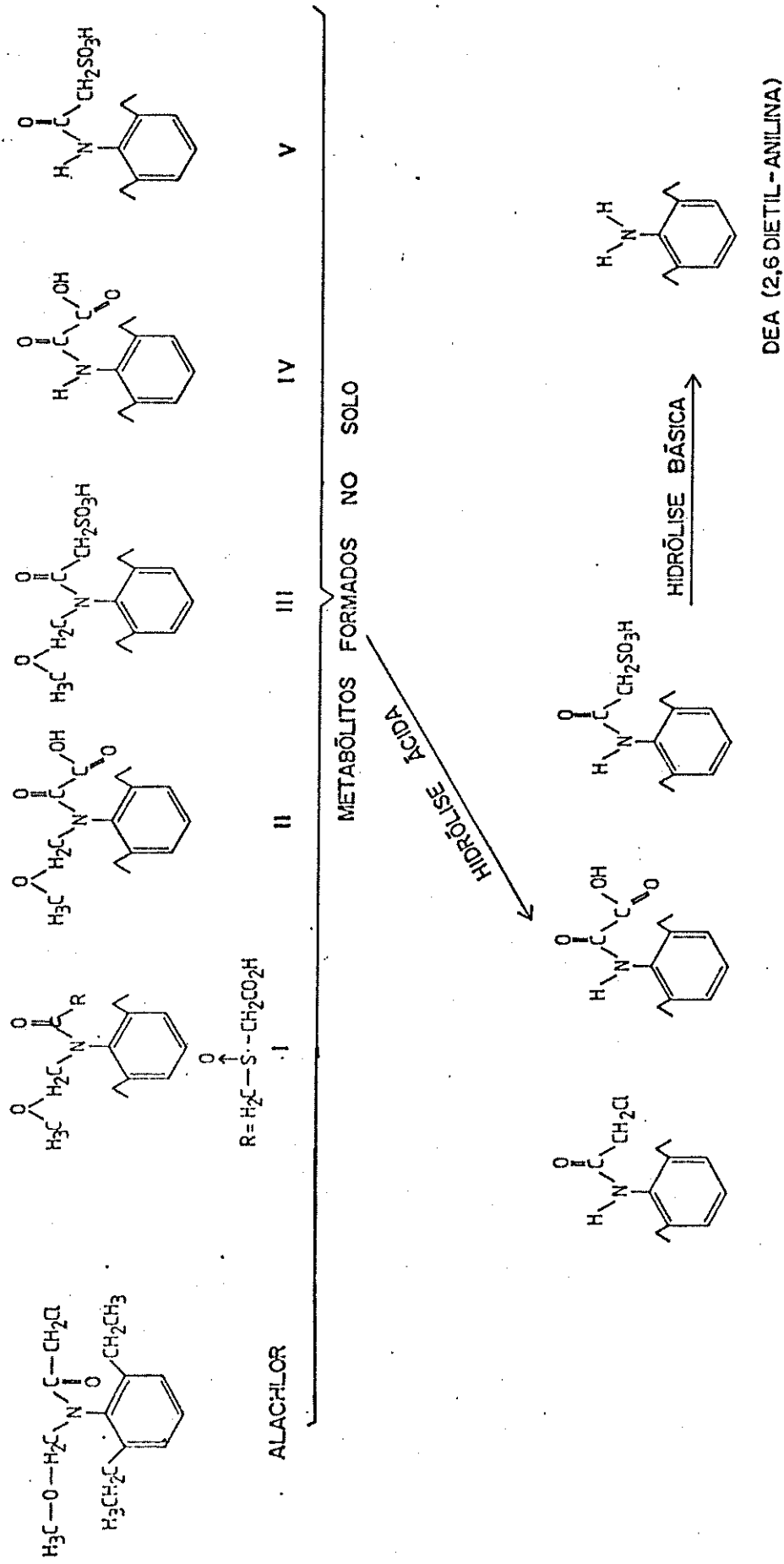


Figura 6.4 - Esquema do Rotaevaporador.

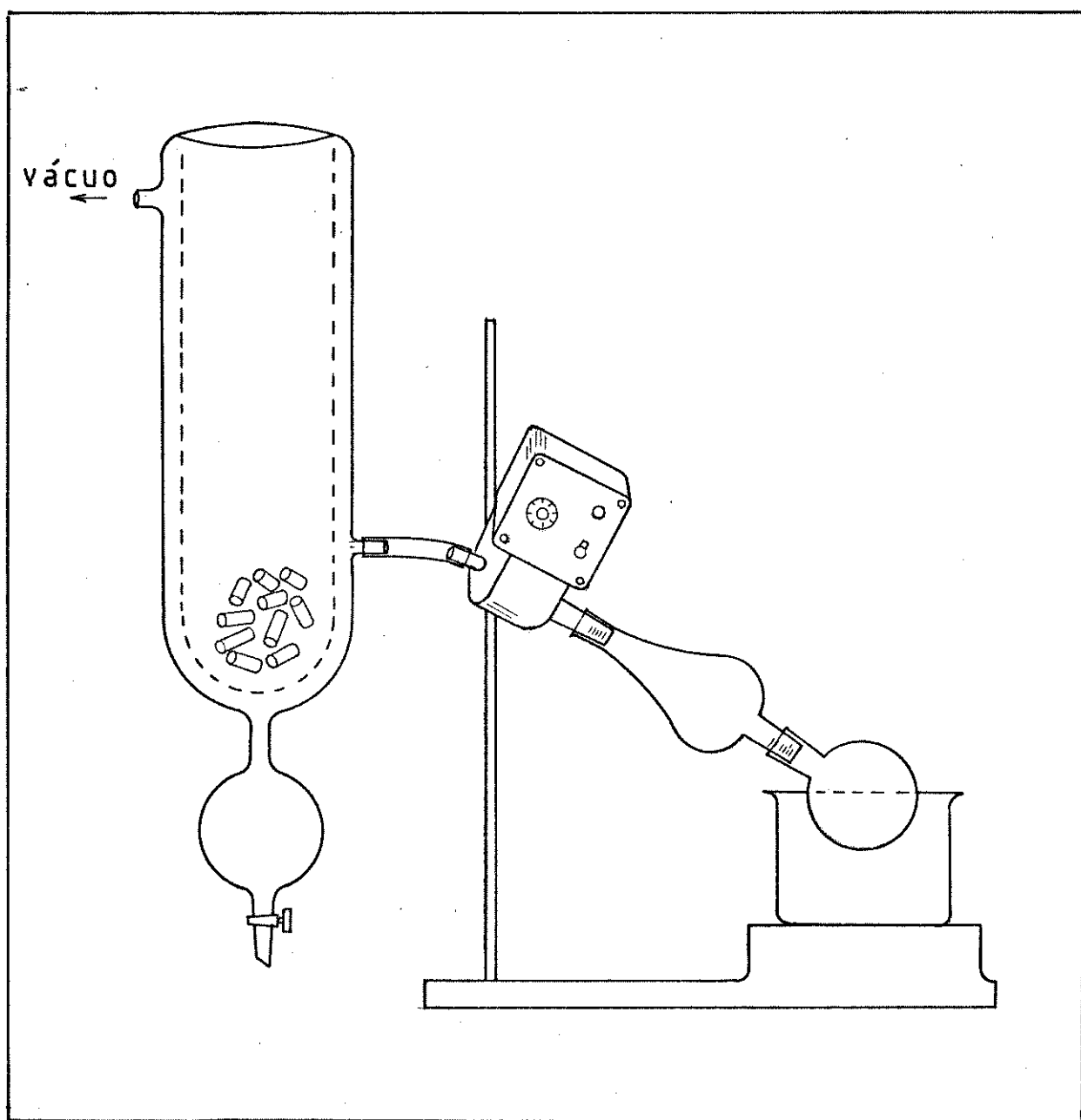
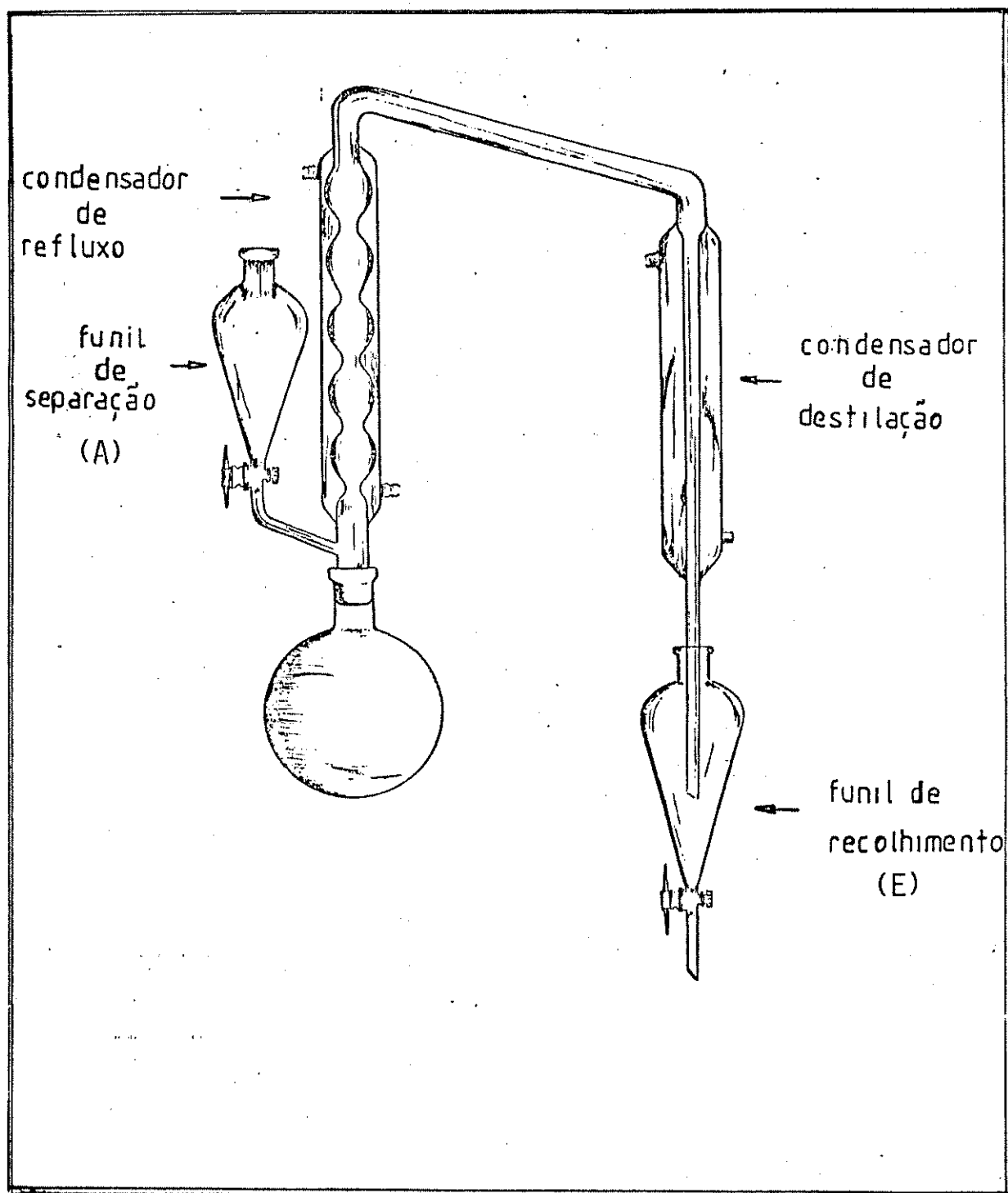


Figura 6.5 - Sistema de refluxo e destilação



teve-se refluxo por 30 min e, com auxílio de agitador magnético, manteve-se a homogeneização da solução no balão. Após refluxo deixou-se resfriar o sistema, sempre com agitação. Depois de frio adicionou-se 50 ml de hidróxido de sódio 50% pelo funil (A) e manteve-se o sistema em refluxo por 30 min.

Após o término do refluxo, iniciou-se a destilação da dietilanilina, desviando-se a água corrente do condensador de refluxo para o condensador de destilação. O destilado foi recolhido no funil de recolhimento (E) (Figura 6.5), sobre 10 ml de ácido sulfúrico 12N, até um volume total de 70 ml.

Após a homogeneização da solução recolhida, tirou-se uma alíquota de 1ml para a avaliação do rendimento da hidrólise através da contagem do conteúdo de carbono-14. Esta avaliação só foi possível depois da destilação do metabólito transformado, caso contrário, tirando-se uma alíquota após a hidrólise ácida dentro do balão haveria Alachlor-14C não transformado e o metabólito.

Nesta etapa de hidrólise, o ácido sulfúrico 1N apresentou o melhor resultado de recuperação do metabólito, Carbono-14C ao redor de 80%.

6.4.3 - Purificação do Metabólito

A solução ácida obtida na destilação foi lavada com hexano. Testou-se extração com uma fração de 20 ml e extração com duas frações de 10ml, afim de extrair impurezas solúveis em hexa-

no. O metabólito de Dietilanilina (DEA) ficou na fase aquosa ácida.

Nesta etapa, testou-se a quantidade de hexano efetiva para retirar as impurezas, contudo extraíndo-se o mínimo possível de metabólito, para não diminuir a recuperação.

O tempo de agitação foi mantido em 3 min para cada extração. Deixou-se separar as fases por 20 min. Recolheu-se a fase aquosa em outro funil de separação, tirou-se alíquota para contagem do conteúdo de carbono-14, no cintilador líquido.

Tirou-se também uma alíquota da fase hexânica a ser descartada para contagem do carbono-14. As contagens para carbono-14 mostraram que a extração com 20 ml de hexano foi mais eficiente.

Para posterior extração do metabólito da fase aquosa com hexano, baseificou-se o conteúdo do funil com 10 ml de hidróxido de sódio, 50%, usando-se um banho de gelo para evitar aquecimento e consequente perda por volatilização, assim desprotonando a DEA, tornando o meio menos polar e aumentando a sua tendência de passar para o solvente orgânico.

Adicionou-se 10 ml de hexano e agitou-se por 3 min. Depois, deixou-se por 30 min para separar as fases. Neste caso a avaliação foi realizada no sentido de retirar o máximo do metabólito, sem carregar impurezas.

Testou-se 2 e 3 extrações com 5 ml de hexano e uma extração com 10 ml de hexano. O melhor rendimento obtido foi para uma extração com 10 ml de hexano, concluído pelas medidas de recuperação do carbono-14.

6.4.4 - Método de conversão para Acetochlor.

Após análise dos resultados obtidos nos testes de Alachlor-¹⁴C, foi proposta a sequência indicada na Figura 6.6 para a extração, hidrólise e lavagem do extrato de Acetochlor. O esquema das reações envolvidas para transformação do p.a. ao metabólito mais simples é semelhante as do Alachlor (Figura 6.7).

6.4.5 - Validação da metodologia para Acetochlor.

Para o uso da metodologia para análise de resíduo de Acetochlor, realizou-se uma análise usando amostras "testemunha", fortificando-as ou, seja, acidionando-se a etapa indicada no esquema, Figura 6.6, aliquotas da solução de Acetochlor em etanol em concentrações conhecidas (Tabela 6.2).

Esta análise de validação do método foi realizada para os dois tipos de solos, e dois tipos de homogeneização.

Figura 6.6 - Esquema do método Analítico II.

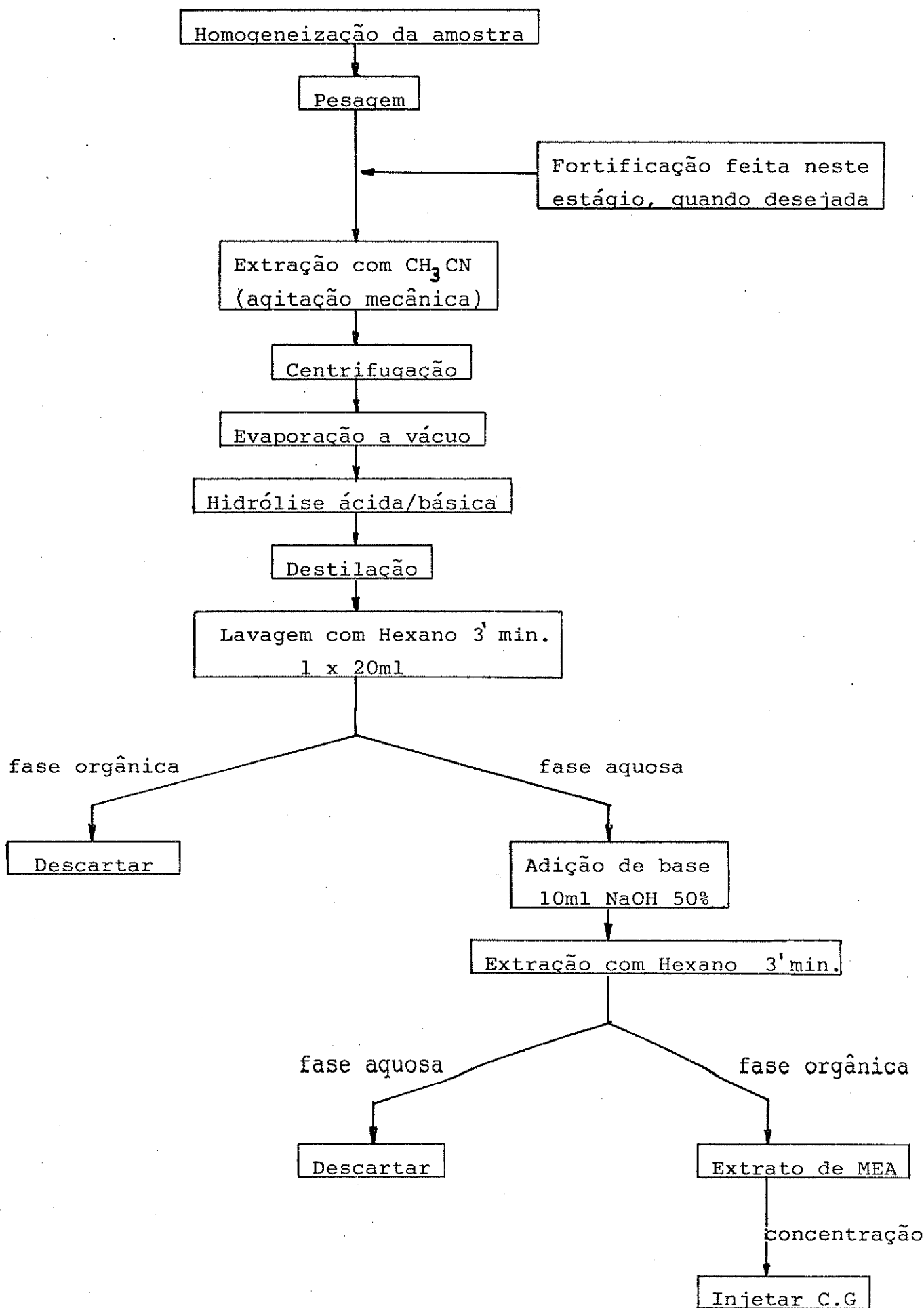


Figura 6.7 - Fórmulas estruturais do Acetochlor e seus metabólitos e as transformações à MEA.

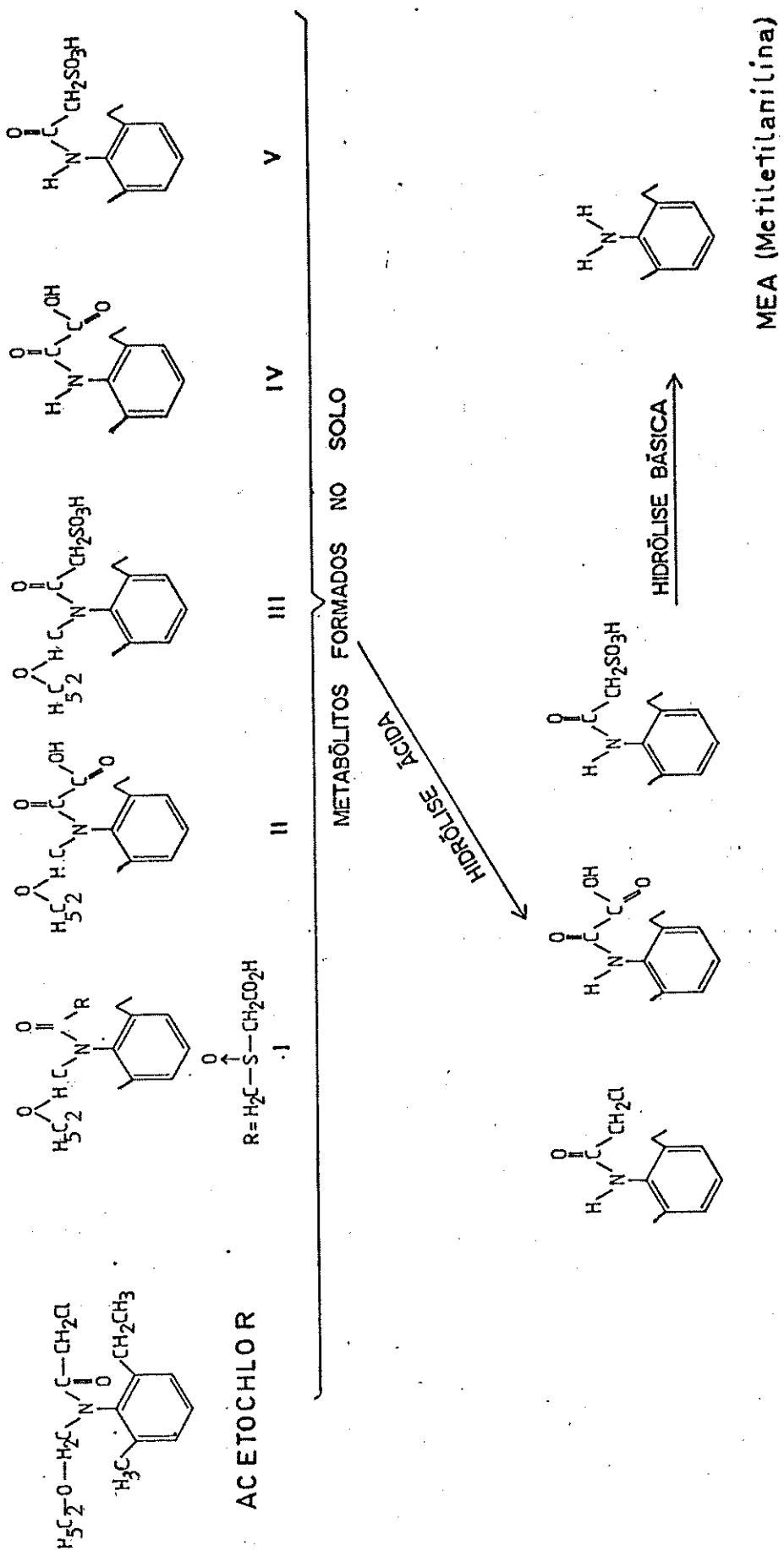


Tabela 6.2- Preparação das amostras fortificadas

nº amostra	nível de Fortificação em ppm	aliquotas da solução	µg adicionado para 25g amostra
1	testemunha	0	-
2	testemunha	0	-
3	Fort 0,01	0,25ml de 1ppm	0,25
4	Fort 0,01	0,25ml de 1ppm	0,25
5	Fort 0,02	0,5 ml de 1ppm	0,50
6	Fort 0,02	0,5 ml de 1ppm	0,50
7	Fort 0,05	1,25ml de 1ppm	1,25
8	Fort 0,05	1,25ml de 1ppm	1,25
9	Fort 0,10	0,5 ml de 5ppm	2,50
10	Fort 0,10	0,5 ml de 5ppm	2,50
11	Fort 0,20	1,0 ml de 5ppm	5,00
12	Fort 0,20	1,0 ml de 5ppm	5,00

6.5 - Análise de Resíduos nas Amostras.

As amostras foram analisadas em conjuntos de 12, de acordo com a data de coleta; por exemplo, a primeira coleta são amostras retiradas antes da aplicação. (Tabela 6.3).

A metodologia utilizada para analisar todas as amostras foi a indicada na Figura 6.6.

Tabela 6.3 - Descrição do conjunto de amostras usadas, para cada análise.

Nº das amostras	Descrição	Profund.	Dose (tratamento)
1	amostra test.	(0-15cm)	0
2	amostra test.	(15-30cm)	0
3	amostra test.	(15-30cm)	Fortificada 0,02ppm
4	amostra test.	(15-30cm)	Fortificada 0,05ppm
5	amostra tratada	(15-30cm)	X
6	amostra tratada	(15-30cm)	X
7	amostra tratada	(15-30cm)	2X
8	amostra tratada	(15-30cm)	2X
9	amostra tratada	(0-15cm)	X
10	amostra tratada	(0-15cm)	X
11	amostra tratada	(0-15cm)	2X
12	amostra tratada	(0-15cm)	2X

As fortificações foram realizadas com solução padrão de Acetochlor em etanol, cujas alíquotas foram adicionadas após pesagem da amostra. Por exemplo, para uma fortificação a 0,02 ppm, adicionou-se 0,5 ml de padrão 1 ppm (que representa 0,5 µg de Acetochlor para 25 g de amostra). Para fortificar a 0,20 ppm, tomou-se alíquota de 1,0 ml da solução padrão de 5 ppm (que re-

presenta 5,0 µg de Acetochlor para 25 g de amostra). No caso da primeira coleta, as fortificações foram em níveis de 0,02 ppm e 0,05 ppm.

Para as outras coletas, foram também analisados conjuntos de 12 amostras, usando um esquema semelhante. A primeira fortificação foi mantida em 0,02 ppm, por causa da sensibilidade do método analítico, e a segunda alternou-se para concentrações de 0,05; 0,10 e 0,20ppm.

Para cada análise foram obtidas 12 extratos do metabólitos (MEA) em hexano, concentrado até um volume final de 4 ml em tubo volumétrico graduado.

6.6 - Quantificação por Cromatografia Gasosa.

O detector usado para quantificação foi o Detetor Termiônico Específico por ser de alta sensibilidade e específico para nitrogênio, sendo que os compostos não nitrogenados não interferem na análise. Este fato é muito importante na análise de resíduo de pesticida.

A coluna usada foi a de vidro, recomendada para análise de resíduo. A fase estacionária líquida foi a UCW-98 (1% vinyl-metilsilicone, da Union Carbide), por ser termoestável, que evita a sangria e a consequente contaminação na análise.

Antes da análise do metabólito nas amostras, foram estabelecidas as condições cromatográficas ideais, quanto ao tempo de retenção e forma do pico. Estes testes foram realizados com solução padrão de MEA, nas concentrações de 0,05 µg/ml e 0,50 µg/ml.

Condições cromatograficas escolhidas:

- Detector: Termiônico Específico
- Coluna de vidro: 2m x 1/4'' recheada com UCW-98 3,8% sobre Gás Chrom Q (80-100mesh).
- Temperatura do Injetor : 230°C
- Temperatura do Detector : 250°C
- Vazão do gás de arraste (N₂) : 20 ml/min
- Vazão de hidrogênio : 4,5 ml/min
- Vazão de ar sintético : 175 ml/min
- Bias Voltagem : 4 volts
- Beam current : 680 Amperes
- Velocidade do papel : 0,25cm/min
- Volume injetado : 3 µl

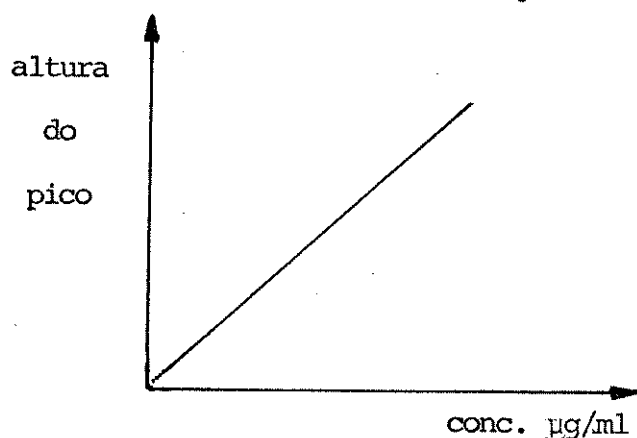
Para a quantificação cromatográfica do metabólito, os extratos de 4 ml foram colocados em vidros especiais para o "auto sampler Varian". As amostras foram intercalados no "carrocel" com os padrões do MEA em hexano. Por exemplo, para cada duas amostras foram incluídos, primeiro, um vidrinho com hexano puro, depois padrões de 0,05 µg/ml; 0,10µg/ml; 0,20µg/ml; 0,30 µg/ml; 0,50 µg/ml; 0,70 µg/ml e 1,00 µg/ml. Obteve-se para cada análise uma curva padrão de concentração versus altura do pico para comparar com os resultados das análises do metabólito.

6.7 - Cálculos.

6.7.1 - Cálculos da concentração e recuperação analítica do Ace-tochlor.

Para cada análise foi plotada a curva padrão, usando as alturas dos picos observados para soluções de concentrações 0,05, 0,10, 0,20, 0,30, 0,70 e 1,00 $\mu\text{g/ml}$. (Figura 6.8), sendo que nesta faixa a resposta do detector é linear.

Figura 6.8 - Curva de Calibração.



Para o cálculo de concentração da amostra, usou-se a equação da reta $y=ax+b$ onde:

y = resposta do CG dado como altura do pico (medida manualmente com paquímetro).

x = quantidade injetada no CG em $\mu\text{g/ml}$.

a = coeficiente angular (inclinação da reta).

b = coeficiente linear (intercepção com eixo y).

r = coeficiente de correlação linear (linearidade da curva).

Usando-se um programa de regressão linear e, entrando com pares (x,y) da curva padrão, obteve as constantes a, b e r.

A quantidade de Acetochlor presente na amostra é calculada usando-se a equação abaixo.

$$\text{ppm Acetochlor} = \frac{(x) \cdot (\text{fator conversão}) \cdot (\text{volume final (ml)})}{\text{peso da amostra}}$$

$$\text{onde } x = \frac{y - b}{a}$$

$$\text{fator de conversão} = \frac{\text{massa molecular Acetchlor } 269,8}{\text{massa molecular MEA } 135,2} = \frac{269,8}{135,2} = 1,999$$

Considera-se o seguinte exemplo:

Da curva de calibração obtida temos:

$$b = -0,0419$$

$$a = 6,1468$$

$$r = 0,9998$$

Resposta do detector em altura (y) = 0,212 polegadas

(lido no paquímetro)

peso da amostra = 25,0 g

volume final = 3,5 ml

$$\text{ppm Acetochlor} = \frac{(0,212 - (-0,0419) \cdot 2,0 \cdot 3,5)}{6,1468 \cdot 25}$$

$$\text{ppm Acetochlor} = 0,012.$$

Este valor (0,012) foi expresso como $< 0,02\text{ppm}$ sendo que 0,02ppm foi sensibilidade do método.

A porcentagem de recuperação de amostra fortificada é calculada como exemplo abaixo:

$$\% \text{ Recuperação} = \frac{(\text{ppm encontrado}) \cdot 100}{(\text{ppm adicionado})}$$

$$\text{ppm Acetochlor} = 0,0151$$

(encontrado)

$$\text{ppm Acetochlor} = < 0,020$$

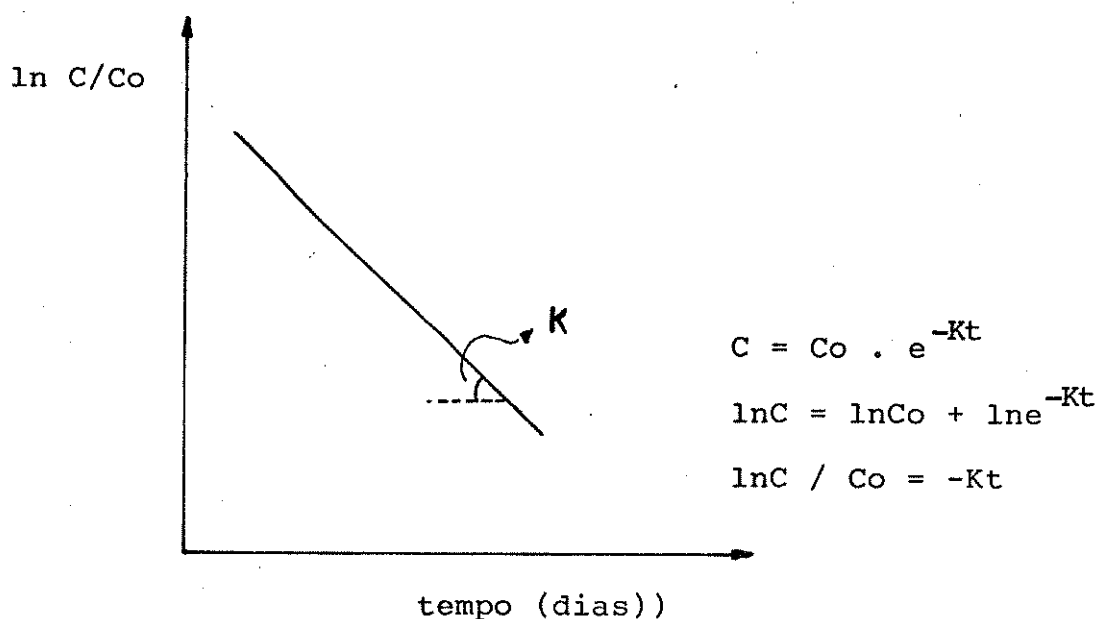
(adicionado)

$$\% \text{ recuperação} = \frac{0,0151 \cdot 100}{0,02}$$

$$\% \text{ recuperação} = 75.5\%$$

6.7.2 - Cálculo da meia-vida.

Primeiramente foi calculada, aplicando-se a equação para cinética de primeira ordem $C = C_0 e^{-Kt}$. Plotando-se $\ln C/C_0$ versus tempo, temos:



onde:

inclinação = K (constante de dissipação)

C_0 = concentração inicial

C = concentração

t = tempo

Se fizermos $C_0 = 1$ e $C = 1/2$ teremos a formula para $t_{1/2}$

$$\ln C/C_0 = - Kt$$

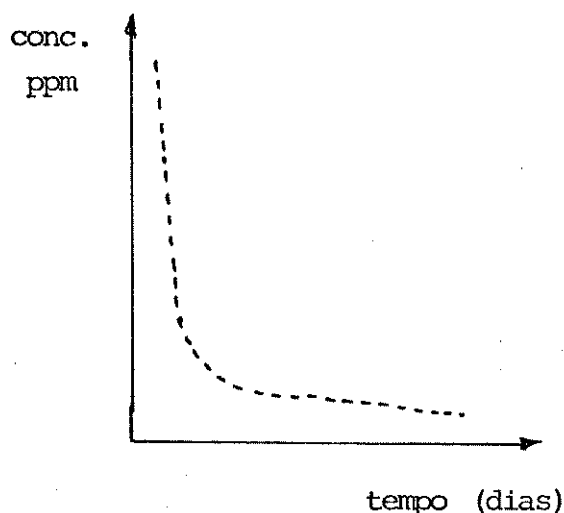
$$\ln \frac{1/2}{1} = - Kt_{1/2}$$

$$t_{1/2} = \frac{0,693}{K}$$

Através de um programa de regressão linear de calculadora, obtivemos K e o coeficiente linear da curva (r).

Também foram testadas quatro funções para os pares de pontos, x, y , onde x é igual o tempo em dias após aplicação e y igual a concentração real do herbicida, Figura 6.9.

Figura 6.9 - Curva de decaimento da concentração do acetochlor versus tempo.



Foi usado no microcomputador um programa de grande eficiência chamado "ajuste de curvas", em que se pode escolher o ajuste (função) que melhor se adaptou aos pontos fornecidos,

através da análise do coeficiente linear de correlação "r". Quanto mais próximo de 1 este for, melhor terá sido o ajuste.

As funções testadas foram:

1. Linear : $y = a + bx$
2. Exponencial : $y = a \cdot e^{bx}$
3. Logarítmica : $y = a + b \ln(x)$
4. Potencial : $y = a \cdot x^b$

Entrando com os pares (x,y), o microcomputador forneceu as constantes a, b e r.

Usando-se as constantes a e b fornecidas e fazendo "y" igual metade da concentração inicial, teremos "x" igual a meia-vida, $t_{1/2}$.

CAPÍTULO 7

RESULTADOS E DISCUSSÕES

7.1 - A Técnica Cromatográfica na Quantificação.

A quantificação foi feita determinando-se a quantidade de metiletilanilina (MEA) presente na solução hexânica usando um cromatógrafo a gás equipado com um detector termiônico específico. Este detector apresenta mais especificidade para compostos nitrogenados, fazendo com que a determinação a ser efetuada torne-se mais sensível, deixando os interferentes não nitrogenados do solo e dos reagentes com pouca sensibilidade na detecção. As condições cromatográficas estão na seção 6.5. Os cromatogramas típicos, ilustrados na Figura 7.1, mostram as soluções padrões usadas para a curva de calibração, as amostras fortificadas usadas para cálculo de recuperação analítica, as amostras testemunhas e as amostras tratadas. Como pode ser visto, a quantidade de 0,05 ppm de MEA pode ser determinada com resposta maior que cinco vezes o nível de ruído da linha de base.

A curva de calibração para o método de padrão externo foi efetuada junto com cada série de análise nas concentrações de 0,05; 0,10; 0,20; 0,30; 0,50; 0,70 e 1,00 ppm de MEA em hexano (Figura 7.2). Como mostra a Tabela 7.1, a resposta do detector varia de um dia para outro, apresentando picos com alturas diferentes. Sendo assim, a curva de calibração foi feita para cada série de análise, obtendo os valores de "a" e "b", constantes da

Figura 7.1 - Exemplos dos cromatogramas obtidos.

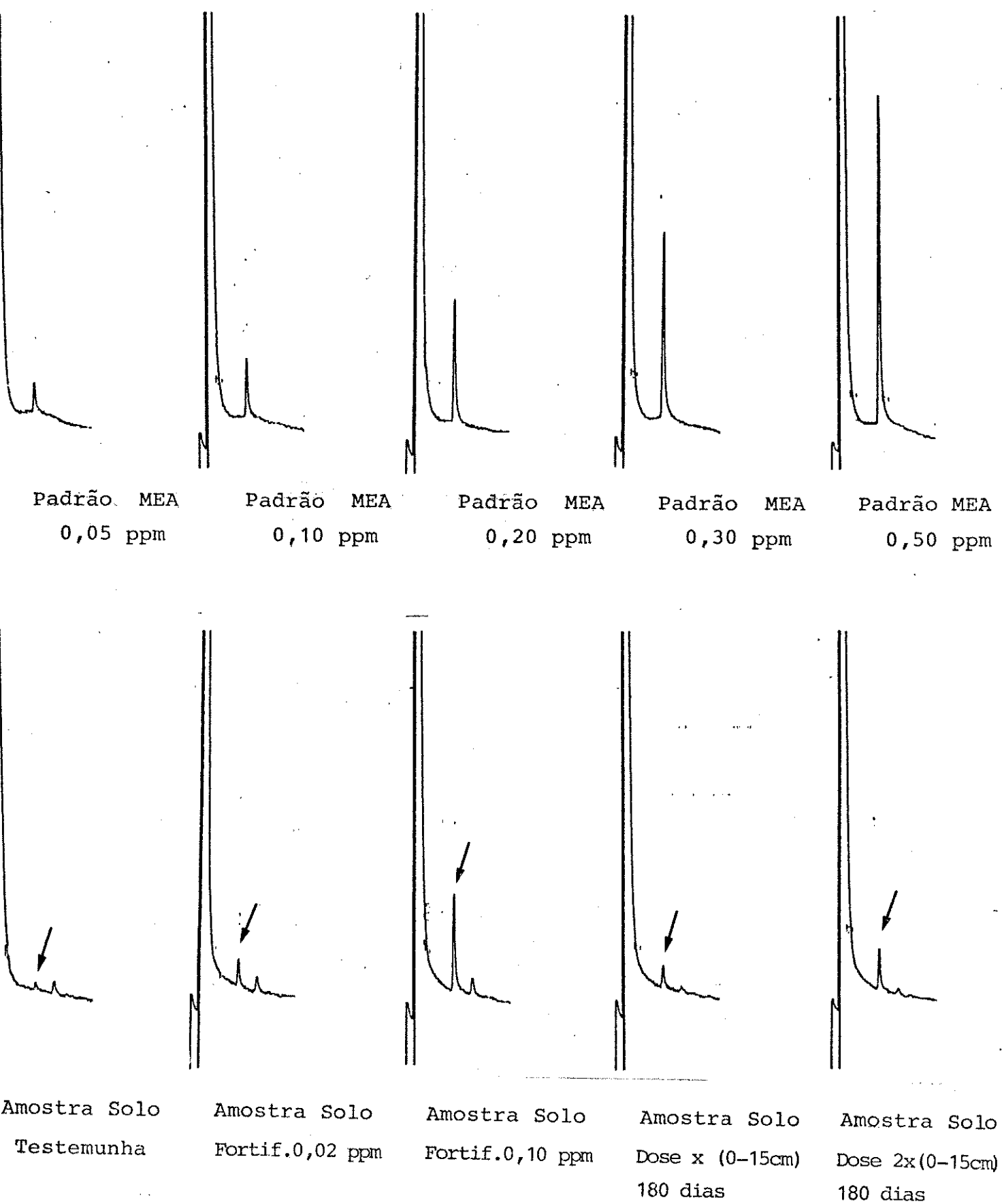


Figura 7.2 - Curva de calibração para MEA.

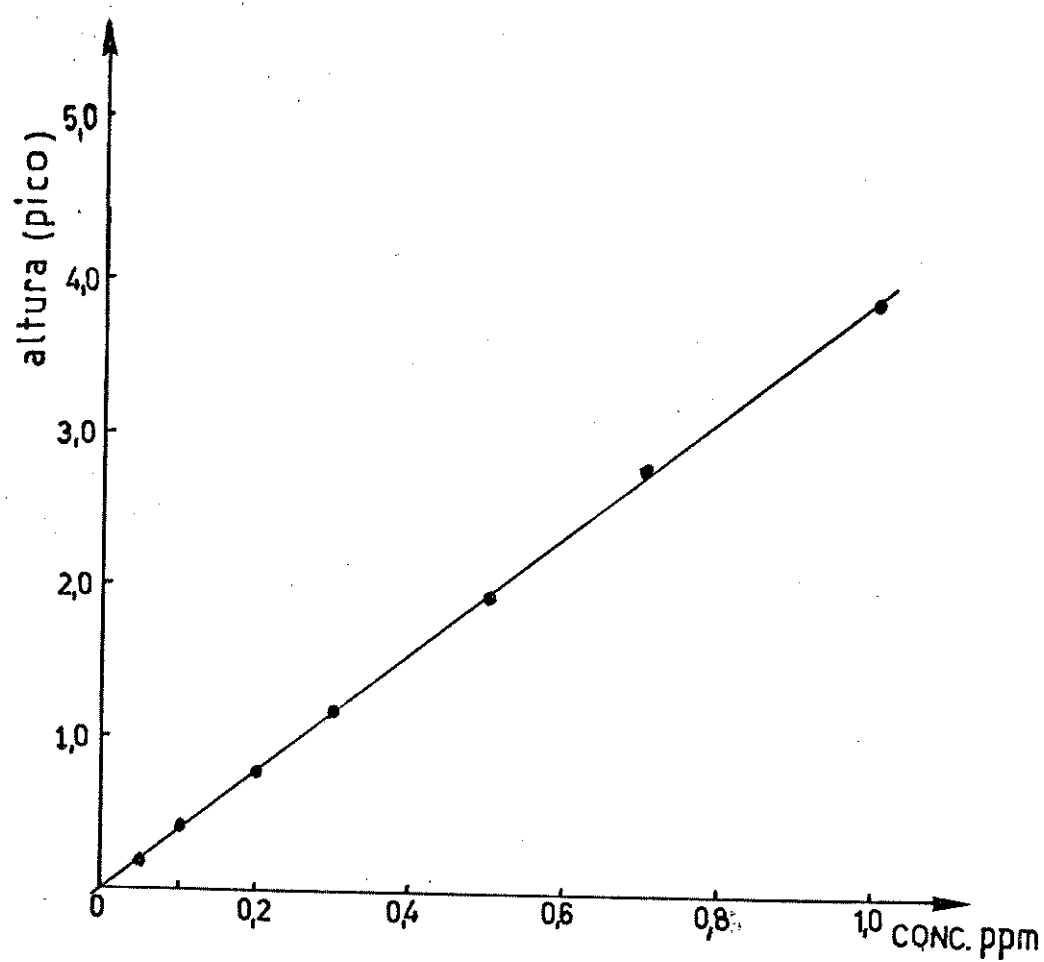


Tabela 7.1 - Exemplos das curvas padrões usados para a quantificação de MEA pelo método de padrão externo.

concentração MEA (ppm)	altura do pico (polegadas)										
	(1)	(2)	(3)	(4)	(5)	(6)	(7)	(8)	(9)	(10)	(11)
0,05	0,172	0,181	0,191	0,222	0,185	0,220	0,342	0,227	0,284	0,210	0,235
0,10	0,382	0,386	0,436	0,448	0,388	0,446	0,684	0,544	0,595	0,468	0,451
0,20	0,762	0,782	0,903	0,762	0,732	0,882	1,424	1,130	1,217	0,970	0,924
0,30	1,153	1,201	1,318	-	1,183	1,354	2,151	1,824	1,845	1,448	1,406
0,50	1,940	2,023	2,336	1,937	2,104	2,296	3,731	3,122	3,170	2,530	2,430
0,70	2,746	2,916	-	-	2,864	3,310	5,207	4,381	4,706	3,596	3,510
1,00	3,862	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
constantes da curva											
a	3,8913	4,1613	4,4646	3,8272	4,1516	4,7124	7,490	6,3502	6,6741	5,1595	5,0016
b	-0,0092	-0,0301	-0,0109	0,0238	-0,0332	-0,0299	-0,0453	-0,0743	-0,0757	-0,0462	-0,0424
r	-0,9999	0,9997	0,9995	0,9993	0,9992	0,9997	0,9998	0,9996	0,9990	0,9997	0,9995

equação da reta $y = ax+b$, usada para cálculo da concentração da amostra através da altura do pico obtido.

O coeficiente de correlação linear foi de $0,9998 \pm 0,0002$ (20 determinações), mostrando que a resposta do detector foi bem linear na faixa de concentração usada. Todas as amostras analisadas caíram nesta faixa, sendo que as amostras do primeiro dia após tratamento, que apresentaram maior concentração de MEA, foram diluídas para que a altura dos picos se localizassem na faixa sem precisar extrapolações.

Para os cálculos, foram usadas alturas dos picos medidas com paquímetro, em que o valor obtido foi em polegada, com uma precisão de $\pm 0,001$ pol. Não foi usada a área integrada do pico porque, com um cromatógrafo à gás acoplado a um detector de alta sensibilidade e injetor automático, necessários quando se trata de níveis muito baixo do composto a ser determinado, o sinal da linha de base, que representa o zero do aparelho, tende a cair e o integrador integra esta parte negativa junto com os picos, admitindo erro no resultado. O uso da altura é recomendada para substâncias eluídas com baixo tempo de retenção, apresentando picos estreitos, como é o caso da MEA.

Concluimos que a cromatografia gasosa com detector termiônico específico atingiu o objetivo, mostrando ser a técnica mais apropriada para análise de resíduo, sendo eficiente, exata e rápida.

Devido ao grande número de amostras a serem injetadas, foi usado um amostrador automático que apresenta melhor reprodutibilidade e rapidez.

7.2 - Desenvolvimento da Metodologia de obtenção da MEA para a Análise Cromatográfica.

Para o desenvolvimento da metodologia foi usada uma única amostra de solo, que nunca recebeu tratamento com herbicida e que se apresentava como um pó fino e solto.

Como já foi dito no capítulo 6, este desenvolvimento de método de extração e determinação (Figura 6.2) foi realizado para o herbicida Alachlor no centro de Pesquisa Agrícola da Monsanto em Paulínia. Infelizmente o mesmo não liberou os resultados quantitativos para a apresentação. Restringimo-nos então, a discutir as técnicas usadas no desenvolvimento da metodologia.

Foi usado um padrão de Alachlor radiomarcado com carbono-14, para ser possível avaliar as etapas limitantes no processo de análise.

Na primeira etapa, a de extração do princípio ativo e seus metabólitos do solo, foi adicionado a cada porção de solo a ser analisado uma quantidade conhecida de Alachlor-14C.

Foram testados, com porções de solo, vários solventes para extração, visando obter a máxima recuperação do padrão radioativo adicionado ao solo. Os herbicidas normalmente apresentam ligações irreversíveis com o solo ou com um ou mais de seus constituintes [14]; portanto, a porcentagem de recuperação na extração dificilmente chegará a 100%. Neste estudo, conseguiu-se um máximo de 90% de recuperação para a acetonitrila após extração por 20 min. a temperatura ambiente. Outros solventes, como acetonitrila/água 4:1, acetona, metanol e isoctano/ isopropanol 1:2 apresentaram recuperações menores.

Na etapa de evaporação do solvente de extração, foi necessário tomar alguns cuidados especiais para não se perder o p.a por evaporação; para isso, foi usado banho de gelo e evaporador rotativo com alto vácuo e "trap" refrigerado com gelo seco, (Figura 6.4).

Na etapa de hidrólise também foi necessário cuidado especial para não perder o p.a. Foi importante, no sentido de maximizar o rendimento da reação, não apenas utilizar reagentes apropriados, já citados no capítulo 6, mas usar também técnicas adequadas de adição do ácido e da base, com um funil acoplado ao sistema, de forma lenta sob agitação constante, evitando superaquecimento e mantendo-se sempre a haste do destilador mergulhada na solução do funil de recolhimento (Figura 7.3). Se todos estes cuidados não fossem tomados, a recuperação diminuiria consideravelmente..

Figura 7.3 - Pontos importantes da hidrólise e destilação.

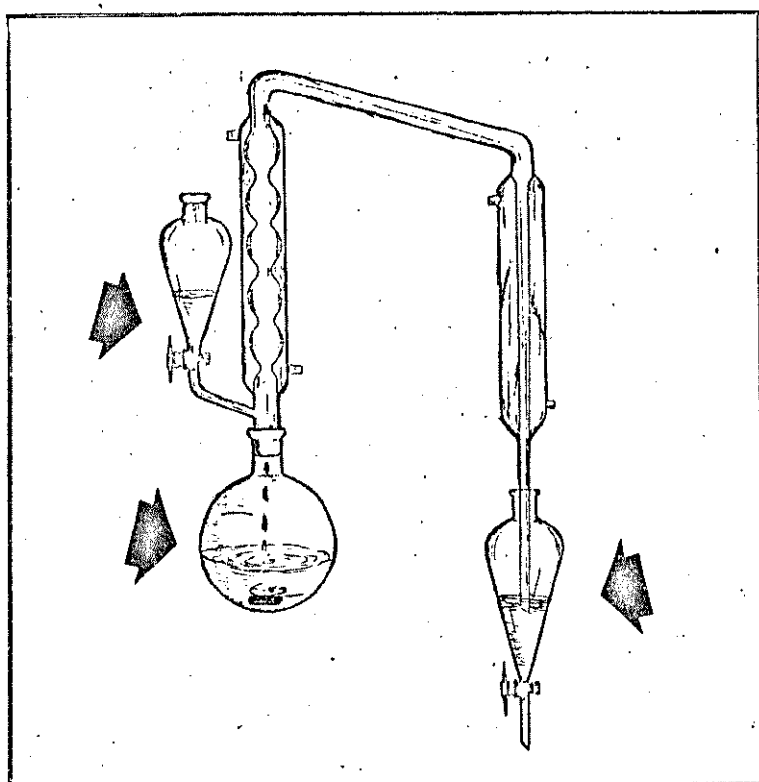


Tabela 7.2 - Recuperação Analítica para Acetochlor em Solo Arenoso.

Massa amostra (g)	Acetochlor adicionado (ppm)	volume final (ml)	volume injetado (µl)	MEA encontrado (ppm)	% Recuperação
25	0,020	4,0	3,0	0,012	61,5
	0,020			0,014	71,0
	0,020			0,014	70,5
25	0,050	4,0	3,0	0,033	65,8
	0,050			0,027	54,0
	0,050			0,026	51,2
25	0,100	4,0	3,0	0,059	58,8
	0,100			0,053	52,8
	0,100			0,074	73,9
25	0,200	4,0	3,0	0,106	53,0
	0,200			0,142	71,0
	0,200			0,132	66,0

Outra etapa que necessitou de cuidado foi a neutralização da fase aquosa ácida em que foi recolhido o p.a. Esta também precisou ser realizada em banho de gelo e com adição lenta do NaOH 50%.

As outras etapas (Figura 6.2) não precisaram de cuidados especiais, somente atenção nas transferências quantitativas até se obter o extrato em hexano para injeção no cromatógrafo à gás.

A menor concentração adicionada ao solo, a qual o método global apresentou resposta confiável, ou seja recuperação $> 50\%$, foi de 0,02 ppm, que foi chamado o "Limite de Detecção do Método Analítico". Este valor é diferente do limite de detecção do método cromatográfico, que seria o dobro do ruído do aparelho e, como pode ser visto na Figura 7.1, foi bem menor que o limite de detecção do método global.

O método que foi desenvolvido para Alachlor (Figura 6.6) foi aplicado ao herbicida Acetochlor, para as análises de recuperação analítica e foi usado o mesmo solo testemunha. Adicionando-se Acetochlor nas concentrações de 0,02, 0,05, 0,10 e 0,20 ppm e realizando-se as etapas de extração, evaporação, hidrólise ácida e básica e reextração obtendo-se os resultados apresentados na Tabela 7.2, os quais mostram que o método também é efetivo para Acetochlor, apresentando recuperação analítica $> 50\%$

7.3 - Influência da Preparação da Amostra.

Observou-se através dos resultados a destacada importância na prévia homogeneização das amostras de solo a serem analisadas.

Primeiramente usou-se amostras homogeneizadas em almofariz, pois as amostras de solo arenoso procedente de Pernambuco, o primeiro local analisado, apresentava torrões de solo que deviam ser triturados.

As amostras de solo assim preparadas não apresentaram repetibilidade nos resultados em duplicatas (Tabela 7.3), apesar de se estar seguindo a metodologia analítica desenvolvida e testada (Seção 7.2).

Desvios nos resultados também foram observados com a amostra testemunha do mesmo local, com a qual se faz análise de recuperação e limite de detecção do método analítico, adicionando-se padrão do p.a. (Tabela 7.4).

Na tentativa de resolver o problema surgido, reviu-se todo o desenvolvimento analítico, já que os resultados eram satisfatórios com o solo do desenvolvimento. Notou-se que a única diferença entre o procedimento no desenvolvimento da análise e a própria análise estava nas características físicas das amostras. A amostra de solo em que o método foi desenvolvido apresentava-se como um pó fino e as amostras de solo (procedente de Pernambuco), apesar de terem sido homogeneizadas com almofariz, ainda apresentavam uma granulometria não homogênea.

Sendo assim, apesar de se estar pesando amostras do mesmo frasco, talvez estivéssemos pegando porções de solo que o herbicida tenha se acumulado mais, por se tratar de partículas menores de solo com maior área superficial para ocorrer adsorção.

Este problema foi resolvido fazendo-se a homogeneização de cada amostra em moinho de martelo para solo, com uma peneira fina acoplada.

Tabela 7.3 - Resíduo de Acetochlor encontrado em duas profundidades do solo arenoso. Amostras homogeneizadas com almofariz.

Dias após aplicação	Doses Aplicadas (kg/ha)	Acetochlor encontrado em ppm	
		(0-15 cm)	(15-30 cm)
antes	5,28	$\leq 0,02$	$\leq 0,02$
	10,56	$\leq 0,02$	$\leq 0,02$
1	5,28	$6,6 \pm 0,3$	$2,23 \pm 0,32$
	10,56	$16,7 \pm 1,4$	$2,1 \pm 0,2$
35	5,28	$2,2 \pm 4,1$	$0,1 \pm 0,2$
	10,56	$1,3 \pm 0,4$	$0,5 \pm 0,2$
61	5,28	$0,17 \pm 0,08$	$0,07 \pm 0,02$
	10,56	$0,2 \pm 0,5$	$0,11 \pm 0,03$
103	5,28	$0,11 \pm 0,02$	$0,07 \pm 0,02$
	10,56	$0,31 \pm 0,01$	$0,28 \pm 0,05$
180	5,28	$0,02 \pm 0,01$	$0,01 \pm 0,00$
	10,56	$0,07 \pm 0,02$	$0,03 \pm 0,01$
365	5,28	$\leq 0,02$	$\leq 0,02$
	10,56	$\leq 0,02$	$\leq 0,02$

Tabela 7.4 - Recuperação analítica de Acetochlor em solo arenoso.
Amostra homogeneizada com almofariz.

Peso da amostra	Número de repetições	ppm encontrado (média)	ppm adicionado	% Recuperação (média)
25	11	0,015	0,020	75,0 \pm 31,9
25	9	0,032	0,050	64,0 \pm 7,9
25	6	0,061	0,100	61,0 \pm 9,9
25	9	0,136	0,200	68,0 \pm 12,1

7.4 - Resultados Quantitativos dos Testes em Campo.

O método testado foi aplicado para determinações de resíduos de Acetochlor em dois solos diferentes, arenoso e argiloso, usados no experimento de campo.

Com o uso de moinho, os resultados encontrados melhoram consideravelmente em termos de repetibilidade e desvio padrão como pode se observar nas Tabelas 7.5, 7.6 e 7.7.

Ainda são evidentes alguns desvios que podem ser relacionados aos testes em campo, sendo que no campo existem muitas variações incontrolláveis, mesmo no momento da aplicação do herbicida. Esta foi feita através de aplicador costal, isto é, por aplicação manual e, se a pessoa que faz a aplicação se cansar e andar mais lentamente, este espaço do solo receberá maior quantidade de herbicida.

Sobre o desvio observado na recuperação analítica usando amostra testemunha, não se aplica o mesmo raciocínio. Uma explicação seria pela granulometria irregular. Onde existem partículas menores teríamos maior área de adsorção associado ao fato de que o herbicida pode formar ligações e até polímeros naturais com o solo e seus constituintes [42]. Quando isto ocorre, implica em baixa recuperação, pois o solvente não extrai o resíduo do herbicida adsorvido irreversivelmente.

Tabela 7.5 - Resíduo de Acetochlor encontrado em duas profundidades de solo argiloso. Amostras homogeneizadas com moinho de solos.

Dias após aplicação	Doses aplicadas (kg/ha)	Acetochlor encontrado em ppm*	
		(0-15 cm)	(15-30 cm)
antes	-	<0,02	<0,02
	-	<0,02	<0,02
1	4,32	0,90 ± 0,06	0,19 ± 0,02
	8,64	2,70 ± 0,08	0,70 ± 0,06
30	4,32	0,37 ± 0,06	0,04 ± 0,00
	8,64	1,11 ± 0,07	0,08 ± 0,00
64	4,32	0,12 ± 0,02	0,03 ± 0,01
	8,64	0,25 ± 0,01	0,07 ± 0,00
91	4,32	0,04 ± 0,00	<0,02
	8,64	0,17 ± 0,02	0,05 ± 0,00
175	4,32	0,02 ± 0,00	<0,02
	8,64	0,04 ± 0,00	0,03 ± 0,01
365	4,32	0,02 ± 0,00	<0,02
	8,64	<0,02	<0,02

*ppm corrigido, com a média da recuperação analítica (64,2%).

Tabela 7.6 - Resíduo de Acetochlor encontrado em duas profundidade de solo arenoso. Amostras homogeneizadas com moinho de solo.

Dias após aplicação	Doses aplicadas (kg/ha)	Acetochlor encontrado em ppm*	
		(0-15 cm)	(15-30 cm)
antes	-	<0,02	<0,02
	-	<0,02	<0,02
1	5,28	9,80 ± 0,04	1,47 ± 0,01
	10,56	16,83 ± 0,01	2,48 ± 0,06
	5,28	0,68 ± 0,01	0,14 ± 0,01
35	10,56	1,18 ± 0,01	0,39 ± 0,05
	5,28	0,35 ± 0,03	0,07 ± 0,00
61	10,56	0,37 ± 0,04	0,20 ± 0,00
	5,28	0,06 ± 0,00	0,06 ± 0,00
103	10,56	0,23 ± 0,01	0,14 ± 0,00
	5,28	<0,02	<0,02
180	10,56	0,04 ± 0,00	<0,02
	5,28	<0,02	<0,02
365	10,56	<0,02	<0,02

*ppm corrigido, com a média da recuperação analítica (64,2%).

Tabela 7.7 - Recuperação analítica de Acetochlor em solos arenoso e argiloso. Amostras homogeneizadas com moinho de martelo para solo.

Tipo de solo	Número de repetições	ppm encontrado (média)	ppm adicionado	% Recuperação (média)
argiloso	5	0,0149	0,020	74,5 ± 3,4
	4	0,0293	0,050	58,6 ± 5,8
	3	0,0579	0,100	57,9 ± 11,2
	3	0,1210	0,200	60,5 ± 7,2
arenoso	10	0,0145	0,020	72,5 ± 8,0
	5	0,0297	0,050	59,4 ± 6,6
	7	0,0664	0,100	66,4 ± 11,3
	6	0,1295	0,200	64,7 ± 7,6

Média Geral: 64,2%

7.5 - Análise de Lixiviação do Herbicida.

Os dados das Tabelas 7.5 e 7.6 foram colocados em gráficos de concentração em ppm versus tempo em dias após aplicação, para amostras coletadas de 0-15 cm e de 15-30 cm de profundidade para os dois tipos de solo (Figuras 7.4 e 7.5).

Concluiu-se para os dois tipos de solo, tanto argiloso como arenoso, que não houve lixiviação, pois as curvas decaíram similarmente mostrando que o herbicida que inicialmente estava na camada superior não foi levado para camada inferior. Se a lixiviação tivesse ocorrido, deveria ser observado um decréscimo nos valores da profundidade 0-15 cm e um aumento correspondente a profundidade 15-30 cm. A quantidade de herbicida encontrada na profundidade de 15-30cm deve resultar diretamente da aplicação.

7.6 - Análise da Dissipação e Adsorção do Herbicida.

Os dados das Tabelas 7.5 e 7.6, apresentados graficamente em concentração versus tempo para a profundidade 0-15 cm, para as duas aplicações e nos dois tipos de solo (Figura 7.6 e 7.7) mostram um decaimento rápido para o solo arenoso, comparado com um decréscimo mais lento para o solo argiloso, significando maior permanência neste solo. Isto era esperado, uma vez que os herbicidas fazem ligações com matéria orgânica e com argila do solo, como indicado literatura [21, 24]. Conclui-se que o solo arenoso funciona como inerte, enquanto que maiores interações ocorrem no solo com um alto teor de matéria orgânica.

Figura 7.4 - Resíduo de Acetochlor encontrado versus tempo, para solo argiloso na dose x para as duas profundidades. (Amostras homogeneizadas com moinho de solo).

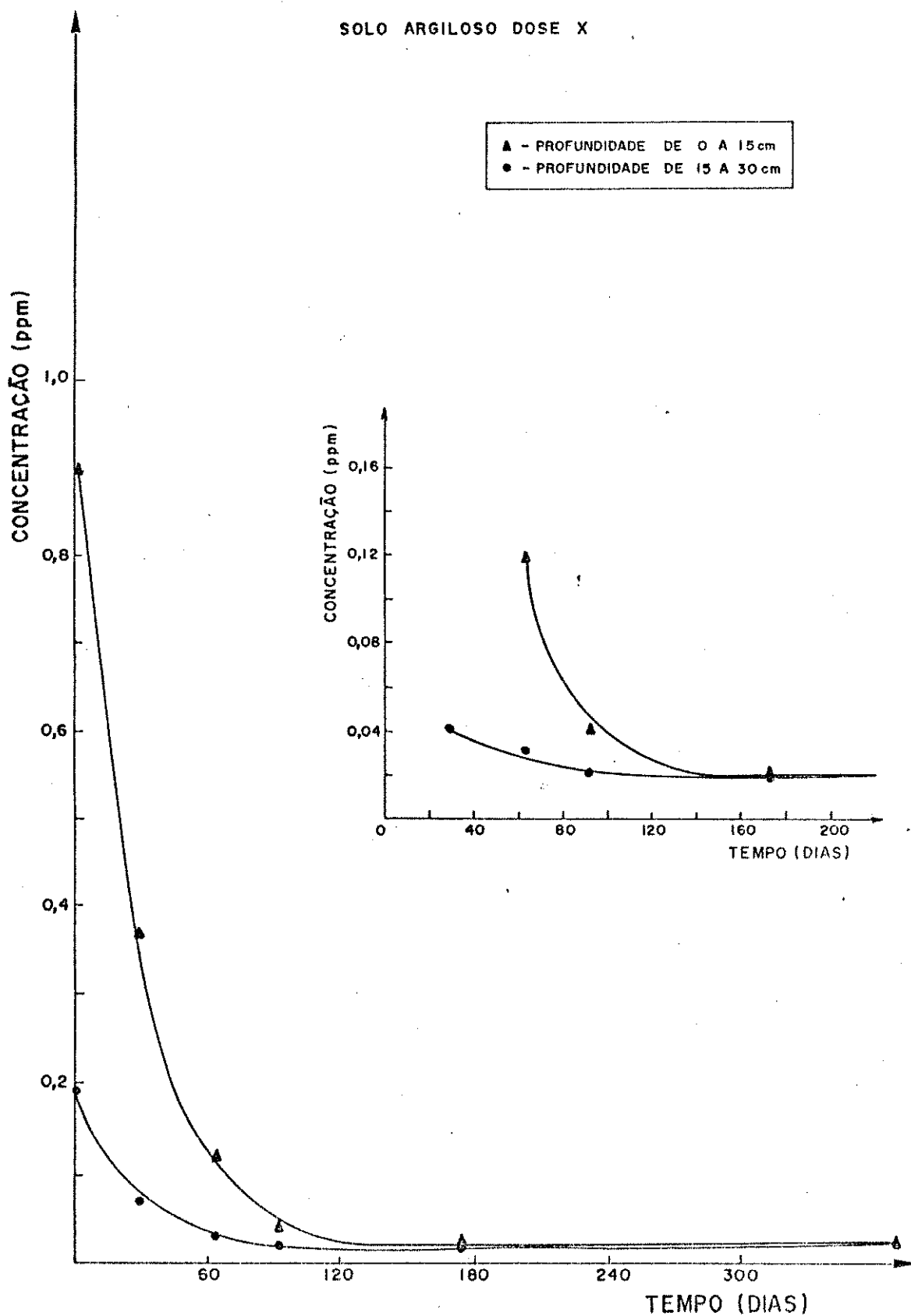


Figura 7.5 - Resíduo de Acetochlor encontrado versus tempo, para solo arenoso na dose x para as duas profundidades.
(Amostras homogeneizadas com moinho de solo).

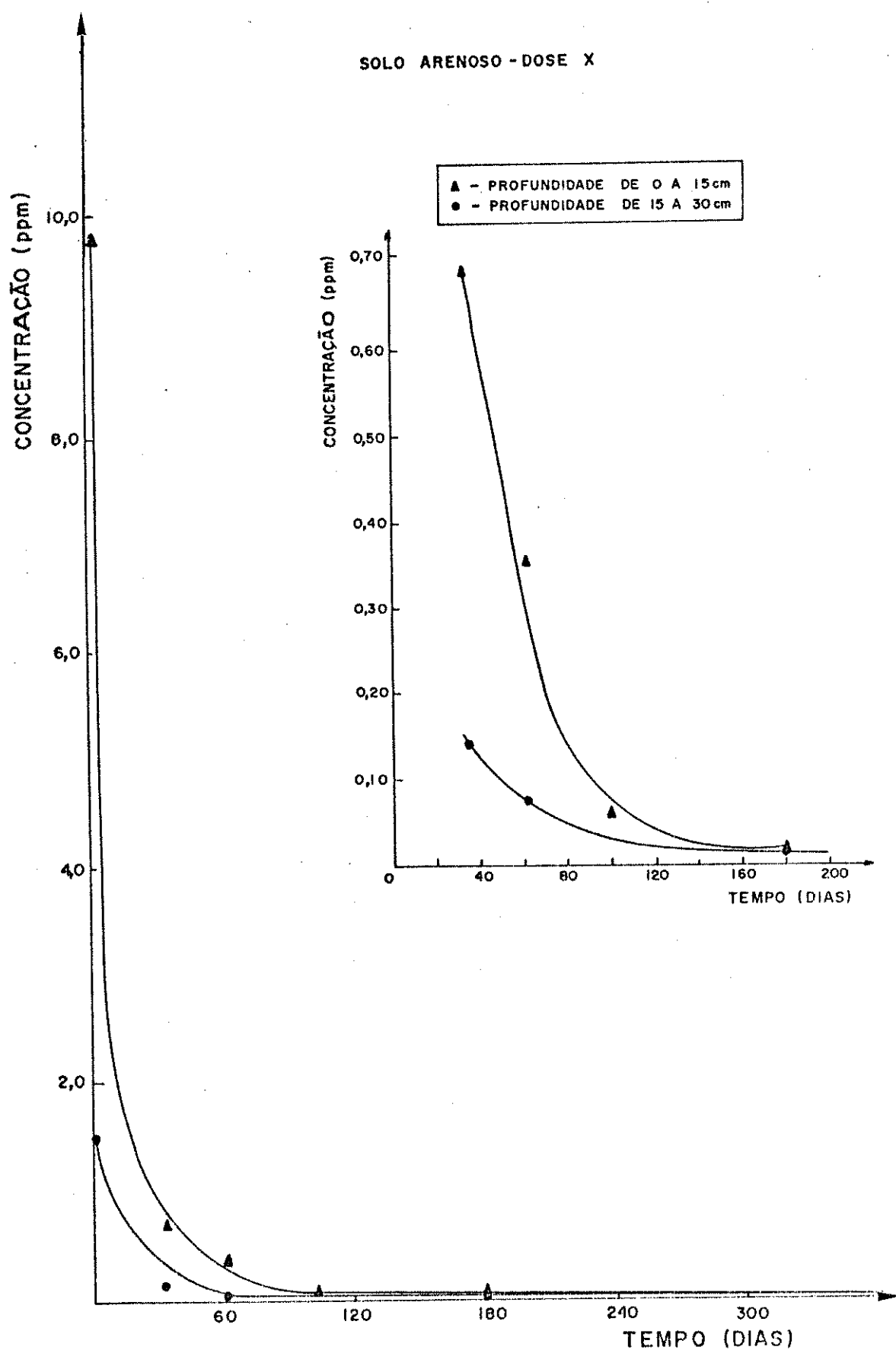


Figura 7.6 - Resíduo de Acetochlor encontrado versus tempo, para solo argiloso na profundidade de 0 a 15 cm para as duas doses de aplicação.

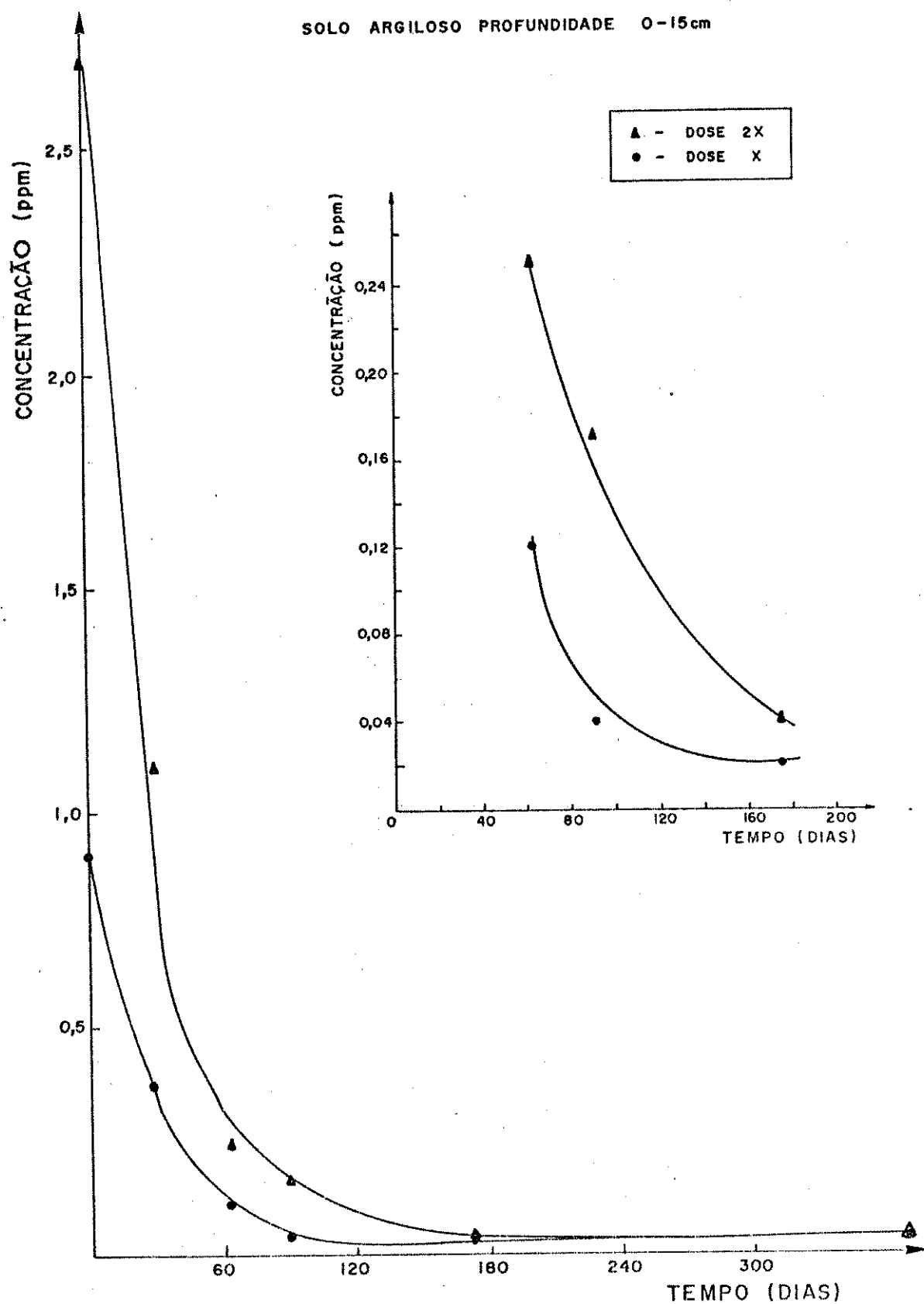
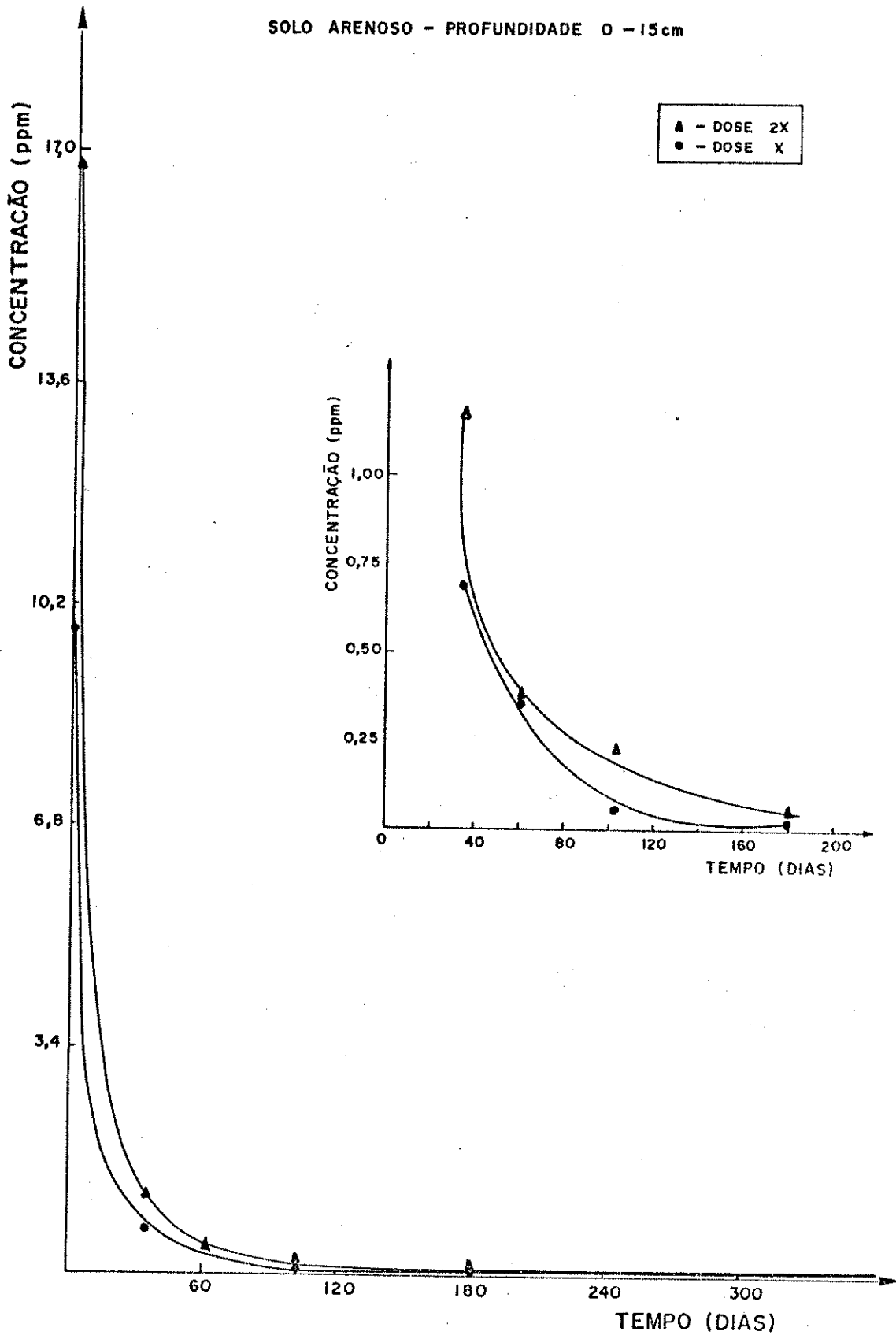


Figura 7.7 - Resíduo de Acetochlor encontrado versus tempo, para solo arenoso na profundidade de 0 a 15 cm para as duas doses de aplicação.



7.7 - Efeito da Concentração do Herbicida Aplicado.

As Figuras 7.6 e 7.7 também comparam nos dois tipos de solo, o resíduo encontrado em ppm versus tempo para a aplicação x e 2x na profundidade de 0-15 cm nos dois tipos de solo.

Conclui-se que, para o Acetochlor, o dobro do herbicida aplicado acarretará no dobro de resíduo a ser encontrado para os dois tipos de solo.

Quanto ao decréscimo, para o solo arenoso é paralelo com as duas doses, fato esperado sendo que o solo não deve ter interações significativas com qualquer concentração do herbicida aplicado. Por outro lado, o solo argiloso mostrou mais adsorção a aplicação do dobro da dose, acarretando no dobro de resíduo. Isto indica que os sítios ativos do solo que efetuaram a interação não foram saturados pela maior quantidade de herbicida aplicado.

7.8 - A Meia-vida do Herbicida no Solo, Aplicando a Cinética de Primeira Ordem.

Como a maioria dos estudos de degradação de pesticida sugerem que o decréscimo segue a cinética de primeira ordem [21, 22, 24, 35], a mesma foi aplicada nos dados obtidos.

Na Tabela 7.8, estão apresentados o \ln da razão de concentração encontrada sobre a concentração inicial, para cada tempo (dias após aplicação), nos dois tipos de solo e nas duas profundidades. As Figuras 7.8 e 7.9 mostram graficamente as curvas obtidas destes dados para solo argiloso e arenoso, respectivamente.

Tabela 7.8 - Sumário de dados usados no cálculo de cinética de primeira ordem.

Tipo de Solo	Dias após aplicação	Média da concentração de residuo de Acetochlor (ppm)				ln C/Co			
		0 - 15 cm		15 - 30 cm		0 - 15 cm		15 - 30 cm	
		dose x	dose 2x	dose x	dose 2x	dose x	dose 2x	dose x	dose 2x
argiloso	1	0,90	2,70	0,19	0,70	0	0	0	0
	30	0,37	1,11	0,04	0,08	-0,87	-0,89	-1,53	-2,23
	64	0,12	0,25	0,03	0,07	-2,03	-2,40	-1,99	-2,32
	91	0,04	0,17	<0,02	0,05	-3,16	-2,79	-2,25	-2,60
	175	0,02	0,04	<0,02	0,03	-3,36	-4,21	-	-3,30
	365	0,02	<0,02	<0,02	<0,02	-3,75	-	-	-
arenoso	1	9,80	16,83	1,47	2,48	0	0	0	0
	35	0,68	1,18	0,14	0,39	-2,67	-2,66	-2,35	-1,85
	61	0,35	0,37	0,07	0,20	-3,33	-3,82	-3,04	2,52
	103	0,06	0,23	0,06	0,14	-5,10	-4,29	-3,20	-2,87
	180	<0,02	0,04	<0,02	<0,02	-	-6,04	-4,30	-4,82
	365	<0,02	<0,02	<0,02	<0,02	-	-	-	-

te, onde se pode observar uma diferença no decaimento para os dois tipos de solo.

Analisando os conjuntos de pontos para solo argiloso (Figura 7.8) vê-se que os quatro primeiros pontos de cada série de dados sugerem linhas retas. Existe também a tendência das quatro retas serem paralelas ou seja com a mesmo "k", à constante de dissipação que é usada para o cálculo de meia-vida $t_{1/2}$, para a cinética de primeira ordem. É óbvio que os pontos referentes a 175 e 365 dias, que estão no limite de detecção, não fazem parte do decaimento de primeira ordem.

Analisando o conjunto de pontos da Figura 7.9, para o solo arenoso, não se consegue traçar uma reta usando os 4 primeiros pontos, sendo que o 1º ponto fica bem acima dos outros três, que por sua vez, são pouco alinhados, sugerindo não seguir uma cinética de primeira ordem. É possível que existam duas reações de primeira ordem uma ocorrendo rapidamente, implicado pela grande inclinação, e outra moderadamente com menor inclinação.

Esta análise visual é confirmada pelos resultados mostrados na Tabela 7.9 de regressões lineares aplicadas para 6, 5, 4 e 3 pontos, contados a partir do 1º dia de aplicação. Nota-se que a correlação linear é baixa quando se usa todos os pontos e melhora quando se usa os 4 primeiros pontos, principalmente para solo argiloso, confirmando que este solo segue uma cinética de primeira ordem neste período de tempo. É razoável desprezarmos os últimos pontos devido a baixa concentração, perto do limite de detecção.

Figura 7.8 - Valores de $\ln C/Co$ versus tempo para solo argiloso para as duas profundidades e duas doses de aplicação.

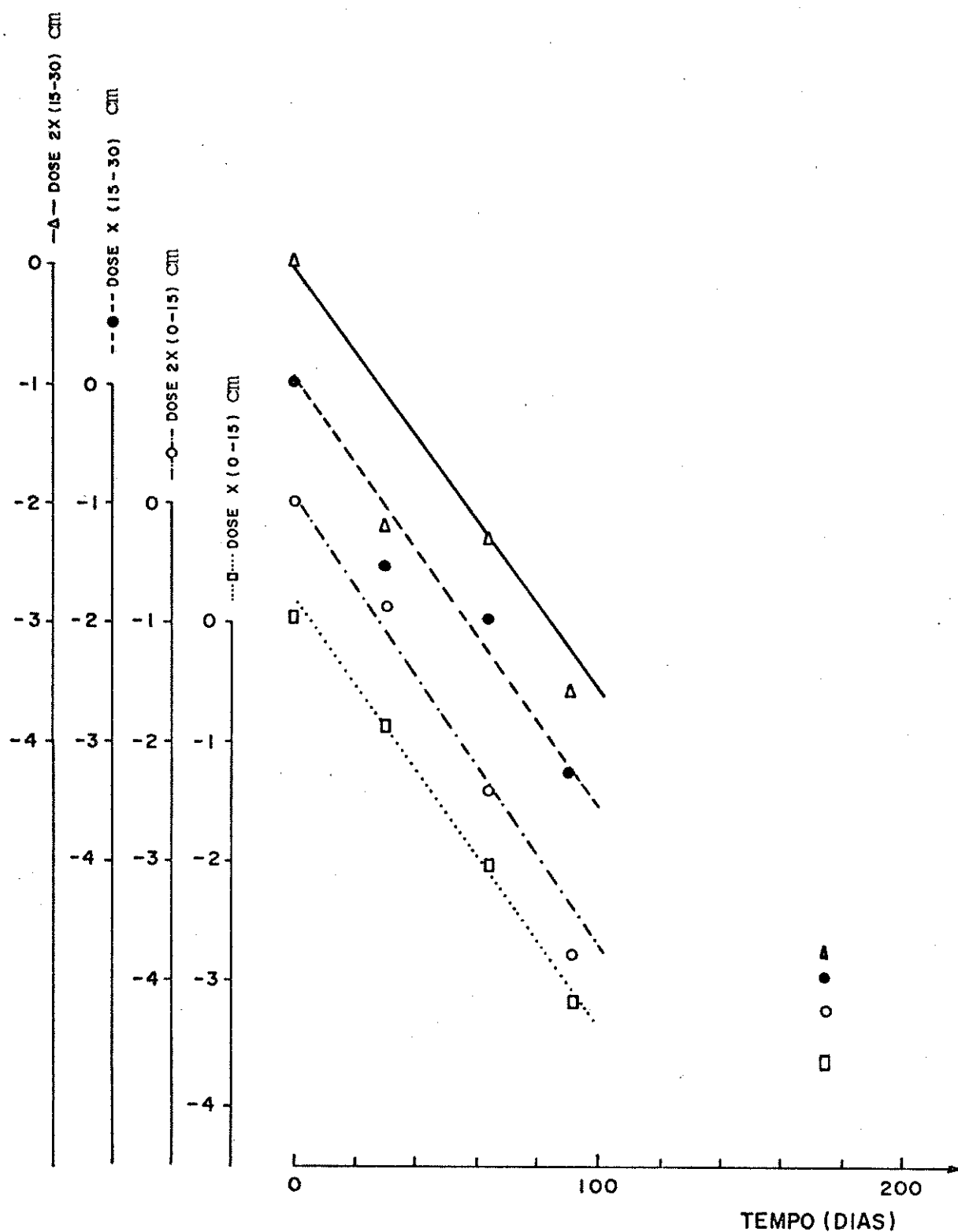


Figura 7.9 - Valores de $\ln C/C_0$ versus tempo para solo arenoso para as duas profundidades e duas doses de aplicação.

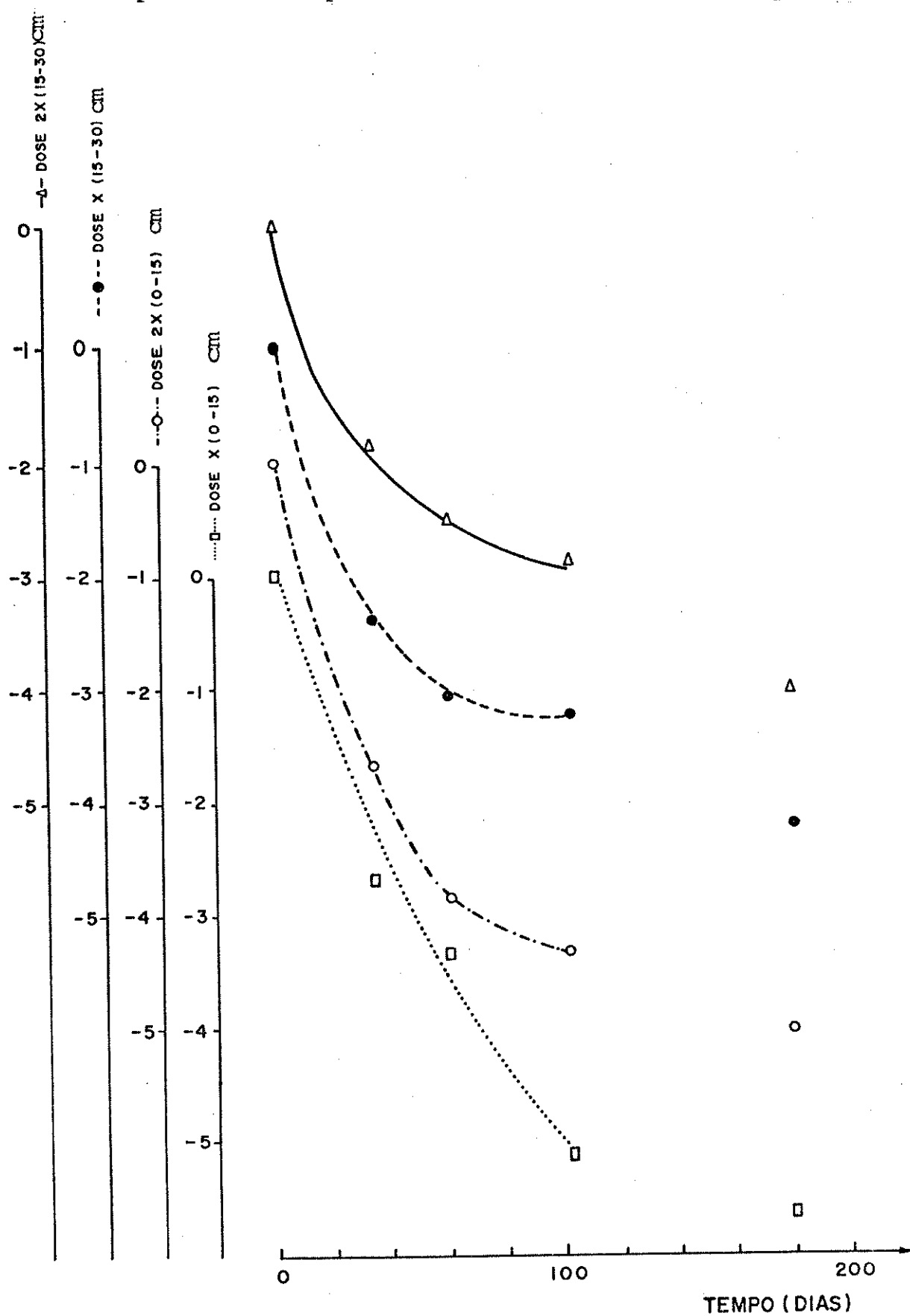


Tabela 7.9 - Valores de coeficientes de correlação linear para cinética de primeira ordem.

Tipo de Solo	Dose Aplicada	Profundidade (cm)	Constantes	Pontos usados para cálculos					
				(tirando os últimos pontos)		(tirando o 1º e o último)			
				6	5	4	3	4	3
Argiloso	X	0-15	r	0,7925	0,9355	0,9976	0,9990	-	-
			a	-0,0092	0,0214	-0,0349	-0,0322	-	-
			b	-1,1303	-0,3977	-0,109	-0,0543	-	-
	2X	0-15	r	-	0,9722	0,9865	0,9948	-	-
			a	-	-0,0239	-0,0327	0,0383	-	-
			b	-	-0,3363	-0,0007	-0,1147	-	-
	X	15-30	r	-	-	0,9247	0,9397	-	-
			a	-	-	0,0237	-0,0310	-	-
			b	-	-	0,3404	-0,1900	-	-
	2X	15-30	r	0,7500	0,8273	0,8425	0,8796	-	-
			a	-0,0071	-0,0154	-0,0258	-0,0360	-	-
			b	-1,4780	-0,9809	-0,5880	-0,3797	-	-
Arenoso	X	0-15	r	-	-	0,9771	0,9967	-	0,9908
			a	-	-	0,0479	0,0566	-	-0,0364
			b	-	-	0,3485	-0,1682	-	-1,2751
	2X	0-15	r	0,8559	0,9346	0,9257	0,9730	0,9837	0,9306
			a	-0,0156	-0,0303	-0,0413	-0,0643	-0,0218	-0,0228
			b	-1,9771	-1,0592	-0,6254	-0,0778	-2,1381	-2,0812
	X	15-30	r	-	0,8856	0,8791	0,9507	0,9770	0,8867
			a	-	-0,0203	-0,0302	-0,0516	-0,0125	-0,0117
			b	-	-1,0181	-0,6375	-0,2387	-2,0431	-2,0812
	2X	15-30	r	-	0,9659	0,9212	0,9825	0,9856	0,9510
			a	-	-0,0244	-0,0274	-0,0426	-0,0198	-0,0144
			b	-	-0,5589	-0,4414	-0,0786	-1,1351	-1,4602

A diferença notada para o decaimento nos dois tipos de solo era esperado e, foi concordante com a teoria, pois no solo argiloso a concentração de matéria orgânica é maior, e ocorre maior adsorção ocasionando um desaparecimento mais lento do herbicida e uma permanência maior do que no solo arenoso, que funciona como inerte.

As meias-vidas calculadas usando a cinética de primeira ordem para os vários conjuntos de dados estão na Tabela 7.10. Observamos que os valores das meias-vidas são bem diferentes, dependendo do número dos pontos usados nos cálculos.

Considerando-se os valores de coeficiente de correlação linear (Tabela 7.9) e comparando os valores para as doses x e $2x$, sugerimos que os valores de meias-vidas obtidos com os primeiros pontos são os mais razoáveis.

Concluimos que a meia-vida para solo argiloso é de aproximadamente 21 dias e para arenoso ao redor de 15 dias.

A meia-vida para solo arenoso se tornou mais difícil de ser calculada do que para o solo argiloso, pela falta de linearidade. Uma possível explicação para esta falta de linearidade seria o fato das amostras serem de solo em condições reais de campo, sujeito a chuva, sol, vento, microfauna e microflora durante o período de teste. Outra estaria relacionada ao planejamento do experimento, pois entre a primeira amostragem e a segunda existem 30 dias e nesse intervalo de tempo não se pode saber como foi o decaimento. Portanto, para se traçar uma curva melhor, precisaria-se de um maior número de pontos neste primeiro intervalo de 30 dias, implicando num replanejamento do experimento em campo.

Tabela 7.10 - Meia-vidas (dias) calculadas por regressão linear para a cinética de primeira ordem.

Tipo de Solo	Dose aplicada	Profundidade (cm)	Pontos usados para cálculos					
			tirando os últimos				tirando o 1º e último	
			(6)	(5)	(4)	(3)	(5)	(5)
argiloso	X	(0-15)	75	32	20	22	-	-
	2X	(0-15)	-	29	21	18	-	-
	X	(15-30)	-	-	29	22	-	-
	2X	(15-30)	98	45	27	19	-	-
arenoso	X	(0-15)	-	-	14	12	-	19
	2X	(0-15)	44	23	17	11	32	30
	X	(15-30)	-	34	23	13	56	59
	2X	(15-30)	-	28	25	16	35	48

7.9 - A Meia-vida Aplicando Outras Funções Matemáticas.

Na tentativa de melhor representar os pontos obtidos (Figura 7.6 e 7.7) foram testadas para os dados das Tabelas 7.5 e 7.6, várias funções matemáticas, através de um programa de micro-computador o qual fornece cinco tipos de ajuste. As funções foram: linear ($y=ax+b$); exponencial ($x=a.e^{bx}$); logarítmica ($y=a+b\ln x$) e potencial ($y=ax^b$) sempre com x = tempo e y = concentração.

Os valores de a e b , bem como as respectivas correlações lineares estão na Tabela 7.11. Notamos que a função que mostrou melhor correlação, isto é a função que melhor descreveu a linha que passa pelos pontos, foi a logarítmica. A meia-vida calculada por esta função foi de ~ 13 dias para solo argiloso e ~ 9 dias para arenoso.

Na Tabela 7.12 comparamos as meias-vidas obtidas nos solos aplicando a cinética de primeira ordem e o tratamento logarítmico.

Os valores do cálculo de primeira ordem que mais se aproximam do cálculo logarítmico são aqueles em que se usa quatro pontos. Podemos, então, considerar que a meia-vida do herbicida Acetochlor em solo arenoso e argiloso, em condições climáticas tropicais, é de ~ 21 dias e ~ 15 dias, respectivamente.

Estes valores poderiam ser comparados com o valor de ~ 17 dias indicado para o Acetochlor em clima temperado. Este estudo em clima temperado foi realizado pela Monsanto e não indica nem o tipo de solo, nem as atuais condições climáticas durante o teste.

Tabela 7.11a Parâmetros matemáticos das funções testadas com dados de concentração em ppm (y) versus tempo em dias (x) de amostras coletadas na profundidade de 0-15cm (usando-se 5 pontos).

Tipo de Solo	Dose Aplicada	Constantes	Cinética 1a. ordem $\ln C/Co=-Kt$	Linear $y=ax+b$	Exponencial $y=a.e^{bx}$	Logarítmica $y=a+b\ln x$	Potência $y=ax^b$
Argiloso	X	r	0,9355	0,6245	0,8752	0,9752	0,7925
		a	-0,0214	0,6027	0,6015	0,9044	1,2937
		b	0,3977	-0,0043	-0,1784	-0,1784	-0,6710
	2X	r	0,9722	0,6149	0,9438	0,9743	0,7856
		a	-0,0239	1,7986	1,9503	2,7241	4,1347
		b	0,3363	-0,0149	-0,0240	-0,5431	-0,7156
Arenoso	X	r	0,9445	0,4215	0,8920	0,9427	0,8538
		a	-0,0326	5,2297	3,6845	9,2589	16,1582
		b	-0,9783	-0,0401	-0,0364	-2,0233	-1,1709
	2X	r	0,9346	0,4152	0,8734	0,9397	0,9204
		a	-0,0303	8,9324	5,8368	15,8780	22,8940
		b	1,0591	-0,0684	-0,0303	-3,4721	-1,0489

Tabela 7.11b - Parâmetros matemáticos das funções testadas com dados de concentração em ppm (y) versus tempo em dias (x) de amostras coletadas na profundidade de 0-15 cm (usando-se 4 pontos).

Tipo de Solo	Dose Aplicada	Constantes	Cinética 1a. ordem $\ln C/Co=-Kt$	Linear $y=ax+b$	Exponencial $y=a.e^{bx}$	Logarítmica $y=a+b\ln(x)$	Potência $y=a.x^b$
Argiloso	X	r	0,9776	0,8916	0,9963	0,9787	0,7567
		a	-0,0349	0,7912	0,9890	0,9186	1,1171
		b	0,1088	-0,0093	-0,0344	-0,1859	-0,5701
	2X	r	0,9865	0,8713	0,9730	0,9747	0,8080
		a	-0,0327	2,3556	2,6969	2,7529	3,2568
		b	0,0007	-0,0279	-0,0324	-0,5618	0,5620
Arenoso	X	r	0,9771	0,6278	0,9548	0,9752	0,9088
		a	-0,0479	7,0725	6,7435	9,5654	11,7509
		b	-0,3744	-0,0869	-0,0480	-2,2252	-0,9611
	2X	r	0,9257	0,6196	0,8569	0,9731	0,9730
		a	-0,0413	12,0869	9,0056	16,4125	18,3719
		b	-0,6254	-0,1487	-0,0413	-3,8241	-0,9037

Tabela 7.12 - Comparação entre as meias-vidas calculadas pela cinética de 1ª ordem e função logarítmica. (profundidade de 0-15 cm)

Tipo de Solo	Dose aplicada	Meia-Vida (dias)			
		cinética 1ª ordem		logarítmica	
		5 pts	4 ptos	5 ptos	4 ptos
argiloso	X	32	20	13	12
	2X	29	21	13	12
arenoso	X	-	14	9	8
	2X	23	17	9	8

Os resultados de nosso estudo indicam que ambos os fatores são importantes.

7.10 - Comentários Finais.

Neste trabalho foi mostrado que a meia-vida é diferente em diferentes climas e em diferentes solos e condições climáticas, não sendo, então, possível prever a meia-vida para um dado solo, numa dada região usando valores obtidos com um outro conjunto de variáveis, que descreve outra região.

Existe a necessidade de um protocolo brasileiro para estudos de dissipação de pesticida em campo, pois muitas informações têm-se sobre os resíduos em alimentos e poucos dados sobre o meio-ambiente. Quando, no futuro, for exigido dados de dissipação para registros dos pesticidas é necessário que, as indústrias interessadas tenham condições de montar experimentos que gerem dados reais de campo.

Com o presente trabalho de tese espero contribuir com uma pequenina parcela para a elaboração desse protocolo de estudos futuros em campo.

1. Na primeira etapa, existe a necessidade do desenvolvimento de uma metodologia para extrair o pesticida e seus metabólitos, usando solo testemunha, levando-o até sua quantificação, preferencialmente usando o composto radio-marcado. É recomendável a quantificação por cromatografia gasosa acoplada a um detector específico e identificação

dos metabólitos por CG/EM ou outra técnica similar, sensível a nível de ppb.

2. Depois, ou paralelamente, deve ser realizado um experimento com composto radiomarcado usando tubos de PVC, simulando condições de campo, fora do laboratório ou em estufa de crescimento. É recomendável amostragem inicialmente de 5 em 5 dias, depois aumentando este intervalo, mas com as condições controladas para o estudo do seu metabolismo, mobilidade e uma avaliação aproximada de sua meia-vida.
3. Levando em conta os dados já obtidos, os experimentos em campo deveriam ser planejados usando regiões típicas de cultura e solo onde o pesticida normalmente seria usado na formulação comercial. No decorrer do experimento, deveriam ser obtidas amostras representativas em tempos que foram programados através dos testes em tubo de PVC, apropriados a estimativa da meia-vida.
4. As amostras coletadas no campo devem ser representativas e tiradas com os devidos cuidados para análise de resíduo de pesticida, pois qualquer contaminação neste ponto implicará em perda total do trabalho de análise do laboratório. Logo após a coleta as amostras devem ser acondicionadas e mantidas em gelo seco para manter sua integridade até análise.

5. No laboratório, as amostras, se necessário, devem ser secas ao ar e devem ser homogeneizadas usando moinho de martelo ou similar, que permita uma granulometria pequena. Após homogeneizadas, devem ser realizadas as determinações pela metodologia desenvolvida.
6. Com os dados, aplicar os cálculos mais apropriados para obter a meia-vida mais próxima da realidade.

Com este estudo de metabolismo e dissipação de um pesticida, ele poderá ser classificado como ambientalmente aceitável ou não.

O pesticida compatível com o meio ambiente é aquele que seja "eficaz" contra as pragas mas, depois, seja metabolizado ou degradado pelos microorganismos do solo ou outro mecanismo, sem formar metabólitos tóxicos ou persistente. Portanto o pesticida tem que ter meia-vida suficiente para combater as pragas, nem muito curta, nem muito longa, para não interferir na utilização posterior do mesmo solo.

Acima de tudo, o resíduo de pesticida no solo e seus metabólitos não devem apresentar nenhum risco a vida humana ou animal, que indiretamente tenham contacto com ele através do lençol freático ou por alimentos que são colhidos diretamente do solo.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Lara, H.N. (coordenadora), "Relatório VII Encontro Nacional Analista de Resíduos de Pesticidas", Instituto Adolfo Lutz, São Paulo-SP., 1983, p. 2-3.
2. Hodges, L., "Environmental Pollution" 2a ed. Holt, Rinehart-land Winston, New York, 1977, p. 251-257.
3. Sanders, H.J., "Herbicides Special Report", Chem.Eng.News, Aug. 3, 1981, p.21.
4. Stellfeld, A.M. e outros, "Resíduos de Pesticida em Alimentos no Brasil", Coordenadoria de Assistência Técnica Integral (CATI), Campinas, 1981, p.3-6.
5. Kovacs, M.F., Residue Rev., 1983, 85, 7.
6. Yokomizo, Y., "Resíduos de Pesticidas em Alimentos", ITAL, Campinas, 1985, p. 220-222.
7. Chiba, M., Morley, H.V., J.Agric.Food Chem., 1968, 16, 916.
8. Lara, H.W. (coordenadora), "Manual de Análise de Resíduos de Pesticidas", Instituto Adolfo Lutz, São Paulo, 1982, p.2-5 e 24-26.
9. Sherma, J., "Manual of Analytical Quality Control for Pesticides and Related Compounds in Human and Environmental Samples. A Compendium of Systematic Procedures Designed to Assist in the Prevention and Control of Analytical Problems", EPA/600/1-76/017, NTIS, Springfield, 1976.
10. Ciola, R., "Introdução à Cromatografia a Gás", Edgard Blucher, São Paulo, 1985.

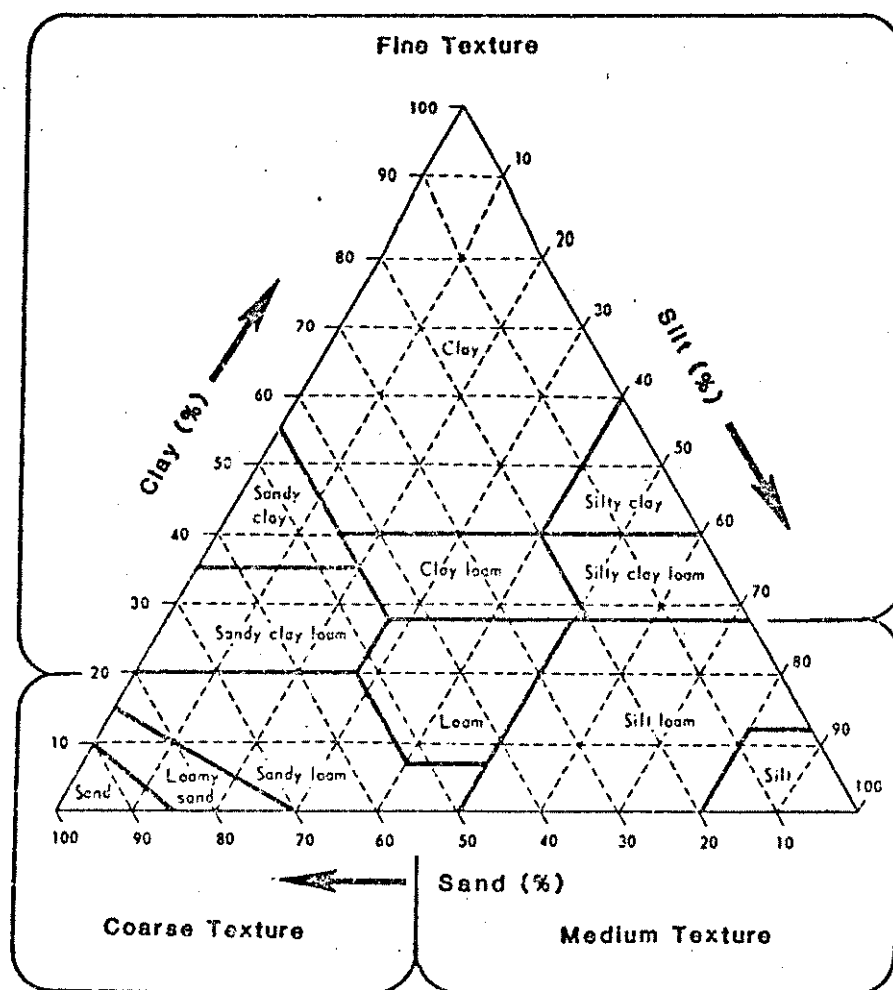
11. Hammarstrand, K., "Gas Chromatographic Analysis of Pesticidas", Varian Associates, Palo Alto, 1976.
12. Szepezy L., "Gas Chromatography" Iliffe Books, London, 1970.
13. Grob, R.L., "Modern Practice of Gas Chromatography", 2^a ed. John Wiley and Sons, New York, 1985.
14. Bache, C.A., Lisk, D.J., J. Assoc.Offic.Anal.Chem., 1969, 51, 1270.
15. Leoni, V., Pucceti, G., J. Chromatogr., 1969, 43, 388.
16. McNair, H.M., Bonelli, E.J., " Basic Gas Chromatography", 5^a ed., Varian Associates, Palo Alto, 1969.
17. Carrol, K.K., Nature, 1961, 191, 337.
18. Bartlet, J.C., Iverson, J.L, J. Assoc.Offic.Anal.Chem., 1966, 49, 21.
19. Brandt, A.E., Lands, W.E.M., Lipids, 1967, 3, 179.
20. Bevenue, A., Kelley, T.W., J. Chromatogr., 1971, 54, 71.
21. Yaron, B., Saltzman, S., Residue Rev., 1978, 69, 1.
22. Constenha, M.A., Moza, P., Scheunert, I., Haque, A., Klein, W., J. Agric.Food Chem., 1984, 32, 208.
23. Helene, C.G., Lord, K.A., Rüegg, E.F., "Persistência, Lixiviação e Volatilização de 14C-Aldrin em Dois Solos Brasileiros", Boletim Técnico, Instituto Biológico, São Paulo, 1980.
24. Yaron, B., Swoboda, A.R., Thomas, G.W., J. Agric.Food Chem., 1967, 15, 671.
25. Hamaker, J.W., Goring, C.A.I., Youngson, C.R., "Organic Pesticides in the Environment", American Chemical Society, Washington, 1965, p.23-27.

26. Musumeci, M.R., Lord, K.A., Rüegg, E.F. "Adsorção, Lixiviação e Persistência do Carbendazim em Solos Brasileiros", Boletim Técnico, Instituto Adolfo Lutz, São Paulo, 1980.
27. Swoboda, A.R., Thomas, G.W., J. Agric.Food Chem., 1968, 16, 923.
28. Carlo, C.P., Ashdown, D., Heller, V.G., Okla. Agr. Expt.Sta., Tech. Bull. T-42, 1952. (citado em 27).
29. Nicholson, H.P., Webb, H.J., Lawer, G.J., O'Brien, R.E., Grzenda, A.R., Shanblin, D.W., Trans Am.Fish.Soc., 1962, 91, 213. (citado em 27).
30. MacPhee, A.W., Chisholm, D., MacEachern, Can. J., Soil Sci., 1960, 40, 59.
31. Andrea, M.M., Lord, K.A., Bromilow R.H., Rüegg, E.F., "The Degradation of [14C] Parathion in Two Brazilian Soils", Boletim Técnico, Instituto Biológico, São Paulo, 1980.
32. Bartha, R., Lanzilotta, R.P., Pramer, D., Appl.Microbiol., 1967, 15, 67.
33. Getzin, L.W., Rosefield, L., J. Agric.Food Chem., 1968, 16, 598.
34. Lichtenstein, E.P., Residue Rev., 1980, 76, 152.
35. Konrad, J.G., Chesters, G., J. Agric. Food Chem., 1969, 17, 226.
36. Nicholls, P.H., Briggs, G.G., Evans, A.A., Weed Res., 1984, 24, 37.
37. Engelhardt, G., Oehlmann, L., Wagner K., Wallnofer, P.R., Wiedemann, M., J. Agric.Food Chem., 1984, 32, 102.

38. Sethunathan, N., MacRae, I.C., J. Agric. Food Chem., 1969, 17, 221.
39. Staiger, L.E. Quistad, G.B., J. Agric. Food Chem., 1983, 31, 599.
40. Luchini, L.C., Lord, K.A., Ruegg, E.F., "Sorção e Dessorção de Inseticidas em Solos Brasileiros", Boletim Técnico, Instituto Biológico, São Paulo, 1980.
41. Smith, A.E., Milward, L.J., J. Chromatogr., 1983, 43, 378.
42. Khan, S.U., Residue Rev., 1982, 84, 1.
43. Helling, C.S., Residue Rev., 1970, 32, 175.
44. Smith, A.E., J. Chromatogr., 1976, 129, 309.
45. Ammann, B.D., Call, D.I., Draayer, H.A., J. Assoc. Off. Anal. Chem., 1976, 59, 859.

APÊNDICE

Classificações de tipos de solo, definidas pela
Sociedade Americana de Ciência do Solo.



[Soil Sci Soc. Am. Proc. 1962, 26, 305]

clay = argiloso
sand = arenoso
silt = limo

coarse = grossa
medium = média
fine = fina